

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Morgana Doneda

**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS
PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÂNIONS EM
ÁGUA SEPARADA DE EMULSÕES DE PETRÓLEO**

Santa Maria, RS
2020

Morgana Doneda

**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÂNIONS EM ÁGUA SEPARADA
DE EMULSÕES DE PETRÓLEO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Doneda, Morgana

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS
PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÂNIONS EM ÁGUA
SEPARADA DE EMULSÕES DE PETRÓLEO / Morgana Doneda.- 2020.
183 p.; 30 cm

Orientador: Érico Marlon de Moraes Flores

Coorientadores: Paola de Azevedo Mello, Fábio Andrei
Duarte

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. Ácidos orgânicos 2. Cromatografia líquida 3. IC-MS
4. Água separada de emulsões de petróleo 5. Remoção de
Cloreto I. Marlon de Moraes Flores, Érico II. de Azevedo
Mello, Paola III. Andrei Duarte, Fábio IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MORGANA DONEDA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Morgana Doneda

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÂNIONS EM ÁGUA SEPARADA DE EMULSÕES DE PETRÓLEO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Aprovada em 31 de março de 2020

Érico Marlon de Moraes Flores, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Adilson Ben da Costa, Dr. (UNISC)

Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)

Márcia Foster Mesko, Dra. (UFPeI)

Rochele Sogari Picoloto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela bolsa de estudos concedida e à **PETROBRAS** pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação neste trabalho e, principalmente, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e incentivo durante toda trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Edson Irineu Müller**, pela colaboração e acompanhamento direto neste trabalho, pelas valiosas contribuições, apoio, amizade e convívio. Agradeço também pela participação e pelas valiosas contribuições como membro no exame de qualificação e banca examinadora deste trabalho.

Aos Profs. Drs. **Paola de Azevedo Mello** e **Fábio Andrei Duarte**, pela coorientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho, amizade e convívio.

Aos Profs. Drs. **Adilson Ben da Costa**, **Márcia Foster Mesko** e **Rochele Sogari Picoloto** pela participação na banca examinadora deste trabalho, pelas valiosas contribuições para o enriquecimento da tese, bem como pela amizade.

Aos Profs. Drs, **Cezar Augusto Bizzi**, **José Neri Gottfried Paniz**, **Juliano Smanioto Barin**, **Jussiane Souza da Silva**, **Rodrigo Cordeiro Bolzan** e **Valderi Luiz Dressler** pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial, à **Michele S. P. Enders** e, principalmente, à **Kéllen F. Anschau** pela colaboração direta com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Valéria**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Em especial, agradeço aos meus pais, **Nilo** e **Marta** pelo incentivo, suporte, compreensão e apoio incondicional nas minhas decisões. Agradeço, também, ao meu irmão **Alexandre** e a minha cunhada **Renata** que me inspiraram e apoiaram durante todos estes anos. Agradeço ao **Vagner** que esteve comigo em apoio incondicional no momento que eu mais precisava de ajuda.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÂNIONS EM ÁGUA SEPARADA DE EMULSÕES DE PETRÓLEO

AUTORA: Morgana Doneda

ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Devido à sua origem, as águas separadas de emulsões de petróleo do pré-sal possuem alta concentração salina (até 150 g L^{-1} de Cl^-), o que dificulta o desenvolvimento de metodologias analíticas, principalmente por meio da cromatografia líquida. Neste trabalho foi proposto o uso da cromatografia líquida, usando detectores de condutividade e de espectrometria de massas (MS), para a separação e posterior quantificação de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear e ânions, em águas separadas de emulsões de petróleo. Inicialmente foi feita a otimização da separação em coluna de troca iônica, e as melhores condições de separação encontradas foram utilizando gradiente de fase móvel de KOH (1 a 60 mmol L^{-1}), $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 50 min de corrida cromatográfica. Foi possível obter boa resolução na separação dos ácidos orgânicos C1 a C8 e os ânions F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} , com limites de quantificação (LOQs) variando de 10 a 50 e 100 a $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, para ânions e ácidos orgânicos, respectivamente. Porém, devido a sobreposição de sinais pela alta concentração de Cl^- , não foi possível quantificar ânions e ácidos orgânicos, simultaneamente, utilizando cromatografia de troca iônica, em amostras com concentração de Cl^- superior a 100 mg L^{-1} devido a necessidade de diluição da amostra e consequente aumento dos LOQs de maneira proporcional ao fator de diluição utilizado. Como alternativa, a separação dos ácidos orgânicos C1 a C10 foi avaliada em coluna de exclusão iônica, com fase móvel no modo isocrático de ácido heptafluorbutírico 1 mmol L^{-1} , $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e supressão química com regeneração externa de hidróxido de tetrabutylamônio $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi possível separar e quantificar os ácidos orgânicos C1, C2, C3, C4 e C5, com LOQs de $2,5$, 5 , 8 , 5 e 5 mg L^{-1} , respectivamente. Porém, foi necessária a diluição das amostras com concentração de Cl^- superiores a 5000 mg L^{-1} a fim de evitar interferências por sobreposição de sinal. Os ácidos fórmico e acético foram quantificados com concentrações variando de $2,5$ a 1680 mg L^{-1} e de 5 a 15310 mg L^{-1} , respectivamente. Para os ácidos C3, C4 e C5, devido ao alto fator de diluição e consequente aumento do LOQ, os valores encontrados para todas as amostras, foram menores que os LOQs, com exceção do ácido propiônico em uma amostra (352 mg L^{-1}). Para eliminar a necessidade de diluição das amostras, foi utilizada a cromatografia bidimensional, utilizando uma pré-coluna e coluna de exclusão iônica, na primeira e segunda dimensão, respectivamente, objetivando a separação do Cl^- da matriz na primeira dimensão. Foram necessários $3,8 \text{ min}$ na primeira dimensão para a eliminação da maior parte da matriz e possibilitar a quantificação dos ácidos orgânicos C3, C4 e C5 nas amostras de águas separadas de emulsões injetadas diretamente no sistema cromatográfico, sem necessidade de diluição, com LOQs até 30 vezes menores (amostras com 150 g L^{-1} de Cl^-). Os ácidos orgânicos C1 e C2 são eliminados, em sua maior parte, junto com a matriz na primeira dimensão, não sendo quantificados neste método. A determinação dos ácidos orgânicos C5 a C10 foi feita após a separação, em coluna de pareamento iônico e determinação por MS, utilizando fase móvel acidificada de acetonitrila, metanol e água, 35 min de corrida cromatográfica e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ácidos C1 a C5 não foram quantificados neste método pois foram eliminados na etapa de remoção do Cl^- da matriz que foi feita utilizando cartuchos para extração em fase sólida (SPE) de C18 (lavagem com água e eluição com 75% de acetonitrila + 25% de metanol). As amostras eluídas foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico e os LOQs foram de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para C5, C6 e C7 e de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para C8, C9 e C10. Os valores encontrados para os ácidos orgânicos C5, C6 e C7 variaram de $0,557$ a $22,1 \text{ mg L}^{-1}$, de $0,686$ a $5,06 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,685$ a $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Para C8, C9 e C10, os valores ficaram abaixo do LOQ (1 mg L^{-1}). Cabe salientar que, para todos os métodos utilizados, foram feitos ensaios de recuperação utilizando solução de referência e as recuperações estiveram na faixa de 80 a 110% . Além disso, a exatidão foi avaliada usando material de referência certificado (CRM 46975) e os resultados foram concordantes com os valores de referência (85 a 110%).

Palavras-chave: Ácidos orgânicos. Cromatografia líquida. LC-MS. Águas separadas de emulsões de petróleo. Remoção de Cl^- .

ABSTRACT

MASS SPECTROMETRY ION CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS AND ANIONS IN CRUDE OIL SEPARATED WATER

AUTHOR: Morgana Doneda

ADVISOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

The main difficulty in relation to the methodology development in crude oil separated water is related to the high concentration of salts (up to 150 g L^{-1} of Cl^-) of this type of sample, which can cause interferences in the chromatographic separation stage. In this work, ion chromatography with conductivity and mass spectrometer (MS) detectors was proposed for determination of anions and organic acids in crude oil separated water. Initially, the separation in the ion exchange column it was optimized, with optimal separation using a KOH mobile phase gradient (1 to 60 mmol L^{-1}), column temperature of $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and 50 min chromatographic run. The organic acids C1 to C8 and the anions F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} and PO_4^{3-} were separated with good resolution limits of quantification (LOQs) ranging from 10 to $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, for anions and organic acids, respectively. Due to overlapping signals for high chloride content, it was not possible to quantify anions and organic acids simultaneously by ion chromatography in samples with more than 100 mg L^{-1} of Cl^- . Most samples need to be diluted, increasing the LOQs in the same order. As an alternative, the organic acids separation it was evaluated using ion-exclusion chromatography and conductivity detection, using heptafluorobutyric acid 1 mmol L^{-1} as mobile phase in the isocratic mode, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and chemical suppression with external regeneration of tetrabutylammonium hydroxide $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. It was possible to separate and quantify the organic acids C1, C2, C3, C4 e C5 with limits of quantification of $2,5$, 5 , 8 , 5 and 5 mg L^{-1} , respectively. However, as with the ion-exchange column, the samples needed to be diluted to Cl^- concentrations below 5000 mg L^{-1} to minimize signal overlap. C1 and C2 are presented in most samples with concentrations ranging from bellow of $2,5$ to 1680 mg L^{-1} and bellow of 5 to 15310 mg L^{-1} , respectively. For the acids C3, C4 and C5, due to the need for sample dilution and consequent increase in LOQs proportionally to the dilution factor used it was bellow of LOQ with exception of C3 in only one sample, with 352 mg L^{-1} . Two-dimensional ion chromatography with ion-exclusion pre-column was used to eliminate the Cl^- from the matrix in the first dimension and to separate organic acids in the second dimension (with ion-exclusion column) and minimize the need for sample dilution. It was necessary $3,8 \text{ min}$ in the first dimension to eliminate the most of Cl^- of the sample matrix and enable quantification of C3, C4 and C5 organic acids of the water samples separated from emulsions of crude oil injected directly into the chromatographic system, without the need sample dilution, with LOQs up to 30 times lower (samples with 150 g L^{-1} of Cl^-). The quantification of C1 and C2 organic acids it was not possible in this method because most of them are eliminated with the sample matrix in the first dimension. The organic acids C5 to C10 were quantify using ion-pairing chromatography and MS detection, with acetonitrile, methanol and water acid mobile phase, 35 min of run and $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The separation of C1 to C5 it was not quantify because they was eliminated in the Cl^- matrix removal step using C18 SPE cartridges (washing with water and eluting with 75% acetonitrile + 25% methanol). The eluted samples were injected directly into the chromatographic system and the LOQs were $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ for C5, C6 and C7 and $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ for C8, C9 and C10. The values found for organic acids C5, C6 and C7 ranged from $0,557$ to $22,1 \text{ mg L}^{-1}$, from $0,686$ to $5,06 \text{ mg L}^{-1}$ and $0,685$ to $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. For C8, C9 and C10, the values were lower than LOQ (1 mg L^{-1}). It should be noted that, for all methods used, recovery tests were performed using a reference solution and the recoveries were about 80 to 110% . In addition, the accuracy was evaluated using certified reference material (CRM 46975) and the results were in agreement with the reference values (85 to 110%).

Keywords: Organic acids. Ion chromatography. IC-MS. Crude oil separated water. Cl^- removal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema para a geração eletrolítica de fase móvel com cartucho Dionex EGC 500 KOH (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2013).....	45
Figura 2 - Esquema mostrando a separação de ácidos fracos em colunas de exclusão iônica com fase estacionária de troca catiônica e eluente ácido.....	47
Figura 3 - Esquema da separação de ânions (A) em colunas de pareamento iônico utilizando reagente de par iônico catiônico (hidróxido de tetrabutilamônio - TBAOH) em fase móvel de acetonitrila (ACN) e H ₂ O.....	49
Figura 4 - Esquema de funcionamento de um supressor eletrolítico para ânions utilizando KOH como fase móvel e regeneração com água.....	52
Figura 5 - Esquema de funcionamento de um supressor químico para ácidos orgânicos utilizando ácido clorídrico como fase móvel e regeneração com TBAOH.....	53
Figura 6 - Cromatograma padrão para a separação de duas substâncias.....	62
Figura 7 - Sinal cromatográfico assimétrico e parâmetros para cálculo de A _s	64
Figura 8 - Aspecto das amostras de água separadas de emulsões de petróleo utilizadas neste trabalho.....	65
Figura 9 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ânions e ácidos orgânicos utilizando cromatografia de troca iônica.....	69
Figura 10 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.....	71
Figura 11 - Esquema da montagem com conector de três vias para adição de acetonitrila na fase móvel do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.....	73
Figura 12 - Esquema ilustrativo da montagem do sistema bidimensional para a separação de Cl ⁻ e posterior separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.....	75
Figura 13 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de pareamento iônico.....	77
Figura 14 - Procedimento de SPE inicialmente utilizado para a eliminação de Cl ⁻ em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.....	81
Figura 15 - Representação esquemática das avaliações e otimizações para a quantificação de ânions e ácidos orgânicos em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.....	83

Figura 16 - Cromatograma para ânions (0,5 mg L ⁻¹) e ácidos orgânicos* (5 mg L ⁻¹) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 30 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.....	87
Figura 17 - Cromatograma para ânions (0,5 mg L ⁻¹) e ácidos orgânicos* (5 mg L ⁻¹) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, nas temperaturas de A: 25 °C, B: 30 °C, C: 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.....	89
Figura 18 - Gradiente de concentração de fase móvel (KOH) inicial e otimizado para a determinação de ânions e ácidos orgânicos em coluna de troca iônica.....	91
Figura 19 - Cromatograma para ânions (0,5 mg L ⁻¹) e ácidos orgânicos (5 mg L ⁻¹) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.....	93
Figura 20 - Cromatograma para a amostra “A”, 2 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente a solução de referência contendo 5 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L ⁻¹ dos ânions.....	96
Figura 21 - Cromatograma para a amostra “B”, 40 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 5 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L ⁻¹ dos ânions.....	98
Figura 22 - Cromatograma para a amostra “C”, 100 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 5 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L ⁻¹ dos ânions.....	100
Figura 23 - Resultados obtidos para a avaliação da temperatura na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1) utilizando HPFB 1 mmol L ⁻¹ como fase móvel e detecção por UV. (média ± desvio padrão, n=3).....	107
Figura 24 - Resultados obtidos para a avaliação da concentração de HPFB da fase móvel na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), temperatura de 35 °C e A: detecção por UV e B: detecção por condutividade. (média ± desvio padrão, n=3).....	108

Figura 25 - Cromatogramas para a avaliação da concentração de HPFB (A: 1 mmol L ⁻¹ , B: 0,5 mmol L ⁻¹ , C: 0,25 mmol L ⁻¹ , D: 0,125 mmol L ⁻¹ , E: 0,1 mmol L ⁻¹ e F: 0,005 mmol L ⁻¹) da fase móvel na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), na temperatura de 35 °C e detecção por UV.....	110
Figura 26 - Cromatograma ampliado para a amostra "B", 6 vezes diluída, após separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), temperatura de 35 °C e detecção por UV utilizando fase móvel de HPFB 0,125 mmol L ⁻¹ e 0,25 mmol L ⁻¹ . Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 50 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em fase móvel de HPFB 0,125 mmol L ⁻¹	112
Figura 27 - Cromatograma para uma solução de referência de 25 mg L ⁻¹ após separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e A: detecção por condutividade e B: detecção por UV, ambos com supressão química.....	115
Figura 28 - Cromatograma para o CRM 46975 0,5 mmol L ⁻¹ após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.....	119
Figura 29 - Cromatograma para solução de referência de ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), sem eliminação da matriz, com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.....	125
Figura 30 - Resultados obtidos para a recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ para a avaliação do tempo de eliminação de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).....	126
Figura 31 - Resultados obtidos para área relativa de Cl ⁻ na recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ para a avaliação do tempo de eliminação da matriz após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. (média ± desvio padrão, n=3).....	127

Figura 32 - Resultados obtidos para a recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) para a avaliação da concentração de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,9 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).....	128
Figura 33 - Resultados obtidos para a recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) para a avaliação da concentração de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).....	129
Figura 34 - Cromatogramas sobrepostos da avaliação da recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) para a avaliação da concentração de Cl ⁻ (150, 125, 100, 75, 50, 25 e 10 g L ⁻¹) após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado.....	131
Figura 35 - Cromatograma do CRM 46975 0,5 mmol L ⁻¹ em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado.....	135
Figura 36 - Cromatogramas sobrepostos da amostra “D” sem ajuste de pH (pH 8,25) e com ajuste de pH (pH 4), após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em preto é referente à solução de referência contendo 50 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C5 nas mesmas condições de separação.....	140
Figura 37 - Cromatogramas da amostra “N” após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 50 mg L ⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em 150 g L ⁻¹ nas mesmas condições de separação.....	143

Figura 38 - Gradiente de concentração de fase móvel A (ACN 24%, MeOH 6%, HCl 0,03 mmol L ⁻¹) e B (ACN 60%, MeOH 24%, HCl 0,05 mmol L ⁻¹) inicial e otimizado para a determinação de ácidos orgânicos em coluna de pareamento iônico.....	145
Figura 39 - Avaliação da intensidade de sinal para os ácidos C1 a C10 (10 mg L ⁻¹) para os potenciais do cone de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 V após separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 42 °C e detecção MS, com supressão química.....	146
Figura 40 - Avaliação da intensidade de sinal para os ácidos orgânicos C1 a C8 em uma solução de referência preparada em ■ acetonitrila e ■ 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ em 50% de acetonitrila, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 42 °C e detecção por MS, com supressão química. (média ± desvio padrão, n=3).....	147
Figura 41 - Cromatogramas obtidos para a separação dos ácidos orgânicos C4, iso-C5, C5, iso-C6, C6 e C7 nas temperaturas de A: 10 °C, B:15 °C, C: 20 °C, D: 25 °C, E: 30 °C, F: 35 °C e G: 42 °C, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O e detecção por MS, com supressão química.....	150
Figura 42 - Cromatogramas de íons extraídos para C5 (preto) e C6 (azul) nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 42 °C após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O e detecção por MS, com supressão química.....	152
Figura 43 - Cromatogramas para ácidos orgânicos C1 a C10, 10 mg L ⁻¹ em acetonitrila, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção A: condutividade e B: MS, com supressão química.....	154
Figura 44 - Esquema do procedimento de SPE utilizado cartuchos de C18 para a eliminação de Cl ⁻ em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo com a etapa de otimização da lavagem com H ₂ O.....	157
Figura 45 - Avaliação da recuperação obtida para uma solução de referência de 10 mg L ⁻¹ dos ácidos orgânicos C6 a C10 em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ utilizando a SPE para remoção de Cl ⁻ , em diferentes solventes para a eluição. Condições cromatográficas: separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).....	158

Figura 46 - Procedimento geral da SPE otimizada para a eliminação de Cl ⁻ em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo e retenção dos ácidos orgânicos C5 a C10 para posterior quantificação por IC-MS utilizando coluna de pareamento iônico.....	159
Figura 47 - Resultados obtidos para solução de referência de 10 mg L ⁻¹ dos ácidos orgânicos C5 a C10 em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ utilizando a SPE para remoção de Cl ⁻ e mistura de 75% de acetonitrila + 25% de metanol para a eluição com e sem o condicionamento do cartucho. Condições cromatográficas: separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. (média ± desvio padrão, n=2).....	160
Figura 48 - Cromatogramas obtidos para a amostra "B" sem ajuste de pH (pH 7,2) e com ajuste de pH (pH 4) após SPE para remoção de Cl ⁻ e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. O cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 10 mg L ⁻¹ dos ácidos C5 a C10.....	161
Figura 49 - Cromatograma do CRM 46975 0,05 mmol L ⁻¹ após SPE para eliminação de Cl ⁻ e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química.....	164
Figura 50 - Esquema resumindo os resultados para as colunas de troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico para a determinação de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear em amostras de água separada de emulsões de petróleo.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pKa para os ácidos orgânicos C1 a C10.....	38
Tabela 2 - Critérios de aceitação para ensaios de recuperação.....	60
Tabela 3 - Critérios de aceitação para repetibilidade.....	61
Tabela 4 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a) para a determinação de ânions e ácidos orgânicos por troca iônica.....	70
Tabela 5 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b) para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de exclusão iônica.....	72
Tabela 6 - Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 em sistema bidimensional com coluna de exclusão iônica em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.....	76
Tabela 7 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c) para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de pareamento iônico.....	78
Tabela 8 - Determinação de pH e cloreto por ICP-OES em águas separadas de emulsões de petróleo. (n=1).....	85
Tabela 9 - Condições cromatográficas otimizadas utilizadas para a determinação de ânions e ácidos orgânicos em coluna de troca iônica.....	92
Tabela 10 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de ânions e ácidos orgânicos* após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.....	94
Tabela 11 - Resultados obtidos para ânions e ácidos orgânicos nas amostras "A" e "B" após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica, n=3.....	102
Tabela 12 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de exclusão iônica em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.....	114
Tabela 13 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C1, C2, C3, C4 e C5 após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.....	117

Tabela 14 - Resultados obtidos para C1, C2, C3, C4 e C5 no CRM 46975 em três níveis de concentração (0,25, 0,5 e 0,25 mmol L ⁻¹) após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L ⁻¹ , n=1.....	120
Tabela 15 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C1 a C5) após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. n=2.....	121
Tabela 16 - Valores de recuperação para os ácidos C1, C2, C3, C4 e C5 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. (n=1).....	123
Tabela 17 - Tempo de retenção (t _R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C3, C4 e C5 utilizando exclusão iônica em sistema bidimensional após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química.....	133
Tabela 18 - Resultados obtidos para C3, C4 e C5, em três níveis de concentração (0,22, 0,44 e 0,65 mmol L ⁻¹), no CRM 46975 preparado em 150 g L ⁻¹ de Cl ⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L ⁻¹ , n=3.....	136
Tabela 19 - Resultados para a recuperação de C3, C4 e C5 no CRM 46975 0,5 mmol L ⁻¹ para 150 e 75 g L ⁻¹ de Cl ⁻ e em H ₂ O após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L ⁻¹ , n=1.....	137
Tabela 20 - Comparação dos resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C3, C4 e C5) utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1) sem separação do Cl ⁻ (Sistema 1), somente com diluição da amostra; e após separação em sistema bidimensional (Sistema 2) utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1). (n=2).....	138

Tabela 21 - Valores de recuperação para os ácidos C3, C4 e C5 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L ⁻¹ , temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. (n=1).....	141
Tabela 22 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C10 utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por condutividade e MS em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.....	155
Tabela 23 - Tempo de retenção (t _R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C5, C6, C7, C8, C9 e C10 separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química.....	163
Tabela 24 - Resultados obtidos para C5, C6 e C7 no CRM 46975 em três níveis de concentração (0,05, 0,01 e 5 mmol L ⁻¹), após SPE para remoção de Cl ⁻ e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. Valores em mg L ⁻¹ , n=1.....	165
Tabela 25 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C5, C6, C7, C8, C9 e C10) utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após SPE para eliminação de Cl ⁻ . (n=2).....	166
Tabela 26 - Valores de recuperação para os ácidos C5 a C10 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após SPE para remoção de Cl ⁻ e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H ₂ O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química.....	167
Tabela 27 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) utilizando cromatografia líquida em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo. (n=2).....	169
Tabela 28 - Resumo dos LODs e LOQs (mg L ⁻¹) obtidos para a determinação dos ácidos orgânicos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo utilizando a cromatografia líquida nos diferentes tipos de colunas (troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico).....	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do inglês, <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
ASTM	do inglês, <i>American Society for Testing and Materials</i>
CD	Detector por condutividade, do inglês, <i>conductivity detector</i>
CENPES	Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello, PETROBRAS
CRM	Material de referência certificado, do inglês, <i>certified reference material</i>
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês, <i>electrospray ionization</i>
FBA	Ácidos flúor-benzóicos, do inglês, <i>fluorinated benzoic acids</i>
HPFB	Ácido heptafluorbutírico, do inglês, <i>heptafluorbutyric acid</i>
IC	Cromatografia de íons, do inglês <i>ion chromatography</i>
ICH	do inglês, <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IC-MS	Cromatografia de íons acoplada a espectrometria de massas, do inglês, <i>ion chromatography mass spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC	Cromatografia líquida, do inglês, <i>liquid chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês, <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês, <i>mass spectrometry</i>
PS/DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTFE	Politetrafluoretileno
SIM	Monitoramento de íon selecionado, do inglês, <i>selected ion monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês, <i>solid-phase extraction</i>
TBAOH	Hidróxido de tetrabutílamônio, do inglês, <i>tetrabutylammonium hydroxide</i>
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	Objetivo geral	33
1.1.1	Objetivos específicos	33
2	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	Petróleo	35
2.1.1	Emulsões de petróleo	36
2.1.1.1	Ácidos orgânicos em petróleo	37
2.2	Técnicas para a determinação de ânions e ácidos orgânicos	40
2.2.1	Cromatografia de íons	41
2.2.1.1	Coluna de troca iônica.....	42
2.2.1.2	Coluna de exclusão iônica.....	45
2.2.1.3	Coluna de pareamento iônico.....	48
2.2.1.4	Detectores.....	50
2.3	Alternativas para remoção de cloreto de matrizes salinas	55
2.4	Validação de métodos analíticos.....	58
3	MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1	Amostras, reagentes e soluções	65
3.2	Instrumentação.....	66
3.3	Determinação de ânions e ácidos orgânicos por cromatografia.....	68
3.3.1	Coluna de troca iônica	68
3.3.2	Coluna de exclusão iônica	70
3.3.2.1	Otimização das condições cromatográficas	72
3.3.2.1.1	Avaliação da adição de acetonitrila pós-coluna	73
3.3.2.1.2	Avaliação da temperatura do compartimento da coluna	73
3.3.2.1.3	Avaliação da concentração de ácido heptafluorbutírico da fase móvel	74
3.3.2.1.4	Avaliação da concentração de hidróxido de tetrabutylamônio utilizado como solução regenerante no sistema de supressão	74
3.3.2.2	Separação de cloreto utilizando sistema bidimensional e coluna de exclusão iônica.....	74
3.3.2.2.1	Avaliação do tempo na primeira dimensão para eliminação de cloreto	76
3.3.2.2.2	Avaliação da concentração de cloreto na separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando sistema bidimensional	77
3.3.3	Coluna de pareamento iônico	77
3.3.3.1	Avaliação das condições utilizando espectrometria de massas	79
3.3.3.1.1	Avaliação do potencial aplicado no cone de amostragem	79
3.3.3.1.2	Avaliação da presença de sal na ionização dos ácidos C1 a C10 ...	79
3.3.3.2	Avaliação da temperatura do compartimento da coluna	79
3.3.3.3	Extração em fase sólida para remoção de cloretos.....	80
3.3.3.3.1	Avaliação do volume de água para remoção de cloreto	80
3.3.3.3.2	Avaliação do eluente	80
3.3.3.3.3	Avaliação do condicionamento do cartucho para extração em fase sólida	81
3.4	Tratamento de dados	81
4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	85
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	85
4.2	Determinação de ácidos orgânicos por cromatografia	86

4.2.1	Avaliação da capacidade de separação da coluna de troca iônica	86
4.2.1.1	Otimização das condições cromatográficas.....	87
4.2.1.2	Validação do método analítico e quantificação de ânions e ácidos orgânicos utilizando coluna de troca iônica e detecção por condutividade.....	93
4.2.2	Avaliação da capacidade de separação da coluna de exclusão iônica	103
4.2.2.1	Otimização das condições cromatográficas.....	104
4.2.2.1.1	Avaliação da adição de acetonitrila pós-coluna	105
4.2.2.1.2	Avaliação da temperatura do compartimento da coluna	106
4.2.2.1.3	Avaliação da concentração de ácido heptafluorbutírico da fase móvel	107
4.2.2.1.4	Avaliação da concentração de hidróxido de tetrabutilamônio utilizado como solução regenerante no sistema de supressão	112
4.2.2.2	Resumo das condições otimizadas para separação em coluna exclusão iônica	113
4.2.2.3	Validação do método analítico e quantificação de ácidos orgânicos (C1 a C5) utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade.....	115
4.2.2.4	Separação de cloreto da matriz utilizando sistema bidimensional	124
4.2.2.4.1	Avaliação do tempo na primeira dimensão para eliminação do cloreto	125
4.2.2.4.2	Avaliação da concentração de cloreto na separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando sistema bidimensional	128
4.2.2.4.3	Validação do método analítico e quantificação dos ácidos orgânicos (C3 a C5) utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade em sistema bidimensional para eliminação de cloreto	132
4.2.3	Coluna de pareamento iônico	144
4.2.3.1	Avaliação das condições utilizando espectrometria de massas	145
4.2.3.1.1	Avaliação do potencial aplicado no cone de amostragem	146
4.2.3.1.2	Avaliação da presença de sal na ionização dos ácidos C1 a C10	147
4.2.3.2	Avaliação da temperatura do compartimento da coluna.....	148
4.2.3.3	Resumo das condições otimizadas para separação em coluna de pareamento iônico	153
4.2.3.4	Extração em fase sólida para remoção de cloretos	156
4.2.3.4.1	Avaliação do volume de água para a remoção de cloreto	157
4.2.3.4.2	Avaliação do eluente	158
4.2.3.4.3	Avaliação do condicionamento do cartucho de extração em fase sólida	159
4.2.3.4.4	Avaliação do pH	161
4.2.3.5	Validação do método analítico e quantificação dos ácidos orgânicos (C5 a C10) utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS após extração em fase sólida para a remoção de cloreto	162
4.2.4	Resumo dos resultados para a quantificação de ácidos orgânicos em águas separadas de emulsões de petróleo	168

4.2.5	Resumo dos métodos e limites de detecção e quantificação utilizados para a quantificação de ácidos orgânicos em águas separadas de emulsões de petróleo.....	171
5	Conclusões.....	174
	REFERÊNCIAS	177

1 INTRODUÇÃO

Durante a etapa de extração do petróleo, pode ocorrer a incorporação de água, sais e sedimentos ao óleo formando emulsões, geralmente, estáveis (LEE, 1999). Porém, previamente às etapas de refino, esta água, bem como os sais e sedimentos, devem ser removidos para garantir as especificações para o transporte, armazenamento e exportação além de minimizar problemas de corrosão nas tubulações, devido à presença, principalmente, de água e sais inorgânicos (KOKAL, 2005). O tratamento destas emulsões é feito com a adição de agentes químicos e, normalmente, com aplicação de um campo elétrico para a coalescência das gotas e separação dos sais e água do petróleo (THOMAS, 2001).

A composição dos petróleos varia muito, dependendo do poço que foi extraído, das condições de formação, bem como da região (SPEIGHT, 2001; FARAH, 2012). Assim, cada petróleo pode ter um comportamento diferente em relação à estabilidade destas emulsões (THOMAS, 2001). Muitos fatores alteram esta estabilidade, como o teor de asfaltenos e resinas, a concentração de sais, pH da água, temperatura e, também, a presença de ácidos orgânicos (LEE, 1999; KOKAL, 2005). Desta forma, o conhecimento das características de cada petróleo, bem como de cada fator que influencia na estabilidade das emulsões, é de extrema importância para facilitar a separação da água do óleo, diminuindo os custos de produção (GARY, HANDWERK e KAISER, 2007).

Os ácidos orgânicos, assim como os sais, principalmente o cloreto de sódio, podem ser potencialmente corrosivos às tubulações das refinarias (THOMAS, 2001; SPEIGHT, 2006). Além disso, estes ácidos encontram-se, preferencialmente, na interface água/óleo, junto com as espécies de asfaltenos (PITTMAN e LEWAN, 1994; HUTIN, ARGILLIER e LANGEVIN, 2014; ANDERSEN et al., 2017). A presença dos ácidos orgânicos diminui significativamente a tensão superficial da interface óleo/água, contribuindo para a formação de gotículas menores de água e, conseqüentemente, para a formação de emulsões mais estáveis (ANDERSEN et al., 2017). Além disso, os ácidos orgânicos podem alterar o pH do meio e, conseqüentemente, alterar a solubilidade dos minerais, alterando a permeabilidade do petróleo nas rochas (SEEWALD, 2003).

Tendo em vista a importância da caracterização destes petróleos, a cromatografia de íons (IC) é uma técnica analítica amplamente utilizada para a

separação e quantificação de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear (C1 a C10) (HADDAD e JACKSON, 1990; LOPEZ-RUIZ, 2000; WEISS, 2004). Em relação aos ácidos orgânicos em águas separadas de emulsões de petróleo, a cromatografia gasosa, assim como a IC, também é amplamente utilizada. Porém, nestes casos, é necessária a derivatização dos compostos, a fim de melhorar as propriedades cromatográficas e, desta forma, perdas podem ser observadas para os ácidos de cadeia carbônica menor, tanto na etapa de extração, bem como de injeção (PITTMAN e LEWAN, 1994).

A separação por IC pode ser dividida em três principais mecanismos de separação: troca iônica, exclusão iônica, interação iônica e pareamento iônico, dependendo das condições, como por exemplo, tipo de fase móvel, e das colunas utilizadas. Levando-se em consideração a separação e quantificação simultânea de ânions e ácidos orgânicos, a separação em coluna de troca iônica é a mais utilizada, considerando-se que os analitos estejam em sua forma iônica. (KADNAR e RIEDER, 1995; HADDAD e JACKSON, 1990; LOPEZ-RUIZ, 2000). A detecção por IC é feita, geralmente, por condutividade, (PITTMAN e LEWAN, 1994) porém a espectrometria de massas (MS) vem ganhando cada vez mais espaço, principalmente devido aos menores limites de quantificação (LOQs) e a possibilidade de diferenciação de interferências (HADDAD, NESTERENKO e BUCHBERGER, 2008; MILLER e SCHNUTE, 2016).

A principal dificuldade para a determinação simultânea de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear por cromatografia de íons é a alta concentração salina em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo (KADNAR e RIEDER, 1995). Estes sais, geralmente na forma de Cl^- , podem causar interferências na separação cromatográfica, como sobreposição de sinais devido a sua composição majoritária em relação aos outros ânions e ácidos orgânico (KADNAR e RIEDER, 1995; LOPEZ-RUIZ, 2000). Além disso, pode ocorrer a cristalização dos sais presentes na matriz que, geralmente, são abrasivos e podem causar entupimentos no sistema cromatográfico, além de suprimir a ionização dos íons por espectrometria de massas (NETO, 2010). Desta forma, algumas alternativas podem ser utilizadas para a remoção do cloreto da matriz, como a utilização de cartuchos de prata, a extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de C18 e, também, a utilização dos sistemas bidimensionais (HUANG et al., 2000; BRUNO et al., 2003; ZAKARIA et al., 2011; MILLER e SCHNUTE, 2016).

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitem a identificação e quantificação de ânions e ácidos orgânicos em matrizes com alto teor salino. A utilização da cromatografia líquida possibilita a injeção direta das amostras, sem a necessidade de otimização da derivatização dos compostos e possíveis perdas durante a etapa de quantificação. Ainda, o acoplamento da técnica à espectrometria de massas possibilita a identificação dos compostos com maior sensibilidade, principalmente os ácidos orgânicos de cadeia carbônica maior (C5 a C10).

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal a determinação de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear até 10 carbonos utilizando a cromatografia líquida e a espectrometria de massas em águas separadas de emulsões de petróleo oriundos do pré-sal.

1.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia cromatográfica para identificação e quantificação simultânea de ânions e ácidos orgânicos em matrizes com alto teor salino e resíduos de petróleo do pré-sal;
- Avaliar a separação de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear e ânions, simultaneamente, utilizando coluna de troca iônica e detecção por condutividade;
- Utilizar diferentes mecanismos de separação (colunas de troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico) e detecção para a confirmação dos analitos;
- Otimizar a melhor técnica de detecção (condutividade, ultravioleta ou espectrometria de massas) para o mecanismo de separação escolhido;
- Estudar a interferência da matriz na separação e quantificação dos ácidos ânions e ácidos orgânicos;
- Avaliar alternativas para a remoção de cloreto da matriz, como a utilização de cartuchos de Ag, cartuchos de SPE e utilização de sistema bidimensional

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa constituída, principalmente, por hidrocarbonetos, geralmente no estado líquido, podendo conter, também, compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais e outros elementos (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2018). Desta composição, 83 a 87% é carbono, 11 a 14 % é hidrogênio, 0,06 a 8% de nitrogênio, oxigênio e enxofre, bem como uma pequena proporção de metais (<0,3%) como Fe, Ni e V. As características químicas e físicas do petróleo podem variar consideravelmente, dependendo da região e condições a que ele foi submetido (SPEIGHT, 2001; FARAH, 2012).

Mais recentemente, com a descoberta do petróleo do pré-sal, a produção de petróleo no Brasil triplicou, passando de 500 mil barris por dia em 2014 para 1,5 milhão de barris por dia em 2018. Este petróleo é acumulado abaixo de uma camada de sal que pode chegar a 2 mil metros de espessura, sendo que, o petróleo está a 5000 metros de profundidade. Os principais desafios da extração do petróleo do pré-sal são a produção de óleo e gás de um local com acesso limitado, ou seja, mais de 300 km distante da costa, com uma lâmina de água de 2200 metros. Sendo assim, foram necessárias tecnologias capazes de suportar altas pressões dos reservatórios e os contaminantes presentes nos fluidos (PETROBRÁS, 2014).

A formação do petróleo deve-se ao acúmulo de matéria orgânica sob condições específicas de temperatura e pressão, em camadas do subsolo de bacias sedimentares (THOMAS, 2001; FARAH, 2012). Em alguns casos, dependendo das características das rochas, mesmo que comprovada a existência de petróleo, a extração não é comercialmente ou tecnicamente viável. Além disso, dependendo da composição química, são necessários maiores ou menores investimentos em refino, corroborando assim a necessidade da análise de cada tipo de petróleo.(AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL, 2020)

Durante a etapa de extração do petróleo, pode ocorrer a incorporação de água e sedimentos no óleo devido à agitação e cisalhamento durante a produção, formando emulsões (LEE, 1999). Esta água pode estar naturalmente presente nas rochas ou ser injetada no reservatório para facilitar o processo de extração (KOKAL, 2005; FARAH, 2012). Porém, para as etapas de refino, é necessário que esta água seja

separada do óleo com a quebra das emulsões formadas (KOKAL, 2005).

2.1.1 Emulsões de petróleo

As emulsões mais comuns na indústria do petróleo são as formadas por água/óleo, ou seja, água presente no óleo. Estas emulsões são estabilizadas na presença de emulsificantes naturais, que são, geralmente, surfactantes. Os surfactantes são caracterizados por se concentrar na interface óleo/água e formar um filme interfacial, diminuindo a tensão superficial e promovendo a emulsificação das gotas (KOKAL, 2005). Estes compostos são de ocorrência natural no petróleo, como os asfaltenos, resinas e ácidos e bases orgânicas. Ainda, a presença de sedimentos também pode atuar na estabilização das emulsões, dependendo do tamanho de partícula e das interações destes com a interface óleo/água (LEE, 1999; KOKAL, 2005).

As emulsões formadas por petróleo e água são, em geral, emulsões estáveis. Isso se deve ao fato do pequeno tamanho de gota e, também, da presença de um filme interfacial sobre esta, formado e estabilizado por asfaltenos e resinas contendo ácidos orgânicos e bases (STRASSNER, 1968). Este filme interfacial aumenta a estabilidade das emulsões, reduzindo a tensão superficial e aumentando a viscosidade interfacial, o que dificulta a coalescência das gotículas de água e consequente separação da emulsão óleo/água. Cabe salientar que o tipo de petróleo, composição, pH da água, temperatura, pressão e a concentração de moléculas polares, como ácidos orgânicos, alteram as características destes filmes interfaciais (KOKAL, 2005; HUTIN, ARGILLIER e LANGEVIN, 2014).

As emulsões devem ser tratadas com a finalidade de remover a água dispersa bem como os sais inorgânicos, a fim de garantir as especificações para o transporte, armazenamento e exportação, além de reduzir a corrosão e o envenenamento catalítico do processamento (THOMAS, 2001; KOKAL, 2005). Cabe salientar que corrosão é um grande desafio nas refinarias de petróleo e ela é devida, principalmente, a compostos potencialmente corrosivos, como os sais inorgânicos (KOKAL, 2005). Mesmo em baixa concentração, estes podem causar diversos danos às tubulações. Durante as etapas de destilação, pode ocorrer a decomposição térmica destes sais e, conseqüentemente, a formação de ácido clorídrico, que é um dos principais responsáveis pela corrosão (SPEIGHT, 2006). Assim, a eliminação da água do

petróleo reduz o tempo e custo de manutenção, além de aumentar o tempo de vida útil dos equipamentos, minimiza o uso de produtos químicos para a neutralização do ácido clorídrico, propiciando, principalmente, menores custos de transporte e refino (THOMAS, 2001).

Desta forma, a remoção da água, bem como do sal, é feita como um tratamento primário do petróleo, logo após a etapa de extração do petróleo, onde é feita a adição de água aquecida (45 - 60°C) (THOMAS, 2001). Assim, ocorre a dissolução dos sais na água e a fase óleo e água são separadas com a adição de agentes químicos que atuam para desestabilizar as emulsões ou, também, com a passagem da emulsão por um campo elétrico para a coalescência das gotas. Cabe salientar que a concentração máxima de sal no óleo aceito para as refinarias é de 285 mg L⁻¹ (THOMAS, 2001).

Desta forma, tendo em vista a necessidade da remoção destes sais e, conseqüentemente, desestabilização das emulsões, para a obtenção do petróleo é necessário o entendimento da composição das mesmas e dos fatores que podem alterar a estabilidade (SIMANZHENKOV e IDEM, 2003; VAFAJOO, GANJIAN e FATTAHI, 2012; ANDERSEN et al., 2017). Assim, compreendendo melhor os mecanismos envolvidos, o processo de separação da água do óleo pode ser facilitado (KOKAL, 2005). Cabe salientar que, a caracterização dos compostos presentes nos petróleos é necessária, uma vez que estes possuem características muito diferentes entre si, dependendo do tipo e região em que é extraído.

2.1.1.1 *Ácidos orgânicos em petróleo*

Os ácidos orgânicos de cadeia curta e lineares (1 a 10 carbonos), são ácidos fracos com valores de pKa variando de 3,75 a 4,90, para os ácidos fórmico e decanóico, respectivamente (SERJEANT e DEMPSEY, 1979). Os valores de pKa para os ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), hexanóico (C6), heptanóico (C7), octanóico (C8), nonanóico (C9) e decanóico (C10) estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de pKa para os ácidos orgânicos C1 a C10.

Ácido	pKa, em H ₂ O, 25 °C
C1	3,75
C2	4,76
C3	4,87
C4	4,82
C5	4,84
C6	4,85
C7	4,89
C8	4,89
C9	4,96
C10	4,90

Fonte: Adaptação de Serjeant e Dempsey (1989) e Bruice (2010).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta e linear (C1 a C8) podem ser encontrados nas águas de formação de petróleo em concentrações na ordem de 1 a 20 mmol L⁻¹. Dentre estes ácidos, o ácido acético, geralmente, é o que está presente em maior concentração, decrescendo conforme vai aumentando a cadeia carbônica (BORGUND e BARTH, 1994; PITTMAN e LEWAN, 1994).

Os ácidos orgânicos, presentes no petróleo, podem ser formados através de reações de degradação microbológica dos hidrocarbonetos que ocorrem, principalmente, na interface óleo/água (MEREDITH, KELLAND e JONES, 2000). Além disso, em altas temperaturas, estes ácidos podem ser formados, também, pela oxidação dos alcanos presentes no petróleo e, devido à sua solubilidade, tendem a se acumular na interface (PITTMAN e LEWAN, 1994). Ainda, a presença de alguns minerais como, por exemplo, hematita, magnetita e esmectita, contendo ferro, ou enxofre podem, também, oxidar o petróleo e formar ácidos orgânicos e dióxido de carbono. Estes ácidos orgânicos podem dissolver, bem como, alterar a solubilidade dos minerais das rochas reservatório, devido à alteração do pH. Esta dissolução acaba criando uma porosidade secundária, alterando, assim, a permeabilidade do petróleo nas rochas (SEEWALD, 2003).

A caracterização e quantificação dos ácidos orgânicos em petróleos é de extrema importância, devido ao fato de que, além do interesse do conhecimento destes na formação da porosidade secundária (SEEWALD, 2003), estes podem ser potencialmente corrosivos às tubulações metálicas das refinarias (SPEIGHT, 2006). Além disso, os ácidos orgânicos podem alterar a tensão superficial da interface

óleo/água, modificando as condições de separação da mesma (HUTIN, ARGILLIER e LANGEVIN, 2014; ANDERSEN et al., 2017). Cabe salientar que não foram encontrados trabalhos na literatura que identifiquem e quantifiquem este tipo de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear em petróleos do pré-sal.

Além disso, estudos indicam que os ácidos orgânicos são, preferencialmente, adsorvidos ou concentrados na interface óleo/água junto com as espécies de asfaltenos (HUTIN, ARGILLIER e LANGEVIN, 2014; ANDERSEN et al., 2017). Andersen *et al.* (2017) mostraram que a presença desses ácidos diminui significativamente a tensão superficial da interface óleo/água. Cabe salientar que este fator é muito importante para a estabilidade das emulsões, principalmente, quando é necessária a separação do óleo da fase aquosa.

Ainda, Hutin, Argillier e Langevin (2014) mostraram que, em pHs mais elevados ($\text{pH} > 6$), os ácidos orgânicos podem estar na sua forma ionizada e, desta forma, serem transferidos do óleo para a fase aquosa, diminuindo a tensão superficial da interface óleo/água. Ou seja, na presença de soluções alcalinas, como hidróxido de sódio, ocorre a desprotonação dos ácidos e, conseqüentemente, estes passam a atuar como surfactantes, se acumulando na interface e diminuindo a tensão superficial (HUTIN, ARGILLIER e LANGEVIN, 2014). Ainda, cabe salientar que os ácidos orgânicos de menor massa molecular (< 500 Da), alifáticos e de cadeia linear tem maiores interações na tensão superficial da interface óleo/água (ZHANG et al., 2004).

Barth (1991) avaliou a concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear C1 a C8 e íons inorgânicos em 22 amostras de águas de reservatórios de petróleo. A determinação dos ácidos orgânicos foi feita utilizando isotacoforese, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra (BARTH, 1991). A isotacoforese é uma técnica de separação eletroforética, em sistema descontínuo, onde os íons são separados em zonas, de acordo com a sua mobilidades (STRINGER, 2005). Das 22 amostras analisadas, apenas em duas delas a concentração de ácido fórmico (8 e 58 mg L^{-1}) foi maior que os limites de quantificação (LOQs). A presença de ácido fórmico nas amostras, de acordo com o autor, pode ser oriunda da contaminação da água que é injetada durante a prospecção do petróleo, a qual é tratada com formaldeído. Para os ácidos C2, C3, C4, C5 e C6, as concentrações encontradas foram de 19 a 1014, 4 a 113, 4 a 72, 5 a 37 e 10 a 19 mg L^{-1} , respectivamente. Os ácidos C2 e C3 foram encontrados nas 22 amostras analisadas, sendo que os ácidos C4, C5 e C6 foram encontrados somente em 11, 6 e 3 amostras, respectivamente. A concentração dos

ácidos variou consideravelmente entre as amostras, sendo que a concentração de ácido acético foi a maior, decrescendo de acordo com o aumento da cadeia carbônica. O autor fez ainda a quantificação de Cl^- nas amostras e a concentração encontrada nas águas esteve na faixa de 1,8 a 170 g L^{-1} , sendo que maior parte delas (18 amostras) apresentam de 10 a 30 mg L^{-1} de Cl^- (BARTH, 1991).

Varonka *et al.* (2020) encontraram concentrações de acetato na faixa de 16 a 40 mg L^{-1} em águas de produção de petróleo. A determinação foi feita utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e detector de arranjo de diodos. Para a separação, foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos *Altech Prevail*, com fase móvel de KH_2PO_4 25 mmol L^{-1} , pH 2,5 e vazão de 1,5 mL min^{-1} . O limite de quantificação (LOQ) para o acetato foi de 1 mg L^{-1} (VARONKA *et al.*, 2020).

