



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RAPHAEL SEITI MIURA MONFORTE

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DO $\delta^{15}\text{N}$ DO ÍON NITRATO
EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL**

Orientadora: Prof. Dra. Poliana Dutra Maia

Co-orientadora: Prof. Dra. Valéria Regina Bellotto

Brasília - DF

Março/ 2014

RAPHAEL SEITI MIURA MONFORTE

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DO $\delta^{15}\text{N}$ DO ÍON NITRATO
EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Poliana Dutra Maia

Co-orientadora: Prof. Dra. Valéria Regina Bellotto

Brasília - DF

Março/ 2014



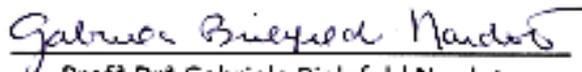
Universidade de Brasília – Instituto de Química

COMUNICADO

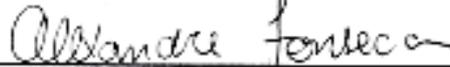
Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Raphael Seiti Miura Monforte**, matrícula nº **11/0165110**, intitulada *“Adaptação do Método de Determinação do $\delta^{15}N$ do Íon Nitrato em Amostras de Água Superficial”*, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 20 de março de 2014.



Profª Drª Poliana Dutra Mala
Presidente de Banca (IQ/UnB)



Profª Drª Gabriela Bielefeld Nardoto
Membro Titular (FUP / UnB)



Profª Dr. Alexandre Fonseca
Membro Titular (IQ/UnB)

Profª Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 20 de março de 2014.

FICHA CATALOGRÁFICA

Monforte, Raphael Seiti Miura

Adaptação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N}$ do íon nitrato em amostras de água superficial /Raphael Seiti Miura Monforte; Orientação: Poliana Dutra Maia. – Brasília, 2014. 86.

Dissertação de Mestrado (Ms) – Universidade de Brasília / Instituto de Química, 2014.

1. Nitrato 2. Águas superficiais 3. Razão isotópica 3. $\delta^{15}\text{N}$

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Monforte, R. S. M. **Adaptação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N}$ do íon nitrato em amostras de água superficial**. Instituto de Química, Universidade de Brasília-Brasília, 2014; 86p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Raphael Seiti Miura Monforte

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Adaptação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N}$ do íon nitrato em amostras de água superficial. GRAU: MESTRE. ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Raphael Seiti Miura Monforte

(61) 98436349

E-mail: raphaelmonforte@gmail.com

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Lis, pelo seu amor, compreensão e carinho, aos meus pais pelo seu inestimável apoio, e ao meu filho, Igor, pela alegria de todos os dias.

AGRADECIMENTO

Ao meu mestre da Vida, Dr. Daisaku Ikeda, pelos maravilhosos incentivos que possibilitaram o término desta Dissertação de Mestrado.

Aos meus pais pelo carinho, dedicação, apoio em todos os momentos cruciais de minha vida