2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÂNIONS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

A acidez no petróleo é caracterizada, principalmente, pela contribuição dos ácidos orgânicos e é definida como a quantidade de hidróxido de potássio, em miligramas, necessária para neutralizar 1 g de amostra (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2002; SPEIGHT, 2006). Os principais ácidos que contribuem para este número são os ácidos naftênicos e, também, os tióis e as mercaptanas (SPEIGHT, 2006). Os ácidos naftênicos são, segundo definição, ácidos carboxílicos ciclo-alifáticos (BRIENT, WESSNER e DOYLE, 2000) e, desta forma, não incluem os ácidos orgânicos de cadeia curta e linear. Para estes ácidos, geralmente, a determinação é feita utilizando infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa (GC), espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (ESI-MS) e HPLC (BROWN e ULRICH, 2015). Atualmente, não há norma definida pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) para a determinação de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear (C1 a C10) em petróleo ou nas águas separadas de emulsões de petróleo.

A cromatografia de íons é uma técnica amplamente utilizada para a determinação tanto de ânions quanto de ácidos orgânicos (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009; SCIENTIFIC, 2013). Levando-se em consideração a identificação e quantificação simultânea destes analitos, a separação em coluna de troca iônica é a mais utilizada (HADDAD e JACKSON, 1990; KADNAR e RIEDER, 1995; WEISS, 2004; FRITZ e GJERDE, 2009).

A principal dificuldade para a determinação dessas espécies está relacionada com a grande concentração de sal presente em solução (superior a 100 g L⁻¹, em alguns casos), que pode causar interferências durante a análise, como a sobreposição dos sinais cromatográficos devido aos íons interferentes, geralmente o Cl⁻ (PITTMAN e LEWAN, 1994; HUANG et al., 2000). A concentração de Cl⁻ é majoritária em relação aos outros ânions e ácidos orgânicos, em razões de 100:1 até 1000:1 (KADNAR e RIEDER, 1995).

Além disso, a presença de sais pouco voláteis, em alta concentração, pode obstruir o orifício de entrada dos íons no espectrômetro de massas, bem como suprimir a ionização dos íons de interesse (NETO, 2010). Outro problema relacionado ao uso tanto de matrizes com alto teor de sais inorgânicos é o risco da formação de cristais em solução, os quais podem se tornar abrasivos para os constituintes mecânicos do cromatógrafo, além de poder causar entupimentos (NETO, 2010). Com isso, geralmente, o teor máximo de sal tolerado nas amostras para os métodos cromatográficos é de 1%, sendo necessário, muitas vezes, altos fatores de diluição (mais que 10 vezes), aumentando assim os LOQs e a aplicabilidade dos métodos (KUBICA et al., 2015).

A cromatografia de íons (IC), utilizando a separação em coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade, é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação de ácidos orgânicos em águas de formação em petróleos/águas separadas de emulsões de petróleo (FISHER, 1987; SAKUGAWA, KAPLAN e SHEPARD, 1993; PITTMAN e LEWAN, 1994; HAJOS e NAGY, 1998; HUANG et al., 2000; LANG et al., 2010). A vantagem da utilização da cromatografia de exclusão iônica é a eliminação das interferências iônicas da matriz, além de ser uma técnica relativamente de menor custo, quando comparada, por exemplo, a cromatografia gasosa (GC) (PITTMAN e LEWAN, 1994). A GC também é utilizada, principalmente para a quantificação de ácidos orgânicos de cadeias carbônicas maiores, após a esterificação destes e extração. Porém, os ácidos de cadeias menores podem precipitar e não serem extraídos, ou serem descarboxilados no sistema de injeção e serem medidos como CO₂ (HADDAD e JACKSON, 1990 ;PITTMAN e LEWAN, 1994).

2.2.1 Cromatografia de íons

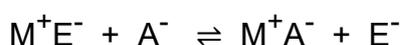
A cromatografia líquida baseia-se na separação de compostos utilizando uma

fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida e, dentro deste conceito, engloba a IC. A IC é uma técnica de separação baseada na interação dos íons presentes em uma solução (fase móvel) com uma fase estacionária, também iônica. As interações dos analitos com a fase estacionária ocorrem em equilíbrio com as interações da fase móvel com a fase estacionária e, dependendo da afinidade, as espécies são separadas. As principais aplicações da IC são para a separação e determinação de, principalmente, ânions inorgânicos, como, também, cátions inorgânicos, ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular e compostos iônicos organometálicos (HADDAD e JACKSON, 1990).

Na IC, a separação dos compostos pode ocorrer por diferentes mecanismos: troca iônica, exclusão iônica, interação iônica e pareamento iônico, sendo que a troca iônica é a mais comum. Em geral, o que vai definir o tipo de mecanismo de separação são as condições utilizadas, como o tipo de coluna (fase estacionária) e a fase móvel. (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009). Nos próximos itens serão descritas as principais características de cada mecanismo de separação, dependendo do tipo de coluna utilizada.

2.2.1.1 Coluna de troca iônica

A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação eletrostática dos íons da fase móvel com os íons de carga oposta da fase estacionária (HADDAD e JACKSON, 1990). O processo de troca iônica leva a um equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel. Assim, a separação dos íons ocorre dependendo da sua afinidade com os grupos funcionais da fase estacionária (FRITZ e GJERDE, 2009). Para a separação de ânions, a fase estacionária é composta de uma matriz insolúvel (M^+), carregada positivamente e seus contra-íons, de carga negativa (E^-). O processo de troca iônica pode ser ilustrado de acordo com a equação abaixo, onde M^+E^- representa o trocador de íons e A^- a solução contendo diferentes ânions. O equilíbrio de troca iônica é então formado entre os íons em solução da fase móvel (E^-) e os íons presente na solução da amostra (A^-).



Geralmente, para a cromatografia de troca iônica as fases estacionárias das colunas são grupos de amônio quaternário (HADDAD e JACKSON, 1990; HADDAD, NESTERENKO e BUCHBERGER, 2008; FRITZ e GJERDE, 2009). Há um amplo número de colunas disponíveis comercialmente para este tipo de separação, sendo que a escolha deve ser feita de acordo com a aplicação particular de cada caso. O tamanho da coluna utilizada depende de inúmeros fatores, como a eficiência cromatográfica e a estabilidade mecânica (HADDAD e JACKSON, 1990). As colunas mais comuns são de 15 a 25 cm, com um diâmetro interno de 4 a 4,6 mm (HADDAD e JACKSON, 1990), embora algumas colunas menores (2 mm de d.i.) estão disponíveis comercialmente (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a). O uso de colunas com d.i. menores tem, como principais vantagens, melhor resolução, quando comparado ao uso de uma coluna com diâmetro interno (d.i.) maior (NETO, 2009). Além disso, a vazão de fase móvel utilizada é bem menor, mantendo as mesmas condições de separação que uma coluna de d.i. maior, sendo assim, há um menor consumo de reagentes (POHL, 2013).

A maior parte das colunas disponíveis para a cromatografia de troca iônica possui fase estacionária empacotada com resinas esféricas com tamanho de partícula variando de 10 μm a 5 μm , sendo que algumas chegam a 4 μm (FRITZ e GJERDE, 2009; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a). O uso de partículas menores melhora a eficiência de separação, uma vez que o espaço entre as partículas de fase estacionária é minimizado. Quando a solução é injetada na coluna, há um equilíbrio entre a concentração dos analitos no interior das partículas e nos espaços vazios, fazendo com que os analitos sejam transferidos entre as duas fases. Com menor espaço vazio entre as partículas, os analitos possuem maior área superficial em contato com a fase estacionária, possibilitando assim uma melhora na separação (FRITZ e GJERDE, 2009; POHL, 2013).

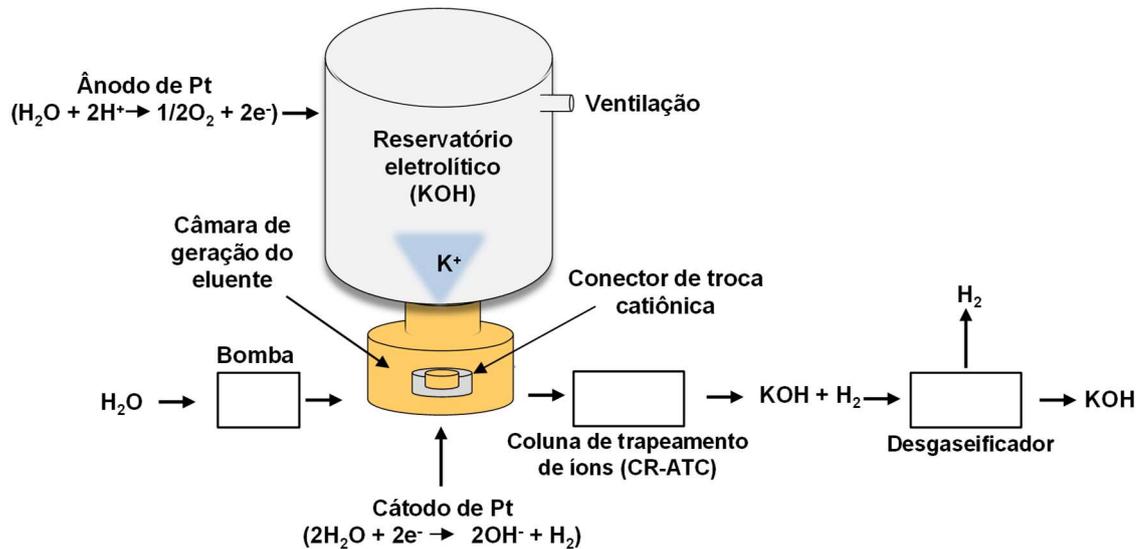
A separação de compostos aniônicos utilizando a cromatografia de íons requer que a solução esteja em pH alcalino. Desta forma, tem-se a garantia de que todas as espécies estejam na sua forma iônica, incluindo os ácidos orgânicos de cadeia simples e linear, de baixa massa molecular (até 10 carbonos). Além disso, a fase móvel deve possuir força iônica adequada para a eluição dos ânions e produzir produtos com condutividade baixa após passar pela coluna supressora. A mistura de soluções de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio foi amplamente utilizada durante muitos anos como fase móvel para a separação de ânions, pois seus produtos, após passar

pela coluna supressora, são ácido carbônico e dióxido de carbono, que podem ser facilmente eliminados por aeração (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009).

Mais recentemente, com o avanço das técnicas de supressão, a utilização de fase móvel baseada em hidróxidos, como por exemplo KOH e NaOH, vem sendo amplamente utilizada em cromatografia iônica (FRITZ e GJERDE, 2009). A principal vantagem da utilização deste tipo de fase móvel é a possibilidade destes íons serem suprimidos, formando somente água como produto e, gerando, assim, um menor sinal de linha base para a detecção, principalmente, por condutividade (FRITZ e GJERDE, 2009). Porém, para o uso de hidróxido como fase móvel, faz-se necessário o uso de colunas supressoras ou supressores com alta capacidade de troca catiônica. Ainda, é difícil eliminar todo o carbonato presente na solução de NaOH, podendo trazer instabilidade na linha base, além de alterações nos tempos de eluição dos íons (FRITZ e GJERDE, 2009; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a),

Como forma de contornar os problemas, principalmente da contaminação da fase móvel por CO₂, é recomendada a geração eletrolítica de íons hidróxido para a fase móvel. Desta forma, o produto é praticamente livre de carbonato, sendo necessária somente a reposição de água ultrapura como fase móvel. Com isto, são minimizados riscos de contaminação, erros do operador, além de permitir um gradiente de eluição mais exato e preciso, devido ao controle da concentração do reagente da fase móvel (STRONG, JOUNG e DASGUPTA, 1991; LOPEZ-RUIZ, 2000; FRITZ e GJERDE, 2009). A Figura 1 ilustra a um esquema para a geração eletrolítica da fase móvel utilizando cartucho de KOH (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2013).

Figura 1 - Esquema para a geração eletrolítica de fase móvel com cartucho Dionex EGC 500 KOH (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2013).



Fonte: Adaptação de Thermo Fischer Scientific (2013, p.9).

Como pode ser observado na Figura 1, no cátodo ocorre a eletrólise da água, gerando íons OH^- que serão contrabalaneados com os cátions K^+ do cartucho de eluente (solução saturada de KOH). Enquanto isso, no ânodo, são formados íons H^+ para manter o equilíbrio com os íons OH^- do cartucho (FRITZ e GJERDE, 2009). A principal vantagem é o controle da concentração de fase móvel por reação eletroquímica, sem necessidade de particionamento mecânico e, conseqüentemente, a possibilidade de gradientes com diferenças de 1 mmol L^{-1} na concentração do eluente (STRONG, JOUNG e DASGUPTA, 1991; FRITZ e GJERDE, 2009; POHL, 2013).

2.2.1.2 Coluna de exclusão iônica

A cromatografia de exclusão iônica foi desenvolvida para a determinação de ácidos fracos de cadeias curtas (ácidos carboxílicos, por exemplo), bases fracas (amônia e aminas) e espécies moleculares hidrofílicas (carboidratos, por exemplo) (FRITZ e GJERDE, 2009). Neste tipo de cromatografia, o sinal da carga da resina de troca iônica é o mesmo dos analitos, que são espécies pouco ionizáveis (HADDAD e JACKSON, 1990). No caso de espécies carregadas negativamente, como os ácidos orgânicos de cadeia curta e linear, a separação é feita em colunas de troca catiônica,

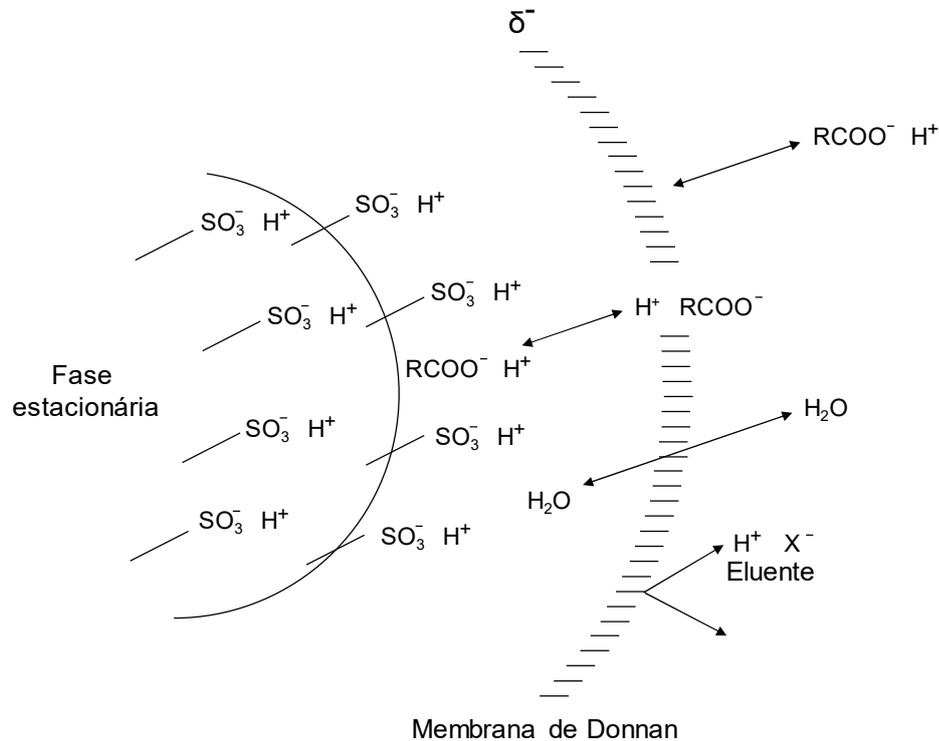
o oposto do que ocorre na cromatografia de troca iônica, utilizando fase móvel ácida (HADDAD e JACKSON, 1990).

Os mecanismos de retenção dos ácidos orgânicos utilizando este tipo de coluna estão baseados na exclusão de Donnan, exclusão por tamanho e adsorção/partição (HADDAD e JACKSON, 1990). Os ácidos, que estarão na sua forma neutra RCOOH, não estão sujeitos à exclusão de Donnan e podem penetrar nos poros da superfície carregada negativamente nas resinas, interagindo com a parte hidrofóbica da fase estacionária (KIHARA, ROKUSHIKA e HATANO, 1987 ;HADDAD e JACKSON, 1990). Desta forma, a separação acontece pelas diferenças no tamanho, bem como pela hidrofobicidade dos ácidos orgânicos (HADDAD e JACKSON, 1990; FISCHER, 2002). O mecanismo de exclusão de Donnan faz com que os ácidos mais fortes fiquem menos tempo retidos do que os ácidos mais fracos, de acordo com o aumento do pH.

Ainda, o mecanismo de adsorção faz com que os ácidos hidrofílicos eluam antes do que os ácidos mais hidrofóbicos (cadeias carbônicas maiores) (KIHARA, ROKUSHIKA e HATANO, 1987; BRUZZONITI, MENTASTI e SARZANINI, 1998). A eluição é, então, controlada pelos valores de pKa, pH, hidrofobicidade da resina e outros, como a temperatura e presença de solventes. Porém, conforme se aumenta o tamanho da cadeia carbônica, as forças de van der Waals entre os ácidos e a resina podem causar ordem de eluição diferente daquela predita pelo pKa (PITTMAN e LEWAN, 1994). Ácidos inorgânicos, como HCl, são totalmente excluídos nestes mecanismos e eluem no tempo morto (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009). Para os ácidos orgânicos, considera-se que o mecanismo de partição entre a fase móvel e a fase da resina seja o principal mecanismo de separação (FRITZ e GJERDE, 2009).

Para a separação de ácidos orgânicos por exclusão iônica, a maior parte das aplicações faz uso de colunas com fase estacionária de resina de poliestireno/divinilbenzeno (PS/DVB) completamente sulfonadas, com uma solução diluída de um ácido forte como eluente (HADDAD e JACKSON, 1990; MORRIS e FRITZ, 1994; XU et al., 1997; LOPEZ-RUIZ, 2000; LANG et al., 2010; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b). A Figura 2 ilustra um esquema para a separação dos ácidos orgânicos em uma coluna com fase estacionária de PS/DVB sulfonada e eluente ácido.

Figura 2 - Esquema mostrando a separação de ácidos fracos em colunas de exclusão iônica com fase estacionária de troca catiônica e eluente ácido.



Fonte: Adaptação de Fritz e Gjerde (2009).

A resina de troca iônica atua como uma membrana semipermeável (membrana de Donnan) entre o líquido dentro dos sítios da resina e a fase móvel entre a resina, permitindo que as espécies não iônicas se partitionem entre essas duas fases (FRITZ e GJERDE, 2009). Os ácidos orgânicos ($\text{RCOO}^- \text{H}^+$), na sua forma não ionizada, permeiam pela membrana e interagem com os sítios da fase estacionária. As espécies ionizadas ($\text{H}^+ \text{X}^-$) são excluídas da fase aquosa da membrana e passam rapidamente pela coluna. (FRITZ e GJERDE, 2009)

Como mencionado anteriormente, a cromatografia de exclusão iônica é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de ácidos orgânicos em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo (PITTMAN e LEWAN, 1994; FISCHER, 2002). Xu *et al.* (1997) fizeram a determinação dos ácidos C1 a C4 em amostras de solo, minerais e tetracloretileno, utilizando coluna de exclusão iônica Dionex IonPac ICE-AS1 e detecção por condutividade, com supressão química (fase móvel em modo isocrático de ácido perfluorbutírico (PFBA) 1 mmol L^{-1} , vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e regeneração externa do supressor com 4 mL min^{-1} de TBAOH 5 mmol L^{-1}). As amostras foram acidificadas com $2 \text{ } \mu\text{L}$ de H_2SO_4 6 mol L^{-1} , centrifugadas, e o

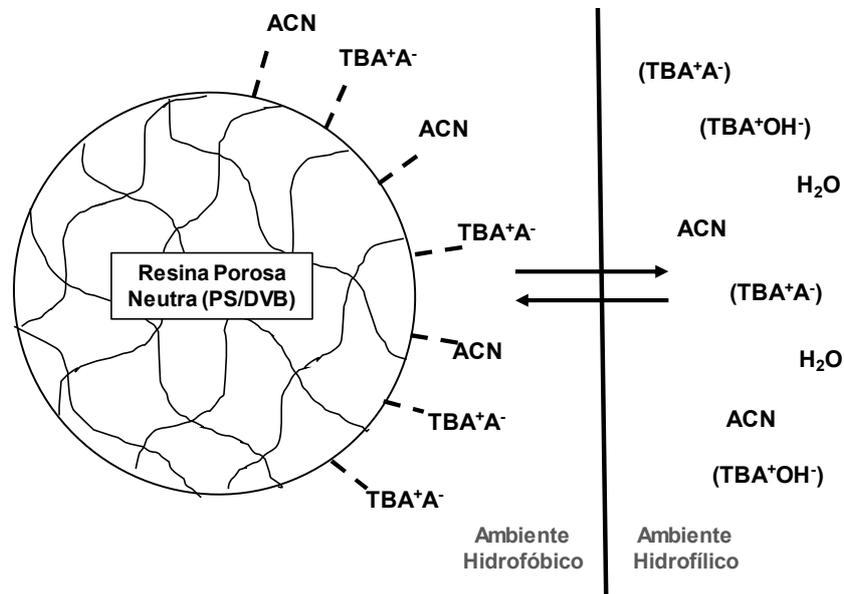
sobrenadante (0,6 mL) foi utilizado para a etapa de determinação. A separação dos ácidos C1 a C4 e do ácido láctico foi possível, sem interferências, em concentração total de íons inferior a 4000 mg L⁻¹. Além disso, para minimizar interferências de carbonato no sinal do ácido propiônico, as amostras foram diluídas ou acidificadas. Os limites de detecção (LODs) para os ácidos C1, C2, C3 e C4 foram de 0,02, 0,05, 0,05 e 0,10 mg L⁻¹, respectivamente. A faixa linear de calibração foi de 2 a 200 mg L⁻¹ para todos os ácidos avaliados (XU et al., 1997).

Lang *et al.* (2010) fizeram a determinação de C1 e C2 em amostras de águas do campo hidrotérmico de Lost City. A separação dos ácidos foi baseada no trabalho de Xu et al. (1997), porém, com o uso de padrão interno de ácido adípico para a determinação de C1 e C2 utilizando a cromatografia de exclusão iônica e detecção por condutividade. As amostras foram filtradas em cartuchos de 2,5 mL de Ba/Ag/H previamente à injeção no sistema cromatográfico. Os LOQs para C1 e C2 foram de 1 µmol L⁻¹, e as concentrações encontradas para C1 foram de 36 a 158 µmol L⁻¹ e para C2 foram de 1 a 35 µmol L⁻¹ (LANG et al., 2010).

2.2.1.3 Coluna de pareamento iônico

O mecanismo de pareamento iônico é baseado no uso de colunas padrões de fase reversa, com características mais hidrofóbicas, como, por exemplo, fases estacionárias de C18 e poliméricas, que são utilizadas em HPLC (FRITZ e GJERDE, 2009). Para a separação de compostos iônicos, nestas condições, é necessário o uso de um reagente de par iônico, que possui uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica na mesma molécula, de carga oposta à do analito. Estes reagentes podem ser catiônicos (geralmente sais de amônio) ou aniônicos (geralmente ácidos sulfônicos com cadeias carbônicas com mais de cinco carbonos) (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009). Devido à característica destes reagentes, a parte hidrofóbica da molécula se associa, por adsorção, na parte hidrofóbica da fase estacionária e, conseqüentemente, acaba criando uma superfície de troca iônica com a parte hidrofílica da molécula. Sendo assim, os íons acabam interagindo com a parte hidrofílica do reagente de par iônico e são, desta forma, separados (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009; ZHONG et al., 2010). A Figura 3 ilustra o esquema da separação para ânions em coluna de pareamento iônico.

Figura 3 - Esquema da separação de ânions (A^-) em colunas de pareamento iônico utilizando reagente de par iônico catiônico (hidróxido de tetrabutilamônio - TBAOH) em fase móvel de acetonitrila (ACN) e H_2O .

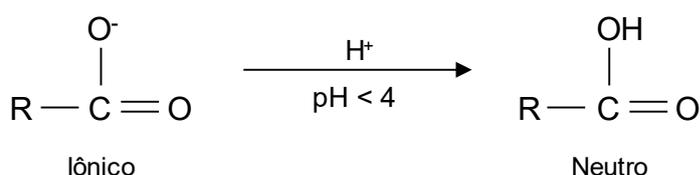


Fonte: Adaptação de Thermo Fischer Scientific⁵³ (2013, p. 9).

De acordo com o exemplo mostrado na Figura 3, a espécie aniônica A^- é separada utilizando uma fase móvel, por exemplo, de acetonitrila contendo TBAOH como reagente de par iônico. Os ânions são retidos pela combinação da sua interação com o TBA^+ , que é adsorvido na fase estacionária (região hidrofóbica) e pela interação do TBA^+ com a fase móvel (região hidrofílica). Quando ocorre a formação do par iônico TBA^+A^- , ocorre uma partição dos ânions entre as fases móvel e a fase estacionária (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009).

Na coluna de pareamento iônico, além da possibilidade da separação de íons utilizando reagente de par iônico, esta coluna pode ser utilizada também para a cromatografia de supressão iônica ou interação iônica (HADDAD e JACKSON, 1990). Este tipo de mecanismo leva em consideração o efeito do pH e as constantes de dissociação das espécies orgânicas ácidas e básicas. Desta forma, dependendo do pH de uma molécula orgânica iônica, como por exemplo um ácido orgânico, a ionização pode ser controlada pelo pH (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c). Neste caso, a separação de ácidos orgânicos, na sua forma não ionizada, ocorre pela interação da sua parte hidrofóbica com a fase estacionária, também hidrofóbica, da coluna, caracterizando uma separação comum em cromatografia líquida de fase reversa (FRITZ e GJERDE, 2009).

As colunas poliméricas, geralmente de PS/DVB, constituídas por fases estacionárias com superfícies hidrofóbicas, possuem grande afinidade por moléculas neutras ou não-iônicas e, normalmente, não possuem restrição quanto ao valor de pH (0-14) (HADDAD e JACKSON, 1990; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c). Assim, a retenção e a seletividade destas pode ser alterada com mudanças no pH. Ou seja, ácidos carboxílicos podem ser protonados em $\text{pH} < 4$, como pode ser observado na reação abaixo (WEISS, 2004; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017).



Fonte: Adaptação de Weiss (2004, p. 273)

Desta forma, os ácidos orgânicos, em sua forma neutra, podem também ser separados em colunas de fase-reversa, com simples ajuste de pH. As colunas de pareamento iônico, por possuírem estas características, podem ser utilizadas para a separação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida, sem a utilização do reagente de par iônico (RABIN et al., 1993).

2.2.1.4 Detectores

Para a IC, o detector considerado como universal e mais frequentemente usado é o detector de condutividade (HADDAD e JACKSON, 1990). Este tipo de detector, além de ser altamente sensível para espécies carregadas, normalmente é de baixo custo de manutenção e construção, além de operar por um longo tempo sem necessidade de manutenção (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). A detecção por condutividade é considerada como não seletiva, ou seja, todos os íons serão detectados, gerando um sinal. Assim, o detector deve ser capaz de responder a mudanças relativamente pequenas na condutividade total do eluente causada pelos íons, uma vez que a fase móvel, geralmente, possui eletrólitos que, também, vão gerar sinal no detector, sobressaindo ao sinal gerado pelo analito (WEISS, 2004; VIEHWEGGER, 2006; FRITZ e GJERDE, 2009).

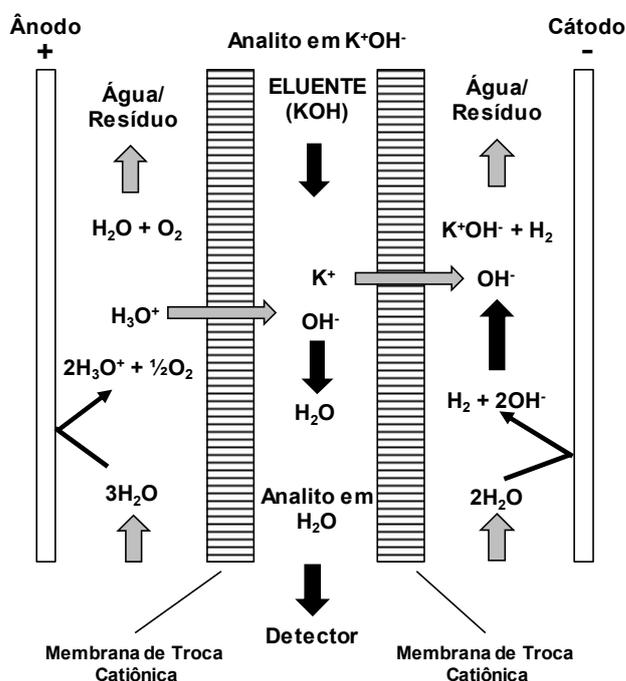
A fim de contornar este problema, faz-se necessário o uso de colunas

supressoras, logo após a coluna trocadora de íons. As colunas supressoras, de maneira geral, são responsáveis por converter os íons da fase móvel em espécies moleculares menos ionizadas, sem afetar a condutividade dos analitos (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). Para a separação de ânions, as colunas supressoras mais comuns são as químicas e consistem de colunas com membranas trocadoras de cátions. Os cátions da fase móvel (geralmente Na^+ ou K^+) são substituídos por íons H^+ , gerando espécies com menor condutividade de fundo, como ácido carbônico ou água, dependendo da fase móvel utilizada (WEISS, 2004).

O inconveniente da utilização destas colunas supressoras é a necessidade da regeneração para converter a membrana trocadora de cátions à sua forma ácida original (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). A regeneração dessas colunas é feita, geralmente, utilizando ácido sulfúrico diluído no sentido oposto ao da fase móvel nas membranas (HADDAD e JACKSON, 1990). Porém, nos anos 1980 foram desenvolvidos os supressores que operam continuamente, onde o eluente e as soluções supressoras fluem em direções opostas de cada lado da membrana permeável de troca iônica. (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009)

Além dos supressores químicos, posteriormente, foram desenvolvidos os supressores eletroquímicos (RABIN et al., 1993). Eles são compostos por três canais e duas membranas trocadoras de íons. O canal central é o do eluente e os laterais são para os regenerantes (RABIN et al., 1993; FRITZ e GJERDE, 2009). A Figura 4 ilustra o funcionamento geral de um supressor eletrolítico.

Figura 4 - Esquema de funcionamento de um supressor eletrolítico para ânions utilizando KOH como fase móvel e regeneração com água.



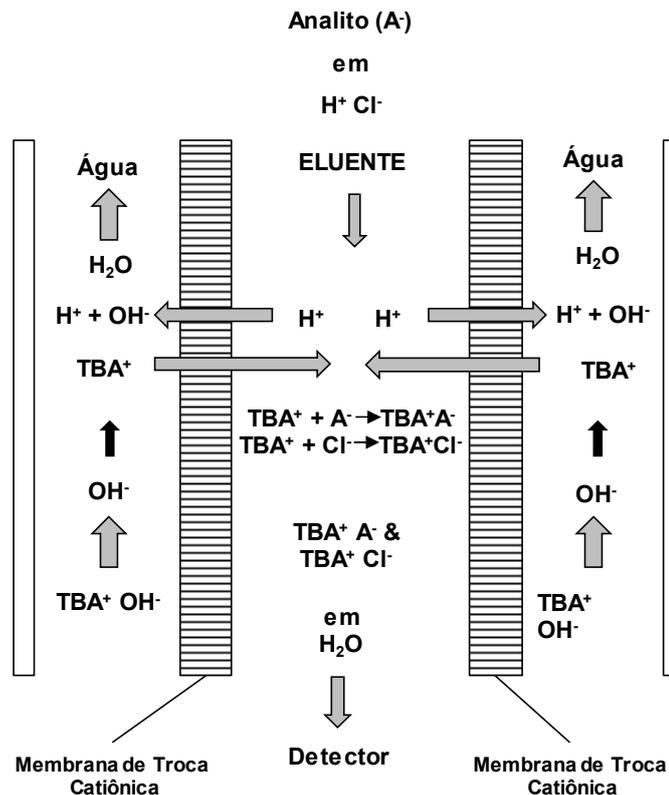
Fonte: Adaptação de Rabin *et al.* (1993, p. 101)

Para os supressores eletrolíticos de troca aniônica, como mostrado na Figura 4, nos canais laterais com o regenerante (H_2O), ocorre a eletrólise da água, com a formação do íon H_3O^+ , que é permeável pela membrana de troca catiônica e este, substitui o K^+ da fase móvel. O íon K^+ , por sua vez, que é permeável à membrana de troca catiônica, é direcionado para o cátodo, para contrabalancear os íons OH^- gerados na eletrólise. Desta forma, os analitos chegam para o detector em H_2O , o que reduz a condutividade de fundo (RABIN *et al.*, 1993; FRITZ e GJERDE, 2009). A principal vantagem da utilização deste tipo de supressor é a regeneração eletrolítica e contínua da membrana de troca catiônica, sendo que, desta forma, não é necessário o uso de uma solução ácida externa para a sua regeneração (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009).

Quando é utilizada a cromatografia de exclusão iônica, são necessários supressores específicos para este fim, devido ao fato de a fase móvel ser ácida (HADDAD e JACKSON, 1990; KARU, DICINOSKY e HADDAD, 2012). Desta forma, a Figura 5 ilustra o funcionamento de um supressor química utilizado com eluentes ácidos na separação de ácidos orgânicos. Cabe salientar que este tipo de supressor

pode ser utilizado, também, em aplicações com colunas de pareamento iônico, para separação em mecanismo de supressão iônica.

Figura 5 - Esquema de funcionamento de um supressor químico para ácidos orgânicos utilizando ácido clorídrico como fase móvel e regeneração com TBAOH.



Fonte: Adaptação de Haddad⁴⁰ (1990, p. 274).

O supressor químico, utilizado com eluente ácido, possui como regenerante uma solução alcalina. Como é mostrado na Figura 5, os íons H^+ da fase móvel são permeados pela membrana de troca catiônica e são substituídos pelos íons TBA^+ do regenerante. O par iônico TBA^+A^- , por sua vez, possui uma condutividade de fundo relativamente menor quando comparada à condutividade do ácido da fase móvel (HADDAD e JACKSON, 1990).

Outro tipo de detector comumente utilizado para a cromatografia é o detector de ultravioleta (UV) e visível (Vis). Isto se deve ao fato de que praticamente todas as moléculas orgânicas possuem grupos cromóforos que são capazes de absorver na região do UV ou Vis (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009). É importante salientar que o eluente, nestes casos, não deve absorver nos

comprimentos de onda monitorados para os analitos. A absorção da luz depende do tipo da molécula, da concentração, do caminho óptico e do comprimento de onda utilizado (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009).

Além destes detectores, o uso da espectrometria de massas (MS) vem ganhando popularidade, devido à, principalmente, a alta sensibilidade e possibilidade de identificação das espécies, além do desenvolvimento da interface coluna/detector que permite o uso acoplado às técnicas de separação (HADDAD e JACKSON, 1990; MASCOLO et al., 2005; FRITZ e GJERDE, 2009; HEADLEY, PERU e BARROW, 2009; MILLER e SCHNUTE, 2016; CASS e CASSIANO, 2015). A espectrometria de massas é baseada na produção de íons que são, posteriormente, separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) (NIESSEN, 2006). Os espectrômetros de massa são constituídos por três partes principais: a interface, onde os íons são gerados, o analisador de massas e o detector, que na maioria dos casos, é um multiplicador de elétrons (MEYER, 2004). Na interface, é onde ocorre a formação dos íons em estado gasoso. As fontes de ionização utilizadas é quem vai ditar o escopo e a utilidade dos métodos espectrométricos e podem ser classificadas como duras ou moles (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). As fontes duras fornecem energia suficiente para que sejam rompidas algumas ligações, produzindo fragmentos de íons que possuem razões massa/carga menores do que o íon molecular. Já as fontes moles são de menor energia, causando pouca fragmentação, geralmente, somente o íon molecular (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009).

Dependendo da aplicação, a IC pode ser combinada com a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de massas e ionização por eletronebulização (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI) (HADDAD, NESTERENKO e BUCHBERGER, 2008; FRITZ e GJERDE, 2009). Para ânions e ácidos orgânicos de baixa massa molecular, a fonte de ionização mais utilizada é a ESI (HADDAD e JACKSON, 1990; LOPEZ-RUIZ, 2000). A amostra, em solução, é introduzida em um capilar metálico com pequeno diâmetro interno, no qual é aplicada uma diferença de potencial. Essa voltagem provoca a separação das cargas neutralizando os contra-íons de carga oposta ao do modo de ionização. As gotas que emergem do capilar são altamente carregadas e são dessolvatadas por um gás inerte, geralmente nitrogênio, em temperaturas próximas de 350 °C, até que o tamanho é suficientemente reduzido, gerando um aumento de densidade de carga. A repulsão eletrostática na superfície da gota faz com que ocorra uma explosão de

Coulomb, formando gotas cada vez menores e conseqüente formação de íons em fase gasosa, que são então conduzidos para a região de alto vácuo do espectrômetro de massas para análise (CASS e CASSIANO, 2015).

Para as aplicações de IC-MS, a saída da coluna é conectada diretamente no espectrômetro de massas (FRITZ e GJERDE, 2009). A principal vantagem do uso deste tipo de detector são os LODs relativamente baixos para algumas espécies, além da possibilidade de medir diferentes isótopos de um mesmo elemento (HADDAD, NESTERENKO e BUCHBERGER, 2008; MILLER e SCHNUTE, 2016). Entretanto, o processo de ionização na interface ESI é intermediado pelo solvente, no caso a fase móvel do sistema, sendo assim, as propriedades físico-químicas dos solventes influenciam diretamente no processo de ionização e, conseqüentemente, na resposta analítica (CASS e CASSIANO, 2015). Em casos de eluição por gradiente, com a mudança na concentração do solvente e, conseqüentemente, na tensão superficial, ocorre uma mudança na nebulização e conseqüente resposta do equipamento (WEISS, 2004).

Para evitar problemas com a ionização dos analitos por ESI, o uso de supressão após a separação é fundamental, principalmente quando é utilizada a fase móvel de carbonato e bicarbonato de sódio. Estes compostos, se presentes na solução, podem formar resíduos não voláteis durante a ionização, depositando-se no cone e, eventualmente, bloquear a sua entrada. Além disso, soluções com alta concentração (KUBICA et al., 2015) de ânions como cloreto e sulfato também podem interferir na ionização dos compostos (WEISS, 2004).

É importante mencionar que tais detectores, como os de condutividade, UV/Vis e MS, podem ser utilizados individualmente em um sistema cromatográfico, bem como em sequência, proporcionando maior quantidade de informação para o operador. O detector a ser utilizado deve ser escolhido de acordo com as espécies a serem analisadas, bem como com as características da fase móvel empregada na separação cromatográfica.

2.3 ALTERNATIVAS PARA REMOÇÃO DE CLORETO DE MATRIZES SALINAS

Para a maior parte dos métodos utilizando separação cromatográfica, o máximo tolerado de sal é, geralmente, menor que 1% (HUANG et al., 2000; KUBICA et al., 2015). Levando-se isso em consideração, em amostras salinas, altos fatores de

diluição são necessários (10 a 20 vezes), o que aumenta os LOQs, limitando a aplicabilidade dos métodos. Desta forma, são necessárias alternativas para remover esse sal, sem perdas de analito (KUBICA et al., 2015).

A utilização de cartuchos de prata para a eliminação de Cl^- é uma alternativa. Porém, com a utilização destes cartuchos pode ocorrer a coprecipitação dos analitos bem como a liberação da Ag^+ pode causar entupimentos na coluna devido à precipitação de AgCl . Ainda, estes cartuchos possuem um custo elevado, o que inviabiliza as análises de rotina (HADDAD, 1989; BRUNO et al., 2003).

Entre as alternativas para a remoção de sal de matrizes, podemos citar métodos de preparo de amostras baseados em extração em fase sólida (KUBICA et al., 2015; HADDAD, 1989; MULLER e SEUBERT, 2012a; MULLER E SEUBERT, 2012b). Estes métodos baseiam-se, basicamente, na retenção dos íons de interesse em um cartucho de fase sólida, lavagem deste para eliminação da matriz e posterior eluição com solvente adequado. As fases estacionárias utilizadas nos cartuchos vão depender dos íons a serem determinados (HADDAD, 1989).

Kubica *et al.* (2015) utilizaram cartuchos com fase estacionária de C18 para a pré-concentração de ácidos fluorobenzóicos (FBAs) em águas com teor de sal maior do que 20%. Os cartuchos foram condicionados utilizando 2 alíquotas de 2 mL de acetonitrila, seguidos por mais 2 alíquotas de 2 mL de H_2O . Em seguida, foram adicionados 2 mL da amostra, seguidos de 2 mL de H_2O para a remoção de sais e compostos polares. Os cartuchos foram, então, secos com fluxo de nitrogênio e a eluição foi feita com 2 alíquotas de 2 mL de acetonitrila: 10% NH_4OH (8:2 v/v). Os extratos foram evaporados sob vácuo e os resíduos dissolvidos em 1 mL de acetonitrila 10% (v/v). Foram obtidas recuperações maiores que 90% para 16 dos 19 ácidos analisados, com a eliminação de mais de 99% do sal da matriz. Os FBAs foram determinados por HPLC-MS/MS com LOQs de 10 a 20 vezes menor do que quando comparados a procedimentos sem a eliminação da matriz (KUBICA et al., 2015).

Uma alternativa utilizada para a remoção de sal é a utilização de sistemas bidimensionais (MILLER e SCHNUTE, 2016). Nestes sistemas, geralmente, são utilizadas duas colunas, ou dois conjuntos de colunas, sendo que na primeira ocorre a separação da matriz e, na segunda coluna, ocorre a separação dos íons de interesse (FRITZ e GJERDE, 2009).

Zakaria *et al.* (2011) utilizaram um sistema tridimensional, com três colunas de troca iônica para a separação de cloreto e sulfato de água do mar e determinação de

bromato. Com isso, foi possível a injeção de amostras não diluídas diretamente no sistema cromatográfico. Nestes sistemas, são utilizadas duas válvulas de desvio, uma para a injeção na primeira dimensão e outra para a injeção na segunda dimensão. Assim, é possível separar os íons de interesse, transferindo os analitos da coluna da primeira dimensão para a coluna da segunda dimensão, eliminando a maior parte dos interferentes da matriz. Para a primeira dimensão foi utilizada uma coluna de troca iônica Dionex IonPac AS19 - Thermo Fisher Scientific (5 mmol L^{-1} de KOH, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) e para a segunda e terceira dimensão uma ou duas colunas, também de troca iônica, Dionex IonPac AS24 - Thermo Fisher Scientific (20 mmol L^{-1} de KOH, $0,25 \text{ mL min}^{-1}$). Com a utilização do sistema tridimensional, os LOQs para bromato foram de 1050 (sistema bidimensional) para $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (sistema tridimensional) (ZAKARIA et al., 2011).

Este tipo de aplicação também foi utilizado para a determinação de nitrito, nitrato e fosfato em água do mar (BRUNO et al., 2003), bem como perclorato em matrizes contendo até 1000 mg L^{-1} de cloreto, sulfato e bicarbonato. A principal vantagem da utilização deste tipo de sistema é a eliminação dos interferentes da matriz, no caso o Cl^- , sendo que não é necessária nenhuma etapa de preparo de amostra (HUANG et al., 2000; BRUNO et al., 2003; ZAKARIA et al., 2011).

A cromatografia bidimensional também pode ser feita utilizando-se duas colunas com mecanismos de separação diferentes, desde que o eluente seja adequado. Bruno *et al* (2003) utilizaram cromatografia bidimensional para a separação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Para isto, na primeira dimensão, foi utilizada uma coluna de troca iônica Dionex IonPac AS11-HC (gradiente com geração de eluente de KOH, $1,5 \text{ mL min}^{-1}$), seguido de um supressor eletroquímico para a neutralização da fase móvel. A segunda dimensão é composta por uma coluna de fase reversa Dionex Acclaim C18 (eluente neutralizado, vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$). A detecção foi feita por UV (BRUNO et al., 2003).

A determinação de C1, C2, C3, C4 e C5 foi feita por Miller e Schnute (2016) em água do mar utilizando sistema bidimensional com colunas de troca iônica e detecção por MS. Na primeira dimensão, os ácidos orgânicos são separados da matriz, que no caso é constituída, na sua maioria, de Cl^- e na, na segunda dimensão, estes ácidos são novamente separados, possibilitando, assim, uma melhor resolução de sinal. O sistema foi montado com coluna Dionex IonPac AS24 (Thermo Fisher Scientific) na primeira dimensão e coluna Dionex IonPac AS11-HC na segunda dimensão, utilizando

gradiente de fase móvel com geração de eluente (KOH), vazão de 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 35 °C, volume de injeção de 25 µL e supressão eletrolítica. Para o MS, o monitoramento foi feito no modo negativo de monitoramento de íon selecionado (SIM), com temperatura do probe de 450 °C e voltagem da agulha de 3 kV. A voltagem aplicada no cone de amostragem foi de 50 V para o C1 e 45 V para os demais ácidos (C2, C3, C4 e C5). Os LODs obtidos para C1, C2, C3, C4 e C5 foram de 200, 100, 15,5, 7,8, 5,6, e 3,8 µg L⁻¹, respectivamente (MILLER e SCHNUTE, 2016).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação dos métodos analíticos envolve uma série de experimentos para a comprovação de que um método analítico produza informações e tenha as características necessárias para a obtenção dos resultados confiáveis. Vários guias estão disponíveis com as normas para serem seguidas, entre eles o da Conferência Internacional em Harmonização (ICH, do inglês, *International Conference on Harmonisation*), (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005) da norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISSO/IEC 17025:2005 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005), do Eurachem Guide (MAGNUSSON e ORNEMARK, 2014), e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018) que publicou o documento “Orientações sobre a validação de métodos analíticos”. Cabe salientar que o documento do INMETRO é baseado nos outros guias internacionais e nas normas ABNT.

De acordo com o INMETRO, os parâmetros de desempenho que devem ser avaliados são seletividade, linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho, sensibilidade, LOD e LOQ, recuperação, precisão e, robustez, sendo que este último é considerado opcional. A robustez é, normalmente, realizada previamente à validação do método, na etapa de otimização (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

A seletividade é definida como a capacidade do método quantificar o analito na presença de outros analitos ou da matriz (AOAC INTERNATIONAL, 2002). Para a avaliação deste parâmetro, é recomendado ensaios com padrões ou materiais de referência em amostras com e sem o analito, na presença da matriz e/ou interferentes

(AOAC INTERNATIONAL, 2013).

A faixa de trabalho é a definição do intervalo entre a maior e a menor concentração do analito para qual se demonstra que o procedimento analítico tem precisão, exatidão e linearidade aceitáveis (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005). Ainda, a faixa linear é a faixa de concentração em que os resultados obtidos são proporcionais, linearmente, à concentração do analito (MAGNUSSON e ORNEMARK, 2014). A sensibilidade é definida como a inclinação da curva analítica e representa o quanto uma mudança na resposta do equipamento corresponde a uma mudança na concentração medida (MAGNUSSON e ORNEMARK, 2014; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Cabe salientar que a recomendação do INMETRO é de que, para a construção da curva analítica são necessários, no mínimo, 5 níveis de concentração. A análise da linearidade da curva não é analisada apenas pela observação do coeficiente de determinação (R^2), mas também pela análise dos dados quando a ausência de *outliers* e da homoscedasticidade (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

O LOQ é definido como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Geralmente, o LOQ é definido como o valor do padrão de calibração de menor concentração, excluindo-se o branco. Há várias maneiras aceitas para o cálculo do LOQ, entre a avaliação e percepção visual, a relação sinal ruído, a estimativa a partir da curva analítica ou pelo desvio padrão do branco (INMETRO, 2018). Em cromatografia, a utilização da razão sinal/ruído e o desvio do branco são mais difíceis, sendo que o LOQ é calculado, geralmente, através da avaliação visual. Para isto, são feitas sucessivas diluições de uma solução de referência até encontrar a menor concentração que pode ser quantificada com confiança (exatidão e precisão adequadas) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

O LOD pode ser definido levando-se em consideração os mesmos aspectos que o LOQ. É caracterizado como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Assim como para o LOQ, em cromatografia, a utilização da relação sinal ruído é dificultada, e a sua determinação pode ser feita a partir do valor obtido para o LOQ, de acordo com a equação (2).

$$LOD = \frac{LOQ}{3,3} \quad (2)$$

Para os ensaios de avaliação da exatidão, tanto de materiais de referência certificados, quanto para as recuperações de analito, alguns critérios são adotados, os quais, normalmente, estão atrelados ao nível de concentração de analito na amostra (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Os critérios adotados para a aceitação dos ensaios de recuperação preconizados pela Associação de Analistas Químicos Oficiais (AOAC), os quais foram utilizados neste trabalho, estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios de aceitação para ensaios de recuperação.

Analito, %	Unidade	Recuperação média, %
100	100%	98 a 102
10	10%	98 a 102
1	1%	97 a 103
0,1	0,1%	95 a 105
0,01	100 mg kg ⁻¹	90 a 107
0,001	10 mg kg ⁻¹	80 a 110
0,0001	1 mg kg ⁻¹	80 a 110
0,00001	100 µg kg ⁻¹	80 a 110
0,000001	10 µg kg ⁻¹	60 a 115
0,0000001	1 µg kg ⁻¹	40 a 120

Fonte: Adaptação de AOAC INTERNATIONAL (2016, p. 9).

A repetibilidade é uma condição de medição, dentro de um conjunto de condições, que incluem o mesmo procedimento de medição, o mesmo operador, o mesmo sistema, as mesmas condições de operação e o mesmo local. Ela pode ser expressa como a dispersão dos resultados, por meio da análise de padrões, material de referência ou adição de analito ao branco da amostra (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Na Tabela 3 estão mostrados os critérios preconizados pela AOAC para a aceitação de repetibilidade e que foram utilizados neste trabalho.

Tabela 3 - Critérios de aceitação para repetibilidade.

Analito, %	Unidade	Desvio padrão relativo, %
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,1	0,1%	3,7
0,01	100 mg kg ⁻¹	5,3
0,001	10 mg kg ⁻¹	7,3
0,0001	1 mg kg ⁻¹	11
0,00001	100 µg kg ⁻¹	15
0,000001	10 µg kg ⁻¹	21
0,0000001	1 µg kg ⁻¹	30

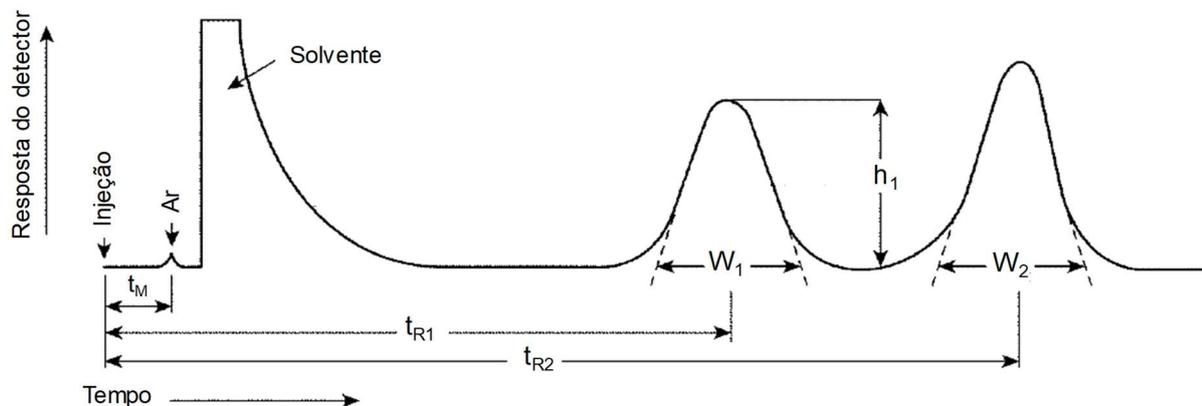
Fonte: Adaptação de AOAC INTERNATIONAL (2016, p. 9).

De acordo com as Tabelas 2 e 3, quanto menor for a concentração de analito na amostra, maior é a faixa de aceitação, tanto para recuperação, quanto para repetibilidade. Cabe salientar que estes dados foram utilizados como referência para a avaliação dos resultados tanto para as recuperações quanto para as repetibilidades usadas neste trabalho.

A precisão intermediária é a avaliação dos resultados de uma mesma amostra, determinada no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes e operadores distintos. Ainda, a reprodutibilidade deve ser medida pela proximidade dos resultados obtidos para a mesma amostra em laboratórios diferentes. Este parâmetro é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos. (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

Ainda, para critérios de validação do método, foram avaliados alguns parâmetros cromatográficos como o número de pratos teóricos (N), fator de retenção (k), fator de separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_s). Na Figura 6 é mostrado um cromatograma padrão indicando as principais variáveis utilizadas para os cálculos destes parâmetros.

Figura 6 - Cromatograma padrão para a separação de duas substâncias.



Fonte: Adaptação de United States Pharmacopoeia <621>. Acesso em: 02 nov. 2022.

O número de pratos teóricos é uma medida para avaliação da eficiência da coluna em condições específicas e é calculado de acordo com a equação (3) (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009; BLIESNER, 2006). O N é uma medida da qualidade da separação cromatográfica e representa o número de etapas de equilíbrio entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel. Desta forma, quanto maior o N , melhor é a separação apresentada pela coluna para um determinado analito, sendo que os valores aceitáveis são $N \geq 1000$ (BLIESNER, 2006).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (3)$$

Onde N = número de pratos teóricos, t_R = tempo de retenção e W = largura do pico na linha base.

O fator de retenção (k), ou fator de capacidade, definido pela equação (4), é determinado pela razão do tempo que a substância fica na fase estacionária pelo tempo que ela fica na fase móvel (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). Este parâmetro é utilizado, geralmente, na comparação de um mesmo analito em colunas diferentes ou em alterações de fase móvel. Os valores de k devem estar entre 2 e 10, (BLIESNER, 2006) sendo que $k < 2$ significa pouca interação do analito com a fase estacionária e, conseqüentemente, $k > 10$, uma forte interação com a fase estacionária, indicando um tempo longo de corrida cromatográfica (POOLE, 2003).

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (4)$$

Onde k = fator de retenção, t_R = tempo de retenção e t_M = tempo morto.

Em uma corrida cromatográfica, quando dois ou mais compostos apresentam o mesmo valor de k , significa que estes não podem ser separados naquelas condições. Assim, o fator de separação (α) mostra o grau de separação entre dois compostos adjacentes, e é definido pela equação (5). Desta forma, para que ocorra a separação dos compostos, o valor de α é sempre > 1 (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (5)$$

Onde α = fator de separação, k_1 e k_2 = fator de separação dos dois componentes.

A resolução é definida como a capacidade de separação de dois componentes de uma mistura e é calculada de acordo com a equação (6) (HOLLER, CROUCH e SKOOG, 2009). Para as análises cromatográficas, é desejável que os valores sejam $R_s > 1,5$. Este valor significa que os sinais estão separados um do outro até a linha base (BLIESNER, 2006).

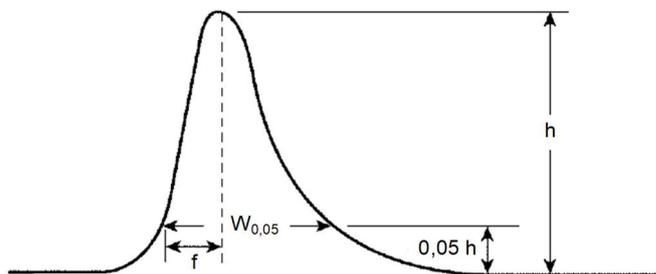
$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2} \quad (6)$$

Onde R_s = resolução, t_{r1} e t_{r2} = tempos de retenção dos dois componentes e W_1 e W_2 = largura dos respectivos sinais obtida na base na linha base.

A simetria de um pico cromatográfico é determinada pelo fator de assimetria, também conhecido como *tailing factor*, definido pela equação (7) (POOLE, 2003). Os parâmetros utilizados para o cálculo de A_s estão mostrados na Figura 7.

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (7)$$

Onde A_s = assimetria, $W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura e f = distância da altura máxima do pico até a vanguarda do sinal, medido a 5% da altura.

Figura 7 - Sinal cromatográfico assimétrico e parâmetros para cálculo de A_s .

Fonte: Adaptação de United States Pharmacopoeia <621>. Acesso em: 02 nov. 2022.

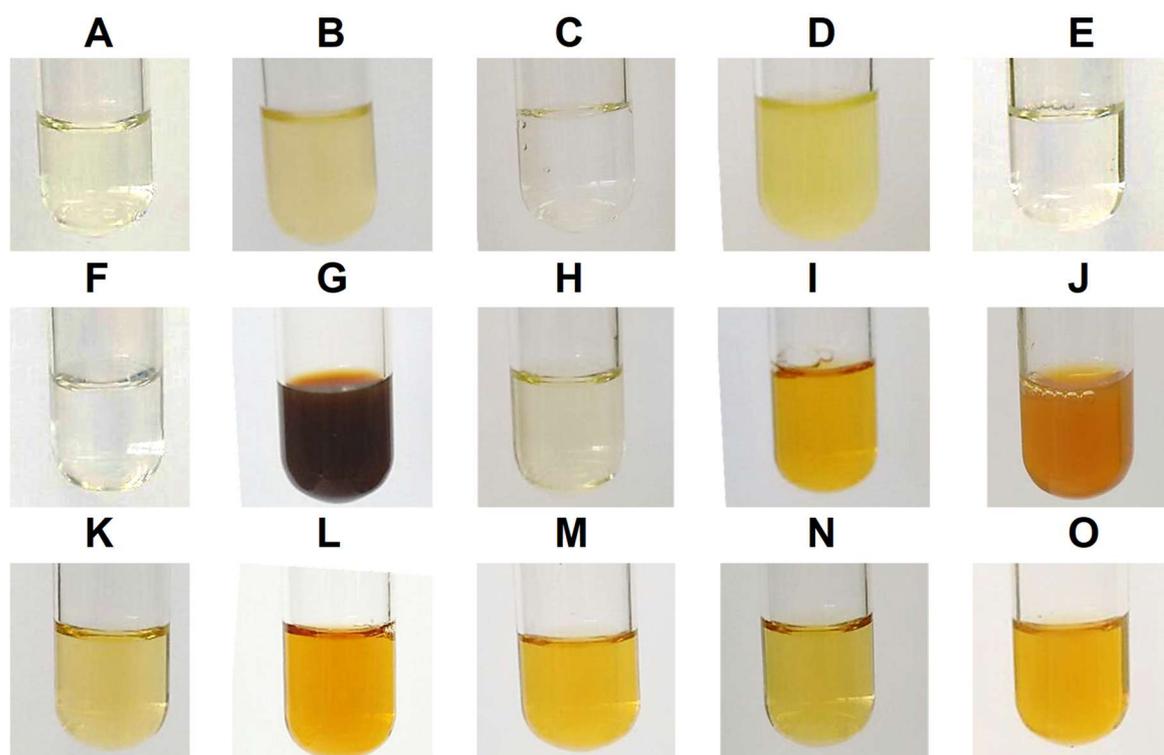
Picos com $A_s > 2$ são indesejáveis, devido a dificuldade de determinar o começo e o final do sinal, dificultando a integração. Sinais com altos valores de assimetria indicam que o método de separação não foi otimizado adequadamente para o analito em questão (BLIESNER, 2006) O valor ideal de A_s é 1,0, o que indica que o sinal é totalmente simétrico (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

As amostras de água separadas das emulsões de petróleo (Figura 8) foram enviadas pelo Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES), em frascos de vidro âmbar com, aproximadamente, 120 mL cada, e identificadas como “A” a “O”. Para conservação, as amostras foram mantidas nos frascos originais, ao abrigo da luz e refrigeradas (aproximadamente 2 °C). Para a quantificação de ácidos orgânicos, cloreto e pH, sem etapa de preparo, as amostras foram filtradas em filtros de politetrafluoretileno (PTFE), de 0,22 µm, previamente às diluições.

Figura 8 - Aspecto das amostras de água separadas de emulsões de petróleo utilizadas neste trabalho.



A água utilizada neste trabalho foi destilada, desionizada em uma coluna de troca iônica e, posteriormente, purificada em um sistema Milli-Q® (Milli-Q® Ultrapure Water Purification Systems, Millipore, EUA) apresentando resistividade final de 18,2 MΩ cm. Acetonitrila e metanol (grau LC-MS, Merck, Alemanha) e ácido

heptafluorbutírico - HPFB (Sigma Aldrich, Alemanha) foram utilizados no preparo das fases móveis para cromatografia. Além disso, para o preparo das soluções regenerantes utilizadas na supressão, foi utilizado hidróxido de tetrabutilamônio hidratado - TBAOH ($C_{16}H_{37}NO \cdot 30H_2O$) (Sigma Aldrich) e hidróxido de potássio P.A (Sigma Aldrich). Para acidificar a fase móvel, bem como para o ajuste de pH, foi utilizado ácido clorídrico 37% (Sigma Aldrich) diluído em água. A simulação de matriz e verificação de possíveis interferências na presença de sal foi feita utilizando cloreto de sódio P.A. (Merck, Alemanha). Ar comprimido foi utilizado na pressurização dos frascos contendo a solução regenerante (*4 L pressurizable regenerant reservoir*, Thermo Scientific, EUA).

Para a determinação dos ácidos orgânicos por cromatografia foram utilizados padrões monoelementares dos ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), hexanóico (C6), heptanóico (C7), octanóico (C8), nonanóico (C9) e decanóico (C10) (Sigma Aldrich). Para a determinação de ânions por cromatografia foi utilizada uma solução de referência multielementar 10 mg L^{-1} (Fluka, Sigma Aldrich). Ainda, foram utilizados padrões puros, grau P.A., clorato de potássio (Merck), bromato de potássio (Merck) e nitrito de sódio (Merck) para o preparo de soluções estoque de 1000 mg L^{-1} .

A avaliação da exatidão foi feita utilizando material de referência certificado (CRM 46975) *Volatile free acid mix*, 10 mmol L^{-1} (TraceCERT®, Sigma Aldrich), contendo os seguintes ácidos: fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isopentanóico, pentanóico, iso-hexanóico, hexanóico e heptanóico.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para a determinação de ânions e ácidos orgânicos foi utilizado um cromatógrafo de íons Dionex ICS 5000+ (Thermo Scientific) equipado com: módulo contendo duas bombas, uma para eluição isocrática, com um canal, e outra que possibilita a eluição por gradiente, com quatro canais, (DP 5000+ *Dual Gradient/isocratic Pump*); compartimento para a utilização de até duas colunas, dois supressores e dois detectores de condutividade (DC *Detector and Chromatography*); amostrador automático (AS-AP *Autosampler*); dois detectores de condutividade (ICS-5000 *Analytical CD Conductivity Detector*); um detector por UV (ICS-Series *Variable Wavelength Detector VWD*); sistema de geração de fase móvel (EG *Eluent Generator*)

com cartucho contendo solução saturada de KOH (EGC 500 KOH). O sistema possui, ainda, um detector por espectrometria de massas (MSQPlus *Single Quadrupole Mass Spectrometer*) equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) e com bomba auxiliar para limpeza da interface (AXP-MS *auxiliary pump*).

Para a determinação de ânions e ácidos orgânicos por troca iônica, foi utilizada uma coluna analítica Dionex IonPac AS11-HC-4 μm (2 x 250 mm), pré-coluna Dionex IonPac AGH11-HC-4 μm (2 x 50 mm), com modo de supressão eletrolítica de troca aniônica Dionex (AERS 500 2mm *Anion Electrolytically Regenerated Suppressor*) e detector de condutividade (CD).

A determinação de ácidos orgânicos em coluna de exclusão iônica, foi feita utilizando uma coluna analítica Dionex IonPac ICE-AS1 (4 x 250 mm), pré-coluna Dionex IonPac ICE-AG1 (4 x 35 mm), detecção por CD, ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (MS). Finalmente, a determinação de ácidos orgânicos por pareamento iônico foi utilizando uma coluna analítica Dionex IonPac NS1 10 μm (4 x 250 mm), pré-coluna Dionex IonPac NG1 10 μm (4 x 35 mm) e detector por MS e supressor químico (ACRS-ICE 500 4 mm *Anion Chemically Regenerated Suppressor*) utilizando regeneração externa com hidróxido de potássio 2,5 mmol L⁻¹.

Na Figura 15 (ver no final deste capítulo, *3 Materiais e Métodos*) é mostrado um resumo das atividades realizadas para a determinação de ácidos orgânicos nas amostras de água separadas de emulsões de petróleo e as otimizações feitas utilizando os diferentes tipos de colunas.

A determinação de cloro foi feita em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha). Este espectrômetro é equipado com nebulizador pneumático do tipo cross-flow (Spectro Analytical Instruments), câmara de nebulização de duplo passo (Scott, Spectro Analytical Instruments) e tocha com injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno (Spectro EOP Quartz Torch, Glass Expansion, Austrália). Para as determinações, a potência do gerador de radiofrequência foi de 1500 W, e as vazões de argônio, como gás principal, auxiliar e nebulizador foram de 12, 1,0 e 1,0 L min⁻¹, respectivamente. O comprimento de onda monitorado para Cl⁻ foi de 134,724 nm.

A determinação de pH para a caracterização das amostras foi feita utilizando um pHmetro (Digimed DM-20, Brasil) com eletrodo de pH (*electrode plus 6.0262.100*, Metrohm, Suíça). A calibração e verificação foi feita com soluções tampão de pH 4 e

pH 7. Para a quantificação, foram utilizados 3 mL de amostra previamente homogeneizados, manualmente. Os procedimentos de pesagem foram efetuados em balança analítica (AY220, Shimadzu, Brasil) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

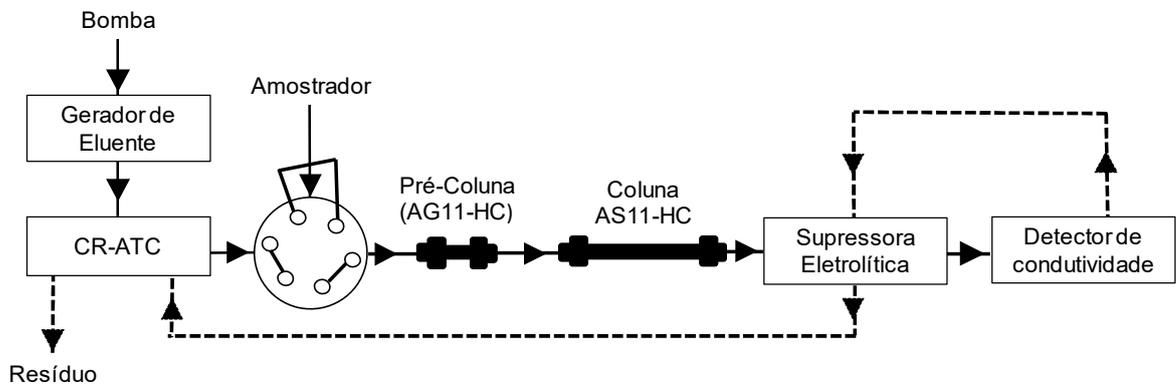
3.3 DETERMINAÇÃO DE ÂNIONS E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA

Para a determinação de ânions e ácidos orgânicos por cromatografia foram testados e otimizados três tipos de colunas diferentes, disponíveis no laboratório. Inicialmente, foram feitos alguns testes utilizando coluna de troca iônica, que é o sistema comumente utilizado, principalmente, na determinação de ânions. Posteriormente, foram utilizadas as colunas de exclusão iônica e pareamento iônico para a quantificação de ácidos orgânicos.

3.3.1 Coluna de troca iônica

As condições utilizadas para a separação utilizando a coluna de troca iônica foram, inicialmente, baseadas em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a). Para a separação em coluna de troca iônica, a fase móvel utilizada foi gerada eletroquimicamente a partir de uma solução de hidróxido de potássio (cartucho de gerador de eluente). Após a geração da fase móvel, a solução passa por uma coluna de trapeamento de íons (CR-ATC), para remover possíveis ânions interferentes, como cloreto e sulfato, que possam estar presentes na água. A regeneração, tanto do supressor, quanto da CR-ATC, foi feita com a própria solução que sai do CD. A Figura 9 mostra um esquema do sistema cromatográfico para a utilização de cromatografia de troca iônica.

Figura 9 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ânions e ácidos orgânicos utilizando cromatografia de troca iônica.



Para as otimizações, foi utilizada solução de referência contendo 5 mg L^{-1} dos ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), heptanóico (C7) e octanóico (C8), além de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ dos ânions F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} . Cabe salientar que os ácidos orgânicos, devido às condições utilizadas na cromatografia de troca iônica, estarão na sua forma dissociada.

Inicialmente, foram avaliadas diferentes temperaturas do compartimento da coluna (25 , 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$), seguido de mudanças no programa de eluição de gradiente. A Tabela 4 mostra as condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a) utilizadas nos testes iniciais.

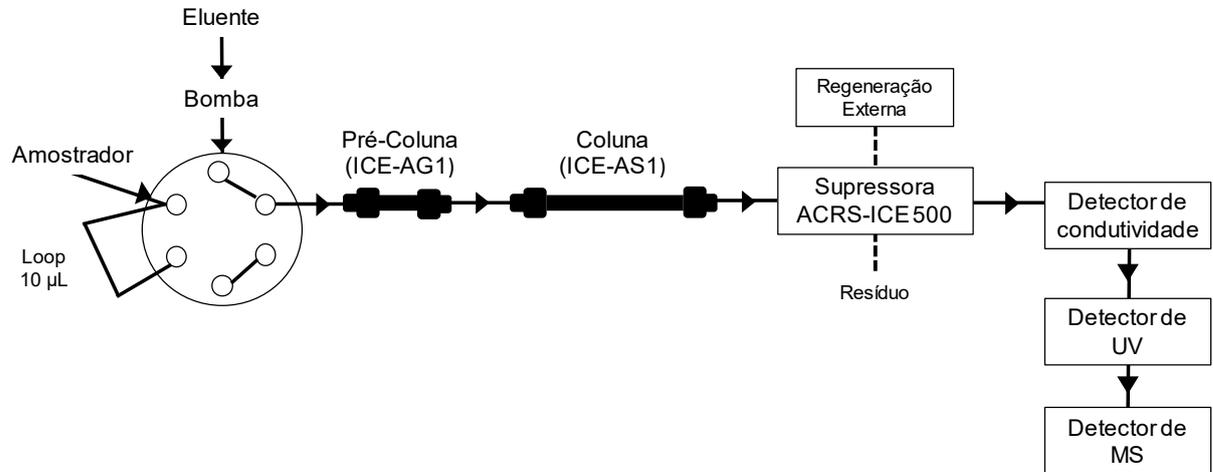
Tabela 4 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a) para a determinação de ânions e ácidos orgânicos por troca iônica.

Coluna	Dionex IonPac AS11-HC-4 μ m (2 x 250 mm)														
Pré-coluna	Dionex IonPac AGH11-HC-4 μ m (2 x 50 mm)														
Fase móvel	KOH (<i>Dionex EGC-KOH cartridge</i>)														
	<u>Programa e gradiente de eluição</u>														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo, min</th> <th>KOH, mmol L⁻¹</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 7</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>7 - 16</td> <td>1 - 15</td> </tr> <tr> <td>16 - 25</td> <td>15 - 30</td> </tr> <tr> <td>25 - 33</td> <td>30 - 60</td> </tr> <tr> <td>33 - 35</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>35 - 36</td> <td>60 - 1</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹	0 - 7	1	7 - 16	1 - 15	16 - 25	15 - 30	25 - 33	30 - 60	33 - 35	60	35 - 36	60 - 1
Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹														
0 - 7	1														
7 - 16	1 - 15														
16 - 25	15 - 30														
25 - 33	30 - 60														
33 - 35	60														
35 - 36	60 - 1														
Vazão	0,3 mL min ⁻¹														
Volume de injeção	10 μ L														
Tempo de corrida	40 min														
Temperatura da coluna	30 °C														
Detector	Condutividade														
	Supressor eletrolítico AERS 500														
	Auto-regeneração														

3.3.2 Coluna de exclusão iônica

Os parâmetros cromatográficos, assim como na troca iônica, inicialmente avaliados para a separação de ácidos orgânicos, foram baseadas em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b), utilizando soluções de referência. Para o uso da coluna de exclusão iônica, o sistema foi montado com os detectores de CD, UV e MS em série, conforme esquema mostrado na Figura 10. Ainda, previamente ao CD, foi utilizada um supressor químico, com regeneração externa. Para o sistema de regeneração, foi utilizado um frasco pressurizado com, aproximadamente, 2,5 psi de ar comprimido. É importante mencionar que, para a regeneração do supressor, o fabricante (Thermo Fisher Scientific) recomenda o uso destes frascos e não o de bombas peristálticas, para a manutenção de uma vazão constante.

Figura 10 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.



As condições cromatográficas recomendadas e baseadas em aplicações do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b) estão mostradas na Tabela 5. Estas condições foram utilizadas para os testes iniciais de separação neste sistema.

Tabela 5 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b) para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de exclusão iônica.

Coluna	Dionex IonPac ICE-AS1 (4 x 250 mm)		
Pré-coluna	Dionex IonPac ICE-AG1 (4 x 35 mm)		
Fase móvel	Ácido heptafluorbutírico (HPFB) 1 mmol L ⁻¹		
Vazão	0,16 mL min ⁻¹		
Volume de injeção	10 µL		
Tempo	60 min		
Temperatura	19 °C		
Detectores	Conductividade		
	Supressor químico ACRS-ICE 500		
	Regeneração externa com TBAOH 5 mmol L ⁻¹		
	Vazão do regenerante: 5 mL min ⁻¹		
	Ultravioleta		
	UV 1: 210 nm		
	Espectrômetro de massas		
	Fonte de ionização: ESI		
	Temperatura do probe: 450 °C		
	Potencial da agulha: 3 kV		
	Modo: negativo (<i>full scan</i>)		
	Parâmetros		
	Ácido	Razão massa/carga (m/z)	Cone (V)
	C1	45	50
	C2	59	50
	C3	73	50
	C4	87	50
	C5	101	50

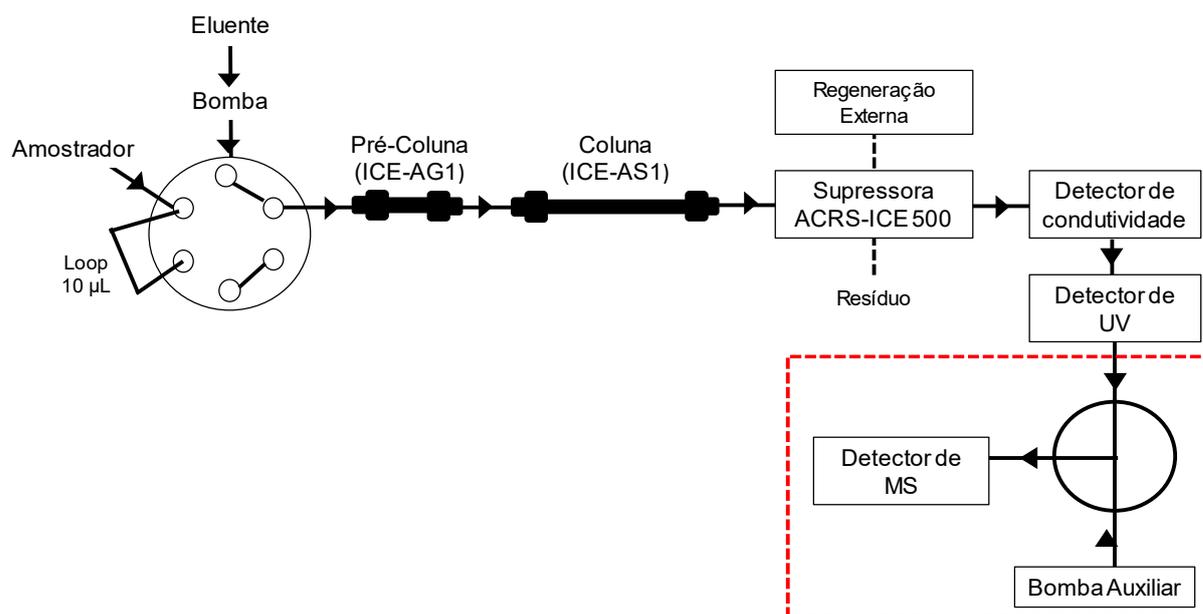
3.3.2.1 Otimização das condições cromatográficas

Para as otimizações, foi utilizada solução de referência contendo 50 mg L⁻¹ dos ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), heptanóico (C7) e octanóico (C8), preparada em água e as condições mencionadas na Tabela 5.

3.3.2.1.1 Avaliação da adição de acetonitrila pós-coluna

A fim de melhorar as condições de ionização, foi adicionada acetonitrila à fase móvel previamente à injeção no espectrômetro de massa. Para isso, foi montado, na saída do detector de UV, um conector com três vias, em forma de “T”, com um canal disponível para a introdução de acetonitrila, outro para a fase móvel e um para a saída da mistura. A Figura 11 mostra um esquema da montagem do sistema com o conector de três vias para a adição de acetonitrila à fase móvel com uma bomba auxiliar, na vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Cabe salientar que deve se tomar cuidado com a instalação deste sistema devido às limitações deste tipo de coluna (pressão máxima de trabalho de 1000 psi).

Figura 11 - Esquema da montagem com conector de três vias para adição de acetonitrila na fase móvel do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.



3.3.2.1.2 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna

A separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 foi avaliada nas temperaturas de 19, 25, 30 e 35 °C utilizando a detecção por UV. A vazão da fase móvel foi alterada para $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ em função do aumento da pressão da coluna.

3.3.2.1.3 Avaliação da concentração de ácido heptafluorbutírico da fase móvel

As concentrações de ácido heptafluorbutírico (HPFB) como fase móvel avaliadas foram de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,1 e 0,05 mmol L⁻¹. Assim como na avaliação da temperatura, a vazão da fase móvel foi mantida em 0,1 mL min⁻¹.

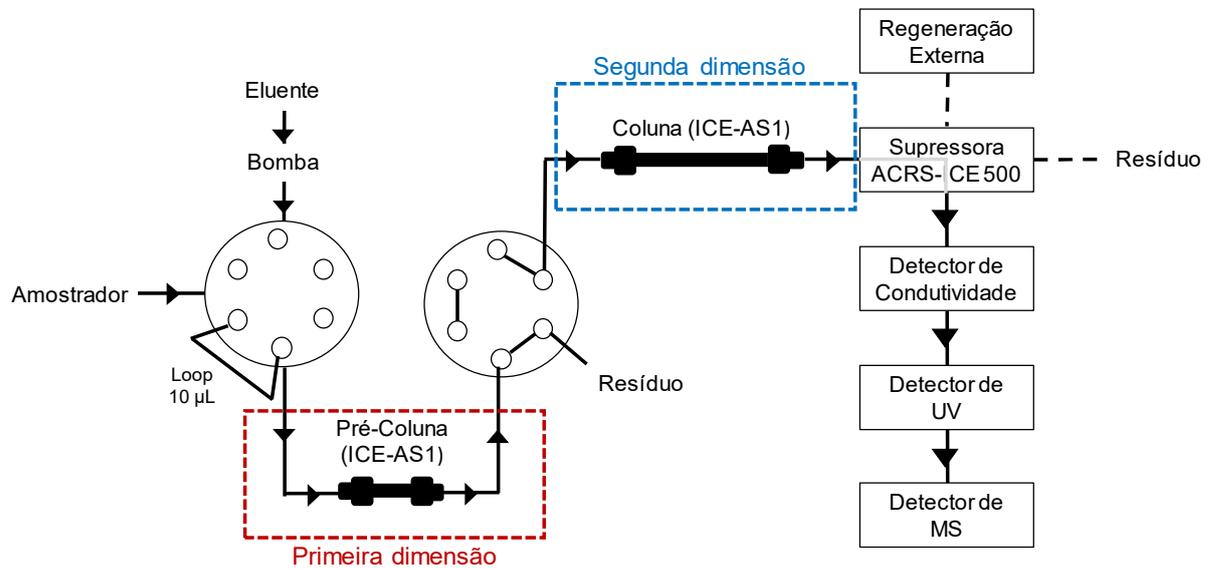
3.3.2.1.4 Avaliação da concentração de hidróxido de tetrabutílamônio utilizado como solução regenerante no sistema de supressão

A fim de diminuir o consumo de reagente da solução regenerante utilizada no supressor químico, foram avaliadas concentrações de TBAOH de 5, 2,5, 1, 0,5 e 0,25 mmol L⁻¹. A vazão do regenerante foi diminuída para, aproximadamente, 2,5 mL min⁻¹ (condição recomendada é de 5 mL min⁻¹, para vazão de fase móvel de 0,16 mL min⁻¹), em função da diminuição da vazão de fase móvel para 0,1 mL min⁻¹.

3.3.2.2 *Separação de cloreto utilizando sistema bidimensional e coluna de exclusão iônica*

A separação de Cl⁻ foi feita utilizando, na primeira dimensão, a pré-coluna de exclusão iônica e, na sequência, como segunda dimensão, separando os ácidos em coluna de mesmo material. Assim, é feita uma prévia separação deste Cl⁻ em uma pré-coluna, sendo que durante os primeiros minutos a solução que elui da pré-coluna é direcionada para o resíduo (separação da matriz). Após a eluição do Cl⁻, com o auxílio de uma segunda válvula de desvio, a solução é então direcionada para a coluna de exclusão iônica, para a separação dos ácidos orgânicos. Cabe salientar que, por esta coluna não suportar valores de pressão maiores que 1000 psi, não foi possível usar uma coluna na primeira dimensão, somente uma pré-coluna. A Figura 12 mostra um esquema da montagem do sistema bidimensional para separação de Cl⁻ e posterior determinação de ácidos orgânicos em coluna de exclusão iônica.

Figura 12 - Esquema ilustrativo da montagem do sistema bidimensional para a separação de Cl^- e posterior separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica.



Para a avaliação das condições de separação utilizando o sistema bidimensional, os testes iniciais foram feitos de acordo com as condições mostradas na Tabela 6, utilizando uma solução de referência de ácidos orgânicos de 25 mg L^{-1} em 150 g L^{-1} de Cl^- .

Tabela 6 - Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 em sistema bidimensional com coluna de exclusão iônica em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.

Primeira dimensão	Dionex IonPac ICE-AS1 (4 x 250 mm)		
Segunda dimensão	Dionex IonPac ICE-AG1 (4 x 35 mm)		
Fase móvel	Ácido heptafluorbutírico (HPFB) 1 mmol L ⁻¹		
Vazão	0,1 mL min ⁻¹		
Volume de injeção	10 µL		
Tempo primeira dimensão	4,5 min		
Tempo segunda dimensão	4,5 - 50 min		
Temperatura	35 °C		
Detectores	Conductividade		
	Supressor químico ACRS-ICE 500		
	Regeneração externa com TBAOH 0,5 mmol L ⁻¹		
	Vazão do regenerante: 2,5 mL min ⁻¹		
	Ultravioleta		
	UV 1: 210 nm		
	Espectrômetro de massas		
	Fonte de ionização: ESI		
	Modo: negativo (SIM)		
	Temperatura do probe: 450 °C		
	Potencial da agulha: 3 kV		
	Parâmetros		
	Ácido	Razão massa/carga (m/z)	Cone (V)
	C1	45	50
	C2	59	50
	C3	73	50
	C4	87	50
	C5	101	50

3.3.2.2.1 Avaliação do tempo na primeira dimensão para eliminação de cloreto

Para a eliminação de Cl⁻, na primeira dimensão, foram avaliados tempos de 3,4 a 4,5 min, com variações de 0,1 min. As avaliações foram feitas com soluções de referência de 25 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em 150 g L⁻¹ de Cl⁻.

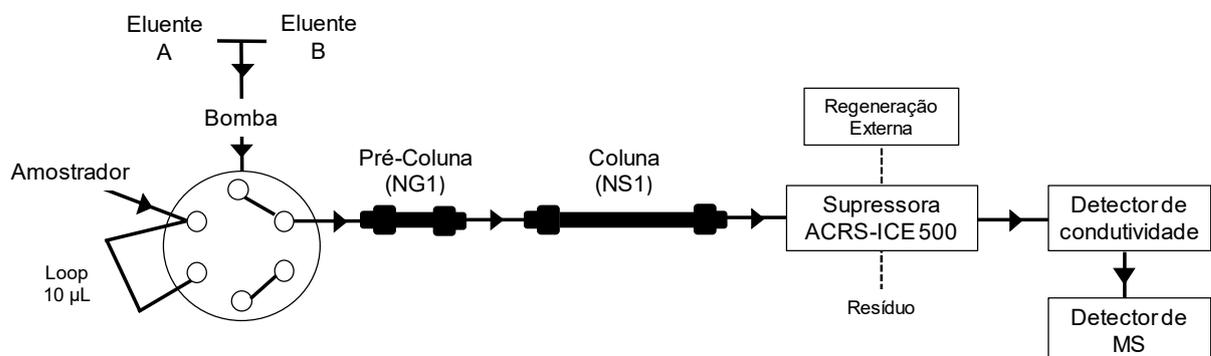
3.3.2.2 Avaliação da concentração de cloreto na separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando sistema bidimensional

A avaliação da influência da concentração de sal na separação dos ácidos C1 a C5 utilizando o sistema bidimensional foi feita utilizando soluções de referência de 25 mg L⁻¹ dos ácidos (C1 a C5) em concentrações de 125, 100, 75, 50, 25 e 10 g L⁻¹ de Cl⁻ e H₂O. Os testes foram feitos utilizando-se 3,8 e 3,9 min de tempo para a eliminação de Cl⁻ na primeira dimensão.

3.3.3 Coluna de pareamento iônico

Os parâmetros cromatográficos, assim como nas outras colunas utilizadas neste trabalho, inicialmente avaliados para a separação de ácidos orgânicos foram baseadas em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c), utilizando soluções de referência. Quando foi utilizada a coluna de pareamento iônico, o sistema foi montado com os detectores de CD e MS em série, conforme esquema mostrado na Figura 13. Ainda, previamente ao CD, foi utilizada um supressor químico, com regeneração externa. Assim como na exclusão iônica, para o sistema de regeneração, foi utilizado um frasco pressurizado com, aproximadamente, 2,5 psi de ar comprimido.

Figura 13 - Esquema da montagem do sistema cromatográfico para a separação de ácidos orgânicos utilizando coluna de pareamento iônico.



As condições cromatográficas recomendadas e baseadas em aplicações do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c), estão mostradas na Tabela 7. Estas condições foram utilizadas para os testes iniciais de separação neste sistema.

Tabela 7 - Condições cromatográficas recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c) para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de pareamento iônico.

Coluna	Dionex IonPac NS1 (4 x 250 mm)																																	
Pré-coluna	Dionex IonPac NG1 (4 x 50 mm)																																	
Fase móvel	A: ACN 24%, MeOH 6%, HCl 0,03 mmol L ⁻¹ B: ACN 60%, MeOH 24%, HCl 0,05 mmol L ⁻¹																																	
	Programa e gradiente de eluição																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo, min</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 20</td> <td>0 - 100</td> </tr> <tr> <td>20 - 40</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo, min	%B	0 - 20	0 - 100	20 - 40	100																											
Tempo, min	%B																																	
0 - 20	0 - 100																																	
20 - 40	100																																	
Vazão	0,3 mL min ⁻¹																																	
Volume de injeção	10 µL																																	
Tempo	40 min																																	
Temperatura	42 °C																																	
Detector	Condutividade																																	
	Supressor químico ACRS-ICE 500																																	
	Regeneração externa com KOH 2,5 mmol L ⁻¹																																	
	Vazão do regenerante: 2,5 mL min ⁻¹																																	
Espectrômetro de massas																																		
	Fonte de ionização: ESI																																	
	Temperatura do probe: 450 °C																																	
	Potencial da agulha: 3 kV																																	
	Modo: negativo (<i>full scan</i>)																																	
	Parâmetros																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Ácido</th> <th>Massa (m/z)</th> <th>Cone (V)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C1</td> <td>45</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C2</td> <td>59</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C3</td> <td>73</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C4</td> <td>87</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C5</td> <td>101</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C6</td> <td>115</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C7</td> <td>129</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C8</td> <td>143</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C9</td> <td>157</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>C10</td> <td>171</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	Ácido	Massa (m/z)	Cone (V)	C1	45	50	C2	59	50	C3	73	50	C4	87	50	C5	101	50	C6	115	50	C7	129	50	C8	143	50	C9	157	50	C10	171	50
Ácido	Massa (m/z)	Cone (V)																																
C1	45	50																																
C2	59	50																																
C3	73	50																																
C4	87	50																																
C5	101	50																																
C6	115	50																																
C7	129	50																																
C8	143	50																																
C9	157	50																																
C10	171	50																																

Para as otimizações da separação cromatográfica, utilizando coluna de pareamento iônico, foi utilizada solução de referência contendo 10 mg L⁻¹ dos ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), heptanóico (C7), octanóico (C8), nonanóico (C9) e decanóico (C10) preparada em acetonitrila e as condições mencionadas na Tabela 7. Foram avaliadas, inicialmente, as condições do espectrômetro de massas, como o potencial aplicado no cone de amostragem e a interferência da presença de sal na ionização e sinal dos ácidos orgânicos. Na sequência, foi avaliada a temperatura utilizada no compartimento da coluna para a separação dos ácidos orgânicos de cadeia simples e linear C4, C5 e C6, principalmente, em relação às suas espécies “iso” (ácidos isobutírico, isopentanóico e isohexanóico, presentes no CRM).

3.3.3.1 *Avaliação das condições utilizando espectrometria de massas*

Inicialmente, foram feitas avaliações em relação às condições de ionização do espectrômetro de massas. Para isto, as corridas cromatográficas foram baseadas nas condições da Tabela 7, usando-se os sinais dos íons extraídos obtidos do modo *full scan*.

3.3.3.1.1 *Avaliação do potencial aplicado no cone de amostragem*

A intensidade de sinal para os ácidos C1 a C10 foi avaliada em potenciais de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 V, utilizando uma solução de referência de 10 mg L⁻¹, preparada em acetonitrila.

3.3.3.1.2 *Avaliação da presença de sal na ionização dos ácidos C1 a C10*

Os ácidos orgânicos C1 a C10 foram avaliados, quanto à intensidade de sinal obtido por MS, utilizando-se uma solução de referência preparada em 150 g L⁻¹.

3.3.3.2 *Avaliação da temperatura do compartimento da coluna*

A separação dos ácidos orgânicos C1 a C7, bem como das espécies isobutírico, isopentanóico e iso-hexanóico foi avaliada nas temperaturas de 10, 15, 20,

25, 30 e 42 °C, utilizando o CRM 46975 0,05 mmol L⁻¹ em acetonitrila. Esta avaliação foi feita utilizando o CRM 46975.

3.3.3.3 *Extração em fase sólida para remoção de cloretos*

Com a finalidade de remover o Cl⁻ das amostras de águas separadas de emulsões de petróleo, foi testada a filtração utilizando cartuchos de SPE de C18 (500 mg, 3 mL, Bond Elut, Agilent, EUA). Para todas as otimizações, foram utilizados 2,5 mL da solução de referência dos ácidos orgânicos C1 a C10 de 10 mg L⁻¹, em 150 g L⁻¹ de Cl⁻, preparada em uma mistura de 15% de metanol + 70% de acetonitrila e 2,5 mL do eluente. A Figura 14 ilustra um esquema do procedimento utilizado para as filtrações utilizando SPE. Os volumes de solução de referência e de eluente foram mantidos, sendo que foi avaliado, inicialmente, o volume de água necessário para a remoção do Cl⁻. Além disso, foi feita a avaliação do melhor eluente para os ácidos C5 a C10, bem como a necessidade de uma etapa de condicionamento do cartucho de SPE.

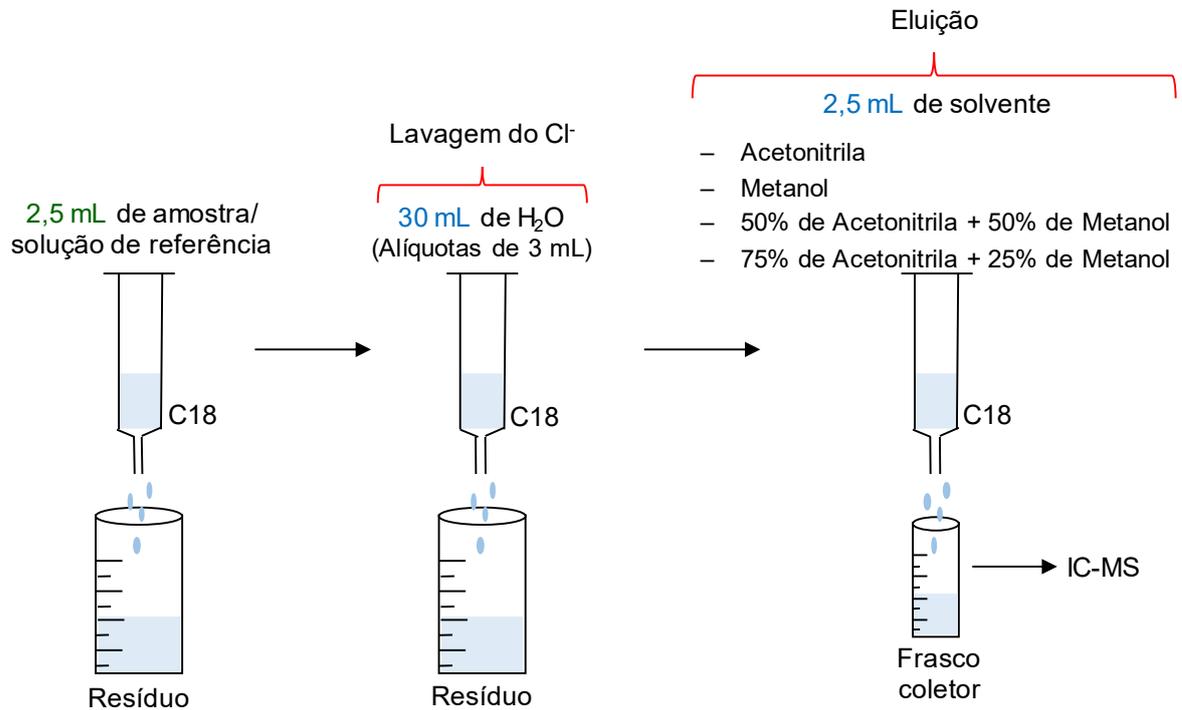
3.3.3.3.1 Avaliação do volume de água para remoção de cloreto

Inicialmente, foi feita a avaliação do volume de água necessário para a remoção de todo o Cl⁻ do cartucho. Para isto, foram utilizados 30 mL de água, separados em alíquotas de 3 mL cada. As alíquotas foram quantificadas, individualmente, quanto ao teor de Cl⁻. O esquema da Figura 14 ilustra o procedimento padrão adotado para a SPE na avaliação do eluente e, também, na avaliação do condicionamento do cartucho de SPE.

3.3.3.3.2 Avaliação do eluente

A avaliação para a verificação do solvente mais adequado para a eluição dos ácidos orgânicos retidos na fase estacionária de C18 foi feita utilizando metanol, acetonitrila, mistura de 50% de acetonitrila + 50% de metanol (v/v) e 75% de acetonitrila + 25% de metanol (v/v).

Figura 14 - Procedimento de SPE inicialmente utilizado para a eliminação de Cl⁻ em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.



3.3.3.3.3 Avaliação do condicionamento do cartucho para extração em fase sólida

Foi avaliada a influência do condicionamento na recuperação dos ácidos utilizando H₂O e o eluente (mistura de 75% de acetonitrila + 25% de metanol) previamente à adição da amostra. Desta forma, o condicionamento consistiu na adição de 5 mL da mistura 75% de acetonitrila + 25% de metanol, 5 mL de H₂O, seguidos da adição dos 2,5 mL de padrão.

3.4 TRATAMENTO DE DADOS

Os dados da cromatografia foram adquiridos pelo *software* Chromeleon 7.2.2, incluindo os dados das curvas de calibração, como a equação da reta e R², além dos parâmetros de tempo de retenção, fator de retenção, resolução e assimetria dos ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear avaliados neste trabalho.

Para os cálculos dos LOQ, foram feitas diluições sucessivas de soluções de referência até a menor concentração que obtivesse linearidade, desvio padrão e exatidão aceitáveis (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E

QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

Os LODs foram calculados a partir dos LOQs, dividindo-se estes por 3,3, de acordo como recomendado pelo INMETRO, não levando em consideração a soma da área dos brancos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

Figura 15 - Representação esquemática das avaliações e otimizações para a quantificação de ânions e ácidos orgânicos em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.



4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Inicialmente, foi feita a caracterização das amostras de água separadas de emulsões de petróleo do pré-sal com a determinação do pH e de cloreto. Cabe salientar que a determinação do teor de óleo das amostras não foi feita neste estudo. Para estas determinações, as amostras foram previamente filtradas em filtros de PTFE de 0,22 μm . Os resultados para a determinação destes parâmetros estão mostrados na Tabela 8. As amostras foram identificadas em ordem crescente de concentração de Cl^- (primeira coluna).

Tabela 8 - Determinação de pH e cloreto por ICP-OES em águas separadas de emulsões de petróleo. (n=1)

Amostra	Cl, g L ⁻¹	pH
A	0,212	3,0
B	8,53	7,2
C	33,1	6,3
D	48,8	8,2
E	61,8	6,2
F	75,1	5,9
G	79,4	4,7
H	92,0	6,5
I	102	4,6
J	109	4,9
K	121	5,8
L	126	5,6
M	130	5,7
N	133	4,8
O	138	5,2

Como pode ser observado, as amostras possuem ampla faixa de pH, variando de pH 3,0 (amostra "A") a pH 8,2 (amostra "D"). Além disso, de uma forma geral, as amostras apresentam alta concentração de Cl^- (acima de 10% nas amostras I, J, K, L, M, N e O), podendo chegar a cerca de 14%, como é o caso da amostra "O". A

concentração de Cl^- nas amostras, no geral, é relativamente maior do que as concentrações normalmente reportadas na literatura para petróleos do pós-sal (média de 10 a 30 g L^{-1} de Cl^-) (BARTH, 1991), o que é uma característica das amostras oriundas dos poços do pré-sal.

4.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA

A determinação de ácidos orgânicos utilizando cromatografia líquida, na maior parte das vezes, baseia-se na separação destes em colunas de exclusão iônica e posterior determinação por condutividade (PITTMAN e LEWAN, 1994; LESTER, *et al.*, 2015). Porém, o objetivo inicial do trabalho foi quantificar tanto os ânions quanto os ácidos orgânicos em uma mesma separação cromatográfica. Os ânions, em sua maioria, possuem pouca interação com a fase estacionária utilizada para exclusão iônica e, desta forma, não são separados utilizando este tipo de coluna.

Assim, após a caracterização inicial das amostras, foi feita a otimização das condições cromatográficas para a separação de ânions e ácidos orgânicos utilizando a coluna de troca iônica. Devido às características das amostras (alta concentração de cloreto), foram avaliadas, também, colunas de exclusão iônica e pareamento iônico para a quantificação dos ácidos orgânicos.

4.2.1 Avaliação da capacidade de separação da coluna de troca iônica

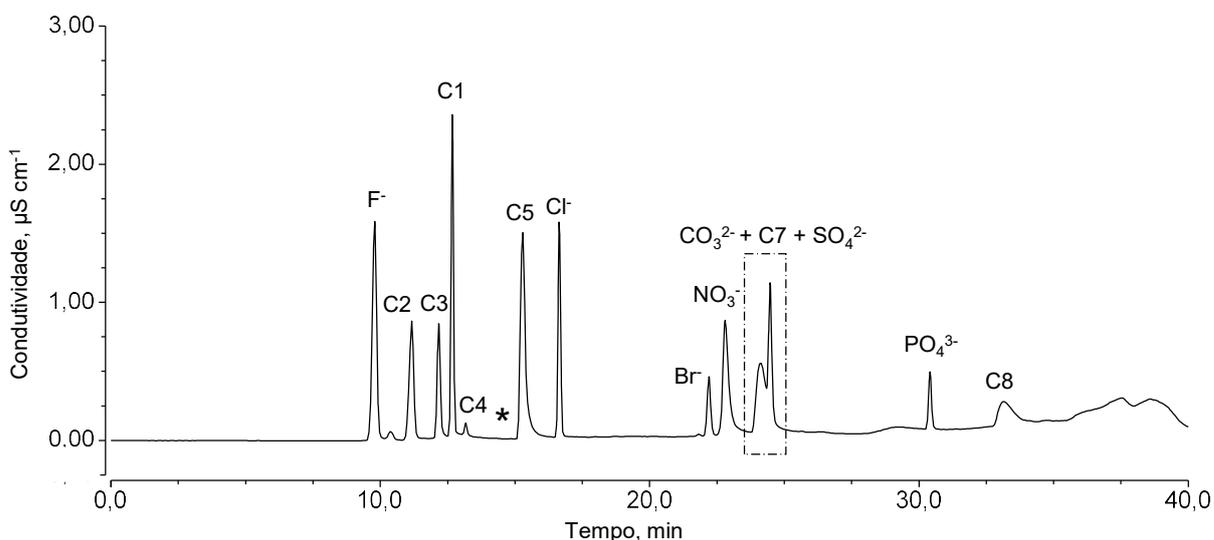
Os parâmetros cromatográficos inicialmente avaliados para a separação de ácidos orgânicos e ânions utilizando a coluna de troca iônica foram baseadas em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a), utilizando soluções de referência. A separação foi feita utilizando uma coluna Dionex IonPac AS11-HC, com gradiente de KOH como fase móvel, temperatura do compartimento da coluna de 30 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. Para as otimizações, foi utilizada solução de referência contendo 5 mg L^{-1} dos ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), pentanóico (C5), heptanóico (C7) e octanóico (C8), além de 0,5 mg L^{-1} dos ânions F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} . O ácido hexanóico (C6) não foi utilizado nas otimizações iniciais devido à indisponibilidade de solução de referência durante estes estudos. Cabe salientar que os ácidos orgânicos, devido à utilização de KOH como fase móvel na

cromatografia de troca iônica, estarão na sua forma dissociada ($\text{pH} > 10$). A Tabela 4, no item 3.3.1 de *Materiais e Métodos*, mostra as condições recomendadas e utilizadas para a separação de ânions e ácidos orgânicos por troca iônica.

4.2.1.1 Otimização das condições cromatográficas

Inicialmente, para a confirmação dos tempos de retenção dos íons, foi feita a injeção de cada padrão individualmente. Cabe salientar que, ácidos orgânicos de cadeia maior de oito carbonos não foram separados utilizando este tipo de coluna, nestas condições, mesmo aumentando-se o tempo de corrida cromatográfica para mais de 100 min. Após a confirmação dos tempos de retenção, foi feita a injeção da solução de referência contendo os ânions e ácidos orgânicos. Foi observado que, nas condições recomendadas, ocorreu a coeluição de sulfato, carbonato e ácido heptanóico, como é mostrado na Figura 16. A separação do ácido C6 não foi avaliada devido à indisponibilidade de solução de referência durante o estudo.

Figura 16 - Cromatograma para ânions ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ácidos orgânicos* (5 mg L^{-1}) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.

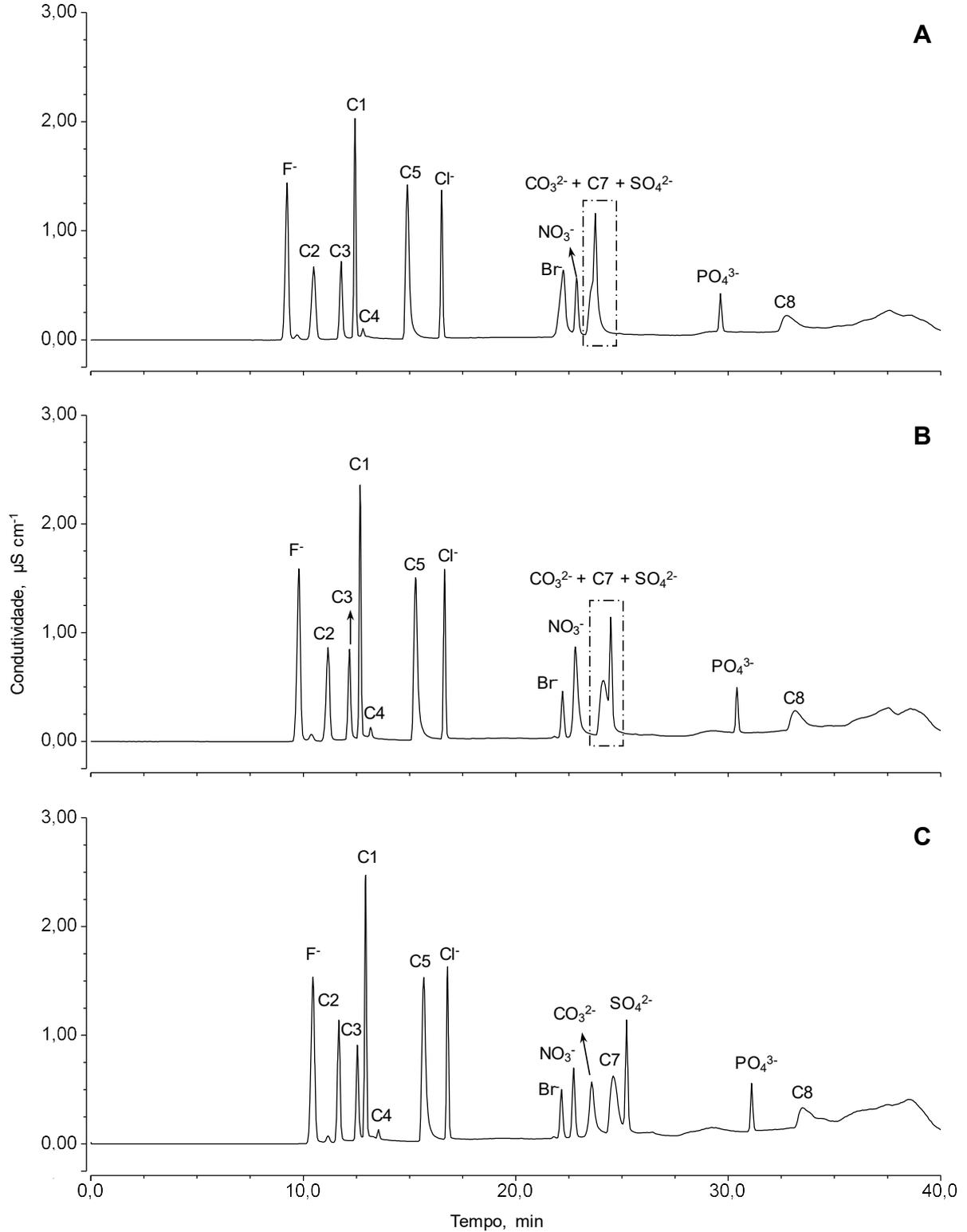


*Com exceção do ácido hexanóico (C6).

Para melhorar a separação e resolução destes íons, inicialmente, optou-se por avaliar a temperatura do compartimento da coluna. Para isto, foram avaliadas temperaturas de 25, 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Cabe salientar que temperaturas menores não foram

utilizadas, pois a separação dos íons foi pior do que quando utilizada a temperatura de 30 °C recomendada pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a) e geralmente utilizada para este método. Da mesma maneira, temperaturas maiores não foram utilizadas, pois a temperatura de 35 °C foi eficiente para a separação dos íons que estavam coeluído. A Figura 17 mostra os cromatogramas obtidos para solução de referência de ânions (0,5 mg L⁻¹) e ácidos orgânicos (5 mg L⁻¹) nas temperaturas avaliadas. É importante mencionar que a separação do ácido C6 não foi avaliada devido à indisponibilidade de solução de referência durante o estudo.

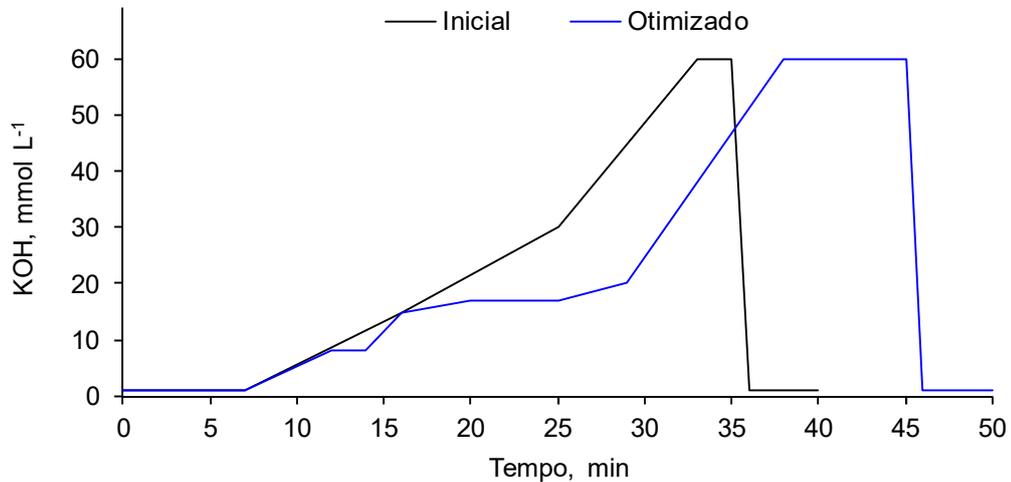
Figura 17 - Cromatograma para ânions ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ácidos orgânicos* (5 mg L^{-1}) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, nas temperaturas de **A**: $25 \text{ }^\circ\text{C}$, **B**: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, **C**: $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.



Conforme pode ser observado pelos cromatogramas da Figura 17, a utilização de 35 °C no compartimento da coluna foi eficiente para a separação de sulfato, carbonato e ácido heptanóico, além dos demais íons avaliados. Quando 35 °C foram utilizados (Figura 17-C) os sinais mostraram boa resolução ($R_s > 1,5$) sendo essa a temperatura escolhida para as próximas avaliações. A temperatura influencia na solubilidade, difusividade e viscosidade da fase móvel. Com o aumento da temperatura, ocorre uma diminuição da viscosidade da fase móvel e consequente aumento da velocidade de difusão, aumentando, assim, a transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária (LANCAS, 2012; MEYER, 2004). Com isso, a eficiência de separação (número de pratos teóricos) é maior, afetando diretamente na melhora da resolução dos sinais. Isto pode ser observado comparando-se os três cromatogramas na região do t_r de 20 a 30 min. Nas Figuras 17-A e 17-B, os íons carbonato, sulfato e heptanoato coeluem, não sendo possível identificá-los. Com o aumento da temperatura para 35°C, e a melhora na transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, como mostrado na Figura 17-C, os íons foram separados com resolução adequada ($R_s > 1,5$).

Com a finalidade de melhorar ainda mais a separação dos íons e obter melhor resolução dos sinais cromatográficos, foram feitas diversas alterações no gradiente de fase móvel. A Figura 18 mostra um gráfico com o gradiente de concentração da fase móvel inicial, indicado na aplicação do fabricante (THERMO FISCHER SCIENTIFIC, 2014a) e o gradiente de fase móvel otimizado para a determinação dos ânions e ácidos orgânicos deste trabalho.

Figura 18 - Gradiente de concentração de fase móvel (KOH) inicial e otimizado para a determinação de ânions e ácidos orgânicos em coluna de troca iônica.



Como pode ser observado pelo gráfico da Figura 18, no gradiente de concentração de KOH otimizado, a concentração de KOH foi mantida estável em 8 mmol L⁻¹, no intervalo de 12 a 14 min e a partir deste, aumentar para 15 mmol L⁻¹ dos 14 aos 16 min de programa. Esta alteração possibilitou uma melhor separação dos ácidos C3, C4 e C1, que eluem nesta faixa de tempo. O aumento mais lento da concentração da fase móvel, ou seja, um aumento gradual da força iônica, possibilita que estes ácidos possam interagir mais tempo com a coluna, devido ao equilíbrio da concentração de íons de fase móvel, facilitando, desta forma, a separação das espécies (CASS e CASSIANO, 2015)

Ainda, a partir dos 16 min, a concentração de fase móvel também foi alterada para um aumento de gradiente mais lento do que o inicial, a fim de melhorar a separação entre C5 e Cl⁻, como também, dos outros íons que eluem na sequência (C6, Br⁻, NO₃⁻, CO₃²⁻, C7 e SO₄²⁻). Na sequência, de 29 a 38 min, o gradiente de eluição foi, então, aumentado de 20 a 60 mmol L⁻¹, possibilitando, desta forma, a eluição dos íons maiores, como o PO₄³⁻ e do C8. Estes íons possuem uma interação mais forte com a fase estacionária da coluna e, desta forma, precisam de uma fase móvel com uma força iônica maior para serem eluídos em tempos menores (FRITZ e GJERDE, 2009; WEISS, 2004).

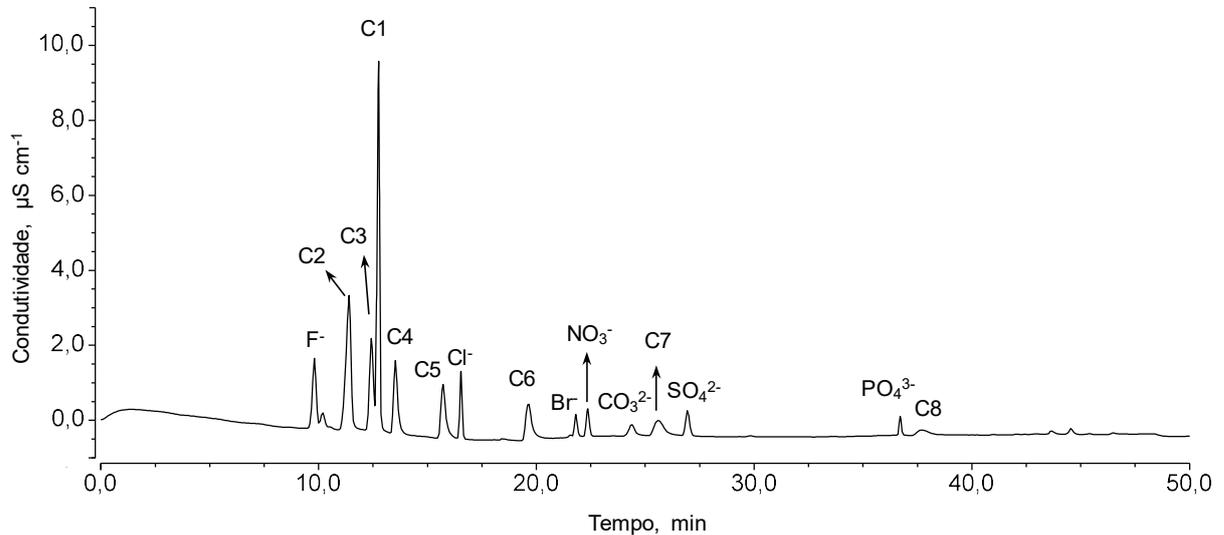
Na Tabela 9 estão mostradas as condições cromatográficas otimizadas, incluindo o novo programa e gradiente de eluição, para a determinação de ânions e ácidos orgânicos utilizando-se coluna de troca iônica.

Tabela 9 - Condições cromatográficas otimizadas utilizadas para a determinação de ânions e ácidos orgânicos em coluna de troca iônica.

Coluna	Dionex IonPac AS11-HC-4 μ m (2 x 250 mm)																								
Pré-coluna	Dionex IonPac AGH11-HC-4 μ m (2 x 50 mm)																								
Fase móvel	KOH (<i>Dionex EGC-KOH cartridge</i>)																								
	<u>Programa e gradiente de eluição</u>																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo, min</th> <th>KOH, mmol L⁻¹</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 7</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>7 - 12</td> <td>1 - 8</td> </tr> <tr> <td>12 - 14</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>14 - 16</td> <td>8 - 15</td> </tr> <tr> <td>16 - 20</td> <td>15 - 17</td> </tr> <tr> <td>20 - 25</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>25 - 29</td> <td>17 - 20</td> </tr> <tr> <td>29 - 38</td> <td>20 - 60</td> </tr> <tr> <td>38 - 45</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>45 - 46</td> <td>60 - 1</td> </tr> <tr> <td>46 - 50</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹	0 - 7	1	7 - 12	1 - 8	12 - 14	8	14 - 16	8 - 15	16 - 20	15 - 17	20 - 25	17	25 - 29	17 - 20	29 - 38	20 - 60	38 - 45	60	45 - 46	60 - 1	46 - 50	1
Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹																								
0 - 7	1																								
7 - 12	1 - 8																								
12 - 14	8																								
14 - 16	8 - 15																								
16 - 20	15 - 17																								
20 - 25	17																								
25 - 29	17 - 20																								
29 - 38	20 - 60																								
38 - 45	60																								
45 - 46	60 - 1																								
46 - 50	1																								
Vazão	0,3 mL min ⁻¹																								
Volume de injeção	10 μ L																								
Tempo	50 min																								
Temperatura	35 °C																								
Detector	Condutividade com supressão eletrolítica																								

A Figura 19 mostra um cromatograma para solução de referência, na condição otimizada, para a separação de ânions (0,5 mg L⁻¹) e ácidos orgânicos (5 mg L⁻¹). Como pode ser observado, até 15 analitos foram identificados e separados utilizando-se a coluna de troca iônica.

Figura 19 - Cromatograma para ânions ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ácidos orgânicos (5 mg L^{-1}) após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.



4.2.1.2 Validação do método analítico e quantificação de ânions e ácidos orgânicos utilizando coluna de troca iônica e detecção por condutividade

Para a separação utilizando coluna de troca iônica, alguns parâmetros foram avaliados, como a faixa linear de calibração, equação da reta, LOD e LOQ para cada analito, além de resolução de sinal, assimetria, fatores de retenção e separação e número de pratos teóricos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Cabe salientar que a robustez não foi avaliada neste trabalho.

Para a obtenção da curva analítica, bem como a faixa linear de trabalho foram seguidas as recomendações do INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Foram utilizados, no mínimo, 5 níveis de concentração (3 replicatas). A Tabela 10 resume os dados obtidos para a separação dos ácidos C1 a C5 por troca iônica e detecção por condutividade.

Tabela 10 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de ânions e ácidos orgânicos* após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica.

Espécie	t_R (min)	Pratos teóricos (N)	Fator de retenção (k)	Fator de separação (α)	Resolução (R_s)	Assimetria (A_s)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
F ⁻	9,77	15344	2,27	1,23	1,41	0,88	10-250	$y = 0,0007 x - 0,0004$	0,9990	3,0	10
C2	11,36	10809	2,80	1,12	2,77	0,81	500-10000	$y = 0,0002 x + 0,0905$	0,9974	151	500
C3	12,43	27423	3,14	1,04	1,40	0,87	100-2500	$y = 0,0001 x + 0,0214$	0,9921	30,3	100
C1	12,76	60550	3,25	1,08	2,88	0,85	500-10000	$y = 0,0002 x + 0,1024$	0,9969	151	500
C4	13,533	26974	3,51	1,21	6,15	1,42	500-10000	$y = 0,0001 x + 0,0267$	0,9973	151	500
C5	15,697	27292	4,24	1,06	2,85	1,59	100-5000	$y = 0,0001 x + 0,0099$	0,9990	30,3	100
Cl ⁻	16,530	112908	4,51	1,23	6,66	1,09	25-500	$y = 0,0004 x + 0,0213$	0,9996	7,57	25
C6	19,570	27417	5,55	1,13	5,82	1,84	50-5000	$y = 0,0001 x + 0,0022$	0,9997	15,1	50
Br ⁻	21,783	141973	6,27	1,03	2,23	1,10	10-500	$y = 0,0002 x + 0,0008$	0,9992	3,0	10
NO ₃ ⁻	22,347	121584	6,45	1,11	5,32	1,09	50-1000	$y = 0,0002 x + 0,0105$	0,9978	15,1	50
CO ₃ ²⁻ **	24,457	37580	7,13	1,06	1,84	1,29	-	-	-	-	-
C7	25,650	15857	7,53	1,06	2,33	1,64	100-5000	$y = 0,0001 x + 0,0007$	0,9991	30,3	100
SO ₄ ²⁻	27,010	98754	7,98	1,41	7,60	1,11	10-1000	$y = 0,0003 x + 0,0014$	0,9996	3,0	10
PO ₄ ³⁻	36,683	603097	11,24	1,03	1,68	1,14	10-1000	$y = 0,0001 x - 0,0013$	0,9980	3,0	10
C8	37,77	22211	11,57	-	-	1,76	500-10000	$y = 0,0001 x + 0,0013$	0,9975	151	500

*Os ácidos C9 e C10 não foram separados utilizando coluna de troca iônica.

**Não foram obtidas correlações lineares para CO₃²⁻ na faixa de 10 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

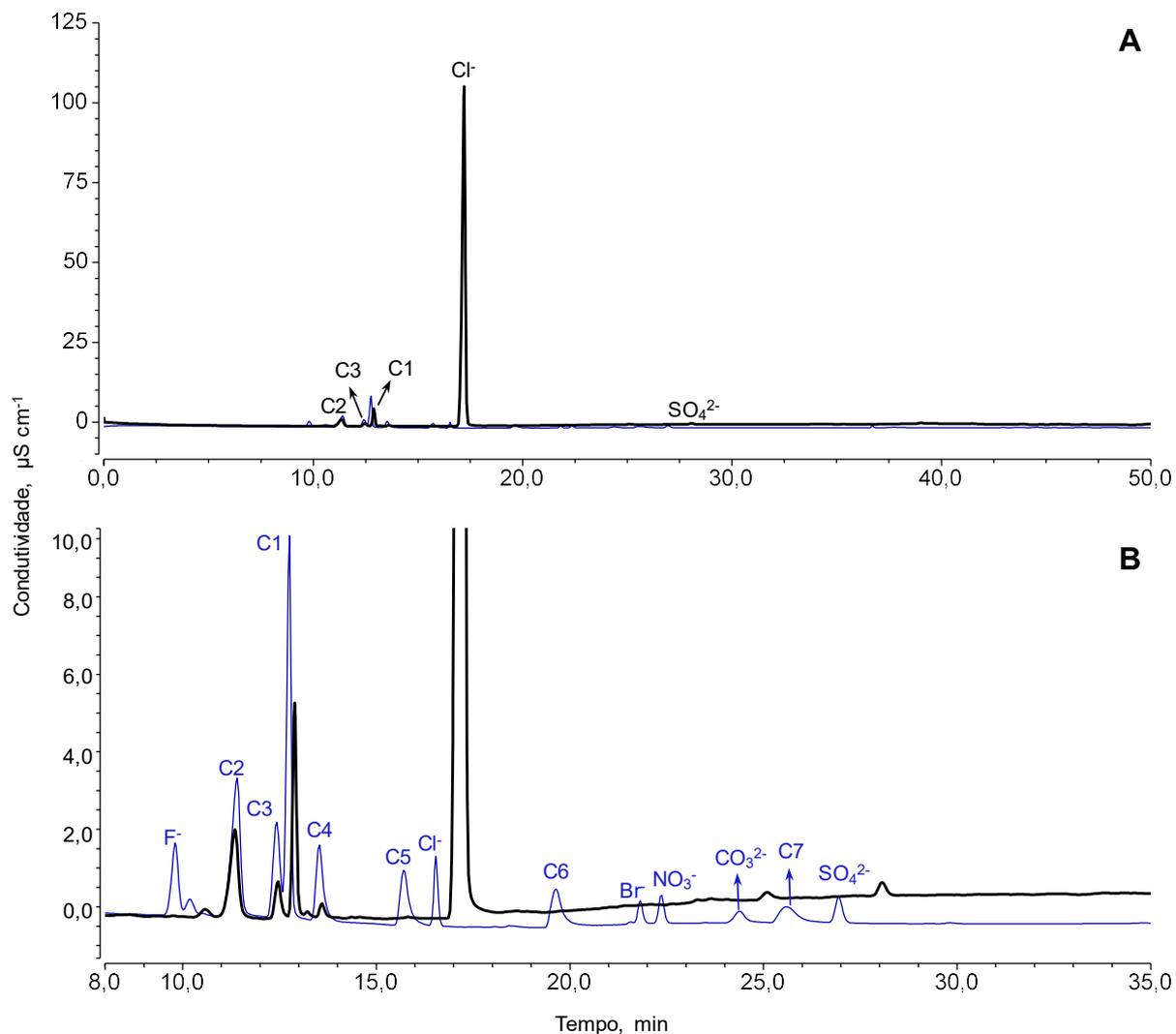
Os dados obtidos para os ânions e ácidos orgânicos indicam que o método otimizado proposto foi adequado para a separação dos analitos ($N > 1000$, $k > 2,0$, $\alpha > 1$ e $A_s < 2$). A resolução para a maior parte dos analitos foi superior a 1,5, com exceção do F^- e do C3, que apresentaram valores relativamente inferiores, porém ainda adequadas para a separação. Em relação a simetria dos sinais, os ácidos orgânicos com cadeias carbônicas maiores que C5 foram os mais assimétricos, provavelmente devido à maior interação destes com a fase estacionária devido à estabilização da carga do íon.

Os coeficientes de determinação obtidos para os ânions e ácidos orgânicos foram superiores a 0,992 e indicam boa adequação do ajuste linear à curva de calibração. Porém, apenas o valor do coeficiente de determinação não é suficiente para garantir a adequabilidade da curva de calibração (RIBEIRO et al., 2008). Desta forma, foi feita, também, a avaliação dos dados utilizando a planilha de validação para métodos analíticos univariados proposta por Ribeiro *et al.* (2008). A análise do gráfico dos resíduos mostrou uma distribuição uniforme dos dados, com variância constante (homocedastidade), além da ausência de amostras atípicas. Estes dados comprovam que o ajuste linear, além da faixa linear de trabalho foram adequadas para a determinação dos ânions e ácidos orgânicos, nas condições otimizadas.

De acordo com Lu, Mou e Riviello (2000) a alta concentração de cloreto em solução pode trazer efeitos na determinação de ânions, como a sobreposição de sinais, utilizando colunas de troca iônica, como a coluna AS11-HC, utilizada neste trabalho. Esta coluna possui capacidade máxima de troca total de íons de 290 $\mu\text{eqv.}$ (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017a). Porém, para a determinação de ânions como F^- , Br^- , NO_3^- e SO_4^{2-} , com desvios menores de 10% na recuperação, os autores encontram que as concentrações máximas de Cl^- permitidas em solução foram de 450, 4050, 12000, 4000 e 4000 mg L^{-1} , respectivamente (LU, MOU e RIVIELLO, 2000). Porém, o estudo não avaliou os efeitos da alta concentração de cloreto na determinação dos ácidos orgânicos, como C5 e C6, que eluem próximos ao t_R do Cl^- .

Assim, para a quantificação das amostras, as injeções foram iniciadas com a amostra "A", a qual possui a menor concentração de cloreto (0,212 g L^{-1}). Para minimizar efeitos de possível saturação na coluna e interferências devido a sobreposição de sinal, a amostra foi diluída em, no mínimo, 2 vezes (106 mg L^{-1} de Cl^-) para a quantificação. Na Figura 20 está mostrado o cromatograma da amostra "A", diluída 2 vezes.

Figura 20 - Cromatograma para a amostra "A", 2 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente a solução de referência contendo 5 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L⁻¹ dos ânions.



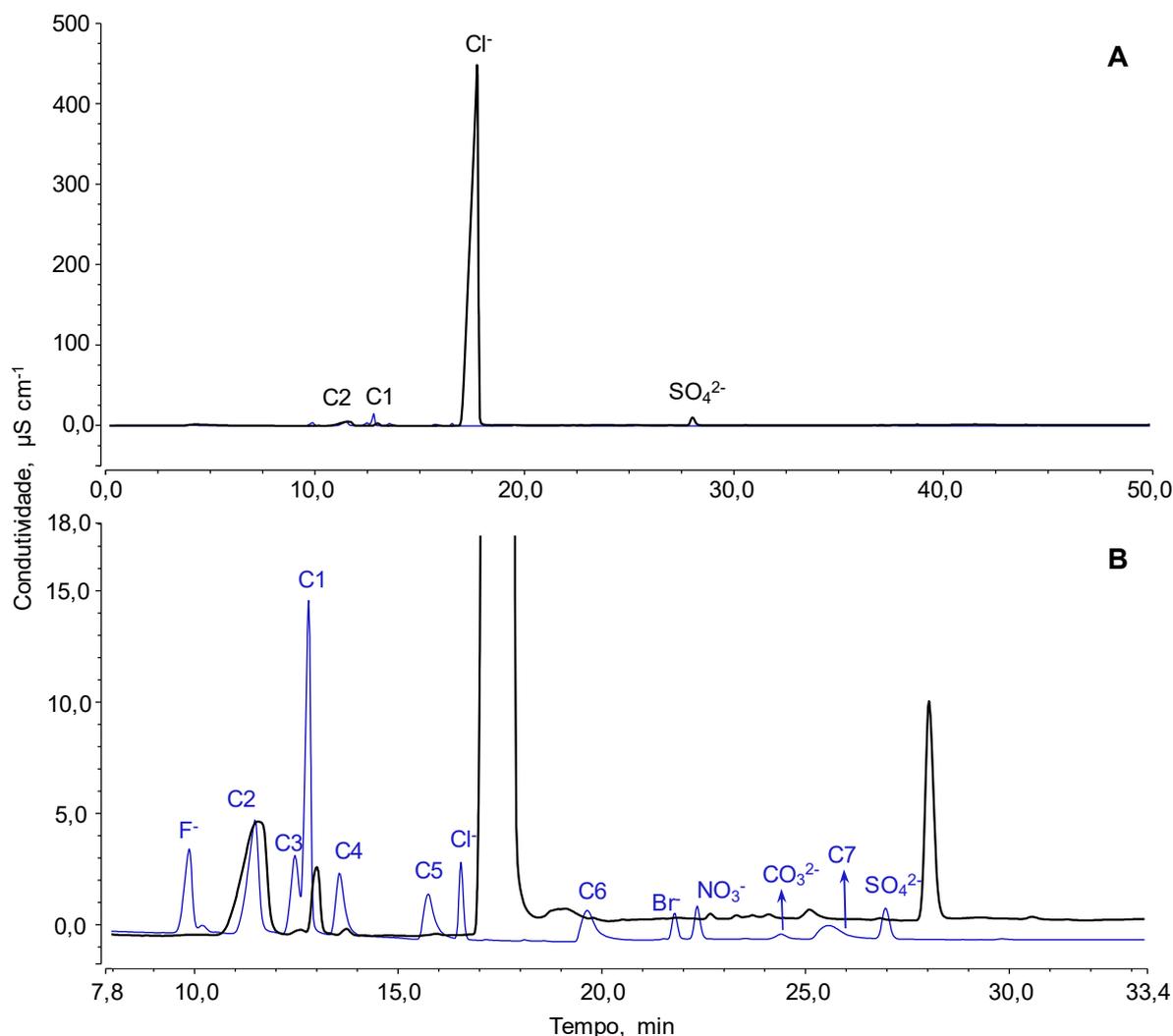
Como pode ser observado, o valor da área do pico para cloreto foi relativamente alto (aproximadamente $19 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ min}$, cerca de 50 vezes maior que a área do último ponto da curva de calibração), sendo que, nessas condições, não foi possível quantificar este íon. Entretanto, foi possível identificar e quantificar os ácidos C1, C2 e C3, além de sulfato nesta amostra, utilizando as condições otimizadas e a diluição de 2 vezes. Cabe salientar que a concentração dos outros ácidos (C4, C5, C6, C7 e C8) e ânions (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} e PO_4^{3-}) ficaram abaixo do LOQ (Tabela 11).

Para confirmar os valores da quantificação dos analitos, foram feitos ensaios

de fortificação, com uma solução de referência de 10 mg L⁻¹ para os ácidos e 2 mg L⁻¹ para os ânions. A fortificação foi equivalente a 100% da concentração de analito encontrada na amostra (BLIESNER, 2006). Previamente às quantificações, as amostras foram diluídas para que as concentrações ficassem dentro da faixa linear do método para cada íon. As recuperações encontradas foram de 92 a 104%, para todos os analitos, mesmo os que não estavam presentes originalmente na amostra.

Para a quantificação dos ânions e ácidos orgânicos nas outras amostras, a fim de minimizar possíveis problemas de saturação na coluna, bem como aumentar a sua vida útil, optou-se por diluir a amostra para uma concentração de cloreto próxima à da amostra anterior, de aproximadamente 100 mg L⁻¹. Assim, a amostra “B” (8,53 g L⁻¹ de Cl⁻) foi diluída 80 vezes, previamente à injeção em coluna de troca iônica. Entretanto, nessas condições, os resultados para a maior parte dos ânions e todos os ácidos orgânicos ficaram abaixo do LOQ. Foi avaliada, então, a injeção da amostra diluída 40 vezes, com uma concentração de cloreto de, aproximadamente, 213 mg L⁻¹. Na Figura 21 pode ser observado o cromatograma da amostra “B”, diluída 40 vezes.

Figura 21 - Cromatograma para a amostra "B", 40 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 5 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L⁻¹ dos ânions.



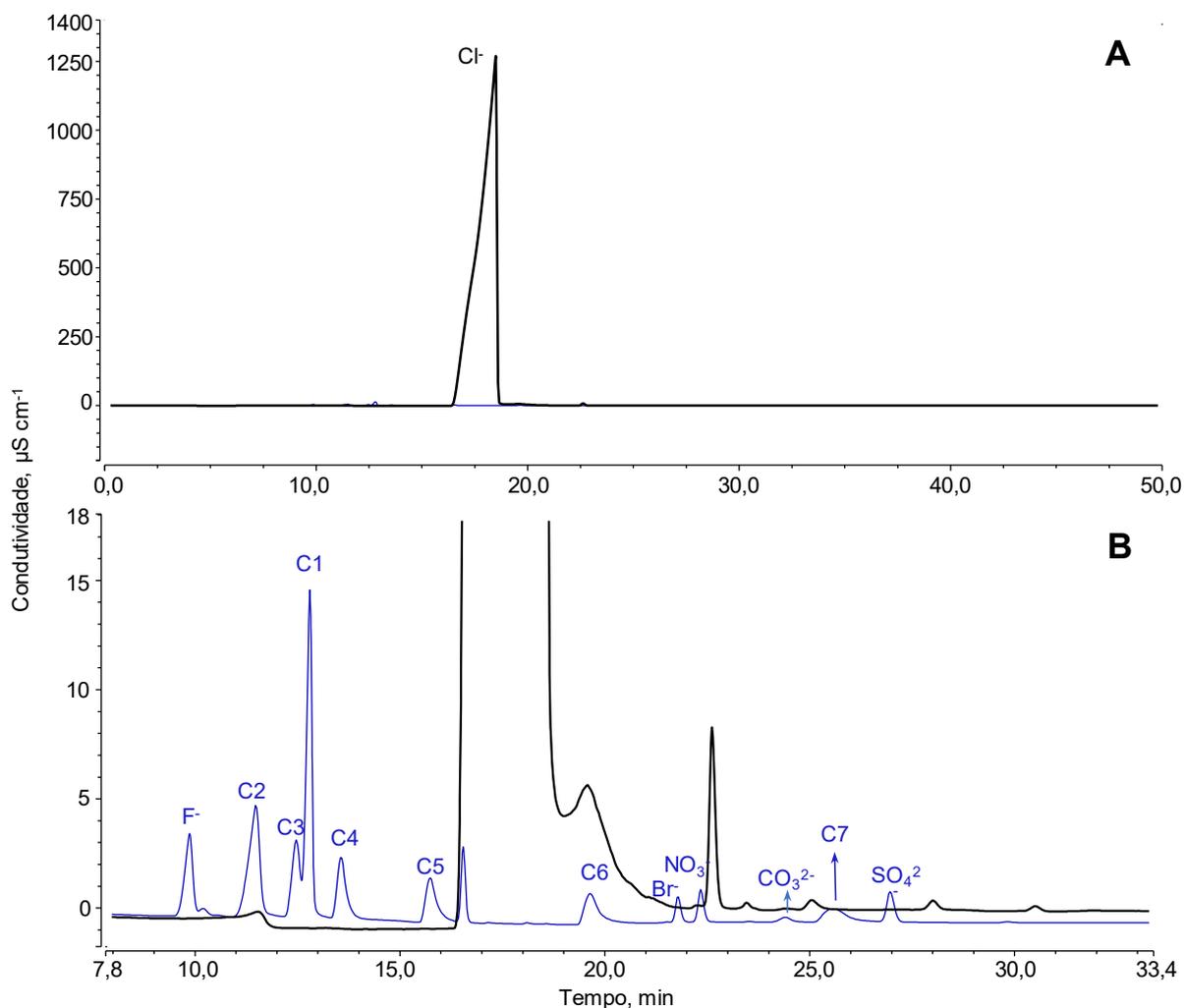
Como pode ser observado pelo cromatograma da Figura 21-B, mesmo com a amostra diluída 40 vezes, os sinais ficam deslocados em relação ao padrão, alterando o tempo de retenção e, além disso, a linha base ficou mais alta após a eluição do Cl^- , não retornando ao seu valor inicial. Ainda, o valor da área do pico para cloreto foi relativamente alto (aproximadamente $193 \mu\text{S cm}^{-1}$, cerca de 470 vezes maior que a área do último ponto da curva de calibração), sendo que, nessas condições, também não foi possível quantificar este íon. Além disso, foram feitas injeções de água após a injeção da amostra e observou-se que ainda ficava Cl^- retido na coluna, sendo necessária duas corridas cromatográficas para que a concentração deste diminuísse

para menos de 1000 mg L^{-1} . Entretanto, foi possível identificar e quantificar os ácidos C1, C2 e SO_4^{2-} nesta amostra, utilizando as condições otimizadas e a diluição de 40 vezes. Cabe salientar que a concentração dos outros ácidos (C3, C4, C5, C6, C7 e C8) e ânions (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} e PO_4^{3-}) ficaram abaixo do LOQ.

A fim de confirmar os valores encontrados, foram feitos ensaios de recuperação, com uma solução de referência para os ânions e ácidos orgânicos e as recuperações foram de 89 a 107%, para todos os analitos. Assim como para a amostra "A", as concentrações adicionadas foram, aproximadamente, a mesma encontrada na amostra, sendo a concentração final igual ao dobro da concentração original. A amostra foi diluída, previamente à injeção, para que as concentrações ficassem dentro da faixa linear.

Ainda, foi feita a injeção da amostra C, diluída 100 vezes (concentração final de Cl^- de, aproximadamente, 330 mg L^{-1}) para a quantificação dos ácidos orgânicos e ânions. Na Figura 22 pode ser observado o cromatograma da amostra C, diluída 100 vezes.

Figura 22 - Cromatograma para a amostra "C", 100 vezes diluída, após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica. A: cromatograma completo, B: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 5 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C8 e 0,5 mg L⁻¹ dos ânions.



Conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 22-A, o sinal para Cl^- ficou assimétrico, com $A_s = 0,78$. De acordo com Snyder este valor deve ser próximo de 1, indicando, assim, que o sinal é totalmente simétrico (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). Quanto mais simétrico o sinal, melhor é a separação dos componentes, pois a assimetria distorce o sinal, reduzindo o valor da eficiência de separação (NEUE, 1997). Além disso, a área para Cl^- foi de, aproximadamente, 520 vezes superior ao último ponto da curva de calibração. Sinais cromatográficos com valores de $A_s < 1$, geralmente, são devidos à saturação do detector e não de sobrecarga da coluna cromatográfica (POOLE, 2003).

A Figura 22-B mostra, pela ampliação do cromatograma, que a linha base ficou

instável no início da corrida cromatográfica e, o sinal de Cl^- encobriu o sinal do C6. A quantificação dos ácidos orgânicos e ânions, nessa amostra, não foi possível pois, devido ao alto fator de diluição, maior parte dos valores ficaram abaixo do LOQ. A fim de verificar a interferência da matriz, foram feitos ensaios de recuperação, utilizando solução de 5 mg L^{-1} dos ácidos orgânicos e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ dos ânions na amostra diluída (100 vezes) e as recuperações, principalmente para os ácidos de cadeias menores (C1, a C6), foram inferiores a 80%.

Desta forma, maior parte das amostras de águas separadas de emulsões de petróleo não foram analisadas utilizando-se esta coluna devido à limitação em relação ao alto teor de Cl^- presente nas amostras. Para a quantificação, utilizando este mecanismo de separação, as amostras precisariam ser diluídas, no mínimo, 2 vezes, como é o caso da amostra “A”, até mais de 500 vezes, como é o caso da amostra “O”, que possui a maior concentração de cloreto (138 g L^{-1}).

Desta forma, a quantificação de ânions não foi possível, na maior parte das amostras, como é o objetivo deste trabalho. A limitação para a quantificação de ânions e ácidos orgânicos, na mesma técnica de separação e detecção é a concentração de Cl^- da amostra, que deve ser inferior a 100 mg L^{-1} . Devido à esta limitação, a quantificação utilizando coluna de troca iônica foi feita somente nas amostras “A” e “B”. Os resultados obtidos para os ânions e ácidos nas amostras “A” e “B”, utilizando a cromatografia de troca iônica e detecção por condutividade estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados obtidos para ânions e ácidos orgânicos nas amostras "A" e "B" após a separação em coluna de troca iônica (Dionex IonPac AS11-HC) utilizando gradiente de KOH como fase móvel, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão eletrolítica, n=3.

Íon (mg L ⁻¹)	Amostra	
	A	B
F ⁻	< 0,02*	< 0,4*
C2	25,2 ± 1,5	553 ± 48
C3	7,60 ± 0,78	< 4*
C1	12,1 ± 0,9	< 20*
C4	< 0,1*	< 20*
C5	< 0,2*	< 4*
Cl ⁻	< 0,05*	< 10*
C6	< 0,1*	< 2*
Br ⁻	< 0,02*	< 0,4*
NO ₃ ⁻	< 0,1*	< 2*
C7	< 0,2*	< 4*
SO ₄ ²⁻	1,90 ± 0,81	138 ± 12
PO ₄ ³⁻	< 0,02*	< 0,4*
C8	< 0,2*	< 20*
Fator mínimo de diluição	2 x	40 x

* Valores de LOQ multiplicados de acordo com o fator mínimo de diluição necessário para a quantificação.

Devido à alta concentração de Cl⁻ das amostras (até 138 g L⁻¹), como pode ser observado na Tabela 11, foi possível quantificar os ânions e ácidos orgânicos somente nas amostras A e B. Para a amostra "A", foi possível quantificar os ácidos orgânicos C1, C2 e C3, além de PO₄³⁻ e para a amostra B, C2 e PO₄³⁻. Devido a maior concentração de Cl⁻ na amostra "B", em relação a "A", os LOQs ficaram 40 vezes maior e, conseqüentemente, menos espécies foram possíveis de ser detectadas.

Kadnar e Rieder (1995) relataram que foi possível quantificar Br⁻ mesmo quando a razão de Cl⁻ para Br⁻ foi de 1000:1. Porém, os autores relatam que a coluna perde rapidamente a capacidade de troca, resultando em decréscimo no tempo de retenção e resolução dos sinais para Br⁻ e Cl⁻. Maior parte das amostras utilizadas neste trabalho possuem concentração ainda superior as amostras utilizadas no trabalho de Kadnar e Rieder, sendo algumas cerca de 150 vezes maior (KADNAR e RIEDER, 1995).

Para a quantificação destes íons utilizando cromatografia de íons, como mencionado anteriormente, a concentração de Cl^- deve ser inferior a, aproximadamente, 100 mg L^{-1} . Desta forma, as amostras precisariam de um alto fator de diluição para evitar possíveis interferências na quantificação. Porém, com a diluição, os LODs e LOQs do método são multiplicados proporcionalmente e os íons acabam não sendo detectados nestas condições.

Uma alternativa para reduzir o fator de diluição das amostras é a remoção do Cl^- da matriz, sem que os analitos sejam perdidos. A utilização de um sistema bidimensional pode ser uma alternativa. Porém, a utilização de colunas de troca iônica para a separação do Cl^- , nestes casos, não seria adequada pois a concentração deste íon é muito maior que dos outros e, conseqüentemente, ocorre a coeluição do Cl^- com os outros íons, principalmente os com tempo de retenção maior. Uma alternativa ao sistema bidimensional seria a utilização de cartuchos de Ag^+ para filtração e conseqüente precipitação do Cl^- . Porém, nestes casos, pode ocorrer a coprecipitação dos outros íons, como F^- e Br^- e impossibilitar a quantificação destes íons. Além disso, estes cartuchos são de alto custo.

Assim, como mencionado anteriormente, a quantificação dos ânions não foi possível devido à alta concentração de Cl^- na maior parte das amostras. Conseqüentemente, não foi possível quantificar, nestes casos, ânions e ácidos orgânicos utilizando a mesma corrida cromatográfica. Sendo assim, nos próximos testes, optou-se por avaliar a separação e quantificação somente dos ácidos orgânicos de cadeia curta C1 a C10. Para isto, outros tipos de coluna, como exclusão iônica e pareamento iônico foram utilizados e serão descritos a seguir.

4.2.2 Avaliação da capacidade de separação da coluna de exclusão iônica

Os parâmetros cromatográficos, assim como na coluna de troca iônica, inicialmente avaliados para a separação de ácidos orgânicos foram baseados em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b), utilizando soluções de referência. Para a separação, foi utilizada coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), $19 \text{ }^\circ\text{C}$, HPFB 1 mmol L^{-1} como fase móvel, $0,16 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção por condutividade, UV (210 nm) e MS, com supressão química e regeneração externa de TBAOH 5 mmol L^{-1} . Além do comprimento de onda recomendado de 210 nm, foram monitorados, também, os comprimentos de onda de

230, 250 e 270 nm, a fim de verificar possíveis interferências ou diferentes intensidades de sinal, porém estes não foram utilizados para expressar os resultados.

As otimizações foram feitas utilizando uma solução contendo 50 mg L⁻¹ dos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10, preparada em acetonitrila 50% (v/v). A Tabela 5, no item 3.3.2, *dos Materiais e Métodos*, mostra as condições recomendadas e utilizadas para a separação de ácidos orgânicos por exclusão iônica. Cabe salientar que, para a exclusão iônica, o sistema foi montado com os detectores de CD, UV e MS em série, conforme esquema mostrado na Figura 10. Desta forma, após a separação dos ácidos em coluna de exclusão iônica, estes foram detectados por CD, UV e MS.

4.2.2.1 *Otimização das condições cromatográficas*

Inicialmente, para a confirmação dos tempos de retenção dos íons, foi feita a injeção de cada padrão individualmente (C1 a C10), na concentração de 50 mg L⁻¹. Com 60 min de corrida cromatográfica, não foram obtidos sinais para os ácidos maiores que C5 ou estes foram pouco intensos por condutividade e UV, em todos os comprimentos de onda avaliados. Com a finalidade de separar os ácidos maiores (C6 a C10), foi aumentado o tempo de corrida para 100 min. Porém, mesmo com 100 min, só foi possível separar até o C6. Como o tempo de corrida cromatográfica foi relativamente longo (60 min), optou-se por não avaliar a separação dos ácidos orgânicos maiores que C5.

Os sinais obtidos para C1 a C5 por MS, nestas condições, mostraram pouca sensibilidade e não foram reprodutíveis. Geralmente, em sistemas de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, é utilizada uma fase móvel composta de água e algum modificador orgânico, como acetonitrila ou metanol. O processo de ionização por ESI é fortemente afetado pelas características dos solventes utilizados na fase móvel. Neste caso, os solventes orgânicos facilitam o processo de ionização devido às suas características como baixa tensão superficial, alta volatilidade e menor eficiência de solvatação dos íons, quando comparados à água (KOSTIAINEN e KAUPPILA, 2009). Assim, quando a fase móvel não é adequada para a ionização, faz-se necessária a adição pós-coluna de solventes mais polares, como a acetonitrila, para auxiliarem no processo de ionização (KOSTIAINEN e KAUPPILA, 2009; NIESSEN, 2006). Devido à baixa sensibilidade para C1 a C5 utilizando a MS e ácido

heptafluorbutírico (HPFB) como fase móvel, foi testada a adição de acetonitrila pós-coluna a fim de melhorar as condições de ionização.

4.2.2.1.1 Avaliação da adição de acetonitrila pós-coluna

A fim de melhorar as condições de ionização dos ácidos C1 a C5 por ESI, optou-se por testar a adição de acetonitrila à fase móvel, previamente à injeção no espectrômetro de massas. Para isso, foi inserido, na saída do detector de UV, um conector com três vias, com um canal disponível para a introdução de acetonitrila, em uma vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 11, no item 3.3.2.1.1, dos *Materiais e Métodos*, mostra o esquema da montagem do sistema com a inserção do conector e a adição de acetonitrila à fase móvel com uma bomba auxiliar.

Mesmo com a adição de acetonitrila na fase móvel, os sinais para os ácidos orgânicos não tiveram melhora de reprodutibilidade nem mesmo de intensidade. Cabe salientar que, a adição de acetonitrila pós-coluna acaba diluindo a fase móvel e, conseqüentemente, os analitos em solução. Ou seja, mesmo que a acetonitrila favoreça a ionização dos ácidos orgânicos na fonte de ionização, estes estão mais diluídos e vão chegar em menor concentração ao detector. Desta forma, optou-se por não utilizar este sistema.

Ainda, com o objetivo de tentar melhorar a intensidade de sinal para os ácidos por MS, optou-se por adicionar acetonitrila na própria fase móvel. Para isso, foi testada, a separação dos ácidos C1 a C5 utilizando fase móvel de HPFB 1 mmol L^{-1} em 5% de acetonitrila, na vazão de $0,16 \text{ mL min}^{-1}$. Com estas condições, foi observado que a pressão do sistema foi superior ao limite de 1000 psi e, conseqüentemente, a vazão de fase móvel foi reduzida para $0,13 \text{ mL min}^{-1}$ para evitar danos na coluna. Utilizando-se esta condição, obteve-se uma melhor intensidade e relativa melhora na reprodutibilidade dos sinais para os ácidos no MS, principalmente para o C5, no cromatograma de íons extraídos. Porém, considerando-se os cromatogramas obtidos por condutividade e UV, os sinais, principalmente, para C1, C2 e C3, ficaram com uma menor resolução ($R_s < 1$) e não foram bem separados, dificultando a integração.

Como a adição da acetonitrila tanto na pós-coluna quanto na própria fase móvel não melhorou satisfatoriamente os sinais para os ácidos C1 a C5 por MS e piorou os sinais para condutividade e UV, optou-se por não utilizar este solvente no estudo. Quando os detectores de CD e UV foram utilizados, sem a adição de acetonitrila, os

sinais obtidos foram melhor resolvidos e com uma área maior do que os obtidos por MS, sendo então, estes escolhidos para a quantificação dos ácidos por exclusão iônica. O MS foi utilizado somente em casos que fosse necessária a confirmação de algum sinal cromatográfico.

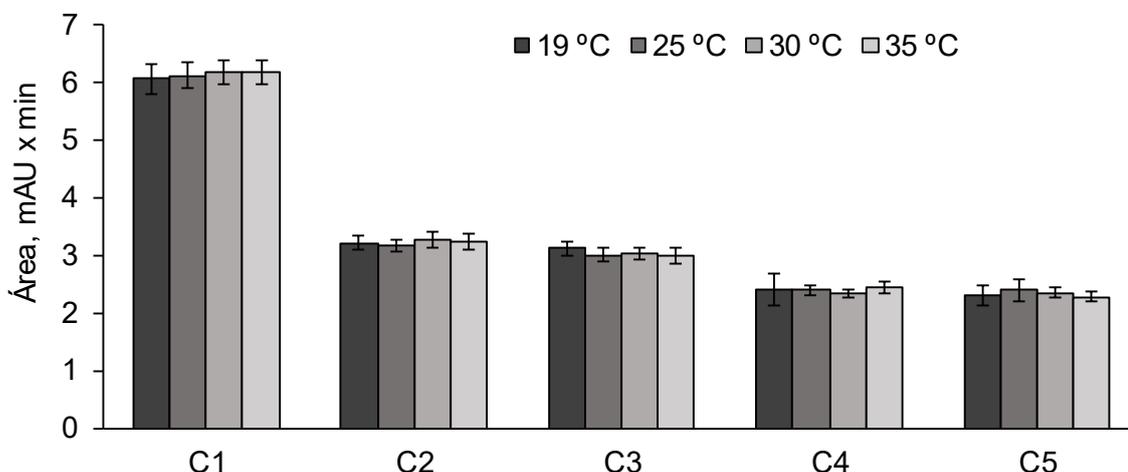
Ainda, a fim de otimizar as condições de separação dos ácidos orgânicos, foram feitas algumas avaliações em relação à concentração de HPFB da fase móvel, temperatura e concentração do TBAOH para a regeneração do supressor. Para todas as avaliações, a vazão de fase móvel foi mantida em $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ para evitar possíveis aumentos de pressão na coluna, podendo isto causar danos na mesma.

4.2.2.1.2 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna

Como mencionado no item 3.2, dos *Materiais e Métodos*, o sistema de cromatografia disponível para este trabalho permite a utilização de até duas colunas simultaneamente, pela disponibilidade de duas bombas e duas válvulas de injeção, além dos diferentes detectores. Entretanto, o compartimento em que ficam as duas colunas é o mesmo e, desta forma, os métodos utilizados devem estar com mesma temperatura. Por questões operacionais do laboratório, no sistema 1 estava sendo utilizada a coluna de troca iônica, operando na temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Com o objetivo de utilizar os dois sistemas ao mesmo tempo, sem a necessidade de parar os trabalhos com a coluna de troca iônica, foi avaliada a possibilidade de utilização da mesma temperatura com a coluna de exclusão iônica. Para evitar possíveis danos a coluna, utilizando diretamente $35 \text{ }^\circ\text{C}$, foi feita uma avaliação das temperaturas usando 19 , 25 , 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura recomendada para a separação, utilizando esta coluna de exclusão iônica, é de $19 \text{ }^\circ\text{C}$ e, portanto, foi a temperatura inicial.

A Figura 23 mostra os resultados em área dos ácidos C1 a C5 e detecção por UV, nas temperaturas de 19 , 25 , 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados para a avaliação com detecção por CD não foram possíveis devido à indisponibilidade de supressor no momento da avaliação. Os resultados para a detecção por MS, como mencionado anteriormente, foram utilizados somente para confirmação, quando necessário.

Figura 23 - Resultados obtidos para a avaliação da temperatura na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1) utilizando HPFB 1 mmol L⁻¹ como fase móvel e detecção por UV. (média ± desvio padrão, n=3)

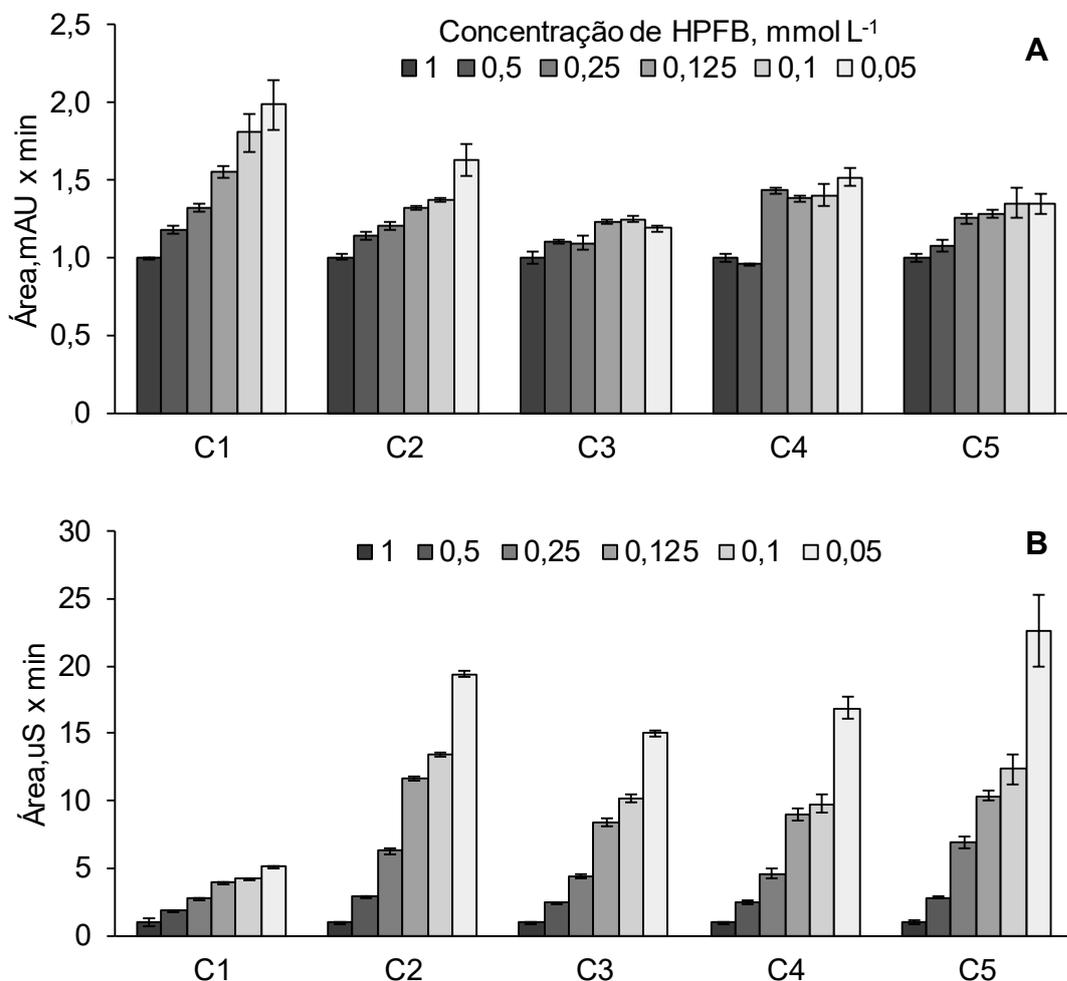


Como pode ser observado pelos gráficos da Figura 23, não foram observadas diferenças significativas (ANOVA) para as temperaturas e os ácidos avaliados, nestas condições. Desta forma, com o objetivo de possibilitar a utilização de duas colunas ao mesmo tempo no sistema cromatográfico, optou-se por utilizar a temperatura de 35 °C para as separações e outras otimizações.

4.2.2.1.3 Avaliação da concentração de ácido heptafluorbutírico da fase móvel

Após a avaliação do efeito da temperatura, foi feita a avaliação da concentração do HPFB da fase móvel. A separação foi feita no modo isocrático, na vazão de 0,1 mL min⁻¹ e foram avaliadas as concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,1 e 0,05 m mol L⁻¹. A Figura 24 mostra os resultados, em área, para uma solução de referência dos ácidos orgânicos C1 a C5 50 mg L⁻¹ e detecção por UV e CD, na avaliação da concentração de HPFB da fase móvel. Para melhor visualização, os valores de área foram normalizados em relação aos valores obtidos para a concentração de 1 mmol L⁻¹, considerando-se estes como 1.

Figura 24 - Resultados obtidos para a avaliação da concentração de HPFB da fase móvel na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), temperatura de 35 °C e **A**: detecção por UV e **B**: detecção por condutividade. (média \pm desvio padrão, n=3).

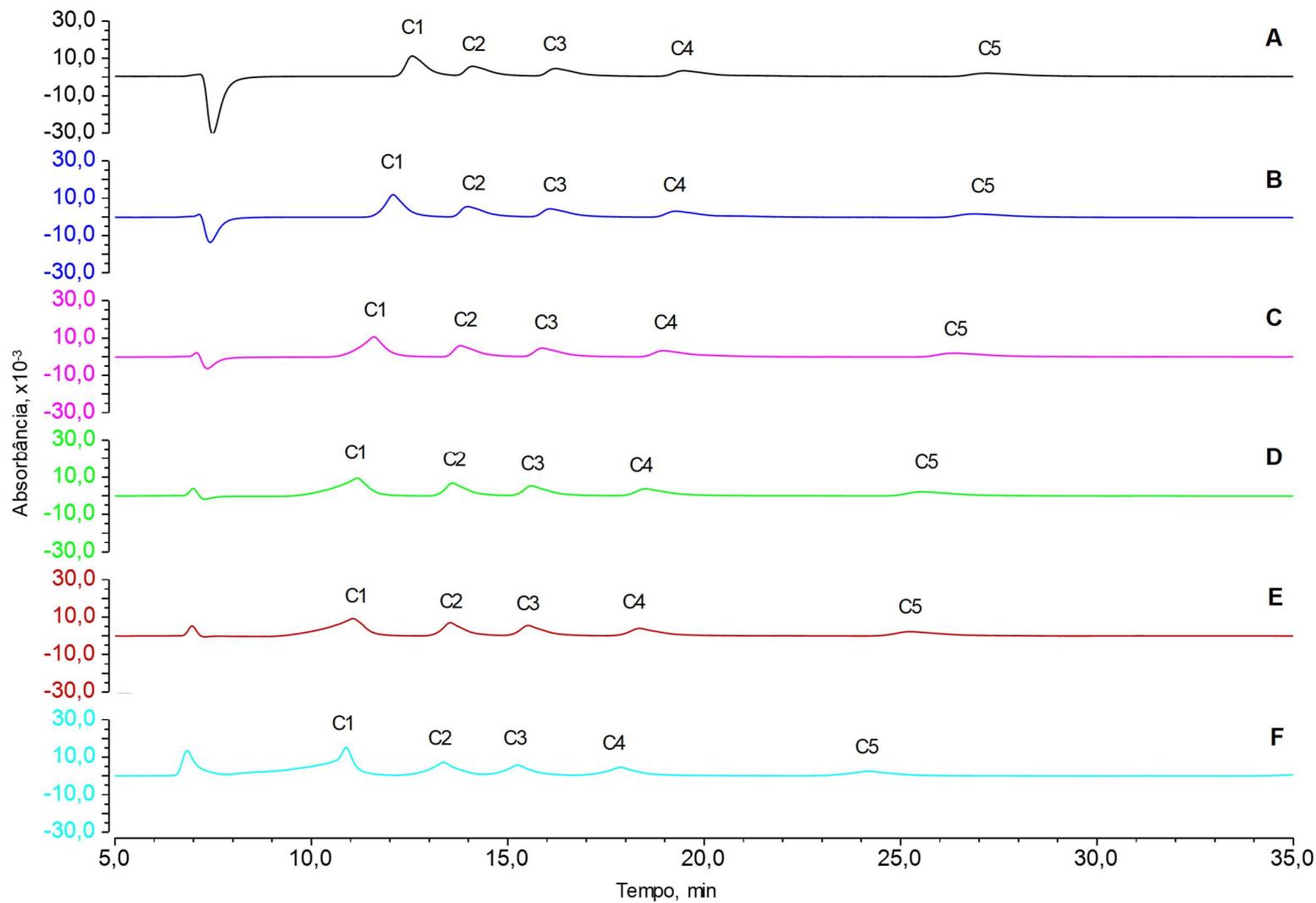


Para a avaliação da concentração de HPFB foram observados comportamentos diferentes, dependendo do detector utilizado. Quando se utilizou a detecção por UV, para os ácidos C1 e C2, a área obtida aumentou com a diminuição da concentração de HPFB. Para o C3, os valores de área não variaram muito em relação ao valor encontrado para 1 mmol L⁻¹, sendo que foi observado um pequeno aumento relativo desta área para concentrações menores do que 0,125 mmol L⁻¹. Para os ácidos C4 e C5, os valores para 1 e 0,5 mmol L⁻¹ foram menores do que os encontrados para as concentrações menores de HPFB (0,25, 0,125, 0,1 e 0,05 mmol L⁻¹).

Os resultados da avaliação de concentração de HPFB utilizando-se detecção por CD, mostraram um aumento na área obtida para os ácidos C1 a C5, com a

diminuição da concentração utilizada para a fase móvel. Porém, quando foram utilizadas concentrações muito baixas, como 0,05 e 0,1 mmol L⁻¹, os sinais ficaram assimétricos ($A_s > 2,5$), principalmente para o C1, independentemente do detector utilizado (CD ou UV). Devido à assimetria dos sinais, nas concentrações mais baixas de HPFB (0,05 e 0,1 mmol L⁻¹), a integração de sinal é prejudicada e pode ocasionar erros no cálculo da área, o que pode ser um fator para explicar o aumento da área, principalmente, quando é utilizada a detecção por condutividade. Além disso, em concentrações maiores de HPFB, o pH da solução está relativamente menor e, desta forma, os ácidos orgânicos estarão menos ionizados, o que possibilita uma maior interação destes com a fase estacionária da coluna e, conseqüente melhora na separação. Esta assimetria, principalmente para o ácido C1 está mostrada na Figura 25 para os cromatogramas da avaliação da concentração de HPFB.

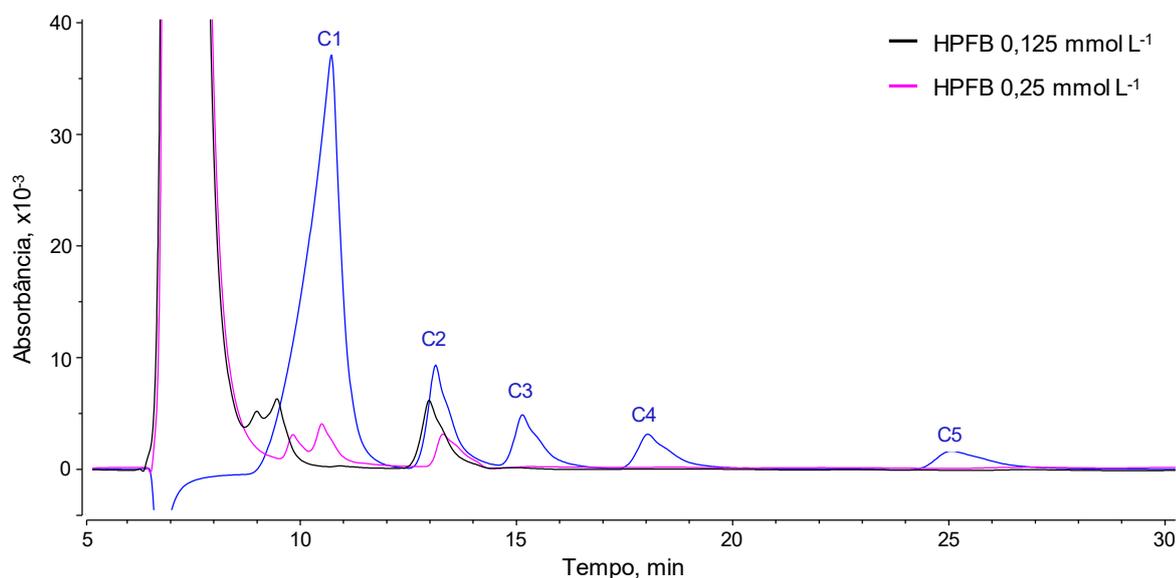
Figura 25 - Cromatogramas para a avaliação da concentração de HPFB (**A**: 1 mmol L⁻¹, **B**: 0,5 mmol L⁻¹, **C**: 0,25 mmol L⁻¹, **D**: 0,125 mmol L⁻¹, **E**: 0,1 mmol L⁻¹ e **F**: 0,005 mmol L⁻¹) da fase móvel na separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), na temperatura de 35 °C e detecção por UV .



Como pode ser observado pelos cromatogramas e, também, pelos cálculos do fator de retenção (k), conforme vai diminuindo a concentração de HPFB da fase móvel, o valor de k para C1 também diminui, 0,8 em 0,05 mmol L⁻¹ para 0,5 em 1 mmol L⁻¹). Em todas as concentrações avaliadas, os valores de k foram menores que o recomendado ($k > 2$). Além disso, o sinal para C1, nas concentrações mais baixas de fase móvel (0,05 e 0,1 mmol L⁻¹) ficou assimétrico, com $A_s < 0,7$. A resolução e o número de pratos teóricos foram adequados em todas as condições avaliadas. Desta forma, considerando-se os valores de área e os parâmetros de separação, optou-se por utilizar a concentração de HPFB na fase móvel de 0,125 mmol L⁻¹ para os próximos testes.

O Cl⁻, que está em alta concentração nas amostras, possui pouca interação com a coluna de exclusão iônica, e, conseqüentemente, acaba eluindo no tempo morto. Como foi observado nas avaliações anteriores, utilizando a coluna de troca iônica, o Cl⁻ acaba coelindo com os outros analitos e sobrepondo os sinais deste. Levando-se isto em consideração, como a concentração da fase móvel afeta na separação, principalmente, do sinal do C1 do sinal para o tempo morto (Cl⁻), foi feita a injeção da amostra utilizando as condições otimizadas até o momento. Para evitar possíveis danos a coluna, a amostra foi diluída 6 vezes previamente a injeção. Porém, quando foi feita a injeção da amostra, utilizando fase móvel de HPFB 0,125 mmol L⁻¹, não foi obtida boa resolução do sinal relativo ao tempo morto e o sinal para C1. Assim, optou-se por fazer, também, a injeção da amostra com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹. Os cromatogramas obtidos para a amostra "B", na avaliação da fase móvel, estão mostrados na Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma ampliado para a amostra “B”, 6 vezes diluída, após separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), temperatura de 35 °C e detecção por UV utilizando fase móvel de HPFB 0,125 mmol L⁻¹ e 0,25 mmol L⁻¹. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 50 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em fase móvel de HPFB 0,125 mmol L⁻¹.



Como pode ser observado na Figura 26, quando foi utilizada fase móvel de HPFB 0,125 mmol L⁻¹, os sinais para C1, na amostra “B”, ficaram com pior resolução ($R_s = 0,87$), quando comparados com os sinais obtidos para a concentração de 0,25 mmol L⁻¹ ($R_s = 1,38$), levando-se em consideração o sinal do tempo morto. Neste caso, como o valor de k para 0,25 mmol L⁻¹ é relativamente maior do que comparado a concentração de 0,125 mmol L⁻¹, os sinais foram mais bem separados. Assim, levando em consideração uma maior área relativa, obtida com concentrações menores de HPFB e a eficiência de separação do C1 do sinal de tempo morto (obtida com concentrações maiores de HPFB), optou-se por utilizar a concentração intermediária de HPFB 0,25 mmol L⁻¹ como fase móvel para as próximas otimizações.

4.2.2.1.4 Avaliação da concentração de hidróxido de tetrabutylamônio utilizado como solução regenerante no sistema de supressão

Ainda, foi avaliada a concentração da solução de TBAOH utilizada na regeneração da supressora química. Para isto, foi feito o monitoramento do sinal da linha base durante 30 min, sem a injeção de soluções de referência ou obtenção de

cromatogramas e, devido a isto, os resultados não estão ilustrados. Foram avaliadas concentrações de 5, 1, 0,5 e 0,25 mmol L⁻¹, na vazão fixa de, aproximadamente, 2,5 mL min⁻¹. Foi observado que a linha base, tanto para os sinais de UV, quanto de condutividade permanece a mesma, com as concentrações de 5, 1 e 0,5 mmol L⁻¹. Porém, quando 0,25 mmol L⁻¹ de TBAOH foram utilizados, foi observado um aumento no sinal relativo à linha base. Desta forma, a concentração de 0,5 mmol L⁻¹ foi escolhida para a regeneração da supressora.

4.2.2.2 *Resumo das condições otimizadas para separação em coluna exclusão iônica*

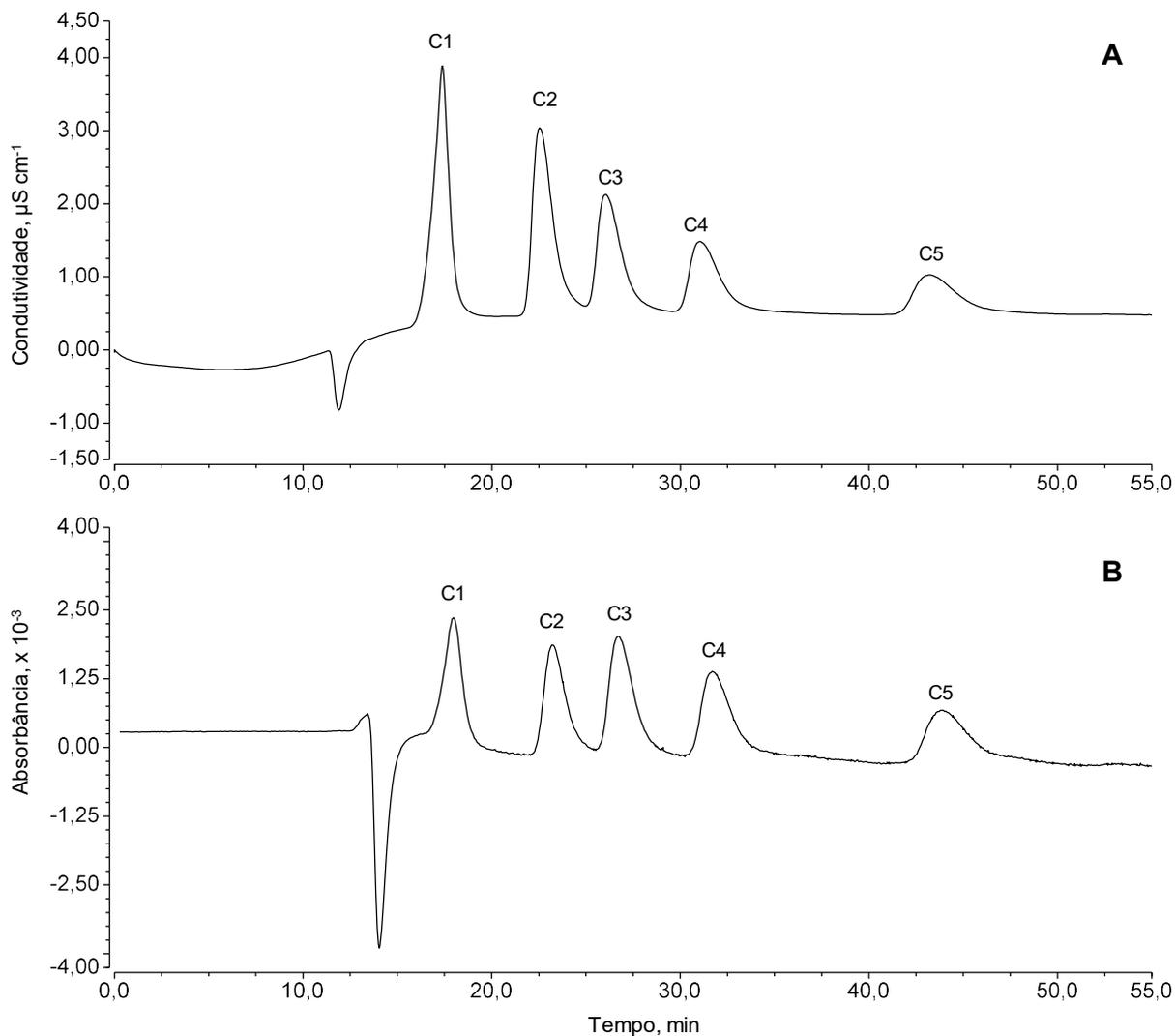
Após todas as avaliações, na Tabela 12 estão mostradas as condições otimizadas para a determinação dos ácidos C1 a C5, utilizando coluna de exclusão iônica. Cabe destacar que, devido à baixa intensidade de sinal obtida para os ácidos C1 a C5, este detector foi utilizado somente para a confirmação de sinal, quando necessário.

Tabela 12 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando coluna de exclusão iônica em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.

Coluna	Dionex IonPac ICE-AS1 (4 x 250 mm)		
Pré-coluna	Dionex IonPac ICE-AG1 (4 x 35 mm)		
Fase móvel	Ácido heptafluorbutírico (HPFB) 0,25 mmol L ⁻¹		
Vazão	0,1 mL min ⁻¹		
Volume de injeção	10 µL		
Tempo	55 min		
Temperatura	35 °C		
Detectores	Conductividade		
	Supressora química ACRS-ICE 500		
	Regeneração externa com TBAOH 0,5 mmol L ⁻¹		
	Vazão do regenerante: 2,5 mL min ⁻¹		
	Ultravioleta		
	UV 1: 210 nm		
	Espectrômetro de massas		
	Fonte de ionização: ESI		
	Temperatura do probe: 450 °C		
	Potencial da agulha: 3 kV		
	Modo: negativo (SIM)		
	Parâmetros		
	Ácido	Razão massa/carga (m/z)	Cone (V)
	C1	45	50
	C2	59	50
	C3	73	50
	C4	87	50
	C5	101	50

A Figura 27 mostra o cromatograma obtido para uma solução de referência de 25 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 nos detectores de CD e UV. Como pode ser observado, foram obtidas boas separações para os ácidos C1 a C5 utilizando coluna de exclusão iônica e detectores tanto de CD, quanto por UV.

Figura 27 - Cromatograma para uma solução de referência de 25 mg L⁻¹ após separação dos ácidos C1 a C5 em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e **A**: detecção por condutividade e **B**: detecção por UV, ambos com supressão química.



4.2.2.3 Validação do método analítico e quantificação de ácidos orgânicos (C1 a C5) utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade

Na separação utilizando coluna de exclusão iônica, o Cl⁻ não possui interação com a fase estacionária, devido à exclusão de Donnan e, desta forma, acaba eluindo junto no tempo morto da coluna. Porém, como a concentração de Cl⁻ nas amostras é alta (até 138 g L⁻¹), foram feitos alguns testes para verificar a influência deste nos sinais obtidos nos cromatogramas. Para isso, assim como na troca iônica, foi feita a injeção de algumas amostras em ordem crescente de concentração de Cl⁻. Foi observado que em concentrações de Cl⁻ superiores a 5000 mg L⁻¹, o sinal do tempo

morto acaba sobrepondo o sinal para C1. Desta forma, optou-se por diluir todas as amostras para concentrações de Cl^- inferiores a 5000 mg L^{-1} . A necessidade de diluição das amostras com altas concentrações de Cl^- é reportada na literatura como uma desvantagem da utilização da cromatografia de exclusão iônica para amostras com alto teor salino (PITTMAN e LEWAN, 1994; XU et al., 1997). Além da sobreposição de picos, as soluções com altas concentrações de Cl^- diminuem o tempo de vida das colunas cromatográficas (PITTMAN e LEWAN, 1994).

Para a quantificação dos ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica, alguns parâmetros para a validação do método analítico foram inicialmente avaliados, como a obtenção da curva analítica, faixa linear de trabalho, LOD e LOQ para cada analito, além de resolução de sinal, assimetria, fatores de retenção e separação e número de pratos teóricos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). As avaliações foram feitas utilizando uma solução de referência preparada em água com, no mínimo, 5 níveis de concentração, que variaram de $2,5$ a 50 mg L^{-1} (3 replicatas). A Tabela 13 resume os dados obtidos para a separação dos ácidos C1 a C5 por exclusão iônica e detecção por condutividade. Os tempos de retenção mostrados na tabela são para uma solução de referência de 25 mg L^{-1} dos ácidos orgânicos C1 a C5.

Tabela 13 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C1, C2, C3, C4 e C5 após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.

Espécie	t_R (min)	Pratos teóricos (N)	Fator de retenção (k)	Fator de separação (α)	Resolução (R_s)	Assimetria (A_s)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
C1	17,0	1780	0,65	1,66	2,90	1,29	2,5 - 25	$y = 0,1449 x + 0,1995$	0,9991	0,75	2,5
C2	22,5	2162	1,08	1,30	1,65	1,60	5 - 50	$y = 0,0636 x + 0,0325$	0,9989	1,5	5
C3	26,0	2131	1,40	1,34	1,67	1,82	8 - 50	$y = 0,0452 x + 0,0039$	0,9987	2,4	8
C4	31,0	1892	1,88	1,61	2,89	1,93	5 - 50	$y = 0,0336 x + 0,0370$	0,9994	1,5	5
C5	43,2	1886	3,03	-	-	1,67	5 - 50	$y = 0,0306 x - 0,0250$	0,9966	1,5	5

*Valores de LOD e LOQ para amostras com concentrações de Cl⁻ inferiores a 5000 mg L⁻¹.

A separação dos ácidos C1 a C5, utilizando coluna de exclusão iônica foi adequada levando-se em consideração que $N > 1000$, $\alpha > 1$ e $R_s > 1,5$ e $A_s < 2$ (BLIESNER, 2006). Comparando-se os valores de N para C1 a C5, utilizando coluna de cromatografia iônica e exclusão iônica, observa-se que a separação é mais eficiente (N maior) quando a coluna de troca iônica é utilizada. Os sinais para estes ácidos são bem mais alargados utilizando coluna de exclusão iônica, além de os limites de quantificação serem maiores (10 a 50 vezes).

Os valores de k, porém, foram menores que o valor considerado adequando ($k > 2$), com exceção de C5. Este parâmetro indica que os analitos estão próximos ao sinal relativo ao tempo morto do sistema e, dependendo das condições, podem ser afetados. Neste caso, como o cloreto elui no tempo morto, se a concentração deste é muito alta, afeta diretamente nos t_R dos ácidos, principalmente de C1, C2 e C3.

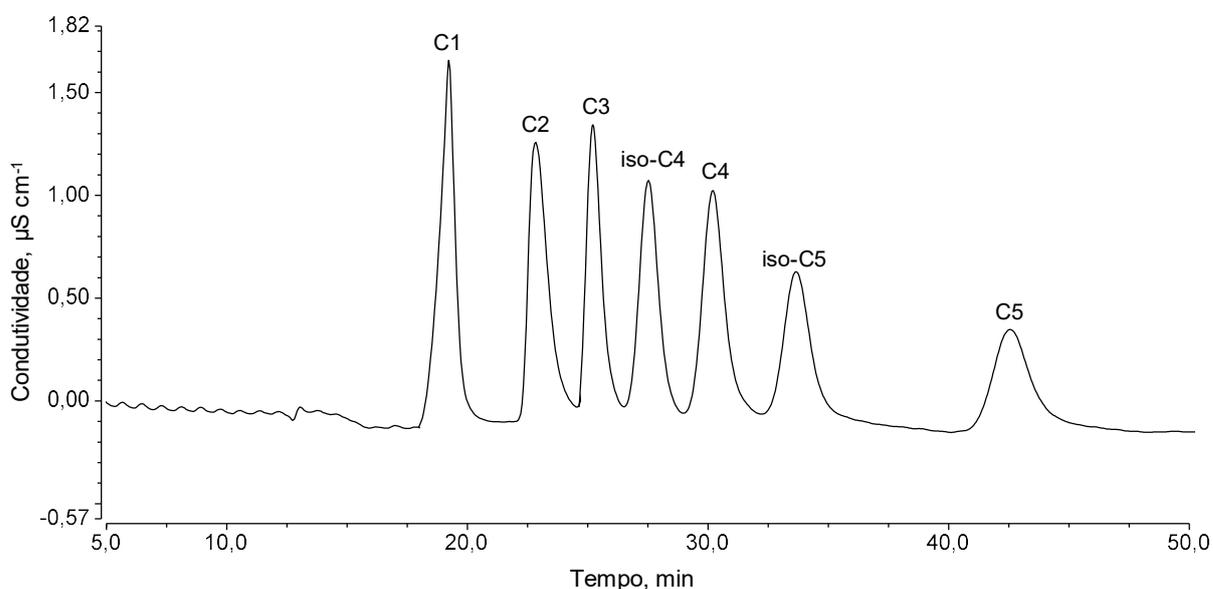
Os coeficientes de determinação obtidos para os ácidos orgânicos foram superiores a 0,996 indicando boa adequabilidade do ajuste linear à curva de calibração. A análise do gráfico dos resíduos, de acordo com a planilha de validação (RIBEIRO et al., 2008), mostrou uma distribuição uniforme dos dados, com variância constante (homocedastidade), além da ausência de amostras atípicas. Estes dados comprovam que o ajuste linear e a faixa linear de trabalho foram adequados para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C5, nas condições otimizadas.

Os valores de LOD e LOQ para o C1 foram relativamente menores do que para os outros ácidos orgânicos (C2, C3, C4 e C5) avaliados neste tipo de coluna. A maior sensibilidade quando este ácido foi usado é, também, comprovada verificando-se os coeficientes angulares das equações de reta, sendo que a inclinação obtida para C1 foi bem maior (2 a 5 vezes) do que para os outros ácidos. A maior sensibilidade para o ácido fórmico, utilizando detecção por condutividade, já é bem reportada na literatura (PITTMAN e LEWAN, 1994). Além disso, a resposta do detector para o ácido fórmico é maior do que para o próximo ácido correspondente, no caso, o ácido acético e, da mesma forma, para os próximos ácidos. Este comportamento pode ser observado pela Figura 27 - A, em que a intensidade para os sinais de C1 a C5 decrescem de acordo com o aumento da cadeia carbônica. A resposta do detector é baseada pela razão carga/massa do analito, sendo que razões maiores possuem uma resposta melhor no detector (PITTMAN e LEWAN, 1994).

Ainda, para a verificação da exatidão do método, foi feita a injeção do CRM 46975, na concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, preparado em H_2O . O CRM, além dos ácidos

orgânicos de cadeia curta e linear C1 a C7, avaliados neste trabalho, possui, ainda, os ácidos isobutírico (iso-C4), isopentanóico (iso-C5) e isohexanóico (iso-C6) em sua composição. A Figura 28 mostra o cromatograma para o CRM 46975 após separação utilizando coluna de exclusão iônica, nas condições otimizadas.

Figura 28 - Cromatograma para o CRM 46975 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão química.



Como pode ser observado pela Figura 28, foi possível separar, além dos ácidos C1 a C5, de cadeia linear, as espécies iso-C4 e iso-C5, com boa resolução. Os ácidos maiores (C6, iso-C6 e C7), presentes no CRM, não foram separados utilizando este método. Apesar da identificação das espécies "iso" no cromatograma do CRM, estas espécies não foram quantificadas devido à falta de padrão disponível para cada ácido, necessário para a confirmação dos resultados e calibração do método. Os resultados obtidos para concordância no CRM 46975, preparado em três níveis de concentração ($0,25$, $0,5$ e 1 mmol L^{-1} em H_2O) estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos para C1, C2, C3, C4 e C5 no CRM 46975 em três níveis de concentração (0,25, 0,5 e 0,25 mmol L⁻¹) após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L⁻¹, n=1.

CRM (mmol L ⁻¹)	Valores (mg L ⁻¹)	Ácido				
		C1	C2	C3	C4	C5
1	Certificado	46,0	60,0	74,1	88,1	102
	Encontrado	48,1	64,0	69,6	82,1	92,6
	Concordância, %	104	107	94	93	91
0,5	Certificado	23,0	30,0	37,0	44,0	51,1
	Encontrado	22,7	32,4	31,8	40,0	50,8
	Concordância, %	99	108	88	91	99
0,25	Certificado	11,5	15,0	18,5	22,0	25,5
	Encontrado	11,6	16,6	16,7	20,2	24,7
	Concordância, %	101	108	90	92	97

Mesmo com a presença das espécies "iso", foram obtidos valores de concordância de 88 a 108% para o CRM 46975, indicando a adequabilidade do método para a quantificação dos ácidos orgânicos C1 a C5. Além disso, mesmo com concentrações fora da faixa linear de calibração (C2, C3, C4 e C5 em 1 mmol L⁻¹ de CRM), as recuperações (91 a 107%) estiveram na faixa dos valores recomendados.

Após a obtenção da curva de calibração e verificação da exatidão do método, foi feita a quantificação dos ácidos C1 a C5 por exclusão iônica nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo. Para isto, as águas foram previamente filtradas em filtros de PTFE de 0,22 µm e diluídas em água, quando necessário, para a obtenção de soluções com concentrações de cloreto inferiores a, no mínimo, 5000 mg L⁻¹. Os resultados obtidos para a determinação destes ácidos estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C1 a C5) após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.n=2.

Amostra	Fator mínimo de diluição ^a	Concentração, mg L ⁻¹				
		C1	C2	C3	C4	C5
A	-	15,1 ± 1,4	27,4 ± 2,4	< 8	< 5	< 5
B	2	17,3 ± 1,2	540 ± 60	< 16 ^b	< 10 ^b	< 10 ^b
C	7	< 18 ^b	199 ± 16	< 56 ^b	< 35 ^b	< 35 ^b
D	10	81,2 ± 8,1	< 50 ^b	< 80 ^b	< 50 ^b	< 50 ^b
E	12	< 30 ^b	820 ± 40	< 96 ^b	< 60 ^b	< 60 ^b
F	15	< 37 ^b	< 75 ^b	< 120 ^b	< 75 ^b	< 75 ^b
G	16	450 ± 32	5050 ± 560	< 128 ^b	< 80 ^b	< 80 ^b
H	18	< 45 ^b	< 90 ^b	< 144 ^b	< 90 ^b	< 90 ^b
I	20	1680 ± 170	1050 ± 110	< 160 ^b	< 100 ^b	< 100 ^b
J	22	634 ± 44	2190 ± 240	< 176 ^b	< 110 ^b	< 110 ^b
K	24	1400 ± 100	476 ± 29	< 192 ^b	< 120 ^b	< 120 ^b
L	25	236 ± 14	1510 ± 170	< 200 ^b	< 125 ^b	< 125 ^b
M	26	< 65 ^b	534 ± 37	< 208 ^b	< 130 ^b	< 130 ^b
N	27	185 ± 11	15310 ± 1070	< 216 ^b	< 135 ^b	< 135 ^b
O	28	1044 ± 84	570 ± 46	352 ± 28	< 140 ^b	< 140 ^b

^a Diluição mínima necessária para concentração de Cl⁻ inferior a, aproximadamente, 5000 mg L⁻¹.

^b Valores inferiores ao LOQ do método, levado em consideração a diluição mínima necessária para a quantificação.

Como pode ser observado na Tabela 15, foi possível quantificar, para a maior parte das amostras, os ácidos C1 e C2 utilizando coluna de exclusão iônica, nas condições otimizadas. As concentrações de C1 e C2 foram bem diferentes entre as amostras, variando de 15,1 até 1680 mg L⁻¹ para C1 e 27,4 até 15310 mg L⁻¹ para C2. Ou seja, entre as amostras analisadas, a concentração de C1 foi cerca de 110 vezes maior para a amostra “I” (1680 mg L⁻¹) em relação a amostra “A” (15,1 mg L⁻¹). Para C2, a concentração da amostra “N” (15310 mg L⁻¹) foi de, aproximadamente, 560 vezes maior do que para a amostra “A” (27,4 mg L⁻¹). Ainda, pode ser observado que os ácidos de cadeias maiores (C3, C4 e C5) estão em concentrações relativamente menores, quando comparados aos ácidos fórmico e acético. Ou seja, assim como reportado por Sakugawa, Kaplan e Shepard (1993) e Pittman e Lewan, (1994), a concentração de ácidos orgânicos total, neste tipo de amostra, é determinada, predominantemente, pela concentração de C1 e C2.

A concentração dos ácidos orgânicos C3, C4 e C5, para a maior parte das amostras, ficou abaixo do LOQ, levando-se em consideração a necessidade de diluição de cada amostra para concentrações de Cl^- inferiores a 5000 mg L^{-1} . Cabe salientar que esta diluição foi necessária para evitar interferências de sobreposição do sinal de Cl^- nos ácidos orgânicos C1 a C3, principalmente, além de aumentar a vida útil da coluna. O limite de quantificação, para a amostra "A", por exemplo, que não precisou ser diluída, foi de 8 mg L^{-1} , para C3. Por outro lado, para a amostra "I", o limite de quantificação foi multiplicado pelo fator mínimo de diluição da amostra e, conseqüentemente, aumentou 20 vezes em relação ao LOQ obtido para a amostra "A", sendo assim de 160 mg L^{-1} para C3. Desta forma, devido à necessidade de diluição da maior parte das amostras em função da alta concentração de cloreto (até, aproximadamente, 140 g L^{-1}), os LOQs foram relativamente altos, o que também dificultou a quantificação dos ácidos de cadeia maior, como C3, C4 e C5.

A avaliação da exatidão nas amostras, bem como da seletividade, foi feita a partir de ensaios de recuperação dos analitos, fortificando-se as amostras com concentrações conhecidas dos ácidos orgânicos. A fortificação foi equivalente a 100% da concentração de analito encontrada na amostra (BLIESNER, 2006). Previamente às quantificações, as amostras foram diluídas para que as concentrações ficassem dentro da faixa linear do método para cada ácido (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Nas amostras em que a concentração dos ácidos orgânicos ficou abaixo do LOQ, a fortificação foi de 5 mg L^{-1} , na diluição adequada de cada amostra ($< 5000 \text{ mg L}^{-1}$ de Cl^-).

Os resultados obtidos para as recuperações dos ácidos C1 a C5, utilizando a cromatografia de exclusão iônica e detecção por condutividade estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores de recuperação para os ácidos C1, C2, C3, C4 e C5 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), utilizando fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. (n=1)

Amostra	Recuperação, %				
	C1	C2	C3	C4	C5
A	99	98	92	102	108
B	90	107	87	98	99
C	98	91	90	95	89
D	90	89	87	98	99
E	101	100	92	86	98
F	94	93	102	106	98
G	95	101	98	100	107
H	108	106	107	95	109
I	96	95	88	91	90
J	103	100	107	104	109
K	108	96	107	97	93
L	103	108	97	109	102
M	96	102	88	108	88
N	102	96	93	99	93
O	101	101	98	103	95

Como pode ser observado na Tabela 16, foram obtidas recuperações quantitativas (86 a 109%) para os ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando a cromatografia de exclusão iônica e detecção por CD. As recuperações encontradas foram coerentes com as de Xu *et al.* (1997) para a determinação de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica (80 a 102%). Além disso, foi feita a injeção de uma amostra “branco” (água ultrapura em 150 g L⁻¹ de Cl⁻), e esta não mostrou sinais para os ácidos orgânicos, evidenciando, também, a seletividade do método. Estas recuperações indicam a adequabilidade do método para a quantificação dos ácidos C1 a C5 neste tipo de amostra, com concentrações de Cl⁻ inferiores a 5000 mg L⁻¹. É importante mencionar que a calibração foi feita utilizando somente água, o que é uma vantagem em relação aos outros métodos de calibração, como a curva por adição de padrão, que é preparada na própria matriz (DANZER e CURRIE, 1998; NETO, PIMENTEL e ARAÚJO, 2002). Para este estudo, devido a alta variação na concentração de Cl⁻ das

amostras (0,214 a 138 g L⁻¹) seriam necessárias mais do que uma curva, o que dificultaria a etapa de quantificação.

Entretanto, o método foi adequado e validado somente para amostras com concentrações de Cl⁻ inferiores a 5000 mg L⁻¹, o que limita a faixa de aplicação ou implica na diluição das amostras, previamente à quantificação. Assim, com o objetivo de reduzir os fatores de diluição das amostras e, conseqüentemente, melhorar os LOQs do método, foi feito um estudo para a separação prévia do Cl⁻ utilizando cromatografia bidimensional (HUANG et al., 2000; BRUNO et al., 2003; ZAKARIA et al., 2011; MILLER e SCHNUTE, 2016).

4.2.2.4 *Separação de cloreto da matriz utilizando sistema bidimensional*

A separação de cloreto da matriz pode ser feita utilizando sistemas bidimensionais, conforme mostrado na literatura (HUANG et al., 2000; BRUNO et al., 2003; ZAKARIA et al., 2011; MILLER e SCHNUTE, 2016). Neste trabalho, optou-se por fazer a separação utilizando uma pré-coluna de exclusão iônica como primeira dimensão e, na sequência, uma coluna de mesma fase estacionária como a segunda dimensão. O esquema ilustrativo da montagem do sistema bidimensional está mostrado no item 3.3.2.2 dos *Materiais e Métodos*. Este tipo de coluna foi escolhido devido ao fato de que o Cl⁻ não possui interação ou esta é muito pequena com a fase estacionária, e é eluído antes da separação dos ácidos orgânicos.

No sistema bidimensional utilizado neste trabalho, na primeira dimensão ocorre a prévia separação da matriz, incluindo o Cl⁻ e, na segunda dimensão, a separação dos ácidos orgânicos. Para isto, durante os primeiros minutos de corrida cromatográfica, a solução que elui da pré-coluna é direcionada para o resíduo para eliminação do Cl⁻, que elui primeiro que os ácidos orgânicos. Após a eluição do Cl⁻, com o auxílio de uma válvula de desvio, a solução é então direcionada para a coluna de exclusão iônica, para a separação dos ácidos orgânicos.

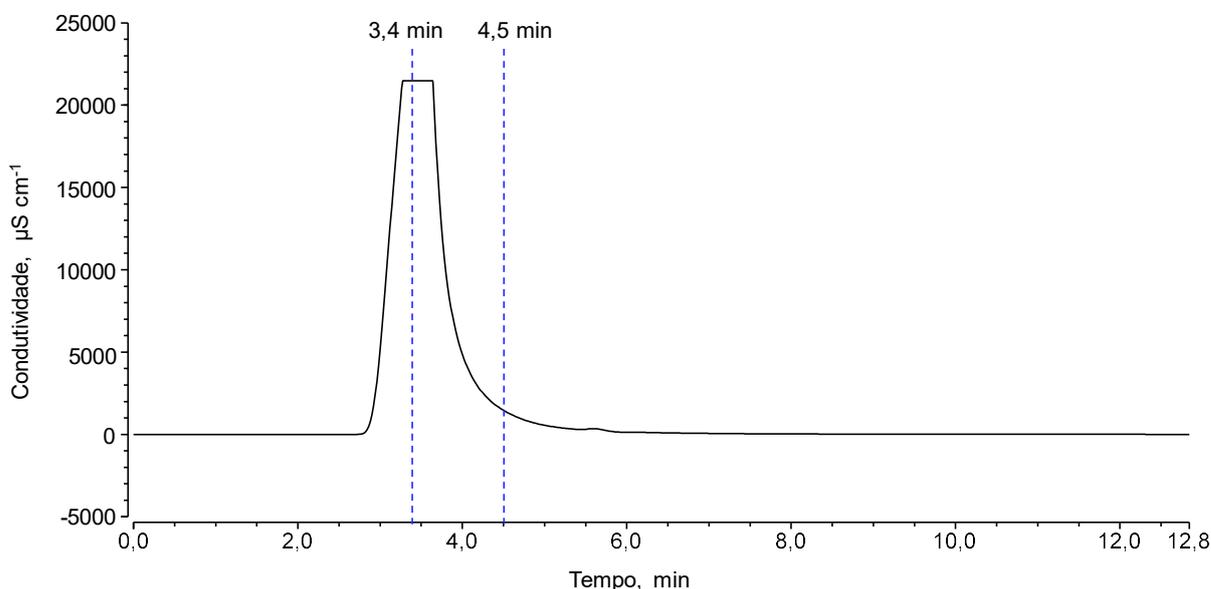
Para a otimização dos parâmetros cromatográficos, foi utilizada uma solução de referência contendo 25 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5, em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ e detecção por condutividade. A concentração de Cl⁻ utilizada para as otimizações foi escolhida devido à faixa de concentração das amostras (até 138 g L⁻¹ de Cl⁻). Os detectores de UV e MS foram utilizados somente como confirmação dos resultados em casos que estes não foram concordantes com os valores de referência. Com as condições

otimizadas do método, os sinais dos ácidos C1 a C5 por MS foram pouco intensos, sendo que as áreas não foram reprodutíveis e, desta forma, não foram utilizadas para quantificação.

4.2.2.4.1 Avaliação do tempo na primeira dimensão para eliminação do cloreto

Inicialmente, a fim de verificar o tempo de retenção do sinal para Cl^- (matriz), foi feita a injeção no sistema de uma solução de referência preparada em 150 g L^{-1} de Cl^- . Para isto, durante todo o tempo da corrida cromatográfica, a solução que elui da pré-coluna foi direcionada para a coluna, sem o desvio para o resíduo. A Figura 29 mostra o cromatograma da injeção da solução de referência dos ácidos orgânicos (25 mg L^{-1}) em 150 g L^{-1} de Cl^- , sem a eliminação da matriz e detecção por condutividade.

Figura 29 - Cromatograma para solução de referência de ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L^{-1} de Cl^- após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), sem eliminação da matriz, com fase móvel de HPFB $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão química.

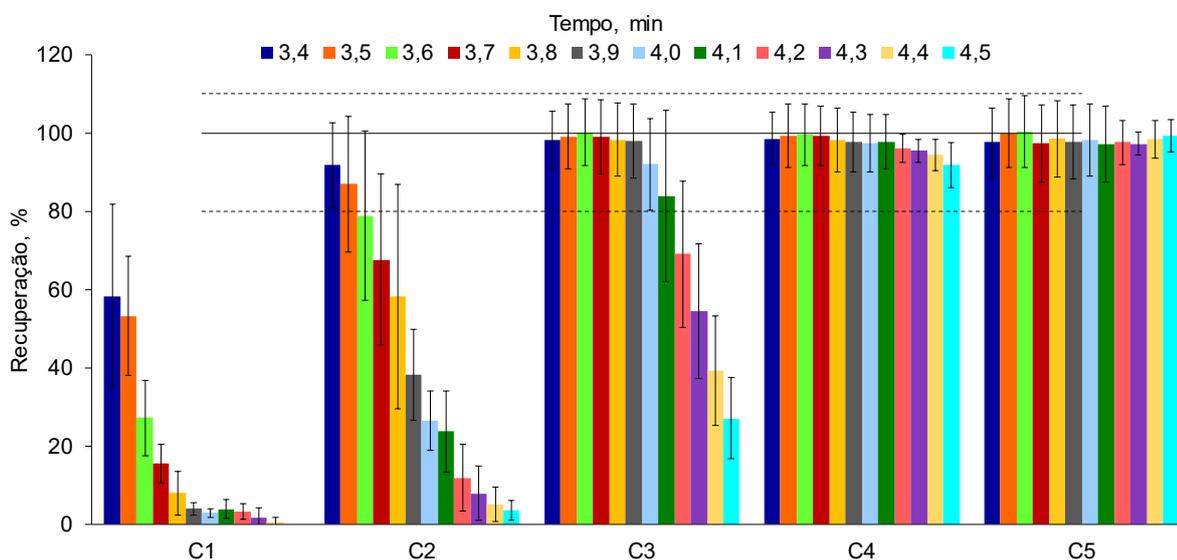


Como pode ser observado no cromatograma da Figura 29, a maior parte do cloreto elui até, aproximadamente, 4,5 min. Ou seja, para a eliminação da maior parte do Cl^- da matriz é necessário o desvio da solução para o resíduo durante os 4,5 min iniciais da corrida cromatográfica. Desta forma, inicialmente, foi feita a injeção no sistema cromatográfico bidimensional de uma solução de referência dos ácidos

orgânicos C1 a C5 25 mg L⁻¹ em 150 g L⁻¹ de Cl⁻, utilizando-se 4,5 min de tempo na primeira dimensão. A partir deste estudo, foi observado que, utilizando 4,5 min, as recuperações dos ácidos orgânicos C1, C2 e C3 foram inferiores a 80%. Provavelmente, parte dos ácidos orgânicos acaba sendo eluído para o resíduo, quando tempos maiores de eliminação são utilizados, devido a estes possuírem tempos de retenção mais próximos ao do sinal de Cl⁻.

Desta forma, com a finalidade de recuperar os ácidos C1, C2 e C3, além dos ácidos C4 e C5, foram avaliados tempos menores para a eliminação da matriz utilizados na primeira dimensão de 4,5 a 3,4 min, com variações de 0,1 min. A Figura 30 mostra o gráfico com a avaliação dos tempos utilizados para a eliminação da matriz e a recuperação dos ácidos orgânicos (C1 a C5).

Figura 30 - Resultados obtidos para a recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ para a avaliação do tempo de eliminação de Cl⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).

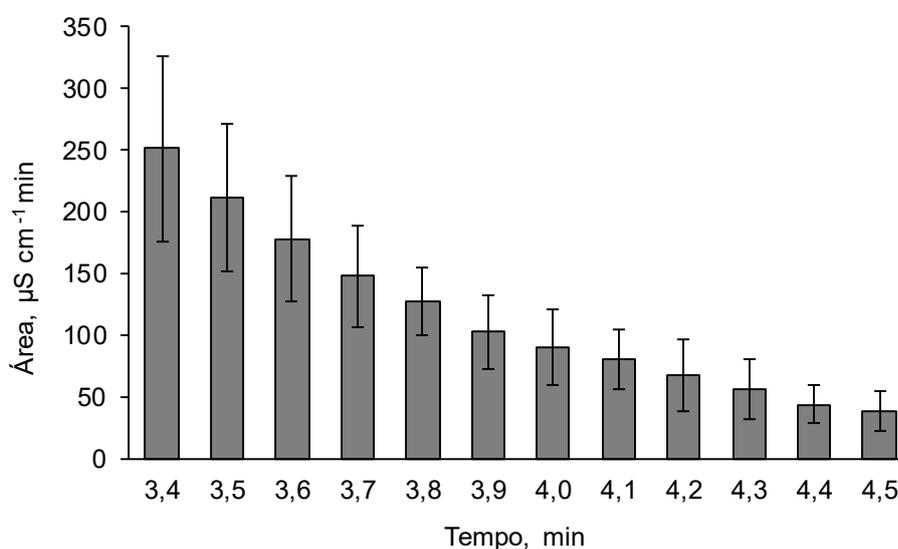


De acordo com a Figura 30, o C1 não foi recuperado em nenhum dos tempos avaliados e para C2, as recuperações foram adequadas somente no tempo de 3,4 min. Para o C3, tempos maiores que 4 min não foram adequados para a recuperação deste e os desvios padrão relativos foram superiores aos valores recomendados (> 15%). Estes dados mostram que as recuperações dos ácidos C1, C2 e C3 foram

menores em tempos maiores de eliminação de matriz. Isto se deve ao fato de que, por serem os que menos interagem com a coluna e, conseqüentemente, eluem primeiro, acabam sendo eliminados junto com o cloreto, dependendo do tempo utilizado na primeira dimensão.

Para os ácidos maiores (C4 e C5), independente dos tempos avaliados, a recuperação ficou dentro da faixa esperada (80 a 110%), sendo que os desvios padrão relativos foram menores para tempos maiores. Isso se deve ao fato de que a quantidade de cloreto que chega na coluna nestes casos é bem menor e, conseqüentemente, este não interfere tanto na reprodutibilidade das separações. A Figura 31 mostra a área de cloreto em função do tempo de eliminação da matriz após separação em sistema bidimensional.

Figura 31 - Resultados obtidos para área relativa de Cl^- na recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) em 150 g L^{-1} de Cl^- para a avaliação do tempo de eliminação da matriz após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por condutividade com supressão química. (média \pm desvio padrão, $n=3$).



Mesmo com a utilização de sistema bidimensional, como pode ser observado na Figura 31, não foi possível eliminar todo o cloreto da matriz, nos tempos avaliados. Porém, a área relativa ao cloreto diminui significativamente quando tempos maiores são utilizados. Como exemplo, a área relativa para Cl^- quando 3,4 min foram utilizados é cerca de 2,5 vezes maior do que comparado ao tempo de 3,9 min.

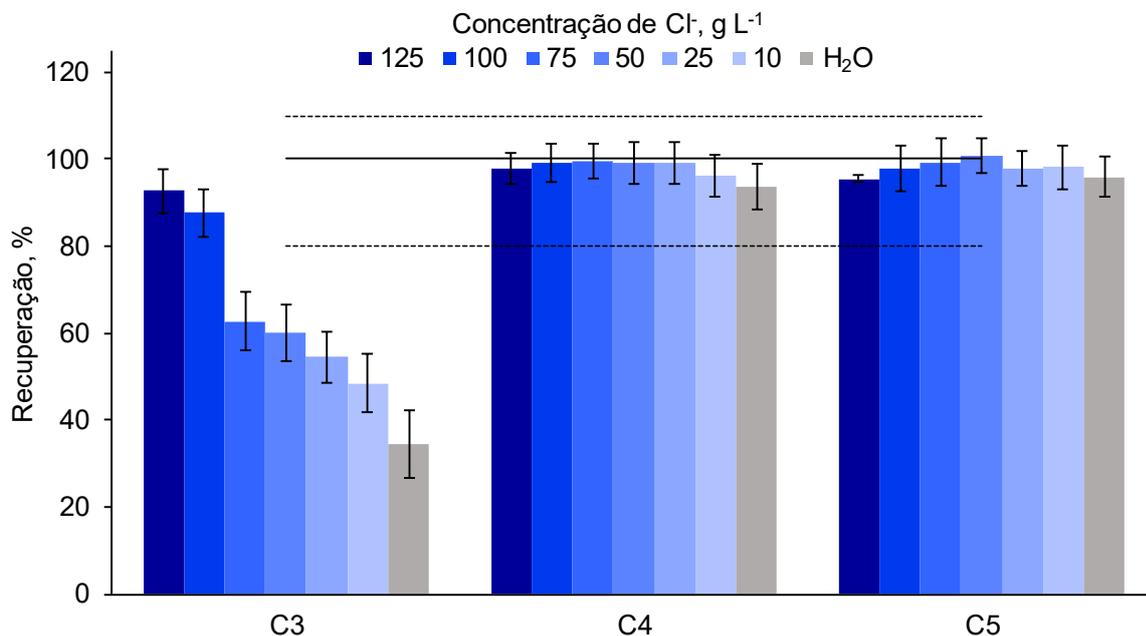
Levando-se em consideração que as recuperações para C1 e C2 não foram

adequadas nas condições avaliadas, estes ácidos não foram quantificados utilizando o sistema bidimensional. Além disso, os ácidos C1 e C2, na maior parte das amostras, foram quantificados utilizando somente a diluição e separação por exclusão iônica. Desta forma, considerando-se as recuperações para os ácidos C3, C4 e C5, e a área relativa ao sinal de Cl^- , optou-se por utilizar o tempo de 3,9 min para a eliminação de matriz.

4.2.2.4.2 Avaliação da concentração de cloreto na separação dos ácidos orgânicos C1 a C5 utilizando sistema bidimensional

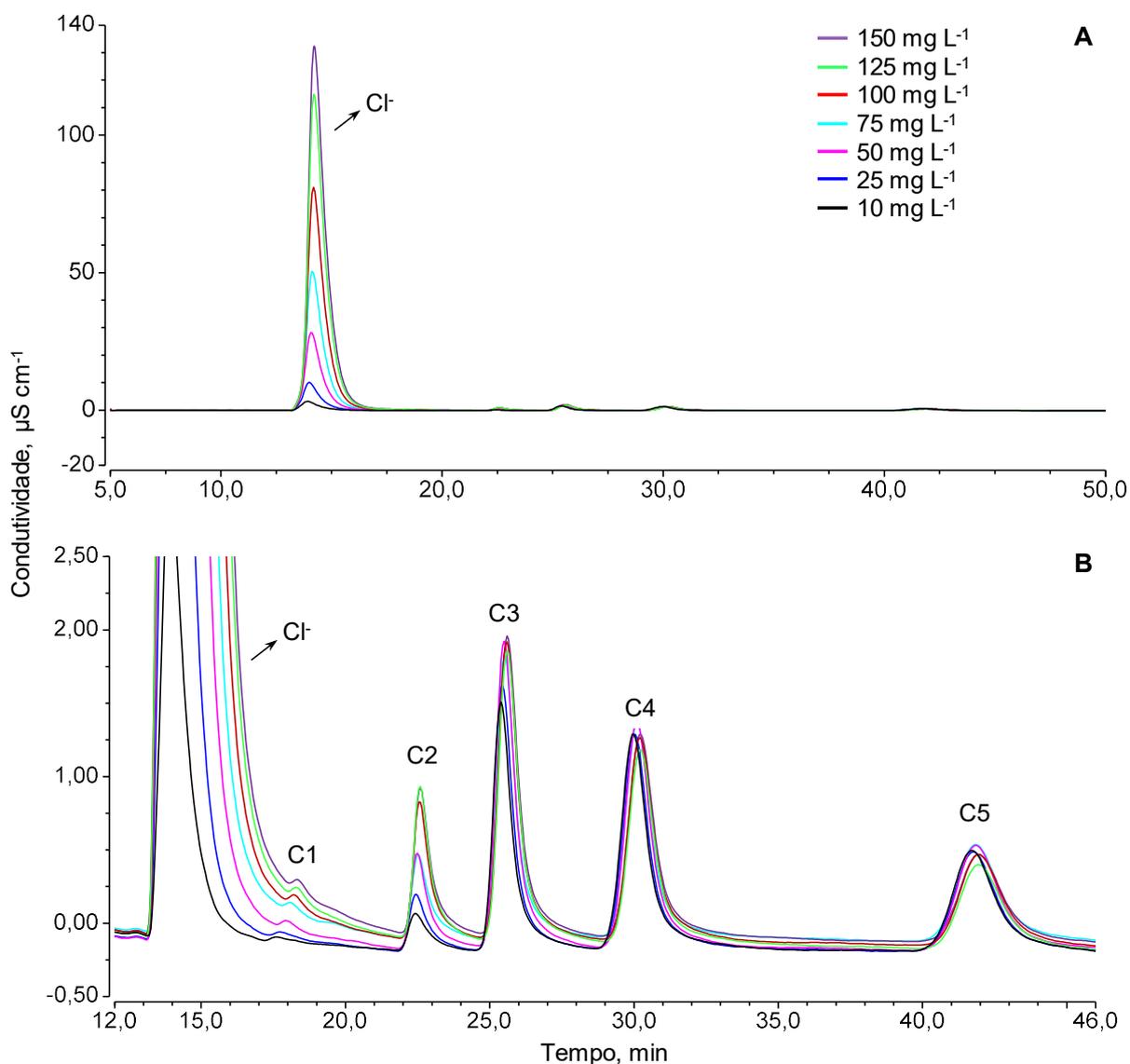
Após a escolha do tempo utilizado para a eliminação da matriz (3,9 min), foi feita a avaliação da influência da concentração de Cl^- (150, 100, 75, 50, 25 e 10 g L^{-1} de Cl^- e H_2O) na separação dos padrões utilizando o sistema bidimensional. Para isto, foram utilizadas soluções de referência cada uma contendo 25 mg L^{-1} dos ácidos (C1 a C5) em concentrações variadas de sal. Os resultados podem ser observados na Figura 32.

Figura 32 - Resultados obtidos para a recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) para a avaliação da concentração de Cl^- após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L^{-1} , temperatura de 35 °C, 3,9 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média \pm desvio padrão, n=3).



De acordo com a Figura 33, utilizando um tempo menor para a eliminação de Cl^- (3,8 min), os resultados para C3 foram superiores a 80%, em todas as concentrações de Cl^- avaliadas, além de quando foi utilizado somente água para simulação da matriz. Optou-se, então, por utilizar esta condição de 3,8 min para a eliminação da matriz. Para soluções com concentrações de Cl^- inferiores a 10 g L^{-1} , as recuperações para C3 foram relativamente menores, porém ainda maiores que 80%, indicando que parte deste ácido pode estar sendo eliminado juntamente com a matriz. Como a maior parte das amostras utilizadas possuem concentração de Cl^- superior a este valor, optou-se por utilizar estas condições (tempo de eliminação da matriz de 3,8 min). A Figura 34 mostra a sobreposição dos cromatogramas da solução de referência dos ácidos orgânicos C1 a C5 (25 mg L^{-1}) nas concentrações de Cl^- avaliadas e detecção por condutividade.

Figura 34 - Cromatogramas sobrepostos da avaliação da recuperação em solução de referência dos ácidos orgânicos (C1 a C5) para a avaliação da concentração de Cl^- (150, 125, 100, 75, 50, 25 e 10 g L^{-1}) após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. **A**: cromatograma completo, **B**: cromatograma ampliado.



Os cromatogramas da Figura 34 mostram claramente a sobreposição do sinal de Cl^- e o aumento da linha base inicial quando altas concentrações de Cl^- estão presentes na matriz. Pode ser observado, ainda, que mesmo com a utilização do sistema bidimensional, o Cl^- não é completamente eliminado da matriz. Ainda, quanto maior a concentração de Cl^- da solução, maior a recuperação para C2. Para C3, como mostrado, também, na Figura 33, em concentrações de Cl^- de 25 e 10 mg L^{-1} , as recuperações foram relativamente menores do que quando comparado com as

soluções de maior concentração de Cl⁻. A presença da alta concentração de Cl⁻ pode alterar a força iônica do meio e, conseqüentemente, alterar os equilíbrios dos analitos com a fase estacionária da coluna, fazendo com que estes fiquem mais tempo retidos na coluna.

4.2.2.4.3 Validação do método analítico e quantificação dos ácidos orgânicos (C3 a C5) utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade em sistema bidimensional para eliminação de cloreto

Após as otimizações das condições cromatográficas do sistema bidimensional, foram avaliados alguns parâmetros para a validação do método analítico, como a obtenção da curva analítica, faixa linear de trabalho, LOD e LOQ para cada analito, além de resolução de sinal, assimetria, fatores de retenção e separação e número de pratos teóricos. As curvas analíticas, bem como a faixa linear de trabalho foram obtidas de acordo com as recomendações do INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018). Foram utilizadas soluções de referência com, no mínimo, 5 níveis de concentração, que variaram de 5 a 50 mg L⁻¹ (3 replicatas). A Tabela 17 resume os dados obtidos para a separação dos ácidos C3, C4 e C5 em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade. Uma solução de 25 mg L⁻¹ dos ácidos orgânicos foi utilizada para a definição dos tempos de retenção dos ácidos C3, C4 e C5.

Tabela 17 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C3, C4 e C5 utilizando exclusão iônica em sistema bidimensional após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química.

Parâmetro	Ácido		
	C3	C4	C5
t_R (min)	25,5	30,1	41,6
Pratos teóricos (N)	5592	4330	3266
Fator de retenção (k)	1,14	1,53	2,53
Fator de separação (α)	1,34	1,65	-
Resolução (R_s)	2,95	5,00	-
Assimetria (A_s)	1,70	1,58	1,49
Faixa Linear (mg L ⁻¹)	8 - 50	5 - 50	5 - 50
Equação da reta	$y = 0,0367 x - 0,0145$	$y = 0,0334 x + 0,0142$	$y = 0,0242 x - 0,0439$
R ²	0,9974	0,9998	0,9992
LOD (mg L ⁻¹)	2,4	1,5	1,5
LOQ (mg L ⁻¹)	8	5	5

A separação dos ácidos C3 a C5, utilizando coluna de exclusão iônica após a eliminação de Cl⁻ em sistema bidimensional foi adequada levando-se em consideração que $N > 1000$, $\alpha > 1$ e $R_s > 1,5$ e $A_s < 2$ (BLIESNER, 2006). Assim como mostrado na validação do método quando não foi feita a separação de Cl⁻, valores de k para C3 e C4 foram menores que 2. Este fator confirma a influência maior do tempo de eliminação de Cl⁻ nestes dois ácidos, por estarem mais próximos da eluição do Cl⁻, no tempo morto da coluna.

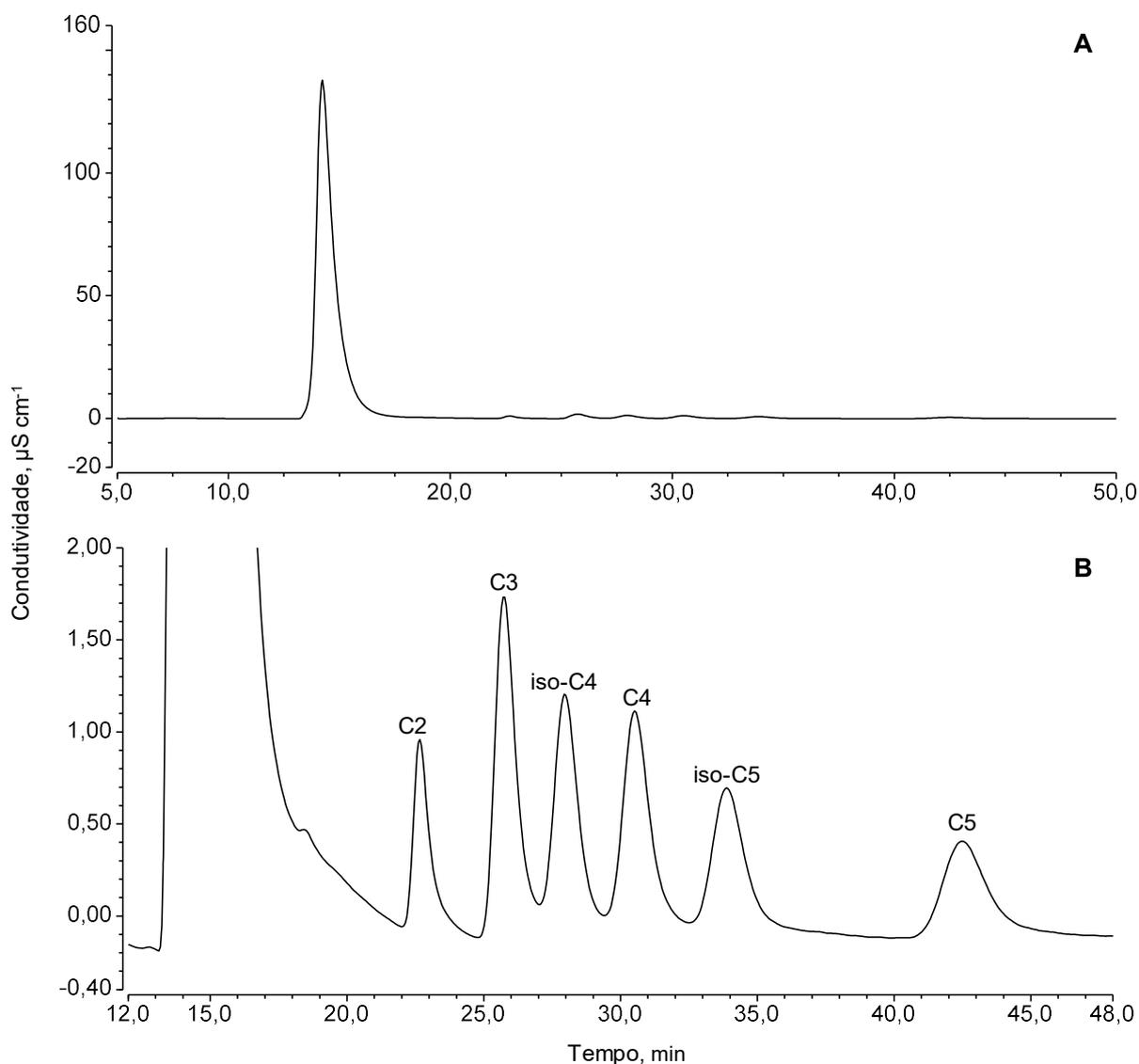
Os coeficientes de determinação obtidos para C3, C4 e C5 foram superiores a 0,997 indicando boa adequabilidade do ajuste linear à curva de calibração. A análise do gráfico dos resíduos, de acordo com a planilha de validação (RIBEIRO et al., 2008), assim como as otimizações sem a eliminação de Cl⁻, mostrou uma distribuição uniforme dos dados, com variância constante (homocedastidade), além da ausência de amostras atípicas. Estes dados comprovam que o ajuste linear, além da faixa linear de trabalho foram adequadas para a determinação de C3, C4 e C5 nas condições otimizadas.

Os LODs e LOQs obtidos em sistema bidimensional foram iguais aos obtidos

para C3, C4 e C5 na cromatografia de exclusão iônica, o que era esperado, devido às condições de calibração serem as mesmas. Porém, como foi mencionado anteriormente, quando não é feita a separação da matriz, a concentração de Cl^- deve ser inferior a 5000 mg L^{-1} . Desta forma, maior parte das amostras precisou ser diluída para a quantificação dos ácidos orgânicos, e teve os seus LODs e LOQs aumentados na mesma proporção. Quando foi utilizado o sistema bidimensional, a etapa inicial de separação da matriz eliminou a necessidade de diluição das amostras, fazendo com que os LOQs não fossem alterados. Como exemplo, o LOQ para C5, na amostra "O" (138 g L^{-1} de Cl^-) foi cerca de 28 vezes menor utilizando o sistema bidimensional do que comparado com a separação sem a eliminação da matriz.

A exatidão do método foi avaliada com a injeção do CRM 46975 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em uma solução de 150 g L^{-1} . Cabe salientar que o CRM, além dos ácidos orgânicos C3, C4 e C5, otimizados neste método, possui, ainda, os ácidos C1, C2, iso-C4, iso-C5, iso-C6 e C7 em sua composição. A Figura 35 mostra o cromatograma para o CRM 46975 em 150 g L^{-1} de Cl^- , após separação em sistema bidimensional para a separação da matriz, nas condições otimizadas.

Figura 35 - Cromatograma do CRM 46975 0,5 mmol L⁻¹ em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. **A**: cromatograma completo, **B**: cromatograma ampliado.



O cromatograma da Figura 35 mostra a separação dos ácidos orgânicos de cadeia linear C2 a C5, além das espécies iso-C4 e iso-C5, com boa resolução ($R_s > 1,5$) (MEYER, 2004). Os ácidos maiores (C6, iso-C6 e C7), presentes no CRM, não foram separados utilizando este método e as espécies "iso" não foram quantificadas devido à falta de padrão disponível para cada ácido. O C1, como mostrado na otimização, acaba eluindo para o resíduo, bem como parte do C2. Apesar de o cromatograma apresentar sinal para o C2, a concordância deste em relação ao valor de referência foi inferior a 65 %. Isto corrobora a não aplicabilidade da utilização do

sistema bidimensional para a determinação dos ácidos C1 e C2. Os resultados obtidos para concordância do CRM 46975, preparado em três níveis de concentração (0,22, 0,44 e 0,65 mmol L⁻¹ em 150 g L⁻¹ de Cl⁻), estão mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados obtidos para C3, C4 e C5, em três níveis de concentração (0,22, 0,44 e 0,65 mmol L⁻¹), no CRM 46975 preparado em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L⁻¹, n=3.

CRM (mmol L ⁻¹)	Valores (mg L ⁻¹)	Ácido		
		C3	C4	C5
0,22	Certificado	16,3	19,4	22,2
	Encontrado	14,9 ± 1,1	17,9 ± 1,5	21,0 ± 1,1
	Concordância, %	91	92	95
0,44	Certificado	32,6	38,7	44,4
	Encontrado	30,7 ± 2,0	36,3 ± 2,1	43,7 ± 2,6
	Concordância, %	94	94	98
0,65	Certificado	48,8	58,1	66,7
	Encontrado	44,6 ± 3,0	52,7 ± 3,9	63,3 ± 2,4
	Concordância, %	91	91	95

Como pode ser observado na Tabela 18, os ácidos C3, C4 e C5 foram 90,7 a 98,3% concordantes com o valor de referência, indicando a adequabilidade do método, mesmo na presença das espécies “iso” e de Cl⁻. Além disso, foi feita a avaliação da recuperação dos ácidos C3, C4 e C5, para o CRM 46975 0,5 mmol L⁻¹, preparado em soluções de 150 e 75 g L⁻¹ de Cl⁻ e H₂O. Os resultados estão mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados para a recuperação de C3, C4 e C5 no CRM 46975 0,5 mmol L⁻¹ para 150 e 75 g L⁻¹ de Cl⁻ e em H₂O após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. Valores em mg L⁻¹, n=1.

Ácido	Recuperação, %		
	H ₂ O	75 g L ⁻¹ Cl ⁻	150 g L ⁻¹ Cl ⁻
C3	85,5	91,4	94,2
C4	100	99,6	93,8
C5	109	106	98,3

Para os ácidos C4 e C5, como mostrado na Tabela 19, as recuperações foram de 93,8 a 109%, em todas as soluções avaliadas, sendo próximas às encontradas por Miller e Schnute (2016) para a determinação de ácidos orgânicos em sistema bidimensional (90 a 108%). Para o C3, que é o ácido que elui com um menor tempo de retenção, a recuperação foi relativamente inferior em H₂O do que nas soluções contendo Cl⁻. Na ausência de Cl⁻, o equilíbrio dos analitos com a fase estacionária da pré-coluna, fazem com que o C3 elua mais rapidamente e possa ser perdido durante o tempo de eliminação da matriz. Entretanto, foram obtidas recuperações superiores a 85% (estando dentro da faixa recomendada pelo INMETRO) para todas as soluções avaliadas, indicando que, independentemente da concentração de cloreto das amostras, estas podem ser quantificadas utilizando o sistema bidimensional.

Após as otimizações das condições de separação da matriz (Cl⁻), obtenção da curva de calibração e verificação da exatidão do método, foi feita a injeção das amostras no sistema bidimensional. Cabe salientar que, para esta aplicação, em função da eliminação do Cl⁻, as amostras foram somente filtradas em filtros de PTFE de 0,22 µm, previamente a injeção. Os resultados encontrados para os ácidos orgânicos C3, C4 e C5, após separação por exclusão iônica em sistema bidimensional e detecção por condutividade estão mostrados na Tabela 20, comparados com aqueles obtidos após a separação utilizando o mesmo tipo de coluna, sem a remoção do Cl⁻ da matriz.

Tabela 20 - Comparação dos resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C3, C4 e C5) utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1) sem separação do Cl⁻ (Sistema 1), somente com diluição da amostra; e após separação em sistema bidimensional (Sistema 2) utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1). (n=2).

Amostra	Ácido, mg L ⁻¹					
	C3		C4		C5	
	Sistema 1 ^a	Sistema 2 ^b	Sistema 1 ^a	Sistema 2 ^b	Sistema 1 ^a	Sistema 2 ^b
A	< 8	< 8	< 5	< 5	< 5	< 5
B	< 16	< 8	< 10	12,5 ± 1,8	< 10	< 5
C	< 56	< 8	< 35	< 5	< 35	< 5
D	< 80	< 8	< 50	< 5	< 50	< 5
E	< 96	53 ± 14	< 60	< 5	< 60	< 5
F	< 120	< 8	< 75	< 5	< 75	< 5
G	< 128	138 ± 13	< 80	49,8 ± 7,3	< 80	< 5
H	< 144	< 8	< 90	< 5	< 90	< 5
I	< 160	164 ± 25	< 100	30 ± 5	< 100	< 5
J	< 176	235 ± 25	< 110	37,3 ± 2,8	< 110	5,50 ± 0,67
K	< 192	52,1 ± 4,8	< 120	34,5 ± 1,4	< 120	7,53 ± 1,11
L	< 200	288 ± 38	< 125	74,8 ± 7,5	< 125	19,0 ± 1,8
M	< 208	107 ± 16	< 130	46,1 ± 5,3	< 130	12,8 ± 1,8
N	< 216	< 40*	< 135	< 25*	< 135	< 25*
O	352 ± 28	363 ± 44	< 140	167 ± 10	< 140	28,1 ± 3,2

^a Sistema 1: Separação em coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C e detecção por condutividade com supressão química.

^b Sistema 2: Separação em sistema bidimensional com coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química.

*LOQ devido à necessidade de diluição das amostras para minimizar a interferência de C2 nas determinações de C3 e C4.

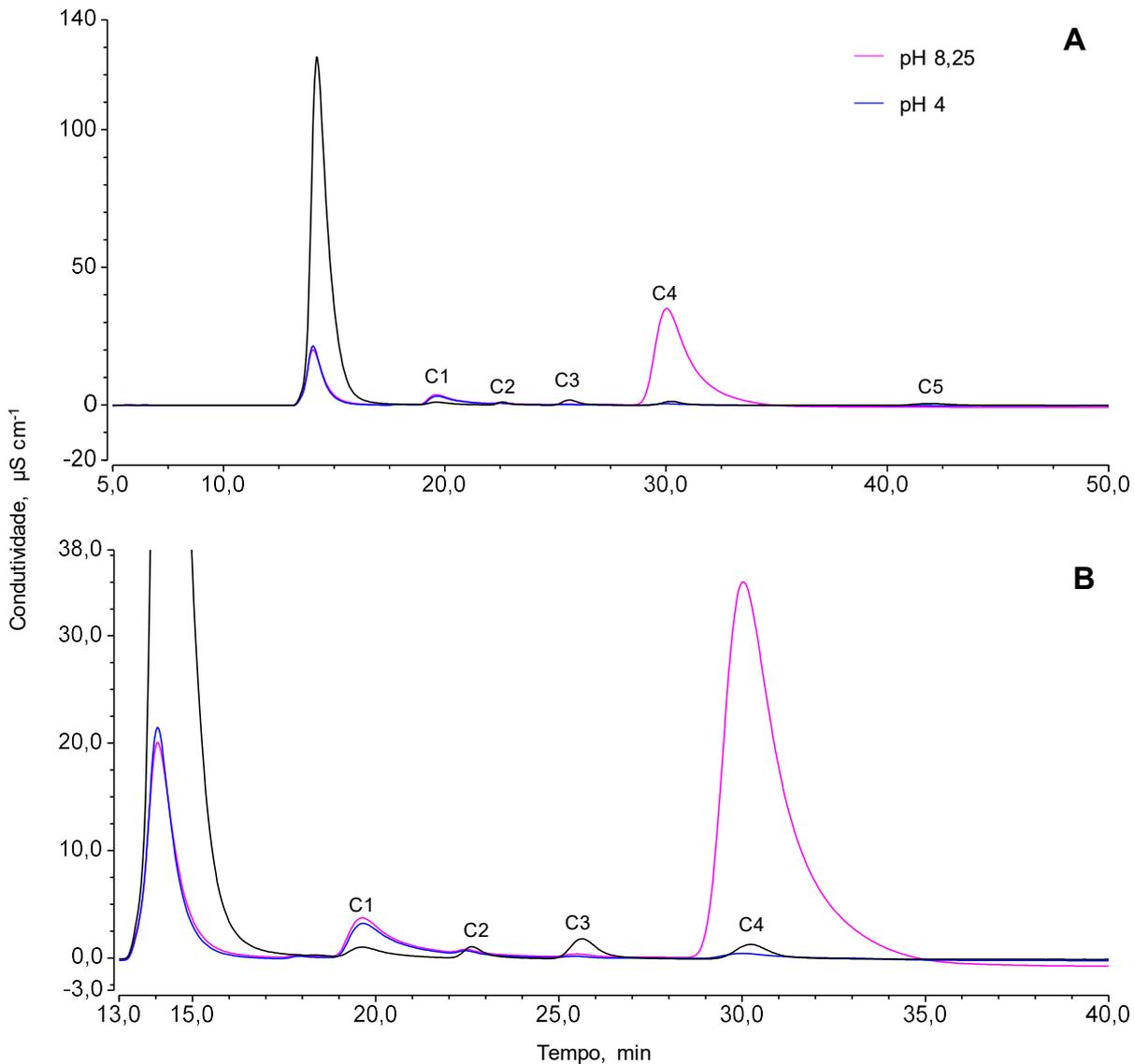
Como pode ser observado pela Tabela 20, os resultados para C3, C4 e C5 variaram bastante entre as amostras, sendo que a concentração do C3 é relativamente maior que C4 e C5, em todos os casos. Para o C3 nas amostras “J” e “L” e para o C4 na amostra “O”, os resultados obtidos utilizando o sistema bidimensional (Sistema 2) não foram concordantes com os obtidos no Sistema 1. Porém, estas amostras, por possuírem alta concentração de Cl⁻ (> 100 g L⁻¹), precisaram ser diluídas em, no mínimo, 20 vezes, para a quantificação utilizando o Sistema 1. Desta forma, os LOQs foram estimados pelas diluições necessárias das amostras.

Para a avaliação da seletividade, assim como para avaliação da exatidão, nas amostras, foram feitos ensaios de recuperação dos analitos, fortificando-se as amostras com concentrações conhecidas dos ácidos orgânicos avaliados. Para os ensaios de recuperação, as concentrações adicionadas de padrão foram equivalentes a 100% da concentração de analito encontrada na amostra (BLIESNER, 2006). Quando necessário, previamente às quantificações, as amostras foram diluídas para que as concentrações ficassem dentro da faixa linear do método para cada ácido. Em amostras em que a concentração dos ácidos orgânicos estava abaixo do LOQ, a fortificação foi de 8, 5 e 5 mg L⁻¹, para C3, C4 e C5, respectivamente.

Inicialmente, foi observado que, para algumas amostras, as recuperações não foram quantitativas (inferiores a 80%), principalmente para o C4. As amostras que apresentaram esta recuperação inferior foram as que possuem pH relativamente mais alto (pH > 4,5). De acordo com a literatura (HADDAD e JACKSON, 1990; PITTMAN e LEWAN, 1994; FRITZ e GJERDE, 2009), o mecanismo de exclusão iônica é dependente do pH, ou seja, as espécies devem estar nas suas formas não dissociadas. Espécies na forma ionizada possuem pouca interação com a fase estacionária, devido a repulsão de cargas ocasionada pela membrana de Donnan e são eluídas junto com o volume morto (HADDAD e JACKSON, 1990; FRITZ e GJERDE, 2009). Como os valores de pKa destes ácidos orgânicos (C3, C4 e C5) ficam na faixa de 4,9 (SERJEANT e DEMPSEY, 1979), as amostras que possuem pH maiores que este valor possuem uma concentração maior de espécies não dissociadas. Assim, optou-se por acidificar as amostras para pH 4, utilizando uma solução diluída de ácido clorídrico. A escolha do ácido clorídrico foi com a intenção de minimizar possíveis interferências de outros íons, como o nitrato, por exemplo, se ácido nítrico fosse utilizado no ajuste do pH.

A Figura 36 mostra, como exemplo, a sobreposição dos cromatogramas da amostra "D" sem ajuste de pH e com ajuste de pH (pH 4), além do padrão de 50 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em 150 g L⁻¹ de Cl⁻.

Figura 36 - Cromatogramas sobrepostos da amostra "D" sem ajuste de pH (pH 8,25) e com ajuste de pH (pH 4), após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. **A**: cromatograma completo, **B**: cromatograma ampliado. Cromatograma em preto é referente à solução de referência contendo 50 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 nas mesmas condições de separação.



Como pode ser observado pelos cromatogramas da Figura 36, a amostra não acidificada mostra um sinal bem intenso no mesmo tempo de retenção que o C4, sinal este que fica bem menor quando a amostra é acidificada. Xu *et al.* (1997) mostraram que a presença de ácido carbônico em excesso pode interferir na detecção de ácidos orgânicos utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade. O ácido carbônico pode ser separado utilizando este tipo de coluna e pode coeluir com os ácidos orgânicos C3 e C4, ocasionando, assim, uma sobreposição de sinal. Nestes

casos, o ácido carbônico foi removido com a adição de ácidos fortes, como o HCl seguido de agitação da amostra.

Quando foi feito o ajuste de pH, as recuperações para adições de padrão foram adequadas (valores entre 80 e 110%) para a quantificação dos ácidos orgânicos C3, C4 e C5. Desta forma, as amostras com pH acima de 4,5 foram ajustadas para pH 4, previamente às quantificações. Cabe salientar que para amostras com pH < 4,5 não houve diferença nos valores de recuperação para os ácidos orgânicos, independentemente do valor de pH nestes casos.

Os resultados obtidos para as recuperações dos ácidos C3, C4 e C5 estão mostrados na Tabela 21. Cabe salientar que as amostras foram ajustadas quanto ao pH (pH 4) utilizando uma solução diluída de HCl, quando necessário.

Tabela 21 - Valores de recuperação para os ácidos C3, C4 e C5 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. (n=1).

Amostra	Recuperação, %		
	C3	C4	C5
A	87	108	108
B	99	106	110
C	85	105	104
D	109	105	103
E	110	90	95
F	87	108	109
G	90	103	98
H	96	106	97
I	106	94	103
J	107	106	108
K	109	95	100
L	97	108	101
M	97	101	101
N	nd*	nd*	nd*
O	91	108	106

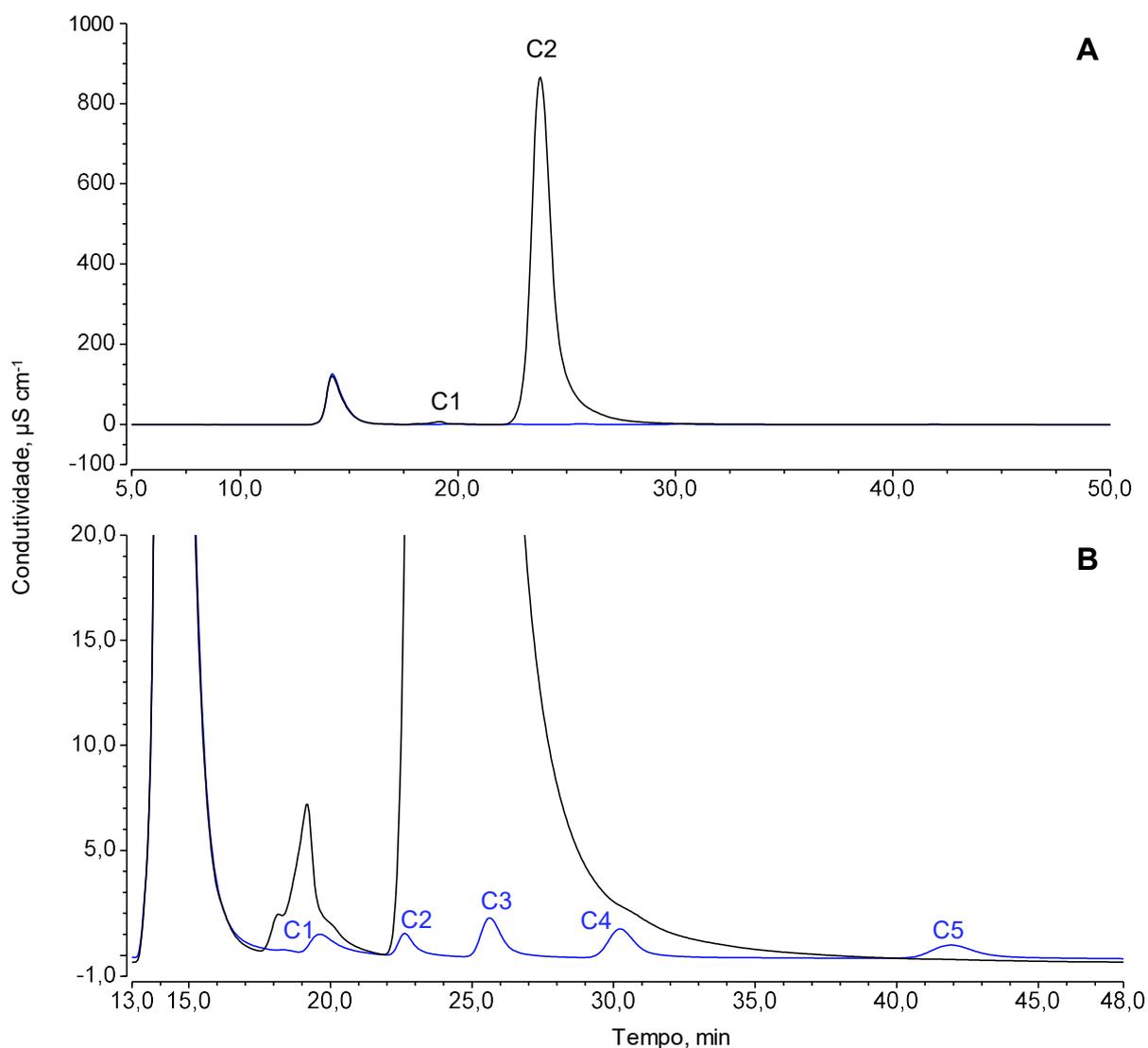
nd: não determinado

* Interferência da sobreposição de sinais devido à alta concentração de C2 da amostra.

Conforme pode ser observado pelos resultados da Tabela 21, os valores de recuperação encontrados estão entre 87 e 110%, sendo considerados adequados de acordo com as recomendações do INMETRO para os ácidos orgânicos C3, C4 e C5, na maior parte das amostras (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

Para a amostra N, não foram obtidos sinais para C3 e C4, mesmo com fortificações de 50 mg L⁻¹. Isto se deve ao fato de que esta amostra possui alta concentração de C2 (15310 mg L⁻¹) e, conseqüentemente, o sinal deste acaba sobrepondo os sinais de C3 e C4. O cromatograma completo, assim como sua ampliação, da amostra N, está mostrado na Figura 37.

Figura 37 - Cromatogramas da amostra "N" após separação em sistema bidimensional utilizando coluna de exclusão iônica (Dionex IonPac ICE-AS1), com fase móvel de HPFB 0,25 mmol L⁻¹, temperatura de 35 °C, 3,8 min na primeira dimensão e detecção por condutividade com supressão química. **A**: cromatograma completo, **B**: cromatograma ampliado. Cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 50 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C5 em 150 g L⁻¹ nas mesmas condições de separação.



Como pode ser observado pelo cromatograma da Figura 37, o sinal para o C2 acaba sobrepondo os sinais do C3 e do C4, retornando para a linha base bem próximo ao sinal do C5. Em razão da alta concentração de C2 nesta amostra (N), foram feitas algumas diluições destas a fim de verificar a possibilidade de quantificação de C3 e C4. Para que não houvesse sobreposição do sinal de C2 nos outros ácidos, a amostra precisou ser diluída em, no mínimo, 5 vezes, para N (concentração de C2 inferior a, aproximadamente, 3000 mg L⁻¹). Porém, nesta diluição (5 vezes), os ácidos C3 e C4

não apresentaram sinal. Desta forma, a concentração de C2 é um limitante para a quantificação de C3, C4 e C5, ou seja, só pode ser utilizada em amostras com concentrações iguais ou inferiores a, aproximadamente, 3000 mg L⁻¹. Utilizando-se estas diluições, e concentrações de C2 inferiores a 3000 mg L⁻¹, foram feitos ensaios de recuperação para os ácidos C3, C4 e C5, e estas foram de 89, 91 e 94%, respectivamente.

Além disso, para a avaliação da seletividade do método e possível interferência da matriz, foi feita a injeção de uma amostra “branco” (solução de 150 g L⁻¹ de Cl⁻ em H₂O), no sistema bidimensional. Este ensaio permite avaliar possíveis interferências devido aos componentes da matriz, neste caso o Cl⁻, nos sinais referentes aos ácidos orgânicos. Não foram observados sinais analíticos para os ácidos orgânicos C1 a C5, evidenciando, também, a seletividade do método.

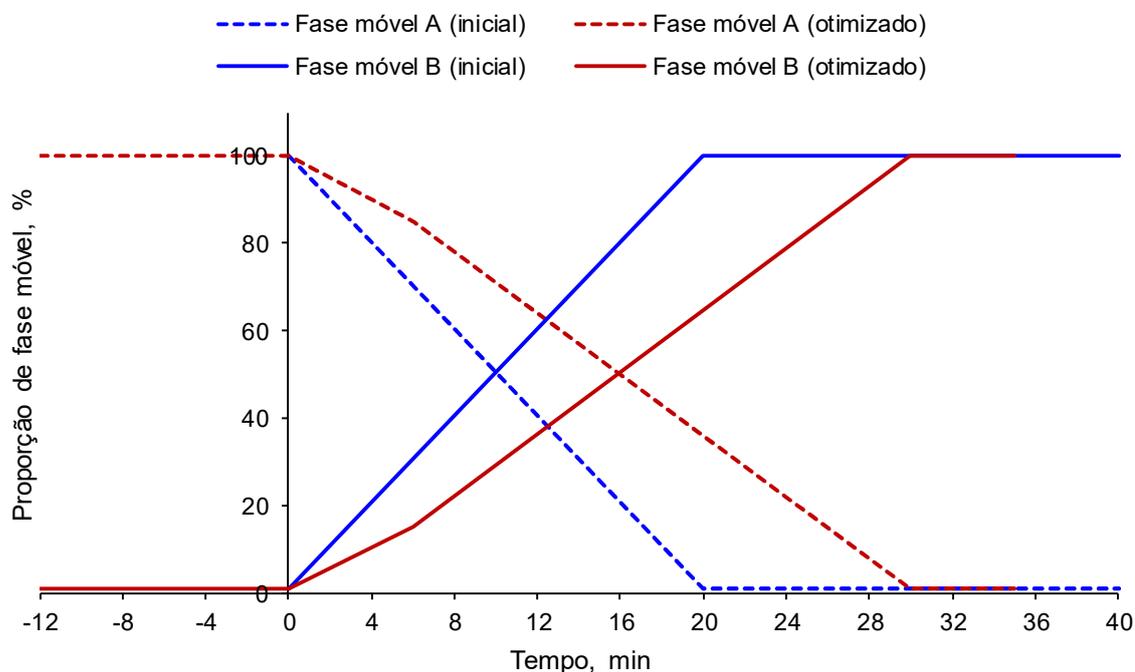
4.2.3 Coluna de pareamento iônico

Assim como nas colunas de troca iônica e exclusão iônica, as condições utilizadas para a separação em coluna de pareamento iônico foram baseadas em aplicações recomendadas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c). As condições iniciais utilizadas estão mostradas na Tabela 7, no item 3.3.3, dos *Materiais e Métodos*.

Para as otimizações da separação em coluna de pareamento iônico, foi utilizada solução de referência contendo 10 mg L⁻¹ dos ácidos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10. A solução de referência dos ácidos C1 a C10 foi preparada em acetonitrila, devido à baixa solubilidade dos ácidos orgânicos de cadeia maior (C8-C10) (BRUICE, 2010).

Inicialmente, após a injeção do padrão nas condições recomendadas, foram feitas algumas alterações no gradiente da fase móvel, a fim de melhorar a separação dos ácidos C1 e C2, que estavam com baixa resolução ($R_s < 1$). A condição otimizada alterou a concentração da fase móvel B (ACN 60%, MeOH 24%, HCl 0,05 mmol L⁻¹) no início do programa, diminuindo a curvatura do gradiente e, conseqüentemente, o percentual de solvente orgânico. A Figura 38 mostra os gradientes de concentração das fases móveis A e B no programa de eluição inicial e otimizado.

Figura 38 - Gradiente de concentração de fase móvel A (ACN 24%, MeOH 6%, HCl 0,03 mmol L⁻¹) e B (ACN 60%, MeOH 24%, HCl 0,05 mmol L⁻¹) inicial e otimizado para a determinação de ácidos orgânicos em coluna de pareamento iônico.



Com esta alteração, C1 e C2 tiveram uma melhora significativa na resolução ($R_s > 1,5$), devido ao aumento na seletividade para os ácidos orgânicos, fator alterado pela mudança da fase móvel (MEYER, 2004; BLIESNER, 2006). A diminuição da concentração de metanol e acetonitrila da fase móvel, durante a eluição dos ácidos C1 e C2, possibilitou uma maior interação destes com a fase estacionária da coluna, alterando assim o fator de retenção e, conseqüentemente, a resolução dos sinais (CASS e CASSIANO, 2015; MEYER, 2004). O gradiente de concentração de fase móvel otimizado é mostrado na Tabela 22. Além disso, em função do condicionamento da coluna para a próxima corrida, foi adicionado um tempo inicial de 12 min para estabilização da linha base, previamente à injeção da amostra.

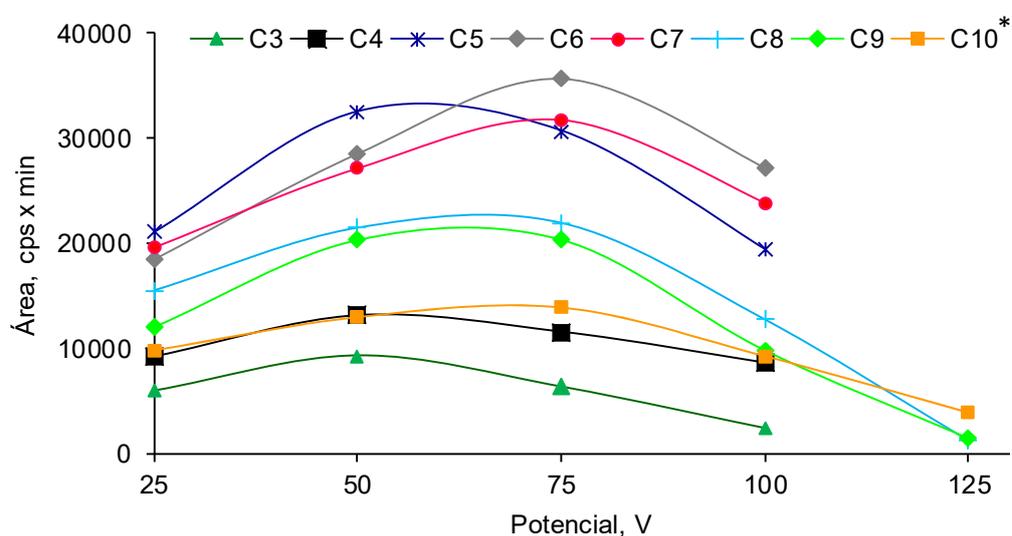
4.2.3.1 Avaliação das condições utilizando espectrometria de massas

Inicialmente, foram feitas avaliações em relação às condições de ionização do espectrômetro de massas. Cabe salientar que para as otimizações, a avaliação da intensidade dos sinais foi avaliada pelos íons extraídos obtidos do modo *full scan*.

4.2.3.1.1 Avaliação do potencial aplicado no cone de amostragem

O potencial aplicado no cone pode influenciar na intensidade do sinal dos analitos. Desta forma, foram avaliados os potenciais de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 V, utilizando uma solução de referência de 10 mg L⁻¹ dos ácidos C1 a C10, preparada em acetonitrila, e os resultados estão mostrados na Figura 39. Cabe salientar que todos os ácidos foram monitorados (modo *full scan*) em cada potencial.

Figura 39 - Avaliação da intensidade de sinal para os ácidos C1 a C10 (10 mg L⁻¹) para os potenciais do cone de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 V após separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 42 °C e detecção MS, com supressão química.



* Não foram observados sinais significativos para os ácidos C1 e C2, nas condições avaliadas.

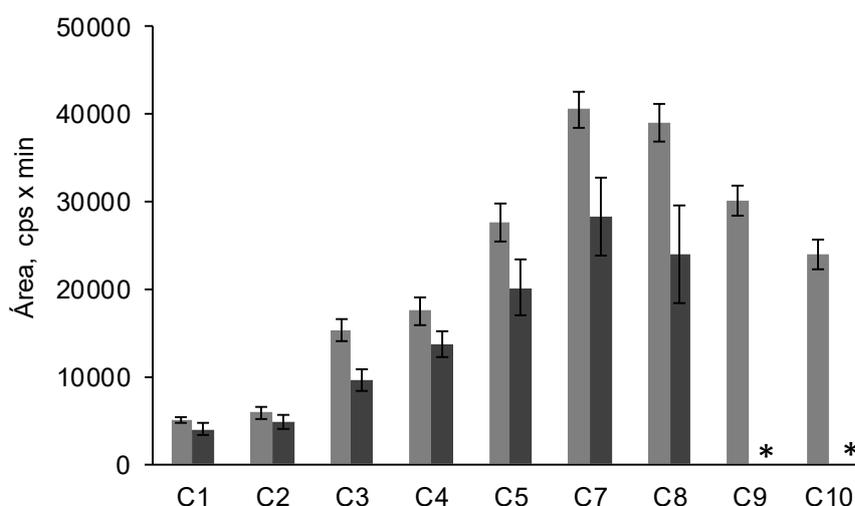
Para os ácidos menores, C3, C4 e C5, a maior intensidade foi obtida quando foi utilizado o potencial de 50 V. Em relação aos ácidos maiores, C6 a C10, os melhores resultados foram obtidos com o potencial de 75 V. Pode ser observado, ainda, que os ácidos C1 a C7 não obtiveram sinal, ou este foi muito baixo, quando 125 V foi utilizado. Ainda, com a utilização de 150 V, nenhum ácido obteve sinal. Os ácidos C1 e C2 tiveram sinais pouco intensos e ruidosos, não sendo possível a integração dos mesmos.

Desta forma, ao utilizar o modo de monitoramento individual de íons (SIM), o potencial do cone utilizado para os ácidos C1 a C5 foi de 50 V e de C6 a C10 foi de 75 V. Cabe salientar que, nas otimizações seguintes, em que foi utilizado o modo *full scan*, foi utilizado o potencial de 50 V em toda a corrida cromatográfica.

4.2.3.1.2 Avaliação da presença de sal na ionização dos ácidos C1 a C10

A fim de verificar possíveis interferências da matriz, principalmente em relação a alta concentração de Cl^- , foram feitos alguns testes com padrões de ácidos orgânicos preparados em uma solução sintética de Cl^- 150 g L^{-1} em 50% de acetonitrila. Esta concentração de Cl^- foi escolhida em função da maior concentração de Cl^- encontrada nas amostras. Os resultados para os ácidos orgânicos C1 a C10 em acetonitrila e na presença de Cl^- em acetonitrila 50% estão mostrados na Figura 40.

Figura 40 - Avaliação da intensidade de sinal para os ácidos orgânicos C1 a C8 em uma solução de referência preparada em ■ acetonitrila e ■ 150 g L^{-1} de Cl^- em 50% de acetonitrila, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H_2O , temperatura de $42 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por MS, com supressão química. (média \pm desvio padrão, $n=3$).



* Não foram observados sinais significativos para os ácidos C9 e C10 na presença de Cl^-

Como pode ser observado pelo gráfico da Figura 40, a presença de Cl^- interfere na detecção por MS. É possível observar, também, que este efeito é mais pronunciado em ácidos de cadeia maior (C3 a C8). Os ácidos C9 e C10 apresentaram sinal pouco intenso e não foi possível fazer a integração destes na presença de Cl^- na concentração de 150 g L^{-1} .

Além disso, foi observada a deposição salina no cone após a avaliação, o que acaba prejudicando, também, a ionização dos ácidos. Não foram obtidos os resultados

por condutividade devido à indisponibilidade da supressora quando foram feitos os testes. Desta forma, não se pode afirmar se a interferência devido a presença de alta concentração de Cl^- ocorre na separação dos ácidos na coluna ou na ionização destes no MS. Cabe salientar que, o Cl^- , por possuir pouca interação com a fase estacionária da coluna, elui praticamente todo no tempo morto da corrida cromatográfica. Porém, devido à alta concentração, pode ser que parte do Cl^- fique na coluna e possa coeluir e alterar as condições de equilíbrio entre os ácidos orgânicos e a fase estacionária. É importante mencionar que, nas avaliações anteriores, em relação ao potencial aplicado no cone e na otimização do gradiente de eluição, a solução de referência foi preparada somente em acetonitrila, na ausência de Cl^- . Desta forma, estes efeitos não foram observados.

Assim, para minimizar os efeitos do sal na quantificação dos ácidos C1 a C10, bem como na deposição deste na interface do MS, foi feita a utilização da extração em fase sólida (SPE) para remoção do Cl^- e posterior quantificação utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS.

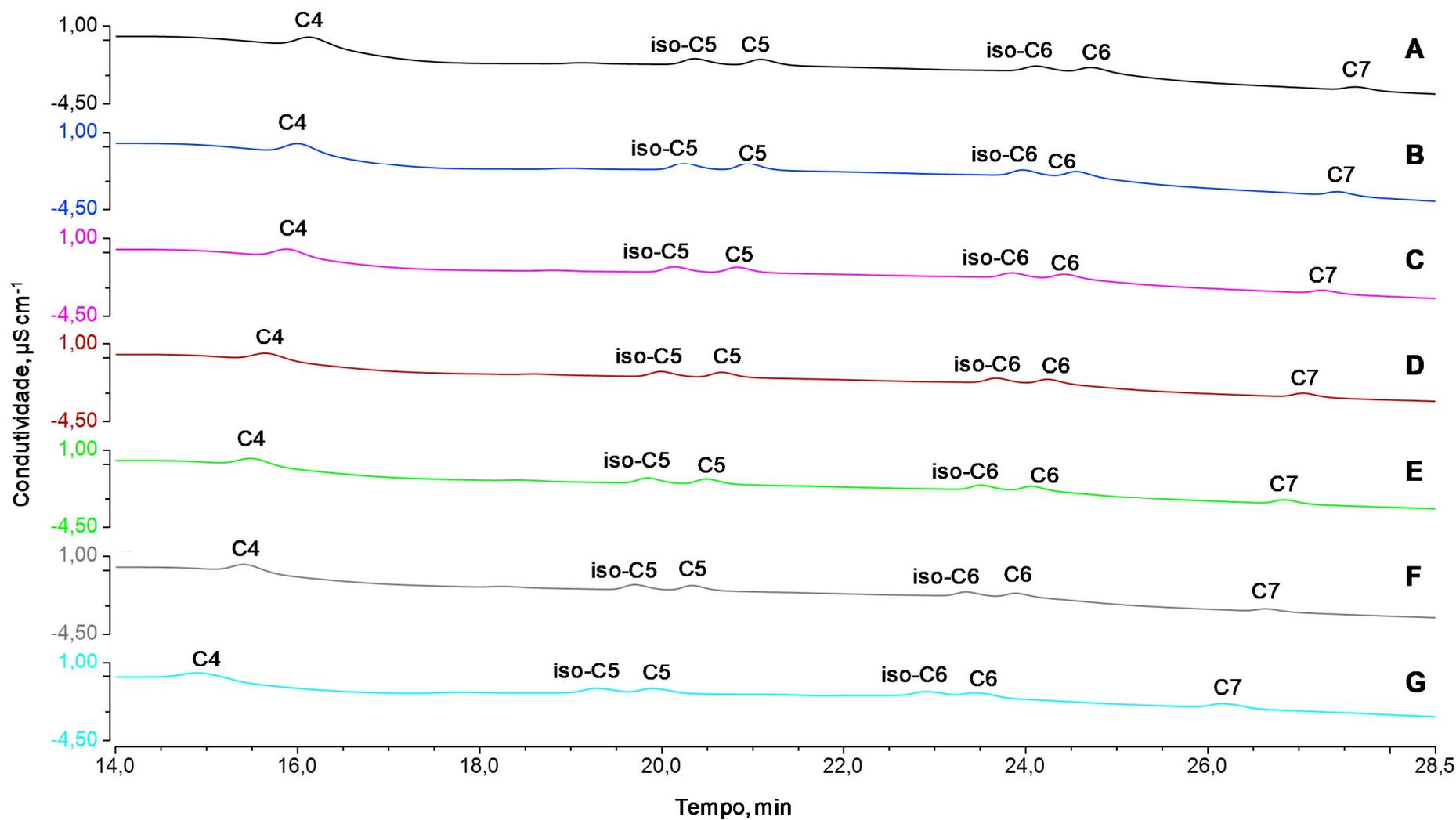
4.2.3.2 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna

A avaliação da temperatura na separação dos ácidos orgânicos utilizando coluna de pareamento iônico foi feita utilizando o CRM 46975, na concentração de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, preparado em acetonitrila. Como foi observado na separação dos ácidos C1 a C5, utilizando coluna de exclusão iônica, mesmo que não foram quantificados, algumas amostras mostraram sinais para as espécies iso-C4 e iso-C5. Desta forma, a separação dos ácidos C1 a C7, bem como das espécies iso-C4, iso-C5 e iso-C6 foi avaliada nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C, além daquela recomendada, que é de 42 °C. As avaliações em temperaturas mais baixas foram feitas a fim de melhorar a separação, principalmente, das espécies "iso". Os ácidos maiores (C8, C9 e C10), que não estão presentes na solução do CRM, foram separados com boa resolução em relação aos demais ácidos, independente da temperatura utilizada na separação e, por este motivo, não foram avaliados neste estudo.

A Figura 41 mostra os cromatogramas obtidos para a separação dos ácidos orgânicos C4, iso-C5, C5, iso-C6, C6 e C7 nas diferentes temperaturas utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por condutividade. Os cromatogramas foram

ampliados para a melhor visualização dos sinais. Os sinais para os ácidos C1, C2 e C3 não foram bem resolvidos ($R_s < 1$) em todas as temperaturas avaliadas, utilizando a detecção por condutividade e, desta forma, também não estão mostrados nos cromatogramas.

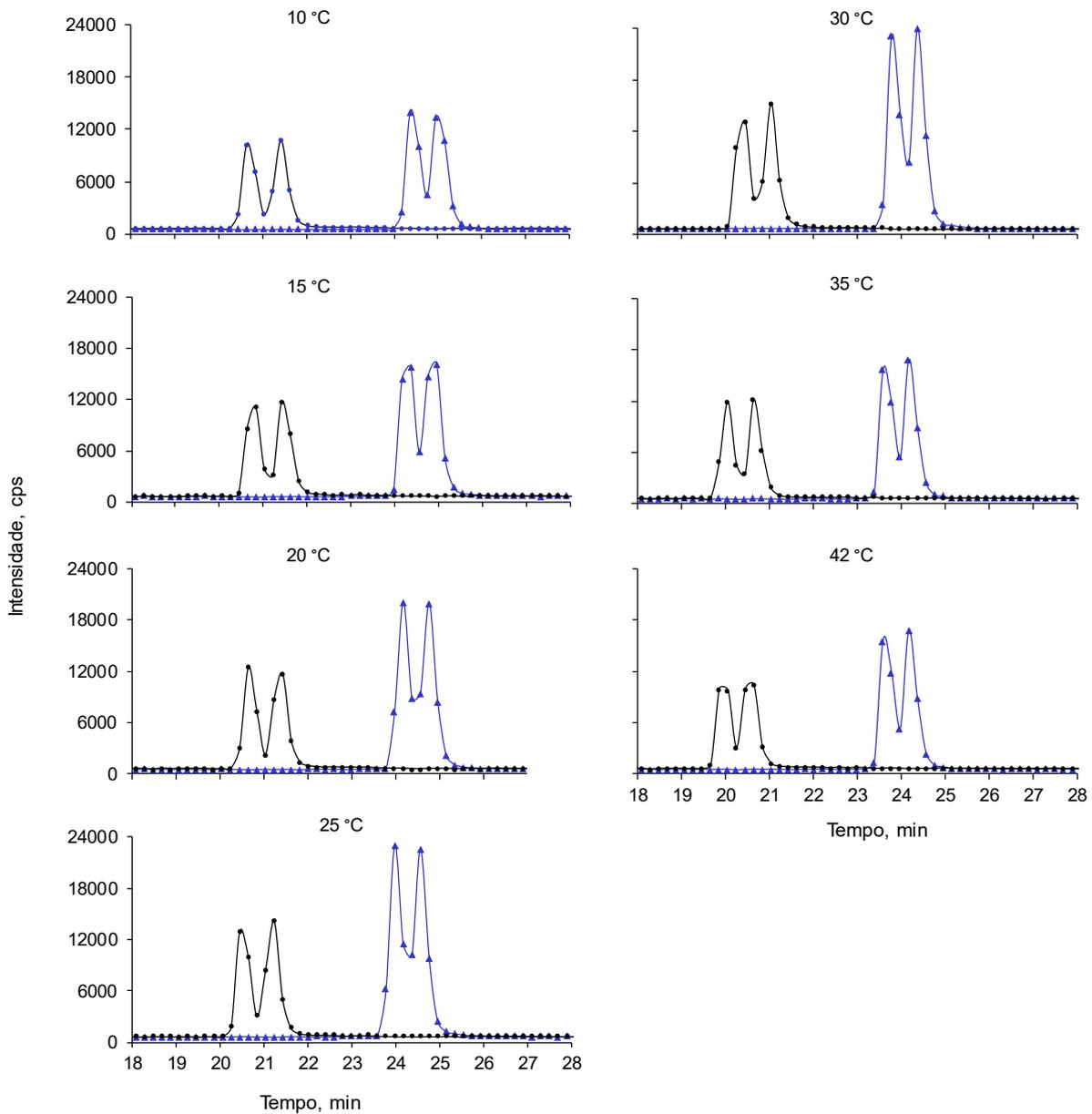
Figura 41 - Cromatogramas obtidos para a separação dos ácidos orgânicos C4, iso-C5, C5, iso-C6, C6 e C7 nas temperaturas de **A**: 10 °C, **B**: 15 °C, **C**: 20 °C, **D**: 25 °C, **E**: 30 °C, **F**: 35 °C e **G**: 42 °C, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O e detecção por MS, com supressão química.



Como pode ser observado pelos cromatogramas da Figura 41, a temperatura praticamente não teve influência na separação dos ácidos, apenas no tempo de retenção dos mesmos, quando estes foram detectados por condutividade. Os valores de resolução para o sinal de iso-C5, em relação ao C5 praticamente não variaram (1,37 a 1,41), independente da temperatura utilizada, sendo que os maiores valores (1,41) foram para 25 e 30 °C. A resolução para o sinal de iso-C6, em relação ao C6 variaram de 1,08 a 1,16, sendo que a melhor resolução (1,16) foi para 25 e 30 °C, assim como para iso-C5. O mesmo comportamento obtido para a resolução das espécies "iso" foi observado para o número de pratos teóricos, que variou de 23967 a 29063 para iso-C5 e 37402 a 45751 para iso-C6, sendo os maiores valores encontrados para a temperatura de 25 °C. Além disso, foi observado que o ácido butírico não foi separado da sua espécie "iso", pois o mesmo possui somente um sinal. As espécies "iso" dos ácidos C5 e C6 foram separadas.

Os sinais obtidos por MS, para a avaliação da separação dos ácidos C5 e C6 e suas espécies "iso", em diferentes temperaturas, estão mostrados na Figura 42. Como os sinais foram obtidos no modo *full scan*, os cromatogramas são dos íons extraídos. Além disso, são mostrados os ácidos C5 e C6 devido a somente estes possuírem as espécies "iso". Além disso, como pode ser visto nos cromatogramas obtidos com detecção por condutividade, os outros ácidos (C7, C8, C9 e C10) foram separados com boa resolução ($R_s > 1,5$) em todas as temperaturas avaliadas.

Figura 42 - Cromatogramas de íons extraídos para C5 (preto) e C6 (azul) nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 42 °C após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O e detecção por MS, com supressão química.



Nos cromatogramas da Figura 42 pode ser observado que as temperaturas avaliadas não tiveram muita influência na separação das duas espécies tanto do ácido C5, quanto do ácido C6, o mesmo comportamento observado nos cromatogramas de condutividade. Considerando-se os critérios de resolução e de número de pratos teóricos, as melhores condições de separação foram obtidas com a temperatura de 25 °C ($R_s = 1,37$ e $1,41$, $N = 25271$ e 28054 , para iso-C5 e iso-C6, respectivamente).

A temperatura pode alterar, assim como nos outros tipos de cromatografia, a

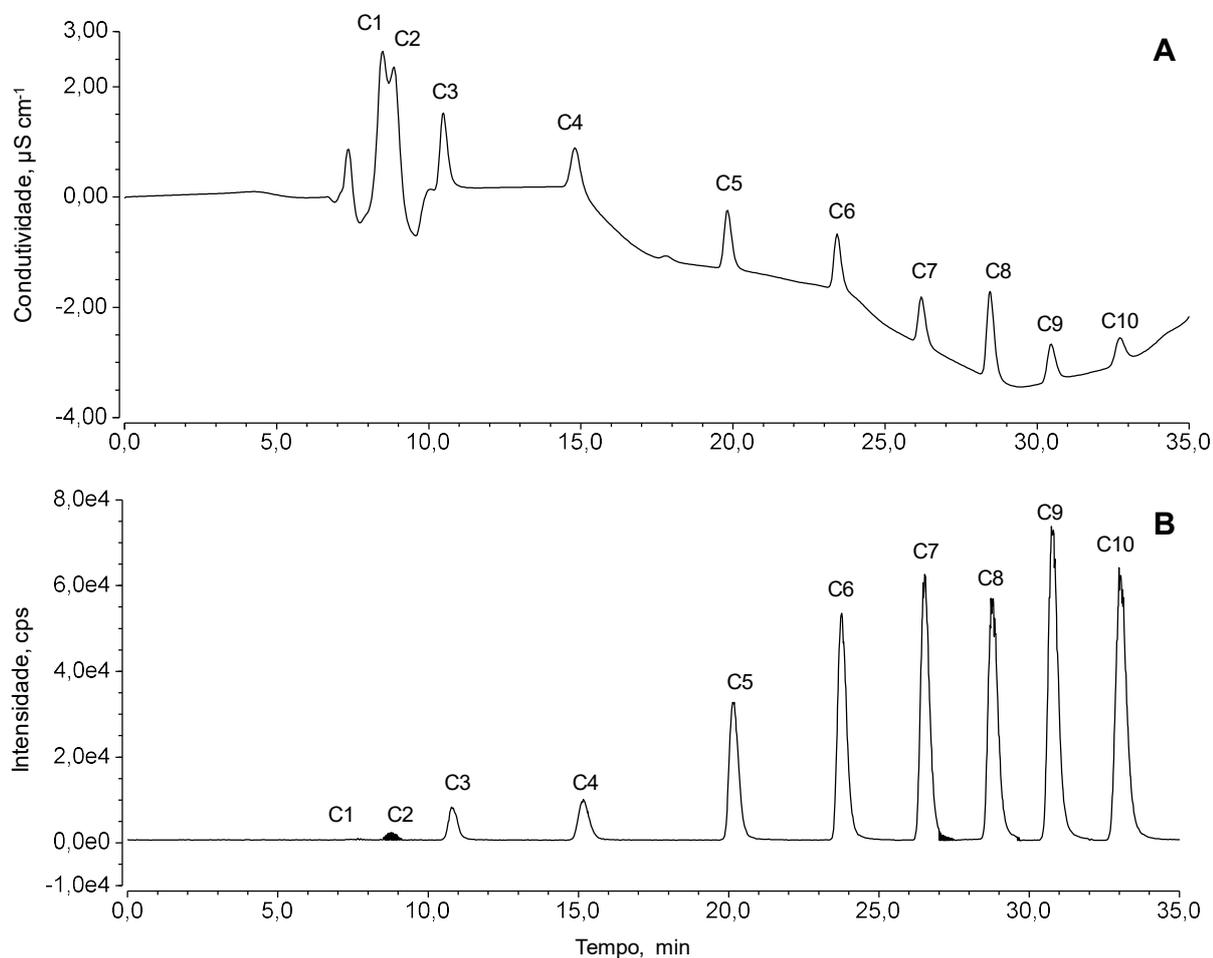
viscosidade da solução e assim, permitir uma melhor transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária (HATSIS e LUCY, 2001). Desta forma, ocorre uma melhora no formato dos picos e conseqüente melhora na separação, além da redução dos tempos de retenção dos analitos. Além disso, a temperatura pode afetar o grau de ionização dos analitos. Em temperaturas maiores, a ionização dos ácidos orgânicos é maior, diminuindo assim a interação destes com a fase estacionária, resultando numa piora na resolução e fatores de retenção (HADDAD e JACKSON, 1990).

Levando-se em consideração os parâmetros de separação das espécies "iso", tanto na detecção por condutividade, quanto por MS, a temperatura de 25 °C foi escolhida para a separação dos ácidos orgânicos utilizando coluna de pareamento iônico. O controle de temperatura neste tipo de coluna é muito importante, sendo que o fabricante recomenda avaliar a seletividade do método caso a temperatura seja altera em 5 °C ou mais (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017c).

4.2.3.3 *Resumo das condições otimizadas para separação em coluna de pareamento iônico*

Na Figura 43 são mostrados os cromatogramas de uma solução de referência de ácidos orgânicos C1 a C10, em acetonitrila, após separação em coluna de pareamento iônico e detecção por condutividade e MS.

Figura 43 - Cromatogramas para ácidos orgânicos C1 a C10, 10 mg L⁻¹ em acetonitrila, após a separação utilizando coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 25 °C e detecção **A**: condutividade e **B**: MS, com supressão química.



A Tabela 22 mostra as condições otimizadas para a separação dos ácidos orgânicos C1 a C10 em coluna de pareamento iônico, com detecção por condutividade e MS.

Tabela 22 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos ácidos orgânicos C1 a C10 utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por condutividade e MS em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.

Fase móvel	A: ACN 24%, MeOH 6%, HCl 0,03 mmol L ⁻¹ B: ACN 60%, MeOH 24%, HCl 0,05 mmol L ⁻¹												
	Programa e gradiente de eluição												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo, min</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-12* - 0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>0 - 6</td> <td>0 - 15</td> </tr> <tr> <td>6 - 30</td> <td>15 - 100</td> </tr> <tr> <td>30 - 35</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>100 - 0</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo, min	%B	-12* - 0	0	0 - 6	0 - 15	6 - 30	15 - 100	30 - 35	100	35	100 - 0
Tempo, min	%B												
-12* - 0	0												
0 - 6	0 - 15												
6 - 30	15 - 100												
30 - 35	100												
35	100 - 0												
Vazão	0,3 mL min ⁻¹												
Volume de injeção	10 µL												
Tempo	35 min												
Temperatura	25 °C												
Detector	Condutividade												
	Supressora química ACRS-ICE 500												
	Regeneração externa com TBAOH 0,5 mmol L ⁻¹												
	Vazão do regenerante: 2,5 mL min ⁻¹												

Espectrômetro de massas

Fonte de ionização: ESI

Temperatura do probe: 450 °C

Potencial da agulha: 3 kV

Modo: negativo (SIM)

Parâmetros

Ácido	Massa (m/z)	Cone (V)
C1	45	50
C2	59	50
C3	73	50
C4	87	50
C5	101	50
C6	115	75
C7	129	75
C8	143	75
C9	157	75
C10	171	75

*Tempo necessário para a estabilização da linha base devido ao gradiente de concentração da fase móvel.

4.2.3.4 *Extração em fase sólida para remoção de cloretos*

Devido à alta concentração de cloreto nas amostras (concentrações próximas a 15%), foram testadas algumas alternativas a fim de remover parte desse cloreto e minimizar possíveis interferências, tanto na parte da separação cromatográfica, quanto na parte de quantificação. Uma das alternativas, que foi testada anteriormente utilizando a coluna de exclusão iônica, é a utilização de sistemas bidimensionais. Entretanto, para que seja possível este tipo de arranjo cromatográfico, o sistema precisa possuir, no mínimo, duas válvulas de desvio, para que possa ser controlado o tempo de eliminação do cloreto e direcionamento deste para o resíduo. Como não são todos os sistemas que possuem este tipo de configuração, alternativas são necessárias para a eliminação do Cl^- das amostras.

Como o objetivo principal de quantificar os ácidos orgânicos de cadeia maior (> 5 carbonos), que não foram possíveis de serem quantificados utilizando troca iônica e exclusão iônica, foi avaliado o uso da extração em fase sólida (SPE) para a remoção do Cl^- . A SPE é amplamente utilizada como método de preparo de amostra em cromatografia devido à, principalmente, sua simplicidade, rapidez e efetividade, além do relativo baixo custo (FRITZ e MACKA, 2000).

A utilização de cartuchos com fase estacionária de características mais apolares, como C18, faz com que os ácidos de cadeia maior tenham maior interação com esta, em relação aos menores, devido ao tamanho da cadeia carbônica, o que os torna mais apolares. Sendo assim, o cloreto, bem como os ácidos orgânicos de cadeia carbônica menor, interage pouco com a fase estacionária do cartucho e é facilmente eluído com solventes mais polares, como a água. Desta forma, foi avaliada a utilização de cartuchos de C18 para a separação dos ácidos de cadeia maior do Cl^- presente na matriz.

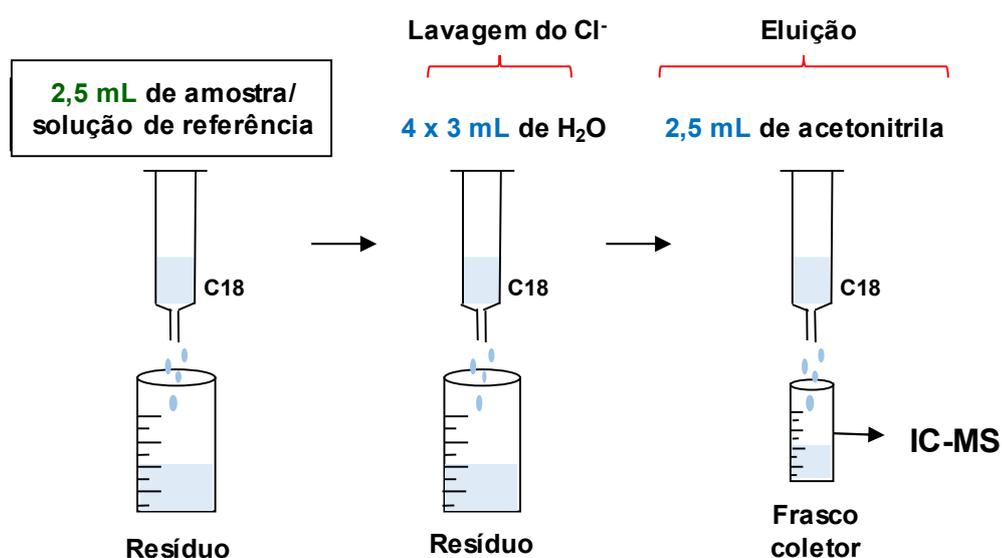
Para a otimização do procedimento, foi preparada uma solução de referência dos ácidos orgânicos C1 a C10 de 10 mg L^{-1} , em 150 g L^{-1} de Cl^- , em uma mistura de 30% de metanol + 70% de H_2O . As soluções padrão de ácidos com a carbônica maior (C9 e C10) são pouco solúveis em água, sendo desta forma, necessário algum solvente orgânico para a sua solubilização. Em percentuais menores de água, não foi possível solubilizar todo o NaCl (150 mg L^{-1} de Cl^-).

4.2.3.4.1 Avaliação do volume de água para a remoção de cloreto

Inicialmente, foi feita a avaliação do volume de água necessário para a remoção de todo o Cl^- do cartucho. Para isso, após a eluição de 2,5 mL de amostra, foi feita a lavagem do cartucho com água, utilizando-se alíquotas de 3 mL, totalizando 30 mL de água (10 alíquotas). As alíquotas de água, após passarem pelo cartucho de SPE, foram coletadas separadamente e quantificadas por cromatografia de troca iônica, de acordo com as condições otimizadas neste trabalho, item 4.2.1.1, da *Discussão dos Resultados*. As condições utilizadas para a SPE foram as descritas no item 3.3.3.3, dos *Materiais e Métodos*.

A quantificação de Cl^- por IC na água utilizada para lavagem do cartucho após SPE mostrou concentrações de Cl^- inferiores a 1 mg L^{-1} a partir da quinta alíquota de 3 mL de H_2O . Desta forma, quando foram utilizados 2,5 mL de padrão dos ácidos orgânicos em 150 g L^{-1} de Cl^- , foram necessários 12 mL de água (4 alíquotas de 3 mL) para a limpeza do cartucho. O esquema da Figura 44 ilustra o procedimento padrão adotado para a SPE nas próximas otimizações.

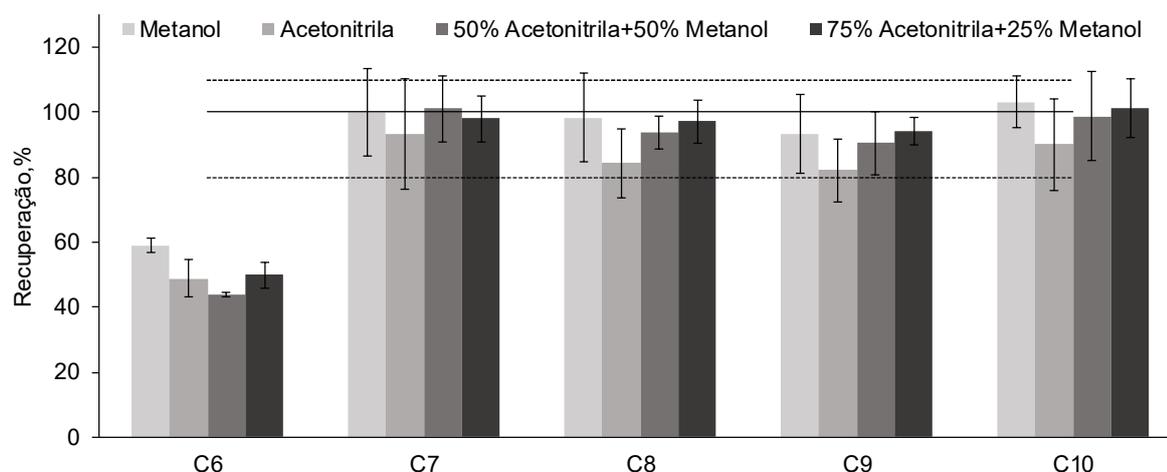
Figura 44 - Esquema do procedimento de SPE utilizado cartuchos de C18 para a eliminação de Cl^- em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo com a etapa de otimização da lavagem com H_2O .



4.2.3.4.2 Avaliação do eluente

A avaliação do solvente mais adequado para a eluição dos ácidos orgânicos retidos na fase estacionária de C18 foi feita utilizando metanol, acetonitrila, mistura de 50% de acetonitrila + 50% de metanol (v/v) e 75% de acetonitrila e 25% de metanol (v/v). A Figura 45 mostra o gráfico com as recuperações dos ácidos orgânicos C6 a C10, em relação ao padrão preparado em metanol e injetado diretamente na coluna. As SPEs foram feitas com 2,5 mL de padrão de 10 mg L⁻¹ dos ácidos C5 a C10 e eluição com 2,5 mL do eluente.

Figura 45 - Avaliação da recuperação obtida para uma solução de referência de 10 mg L⁻¹ dos ácidos orgânicos C6 a C10 em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ utilizando a SPE para remoção de Cl⁻, em diferentes solventes para a eluição. Condições cromatográficas: separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. A linha contínua representa a recuperação de 100% e as linhas tracejadas representam recuperações de 80 e 110%. (média ± desvio padrão, n=3).



Como pode ser observado na Figura 45, para os ácidos orgânicos C7, C8, C9 e C10, todas as soluções avaliadas tiveram recuperações entre 80 e 110%, não mostrando diferença significativa entre elas (ANOVA). Entretanto, quando foi utilizada para eluição a mistura de 75% de acetonitrila + 25% de metanol, os resultados mostraram um menor desvio padrão relativo, e desta forma, esta foi a condição escolhida para os próximos experimentos. Para o C6, a maior parte das recuperações foram inferiores a 50%, independente do solvente utilizado para a eluição. As recuperações para o C5 foram inferiores a 20% e, por este motivo, não

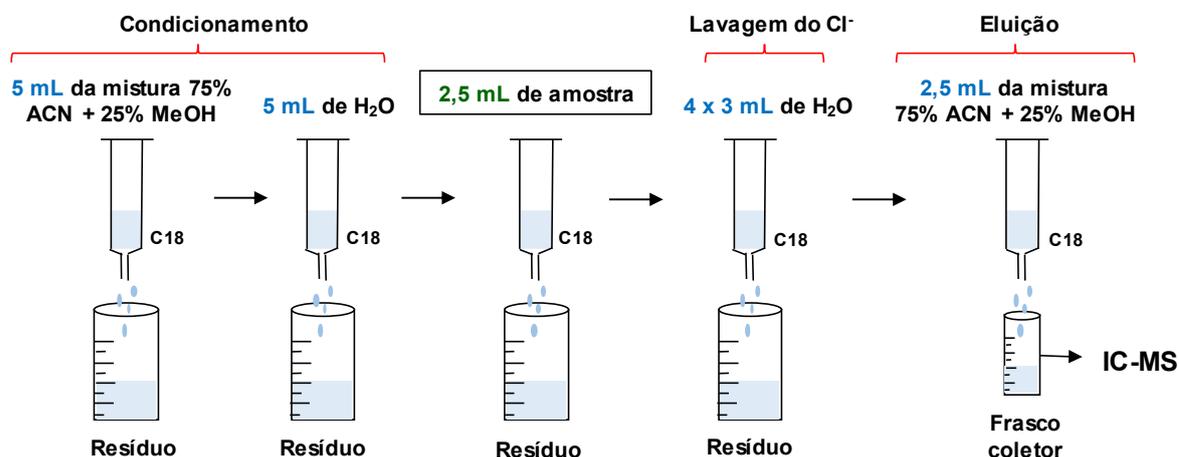
foram mostradas graficamente.

Os ácidos orgânicos C5 e C6 são relativamente mais polares do que os ácidos maiores (C7 a C10), devido a cadeia carbônica menor (BRUICE, 2010). Desta forma, estes ácidos (C5 e C6), possuem uma menor interação com a fase estacionária hidrofóbica (C18) do cartucho e acabam sendo eluídos com a água, durante a etapa de lavagem. Desta forma, a fim de possibilitar uma maior interação destes ácidos com a fase estacionária, foi feita a avaliação da etapa de condicionamento do cartucho de SPE.

4.2.3.4.3 Avaliação do condicionamento do cartucho de extração em fase sólida

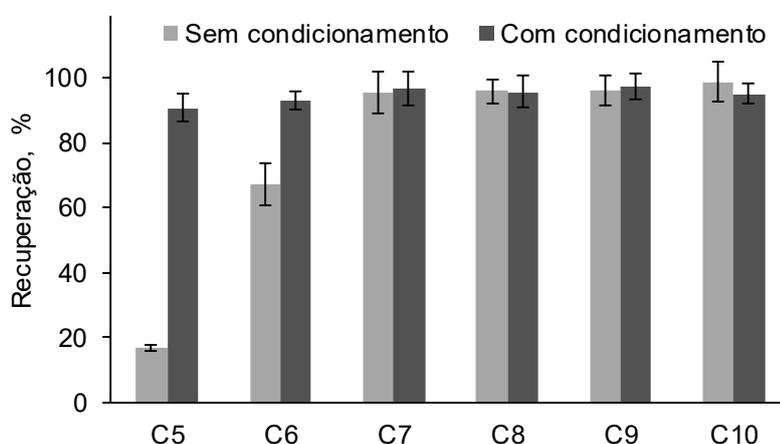
Inicialmente, os procedimentos da SPE estavam sendo feitos sem o condicionamento prévio, ou seja, a amostra foi adicionada diretamente no cartucho. A fim de avaliar a influência deste condicionamento na recuperação dos ácidos orgânicos, foi feito um teste utilizando H₂O e o eluente (mistura de 75% de acetonitrila + 25% de metanol) previamente à adição da amostra. Desta forma, o condicionamento consistiu na adição de 5 mL da mistura 75% de acetonitrila + 25% de metanol, 5 mL de H₂O, seguidos da adição dos 2,5 mL de padrão. O restante do procedimento (lavagem com H₂O e eluição) foram os mesmos citados no item anterior. A Figura 46 ilustra as etapas do procedimento de SPE para a remoção de Cl⁻ com a etapa de condicionamento do cartucho.

Figura 46 - Procedimento geral da SPE otimizada para a eliminação de Cl⁻ em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo e retenção dos ácidos orgânicos C5 a C10 para posterior quantificação por IC-MS utilizando coluna de pareamento iônico.



Para a avaliação da influência do condicionamento do cartucho, foram feitas extrações utilizando solução de referência de 10 mg L⁻¹ dos ácidos C5 a C10 em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ com e sem a etapa de condicionamento. Os resultados obtidos estão mostrados nos gráficos da Figura 47.

Figura 47 - Resultados obtidos para solução de referência de 10 mg L⁻¹ dos ácidos orgânicos C5 a C10 em 150 g L⁻¹ de Cl⁻ utilizando a SPE para remoção de Cl⁻ e mistura de 75% de acetonitrila + 25% de metanol para a eluição com e sem o condicionamento do cartucho. Condições cromatográficas: separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. (média ± desvio padrão, n=2)



Como pode ser observado pelos resultados da Figura 47, quando foi feita a etapa prévia de condicionamento do cartucho, foram obtidas recuperações superiores a 90% para os ácidos C5 e C6, que antes eram inferiores a 20% e 65%, respectivamente. A etapa de condicionamento do cartucho de SPE foi necessária para aumentar a superfície de contato entre o líquido (eluente) e a fase estacionária do cartucho. O uso de solventes orgânicos no eluente faz com que a superfície se torne mais hidrofílica e, conseqüentemente, mais compatível com soluções aquosas. Sem a etapa de condicionamento, a superfície da fase estacionária do cartucho é hidrofóbica e acaba retendo pouco os analitos mais hidrofílicos (FRITZ e MACKA, 2000). Como os ácidos C5 e C6 são mais polares que os ácidos maiores (C7 a C10), estes acabam interagindo pouco com a fase estacionária do cartucho, quando não condicionada, e acabam eluindo para o resíduo na etapa de lavagem do cartucho. Desta forma, a etapa de condicionamento é fundamental para a recuperação de todos

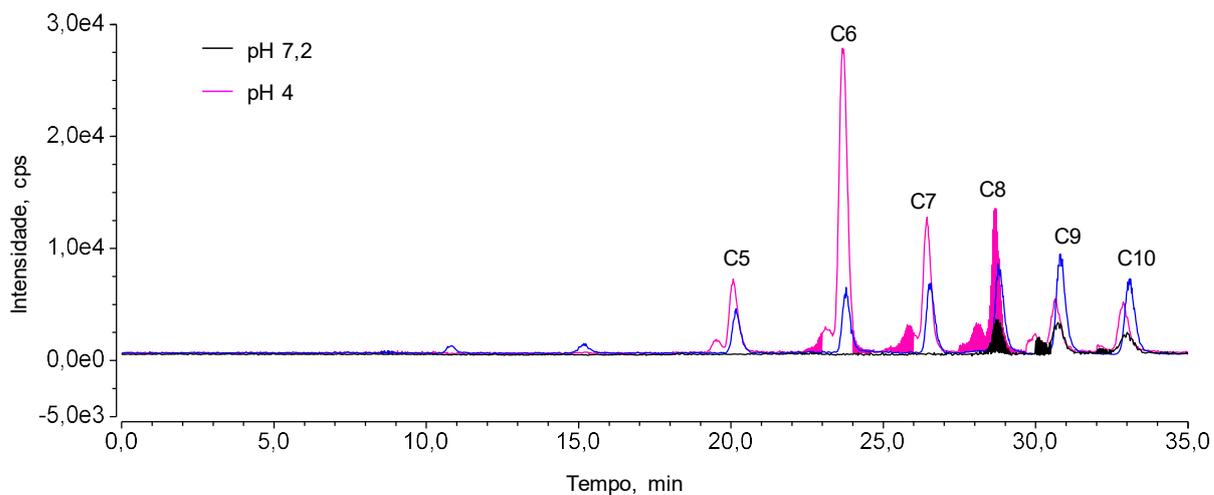
os ácidos avaliados.

Além disso, a etapa de condicionamento elimina possíveis impurezas que possam estar adsorvidas e virem a interferir na etapa de determinação (FRITZ e MACKA, 2000). Desta forma, o procedimento de SPE para remoção de Cl^- , como ilustrado na Figura 46, com a etapa de condicionamento do cartucho, adição da amostra, lavagem com H_2O e posterior eluição dos analitos, foi utilizado para aplicação em amostras de águas separadas de emulsões de petróleos.

4.2.3.4.4 Avaliação do pH

Como foi observado que o pH tem influência na separação e consequente recuperação dos ácidos C1 a C5, quando a cromatografia de exclusão iônica foi utilizada, o mesmo foi avaliado previamente à remoção de Cl^- utilizando a SPE. Para isto, foi feito o procedimento da SPE com a amostra B em duas alíquotas: uma com ajuste a pH 4 e outra sem ajuste (pH 7,2). Os cromatogramas obtidos para a amostra B após SPE para remoção de Cl^- e determinação dos ácidos C5 a C10 utilizando coluna de pareamento iônico e determinação por MS estão mostrados na Figura 48.

Figura 48 - Cromatogramas obtidos para a amostra "B" sem ajuste de pH (pH 7,2) e com ajuste de pH (pH 4) após SPE para remoção de Cl^- e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H_2O , temperatura de 25°C e detecção por MS, com supressão química. O cromatograma em azul é referente à solução de referência contendo 10 mg L^{-1} dos ácidos C5 a C10.



Como pode ser observado pelos cromatogramas, quando a amostra não teve

seu pH ajustado (pH 4), não foram observados sinais para nenhum dos ácidos orgânicos avaliados (sinais para C9, C8 e C10 são menores que os LOQs). Da mesma maneira que na exclusão iônica, em pH menor que 4, as espécies de ácidos orgânicos estarão na sua forma não dissociada. Devido às características hidrofóbicas da coluna de pareamento iônico, moléculas neutras ou não iônicas terão mais afinidade com a fase estacionária. Ou seja, quando as amostras estão com o pH maior que 4, os ácidos orgânicos estarão dissociados e, conseqüentemente, interagem menos com a coluna, podendo serem eliminados no tempo morto. Cabe salientar que o mesmo comportamento é observado na utilização dos cartuchos de SPE, devido a fase estacionária utilizada ser de C18 (hidrofóbica).

Assim, as amostras foram acidificadas para pH 4, utilizando uma solução diluída de ácido clorídrico previamente ao procedimento de SPE para remoção de Cl⁻ e posterior quantificação utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS.

4.2.3.5 Validação do método analítico e quantificação dos ácidos orgânicos (C5 a C10) utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS após extração em fase sólida para a remoção de cloreto

Para a quantificação dos ácidos orgânicos C5 a C10 utilizando coluna de pareamento iônico, alguns parâmetros foram inicialmente avaliados para a validação do método analítico, como a curva analítica e faixa linear, LOD e LOQ para cada analito, além de resolução de sinal, assimetria, fatores de retenção e separação e número de pratos teóricos. A validação foi feita utilizando detecção por MS, sendo que CD foi utilizado para confirmar os resultados. Os LOQs obtidos com o CD são de 2 a 3 vezes maior que os obtidos por MS. As curvas analíticas, bem como a faixa linear de trabalho, foram obtidas de acordo com as recomendações do INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2018).

As avaliações foram feitas utilizando uma solução de referência dos ácidos C5 a C10, preparada em uma mistura de 30% de metanol + 70% de H₂O com, no mínimo, 5 níveis de concentração, que variaram de 0,5 a 10 mg L⁻¹ (3 replicatas). A Tabela 23 resume os dados obtidos para a separação dos ácidos C5 a C10 em coluna de pareamento iônico e detecção por MS. Os tempos de retenção mostrados na tabela são para uma solução de referência de 5 mg L⁻¹ dos ácidos orgânicos C5 a C10.

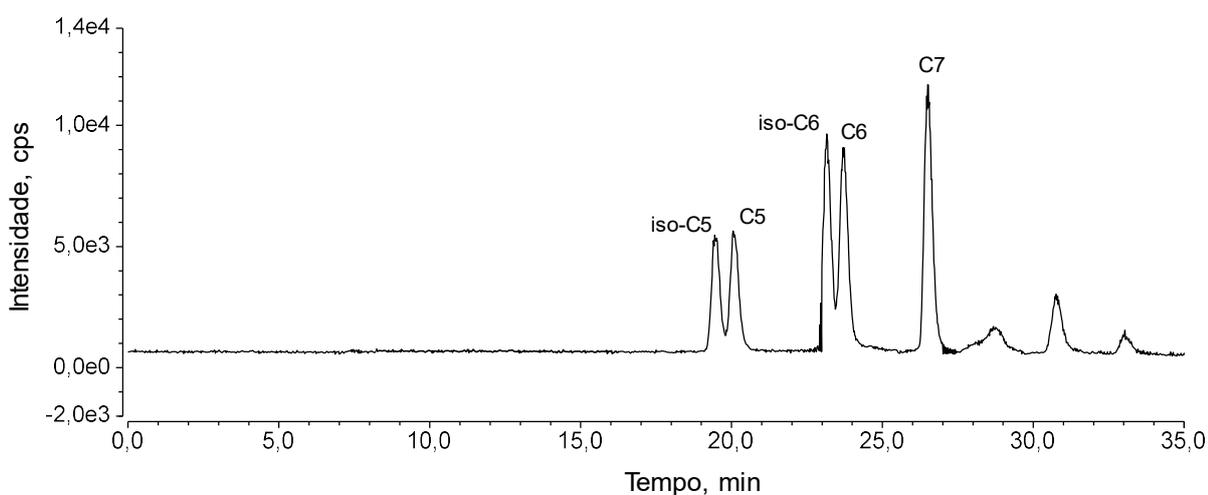
Tabela 23 - Tempo de retenção (t_R), número de pratos teóricos, fator de retenção e separação, resolução, assimetria, faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação, LOD e LOQ para a determinação de C5, C6, C7, C8, C9 e C10 separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química.

Espécie	t_R (min)	Pratos teóricos (N)	Fator de retenção (k)	Fator de separação (α)	Resolução (R_s)	Assimetria (A_s)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
C5	20,15	22673	2,10	1,27	6,69	1,37	0,5-10	$y = 768 x - 66$	0,9988	0,15	0,5
C6	23,78	32768	2,66	1,16	4,59	1,27	0,5-10	$y = 1188 x + 57$	0,9995	0,15	0,5
C7	26,52	44793	3,08	1,11	3,66	1,37	0,5-10	$y = 2030 x + 72$	0,9987	0,15	0,5
C8	28,80	45046	3,43	1,09	3,07	1,23	1-10	$y = 2286 x + 496$	0,9978	0,3	1,0
C9	30,77	49487	3,74	1,09	3,40	1,26	1-10	$y = 2386 x + 338$	0,9985	0,3	1,0
C10	33,07	46036	4,08	-	-	1,31	1-10	$y = 1944 x + 725$	0,9990	0,3	1,0

A separação dos ácidos C5 a C10, utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS foi adequada levando-se em consideração que $N \gg 1000$, $k > 2$, $\alpha > 1$ e $R_s \gg 1,5$ e $A_s < 2$ (BLIESNER, 2006). Os coeficientes de determinação obtidos para os ácidos orgânicos C5 a C10 foram superiores a 0,9978 indicando boa adequabilidade do ajuste linear à curva de calibração. Ainda, a análise do gráfico dos resíduos, de acordo com a planilha de validação (RIBEIRO et al., 2008), mostrou uma distribuição uniforme dos dados, com variância constante (homocedastidade), além da ausência de amostras atípicas. Estes dados comprovam que o ajuste linear, além da faixa linear de trabalho foram adequadas para a determinação de C5, C6, C7, C8, C9 e C10 nas condições otimizadas.

A verificação da exatidão foi feita, também, com a injeção do CRM 46975, diluído para $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em uma solução de Cl^- de 150 g L^{-1} (30% de metanol + 70% de H_2O). O CRM, além dos ácidos orgânicos de cadeia curta e linear C5 a C7, avaliados neste método, possui, ainda, os ácidos C1, C2, C3, C4, iso-C4, iso-C5 e iso-C6 em sua composição. A Figura 49 mostra o cromatograma para o CRM 46975 após SPE para remoção de Cl^- e separação em coluna de pareamento iônico, nas condições otimizadas.

Figura 49 - Cromatograma do CRM 46975 $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ após SPE para eliminação de Cl^- e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H_2O , temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção por MS, com supressão química.



Como pode ser observado pelo cromatograma da Figura 49, foi possível separar, além dos ácidos C5, C6 e C7, de cadeia linear, as espécies iso-C5 e iso-C6,

com boa resolução. Os ácidos maiores C8, C9 e C10 não estão presentes no CRM e, por isso, não mostraram sinais neste cromatograma. Os ácidos menores (C1, C2, C3, C4, iso-C4), devido às condições otimizadas do método, são perdidos durante o procedimento da SPE para a remoção do Cl^- , por isso, não foram recuperados. Apesar da identificação das espécies "iso" no cromatograma do CRM, estas espécies não foram quantificadas devido à falta de padrão disponível para cada ácido. Os resultados obtidos para concordância no CRM 46975, preparado em três níveis de concentração (0,005, 0,01 e 5 mmol L^{-1} em 150 g L^{-1} de Cl^- (30% de metanol + 70% de H_2O) estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados obtidos para C5, C6 e C7 no CRM 46975 em três níveis de concentração (0,05, 0,01 e 5 mmol L^{-1}), após SPE para remoção de Cl^- e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H_2O , temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química. Valores em mg L^{-1} , n=1.

CRM (mmol L^{-1})	Valores (mg L^{-1})	Ácido		
		C5	C6	C7
0,005	Certificado	0,511	0,581	0,651
	Encontrado	0,559	0,569	0,596
	Concordância, %	109	98	92
0,01	Certificado	1,02	1,16	1,30
	Encontrado	1,08	1,03	1,24
	Concordância, %	106	89	95
5	Certificado	5,11	5,81	6,51
	Encontrado	4,41	5,52	6,12
	Concordância, %	86	95	94

Como pode ser observado na Tabela 24, os ácidos C5, C6 e C7 foram de 86 a 109% concordantes com o valor indicado no CRM, indicando a adequabilidade do método, mesmo na presença das espécies "iso". Como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 49, os sinais para os ácidos C5 e C6 e suas respectivas espécies "iso" não foram bem resolvidos. Porém, como pode ser observado pelos valores de concordância, foi possível a integração dos sinais e quantificação dos ácidos C5 e C6.

Após as otimizações das condições de separação de Cl⁻ utilizando a SPE, das condições cromatográficas, obtenção das curvas analíticas e avaliação da exatidão, foi feita a injeção das amostras no sistema cromatográfico. Cabe salientar que, para todas as amostras, inicialmente, foi feito o procedimento de SPE para a remoção do Cl⁻, sendo que as soluções obtidas foram, então, injetadas diretamente no sistema cromatográfico, sem a necessidade de diluição. Os resultados obtidos para os ácidos C5 a C10, utilizando a coluna de pareamento iônico, após SPE e determinação por MS estão mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C5, C6, C7, C8, C9 e C10) utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após SPE para eliminação de Cl⁻. (n=2).

Amostra	Ácido, mg L ⁻¹					
	C5	C6	C7	C8	C9	C10
A	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
B	3,59 ± 0,44	5,06 ± 0,75	1,4 ± 0,2	< 1,0	< 1,0	< 1,0
C	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
D	2,1 ± 0,3	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
E	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
F	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
G	3,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
H	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
I	3,71 ± 0,51	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
J	5,09 ± 0,15	0,686 ± 0,084	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
K	8,15 ± 0,49	1,42 ± 0,14	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
L	*	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
M	9,91 ± 0,77	2,45 ± 0,44	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
N	0,557 ± 0,048	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
O	22,1 ± 3,2	3,24 ± 0,41	0,685 ± 0,033	< 1,0	< 1,0	< 1,0

*Não foram observados sinais para o C5, nem nos ensaios de recuperação

De acordo com os dados mostrados na Tabela 25, os ácidos orgânicos de cadeia maior (C8, C9 e C10), em todas as amostras, estão em concentrações inferiores ao LOQ (1 mg L⁻¹). Os ácidos C7 e C6 estão presentes em um número relativamente menor de amostras e em concentrações inferiores do que quando comparado ao C5, bem como os ácidos orgânicos de cadeia menor (C1 a C4).

Para a avaliação da seletividade, assim como para avaliação da exatidão,

foram feitos ensaios de recuperação dos analitos, fortificando-se as amostras com concentrações conhecidas dos ácidos orgânicos avaliados (C5 a C10). As concentrações adicionadas de padrão foram equivalentes a 100% da concentração de analito encontrada na amostra (BLIESNER, 2006). Assim como para os outros métodos, quando necessário, previamente às quantificações, as amostras foram diluídas para que as concentrações ficassem dentro da faixa linear para cada ácido. Em amostras em que a concentração dos ácidos orgânicos estava abaixo do LOQ, a fortificação foi de 0,5 mg L⁻¹ para C5, C6 e C7 e de 1 mg L⁻¹ para C8, C9 e C10. Os resultados encontrados para as recuperações dos ácidos C5 a C10 utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS estão mostrados na Tabela 26. Cabe salientar que a fortificação foi feita previamente à etapa de remoção de Cl⁻ utilizando a SPE.

Tabela 26 - Valores de recuperação para os ácidos C5 a C10 para fortificação nas amostras de águas separadas de emulsões de petróleo após SPE para remoção de Cl⁻ e separação em coluna de pareamento iônico com gradiente de fase móvel acidificada (HCl) de acetonitrila, metanol e H₂O, temperatura de 25 °C e detecção por MS, com supressão química.

Amostra	Recuperação, %					
	C5	C6	C7	C8	C9	C10
A	105	103	94	86	91	88
B	94	105	84	95	108	106
C	95	102	85	91	109	108
D	106	108	95	88	89	90
E	90	95	98	107	88	90
F	85	97	86	89	89	93
G	87	86	92	83	87	92
H	108	108	104	107	106	107
I	92	109	109	108	107	102
J	108	96	90	91	94	85
K	104	97	92	106	94	89
L	-	92	101	96	93	108
M	106	86	85	85	93	89
N	88	91	95	103	104	99
O	86	96	89	99	94	99

As recuperações obtidas para os ácidos C5 a C10 foram adequadas para todas as amostras avaliadas, sendo estas entre 83 e 109%. Além destes ácidos, muitas

amostras mostraram sinais para as espécies iso-C5 e iso-C6, porém, estes não foram quantificados devido à indisponibilidade de padrão.

Além disso, foi feita a injeção de uma amostra “branco” (água ultrapura em 150 g L⁻¹ de Cl⁻), após filtração no sistema de SPE para remoção de Cl⁻, e esta não mostrou sinais para os ácidos orgânicos C1 a C7, evidenciando, também, a seletividade do método. Foram observados sinais ruidosos para C8, C9 e C10, porém estes foram pouco intensos e menores que os LOQs do método (1 mg L⁻¹).

4.2.4 Resumo dos resultados para a quantificação de ácidos orgânicos em águas separadas de emulsões de petróleo

A Tabela 27 mostra o resumo dos resultados encontrados para a determinação de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear em águas separadas de emulsões de petróleo, utilizando a cromatografia líquida com colunas de exclusão iônica e pareamento iônico.

Tabela 27 - Resultados obtidos para a determinação de ácidos orgânicos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) utilizando cromatografia líquida em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo. (n=2).

Amostra	Ácido, mg L ⁻¹										Somatório
	C1 ^a	C2 ^a	C3 ^b	C4 ^b	C5 ^c	C6 ^c	C7 ^c	C8 ^c	C9 ^c	C10 ^c	
A	15,1 ± 1,4	27,4 ± 2,4	< 8,0	< 5,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	42,5
B	17,3 ± 1,2	540 ± 60	< 8,0	12,5 ± 1,8	3,59 ± 0,44	5,06 ± 0,75	1,4 ± 0,2	< 1,0	< 1,0	< 1,0	590
C	< 18	199 ± 16	< 8,0	< 5,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	199
D	81,2 ± 8,1	< 50	< 8,0	< 5,0	2,1 ± 0,3	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	83,3
E	< 30	820 ± 40	53 ± 14	< 5,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	870
F	< 37	< 75	< 8,0	< 5,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-
G	450 ± 32	5050 ± 560	138 ± 13	49,8 ± 7,3	3,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	5690
H	< 45	< 90	< 8,0	< 5,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-
I	1680 ± 170	1050 ± 110	164 ± 25	30 ± 5	3,71 ± 0,51	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2930
J	634 ± 44	2190 ± 240	235 ± 25	37,3 ± 2,8	5,09 ± 0,15	0,686 ± 0,084	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	3100
K	1400 ± 100	476 ± 29	52,1 ± 4,8	34,5 ± 1,4	8,15 ± 0,49	1,42 ± 0,14	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1970
L	236 ± 14	1510 ± 170	288 ± 38	74,8 ± 7,5	*	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2110
M	< 65	534 ± 37	107 ± 16	46,1 ± 5,3	9,91 ± 0,77	2,45 ± 0,44	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	699
N	185 ± 11	15310 ± 1070	< 40*	< 40*	0,557 ± 0,048	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	15490
O	1044 ± 84	570 ± 46	363 ± 44	167 ± 10	22,1 ± 3,2	3,24 ± 0,41	0,685 ± 0,033	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2170

^a Determinação utilizando coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade.

^b Determinação utilizando coluna de exclusão iônica em sistema bidimensional para eliminação de Cl⁻ e detecção por condutividade.

^c Determinação utilizando coluna de pareamento iônico e detecção por MS utilizando SPE para remoção de Cl⁻.

Como pode ser observado pela Tabela 27, a amostra que possui a maior concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta e linear (C1 a C10) foi a “N”, com 15492 mg L⁻¹, seguido da amostra “G”, com 5693 mg L⁻¹. A concentração de ácido acético foi superior a 99 e 90%, para as amostras “N” e “G”, respectivamente. Estes valores estão bem acima dos valores encontrados na literatura para este tipo de amostra (até 1014 mg L⁻¹ de C2, conforme mostrado por Barth, 1991). Ainda, não foi possível correlacionar diretamente a concentração de ácidos orgânicos com o pH da amostra, uma vez que a amostra “A” é a que possui a menor concentração de ácidos orgânicos e, também, o menor pH (3,0). Cabe salientar que as amostras deste trabalho são de petróleos do pré-sal e estas diferenças podem estar associadas a formação dos mesmos.

Ainda, pode ser observado que, para as amostras “B”, “C”, “E”, “G” e “N”, a concentração de ácido acético foi superior a 90% da concentração total dos ácidos orgânicos. Nas amostras “A”, “I”, “J”, “L” e “M”, a concentração de C2 representa entre 50 e 89% do total de ácidos orgânicos das amostras de águas separadas de emulsões de petróleo. De acordo com a literatura, a concentração de ácido acético é a mais abundante, quando comparada com os outros ácidos orgânicos (C2>C3>C4>C5) e decresce de acordo com o aumento da cadeia carbônica (SAKUGAWA, KAPLAN e SHEPARD, 1993; PITTMAN e LEWAN, 1994). O mesmo comportamento foi observado para a maior parte das amostras deste trabalho. De acordo com a literatura, o C1 ocorre, geralmente, em menor concentração do que os outros ácidos orgânicos de cadeia simples e linear (PITTMAN e LEWAN, 1994), porém, não é o que foi observado para a maior parte das amostras deste trabalho, sendo que para as águas “D”, “I” e “O”, a concentração deste é superior à de C2. Nestas amostras, a concentração de C1 representa 100, 57 e 48% do total dos ácidos orgânicos avaliados.

Em relação ao aspecto visual das amostras (Figura 8), as amostras com a maior concentração total de ácidos orgânicos, no geral, são as que possuem uma coloração mais alaranjada, indicando a presença de óleo na água. Como foi mostrado por Hutin, Argiller e Langevin (2014), os ácidos orgânicos podem estar concentrados na interface óleo/água e, conseqüentemente, diminuir a tensão superficial, aumentando a miscibilidade do óleo na água.

4.2.5 Resumo dos métodos e limites de detecção e quantificação utilizados para a quantificação de ácidos orgânicos em águas separadas de emulsões de petróleo

Para a determinação dos ácidos orgânicos de cadeia curta e linear de 1 a 10 carbonos (C1 a C10), neste trabalho, foram utilizados três métodos de separação na cromatografia líquida, utilizando colunas de troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico. Para a quantificação dos ácidos orgânicos, após a separação em coluna de troca iônica e exclusão iônica, foi utilizado detector de condutividade, enquanto a MS foi utilizada para a detecção após a separação em coluna de pareamento iônico. A Tabela 28 mostra os ácidos e os LODs e LOQs quantificados em cada método avaliado.

Tabela 28 - Resumo dos LODs e LOQs (mg L^{-1}) obtidos para a determinação dos ácidos orgânicos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10) em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo utilizando a cromatografia líquida nos diferentes tipos de colunas (troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico).

Ácido (mg L^{-1})	Tipo de coluna					
	Troca iônica ^a		Exclusão iônica ^{b,c}		Pareamento iônico ^d	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
C1	0,15	0,5	0,75 ^b	2,5 ^b	nd	nd
C2	0,03	0,1	1,5 ^b	5 ^b	nd	nd
C3	0,150	0,5	2,4 ^c	8 ^c	nd	nd
C4	0,15	0,5	1,5 ^c	5 ^c	nd	nd
C5	0,03	0,1	1,5 ^c	5 ^c	0,15	0,5
C6	0,015	0,05	nd	nd	0,15	0,5
C7	0,03	0,1	nd	nd	0,15	0,5
C8	0,15	0,5	nd	nd	0,3	1,0
C9	nd	nd	nd	nd	0,3	1,0
C10	nd	nd	nd	nd	0,3	1,0
	Condutividade		Condutividade		Espectrometria de massas	

^a Valores de LOD e LOQ para amostras com concentrações de Cl^- inferiores a 100 mg L^{-1} .

^b Valores de LOD e LOQ para amostras com concentrações de Cl^- inferiores a 5000 mg L^{-1} .

^c Valores para a determinação utilizando sistema bidimensional para eliminação de Cl^- .

^d Valores para a determinação utilizando SPE para a remoção de Cl^- .

nd: não foi possível quantificar utilizando este tipo de coluna e detector.

Os valores de LOD e LOQ para a determinação dos ácidos C1 a C8 utilizando coluna de troca iônica e detecção por condutividade são menores do que quando comparados aos LOQs obtidos para separação em coluna de exclusão iônica e pareamento iônico. Porém, é importante mencionar que, quando é utilizada a coluna de troca iônica, a concentração de Cl^- das amostras deve ser inferior a 1000 mg L^{-1} . Desta forma, faz-se necessária a diluição prévia das amostras para que a concentração de Cl^- fique na faixa adequada. Conseqüentemente, os valores de LOD e LOQ são multiplicados pelo mesmo fator de diluição. Assim, maior parte das amostras precisou ser diluída, em no mínimo, 100 vezes para a quantificação dos ácidos orgânicos, fazendo com que os LOQs, nestes casos, fossem maiores do que os obtidos na separação por exclusão iônica e pareamento iônico.

A concentração de Cl^- também interfere na sobreposição de sinais quando a separação é feita em coluna de exclusão iônica. Neste caso, a quantificação dos ácidos C1 a C5 foi possível em amostras com concentrações de Cl^- inferiores a 5000 mg L^{-1} , concentração está 50 vezes superior a máxima suportada na coluna de troca iônica. Para os ácidos C1 e C2, que estão presentes nas amostras em concentrações maiores do que os outros ácidos de cadeia maior (C3, C4 e C5), foi possível a quantificação, mesmo sendo necessária a diluição de grande parte das amostras. Porém, a determinação dos ácidos C3, C4 e C5 só foi possível, quando foi utilizada a coluna de exclusão iônica, após a separação do cloreto em um sistema bidimensional. Desta forma, as amostras não precisaram ser diluídas e, conseqüentemente, os valores de LOD e LOQ não foram alterados, independentemente da concentração de Cl^- da amostra.

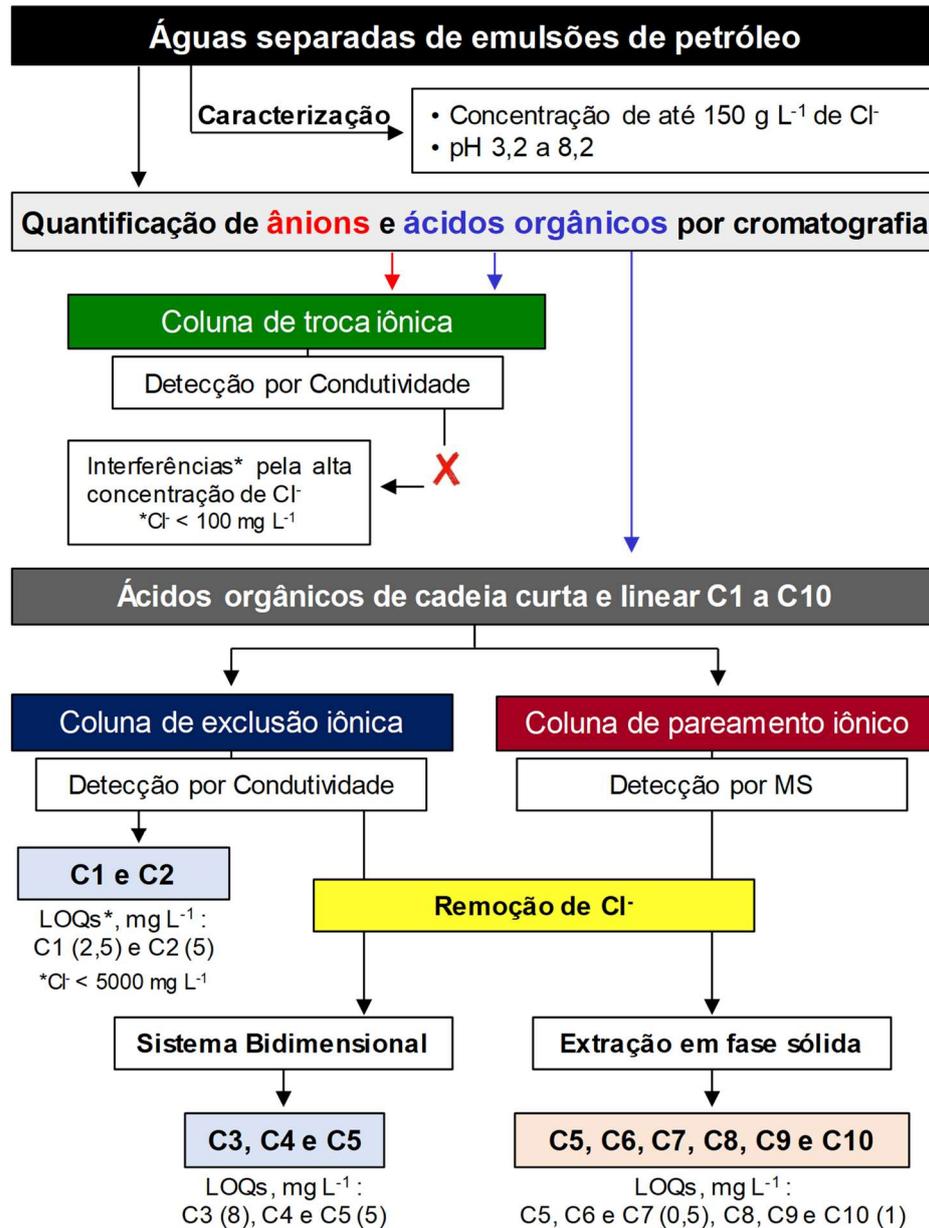
Para a determinação dos ácidos de cadeia maior (C5 a C8), após separação em coluna de pareamento iônico, foram obtidos LODs e LOQs relativamente menores do que quando comparados aos outros métodos. Neste caso, também foi necessária a separação do Cl^- da amostra, utilizando SPE, previamente à quantificação. A utilização da espectrometria de massa, nesse caso, juntamente com a eliminação do Cl^- , contribuiu para os menores valores de LOQ e LOD (CASS e CASSIANO, 2015).

É importante mencionar que, mesmo sendo necessários, pelo menos, dois tipos de coluna e dois detectores para a separação e quantificação dos ácidos C1 a C10, a quantificação de todos foi possível com LOQs relativamente baixos. Além disso, as determinações foram possíveis em amostras com alto teor de Cl^- (até 138 g L^{-1}), em um único equipamento de cromatografia iônica, que é relativamente mais barato que

um GC, por exemplo.

Ainda, a Figura 50 mostra um esquema resumindo as avaliações feitas nas diferentes colunas e os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 50 - Esquema resumindo os resultados para as colunas de troca iônica, exclusão iônica e pareamento iônico para a determinação de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo.



5 CONCLUSÕES

A determinação simultânea de ânions e ácidos orgânicos de cadeia curta e linear (1 a 10 carbonos) em águas separadas de emulsões de petróleo não foi possível para todas as amostras utilizando a cromatografia líquida e detecção por condutividade, UV e espectrometria de massas. A principal dificuldade com a separação destes analitos simultaneamente foi relacionada com a concentração de Cl^- , que varia de 0,212 até 138 g L^{-1} . Sendo assim, foram necessárias alternativas para a remoção do Cl^- presente na matriz, bem como a avaliação de mecanismos de separação alternativos.

A separação dos ânions e ácidos orgânicos foi avaliada inicialmente em coluna de troca iônica, devido à possibilidade de separação simultânea destes analitos. A separação foi otimizada utilizando como fase móvel a eluição por gradiente de KOH , com concentrações de 1 a 60 mmol L^{-1} , na temperatura de 35 °C, supressão eletrolítica e detecção por condutividade. Após as otimizações, foi possível quantificar os ácidos orgânicos C1 a C8 e os ânions F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} com LOQs variando de 10 a 25 e 50 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, para ânions e ácidos, respectivamente. Porém, não foi possível quantificar os ácidos orgânicos e ânions na maior parte das amostras (somente nas amostras A e B), devido à limitação da concentração de cloreto, que deve ser, no mínimo, inferior a 100 mg L^{-1} . Devido a esta limitação, as amostras, com exceção da A e B, precisaram ser diluídas em, no mínimo, 100 vezes, aumentando os LOQs e impossibilitando a quantificação de ácidos orgânicos nestas condições.

Desta forma, buscando-se alternativas para a quantificação destes ácidos, foi feita, inicialmente, a otimização da separação utilizando coluna de exclusão iônica, supressão química e detecção por condutividade. A detecção por UV e MS foi utilizada somente para confirmação de sinal, quando possível, devido a menor sensibilidade em relação ao detector de condutividade. As melhores condições de separação foram utilizando fase móvel no modo isocrático de ácido heptafluorbutírico 1 mmol L^{-1} , temperatura de 35 °C e supressão química com regeneração externa de hidróxido de tetrabutylamônio 0,5 mmol L^{-1} . Foi possível a separação e quantificação dos ácidos orgânicos C1 a C5, com LOQs de 2,5 a 8 mg L^{-1} , para os ácidos fórmico e propiônico, respectivamente. Porém, foram observadas interferências na separação dos ácidos orgânicos, principalmente C1 a C3, em amostras com concentrações de Cl^- superiores a 5000 mg L^{-1} , sendo necessária a diluição e, desta forma, conseqüente aumento dos

LOQs de acordo com o fator de diluição necessário. Mesmo com os altos fatores de diluição, os ácidos fórmico e acético foram quantificados na maior parte das amostras, com concentrações variando de 15,1 a 1680 mg L⁻¹ e 27,4 a 15310 mg L⁻¹, respectivamente. Porém, para os ácidos C3, C4 e C5, devido ao alto fator de diluição, os valores encontrados para todas as amostras, foram menores que os LOQs, com exceção do ácido propiônico para a amostra O.

A fim de melhorar os LOQs para os ácidos C3, C4 e C5, foi utilizada a cromatografia bidimensional com coluna de exclusão iônica e detecção por condutividade. Na primeira dimensão, foi feita a eliminação do cloreto da matriz, utilizando a pré-coluna de exclusão iônica e, na segunda dimensão, foi feita a separação dos ácidos orgânicos em coluna de mesmo material. A determinação dos ácidos orgânicos C1 e C2, neste caso, não foi possível devido a necessidade de um tempo maior para a eliminação da matriz e, conseqüentemente, estes compostos acabam eluindo junto para o resíduo na primeira dimensão. Foram necessários 3,8 min para a eliminação de maior parte da matriz, na primeira dimensão, e posterior separação e quantificação dos ácidos orgânicos C3, C4 e C5. Desta forma, as amostras de águas separadas de emulsões de petróleo injetadas diretamente no sistema cromatográfico, sem necessidade de diluição. As amostras precisaram ser acidificadas para pH < 4 para garantir que estivessem em sua forma não dissociada e, também, eliminar possíveis interferências devido à presença de íons carbonato. Desta forma, os LOQs foram cerca de 30 vezes menores, como é o caso da amostra "O", do que quando comparados a utilização da cromatografia de exclusão iônica e diluição da amostra.

Para a quantificação dos ácidos orgânicos de cadeia linear C5 a C10 foi utilizada uma coluna de pareamento iônico, com um gradiente de fase móvel acidificada de acetonitrila, metanol e água e determinação por MS. A separação foi feita em 35 min, utilizando 25 °C. A presença de sal nas amostras dificulta a ionização dos ácidos orgânicos e, desta forma, foi feita a remoção do Cl⁻ da matriz utilizando cartuchos de SPE de C18, o que possibilitou a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico, sem diluição prévia. As amostras, previamente à etapa de SPE, precisaram ser acidificadas (pH < 4) para garantir que os ácidos estivessem em sua forma não dissociada e, assim, fossem retidos na fase estacionária do cartucho. Os LOQs foram de 0,5 mg L⁻¹ para C5, C6 e C7 e de 1,0 mg L⁻¹ para C8, C9 e C10. Os valores encontrados para os ácidos orgânicos C5, C6 e C7 variaram de 0,557 a 22,1

mg L⁻¹, de 0,686 a 5,06 mg L⁻¹ e 0,685 a 1,4 mg L⁻¹, respectivamente. Para C8, C9 e C10, os valores foram menores do que 1 mg L⁻¹ (LOQ).

Os petróleos do pré-sal, devido às suas origens, possuem concentração salina elevada, em uma razão muito maior que os outros ânions e ácidos orgânicos, sendo que isto impossibilitou que o objetivo principal deste trabalho fosse alcançado. Para contornar este problema, foram utilizadas alternativas para quantificar os ácidos orgânicos com uma técnica de separação simples e de mais baixo custo do que a cromatografia gasosa, por exemplo. A utilização de colunas com mecanismos diferentes e etapas simples de remoção de matriz foi feita com sucesso utilizando metodologias de relativo baixo custo. Desta forma, mesmo com a alta concentração salina das amostras, foi possível quantificar separar e quantificar os ácidos orgânicos C1 a C10 a partir de 0,5 mg L⁻¹, por cromatografia líquida, utilizando colunas de exclusão iônica e pareamento iônico, em amostras de águas separadas de emulsões de petróleo, mesmo em matrizes contendo, aproximadamente, 150 g L⁻¹ de Cl⁻. Cabe salientar que não foram encontrados trabalhos na literatura que fazem a quantificação destes ácidos em amostras do pré-sal

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 4175-18**: Standard Terminology Relating to Petroleum Products, Liquid Fuels, and Lubricants: 2018.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 974-02**. Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration: 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 14025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração: Rio de Janeiro, 2005.

ANDERSEN, S. I. et al. Detection and impact of carboxylic acids at the crude oil-water interface. **Energy & Fuels**, v. 31, p. 8821-8821, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL. Brasil, 2020. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 20 de fevereiro

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis: Washington, 2002.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements: Gaithersburg, 2013.

BARTH, T. Organic-acids and inorganic-ions in waters from petroleum reservoirs, norwegian continental-shelf - a multivariate statistical-analysis and comparison with american reservoir formation waters. **Applied Geochemistry**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 1991.

BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods** - A practical guide. 1 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. 291 p.

BORGUND, A. E.; BARTH, T. Generation of short-chain organic-acids from crude-oil by hydrous pyrolysis. **Organic Geochemistry**, v. 21, n. 8-9, p. 943-952, 1994.

BRIENT, J. A.; WESSNER, P. J.; DOYLE, M. N. **Naphthenic Acids**. New York: John Wiley&Sons, 2000.

BROWN, L. D.; ULRICH, A. C. Oil sands naphthenic acids: A review of properties, measurement, and treatment. **Chemosphere**, v. 127, p. 276-290, 2015.

BRUCE, P. Y. **Organic Chemistry**. 6 ed. United States: Pearson Prentice Hall, 2010. 1263 p.

BRUNO, P. et al. Determination of nutrients in the presence of high chloride concentrations by column-switching ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1003, p. 133-141, 2003.

BRUZZONITI, M. C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C. Carboxylic acids: prediction of retention data from chromatographic and electrophoretic behaviours. **Journal of Chromatography B**, v. 717, p. 3-25, 1998.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia líquida** – Novas tendências e aplicações. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 374 p.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. **Fundamentals and single component calibration** (IUPAC Recommendations 1998). v. 70, p. 993-1014, 1998.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados**. 1ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 282 p.

FISCHER, K. Environmental analysis of aliphatic carboxylic acids by ion-exclusion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 157-173, 2002.

FISHER, J. B. Distribution and occurrence of aliphatic acid anions in deep subsurface waters. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, v. 51, p. 2459-2468, 1987.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. **Ion chromatography**. 4 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2009. 377 p.

FRITZ, J. S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 137-166, 2000.

GARY, J. H.; HANDWERK, G. E.; KAISER, M. J. **Petroleum Refining: Technology and Economics**. 5 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 465 p.

HADDAD, P. R. Sample cleanup methods for ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 482, p. 267-278, 1989.

HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E. **Ion chromatography principles and applications**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1990. 776 p.

HADDAD, P. R.; NESTERENKO, P. N.; BUCHBERGER, W. Recent developments and emerging directions in ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 456-473, 2008.

HAJOS, P.; NAGY, L. Retention behaviours and separation of carboxylic acids by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 717, p. 27-38, 1998.

HATSIS, P.; LUCY, C. A. Effect of temperature on retention and selectivity in ion chromatography of anions. **Journal of Chromatography A**, v. 920, p. 3 - 11, 2001.

HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; BARROW, M. P. Mass spectrometric characterization of naphthenic acids in environmental samples: A review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 121-134, 2009.

HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R.; SKOOG, D. A. **Princípios Análise Instrumental**. 6 ed. Brasil: Bookman, 2009. 1056 p.

HUANG, Y. et al. Simplified column-switching technology for the determination of traces of anions in the presence of high concentrations of other anions. **Journal of Chromatography A**, v. 884, p. 53-59, 2000.

HUTIN, A.; ARGILLIER, J. F.; LANGEVIN, D. Mass Transfer between Crude Oil and Water. Part 1: Effect of Oil Components. **Energy & Fuels**, v. 28, p. 7331-7336, 2014.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline**: London. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METODOLOGIAS, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre a validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE**: Rio de Janeiro, 2018.

KADNAR, R.; RIEDER, J. Determination of anions in oil-field waters by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 706, p. 301-305, 1995.

KIHARA, K.; ROKUSHIKA, S.; HATANO, H. Elution behavior of aliphatic carboxylic acids on a strong cation-exchange resin column. **Journal of Chromatography A**, v. 410, p. 103-110, 1987.

KOKAL, S. Crude-oil emulsions: A state-of-the-art review. **Spe Production & Facilities**, v. 20, p. 5-13, 2005.

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 685-699, 2009.

KUBICA, P. et al. Sensitive simultaneous determination of 19 fluorobenzoic acids in saline waters by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1417, p. 30-40, 2015.

LANCAS, F. Efeitos de temperatura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 7-13, 2012.

LANG, S. Q. et al. Elevated concentrations of formate, acetate and dissolved organic carbon found at the Lost City hydrothermal field. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, v. 74, p. 941-952, 2010.

LEE, R. F. Agents which promote and stabilize water-in-oil emulsions. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 5, p. 117-126, 1999.

LESTER, Y. et al. Characterization of hydraulic fracturing flowback water in Colorado: Implications for water treatment. **Science of the Total Environment**, v. 512, p. 637-644, 2015.

LOPEZ-RUIZ, B. Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 607-627, 2000.

LU, H. T.; MOU, S. F.; RIVIELLO, J. M. Effects of high concentration of chloride on the determination of trace anions by ion chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, p. 2181-2193, 2000.

KARU, N.; DICINOSKI, G. W.; HADDAD, P. R. Use of suppressors for signal enhancement of weakly-acidic analytes in ion chromatography with universal detection methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 40, p. 119-132, 2012.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. **Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics**. 2 ed. Eurachem, 2014. 62 p.

MASCOLO, G. et al. Ion chromatography-electrospray mass spectrometry for the identification of low-molecular-weight organic acids during the 2,4-dichlorophenol degradation. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 191-196, 2005.

MEREDITH, W.; KELLAND, S. J.; JONES, D. M. J. O. G. Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 1059-1073, 2000.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons. 2004. 357 p.

MILLER, M.; SCHNUTE, W. **Direct determination of small organic acids in sea water by IC-MS** (Application Note 1000). San Jose, USA: Thermo Fisher Scientific, 2016.

MORRIS, J.; FRITZ, J. S. Eluent modifiers for the liquid-chromatographic separation of carboxylic-acids using conductivity detection. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 2390-2396, 1994.

MULLER, K.; SEUBERT, A. Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in tap and reservoir water using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1260, p. 9-15, 2012a.

MULLER, K.; SEUBERT, A. Separation and determination of fluorobenzoic acids using ion chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 96-103, 2012b.

NETO, A. J. S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida- Parte 2. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 7, 2009.

NETO, A. J. S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida- Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 61-67, 2010.

NETO, B. D. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v. 25, p. 856-865, 2002.

NEUE, U., D. **HPLC columns** - Theory, Technology, and Practice. 1 ed. New York: Wiley-VCH, 1997. 392 p.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 600 p.

PETROBRÁS. Pré-Sal. 2014. Disponível em:<<https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/pre-sal>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2020.

PITTMAN, E. D.; LEWAN, M. D. **Organic acids in geological processes**. 1 ed. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 1994. 482 p.

POHL, C. Recent developments in ion-exchange columns for ion chromatography. In: **Advances in Ion Chromatography**, Thermo Fisher Scientific, v.31, p. 8-15, 2013.

POOLE, C. F. **The essence of chromatography**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier. 2003. 925 p.

RABIN, S. et al. New membrane-based electrolytic suppressor device for suppressed conductivity detection in ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 640, p. 97-109, 1993.

RIBEIRO, F. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, 2008.

SAKUGAWA, H.; KAPLAN, I. R.; SHEPARD, L. S. Measurements of H₂O₂, aldehydes and organic-acids in los-angeles rainwater - their sources and deposition rates. **Atmospheric Environment -Part B. Urban Atmosphere**, v. 27, p. 203-219, 1993.

SEEWALD, J. S. Organic-inorganic interactions in petroleum-producing sedimentary basins. **Nature**, v. 426, p. 327-333, 2003.

SERJEANT, E.; DEMPSEY, B. **Ionizations constants of organic acids in aqueous solution**. 1ed. New York: Pergamon Press, 1979. 989 p.

SIMANZHENKOV, V.; IDEM, R. **Crude oil chemistry**. 1 ed. New York: Marcel Dekker, 2003. 402 p.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 1997. 745 p.

SPEIGHT, J. G. **Handbook of petroleum analysis**. 1 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2001. 454 p.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**. 5. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 953 p.

STRASSNER, J. E. Effect of ph on interfacial films and stability of crude oil-water emulsions. **Journal of Petroleum Technology**, v. 20, n. 3, p. 303-312, 1968.

STRINGER, R. **Electrophoresis**. in WORSFOLD, P. J.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. F. (Editores). Encyclopedia of Analytical Science. 2 ed. 2005. p. 356-363.

STRONG, D. L.; JOUNG, C. U.; DASGUPTA, P. K. Electrodialytic eluent generation and suppression - ultralow background conductance suppressed anion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 546, p. 159-173, 1991.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Product manual for eluent generator cartridges Dionex EGC 500 KOH**. San Jose, USA. 2013

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Product manual for Dionex IonPac NS1 analytical column**. San Jose, USA. 2017a.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Product manual for Dionex IonPac ICE-AS1 analytical column**. San Jose, CA, USA. 2017b.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Product manual for Dionex IonPac AS11-HC analytical column**. San Jose, USA. 2017c.

THOMAS, J. E. (organizador). Fundamentos de Engenharia de Petróleo. 2. ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 271 p.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **Chromatography** - 621. 35 ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2012. 2879 p

VAFAJOO, L.; GANJIAN, K.; FATTAHI, M. Influence of key parameters on crude oil desalting: An experimental and theoretical study. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 90-91, p. 107-111, 2012.

VARONKA, M. S. et al. Organic compounds in produced waters from the Bakken Formation and Three Forks Formation in the Williston Basin, North Dakota. **Heliyon**, v. 6, p. 8, 2020.

VIEHWEGER, C. (editor) et al. Monografia: Práticas de cromatografia de íons. 2. ed. Metrohm, Herisau, Suíça. 2006.

WEISS, J. Handbook of ion chromatography. 3.ed. Idstein: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2004. 894 p.

XU, N. et al. Ion-exclusion chromatographic determination of carboxylic acids used to support the microbially mediated reductive dechlorination of tetrachloroethene. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 2242-2248, 1997.

ZAKARIA, P. et al. Determination of bromate in sea water using multi-dimensional matrix-elimination ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 9080-9085, 2011.

ZHANG, L. et al. Effect of different acidic fractions in crude oil on dynamic interfacial tensions in surfactant/alkali/model oil systems. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 41, p. 189-198, 2004.

ZHONG, Y. Y. et al. Novel additives for the separation of organic acids by ion-pair chromatography. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 453-456, 2010.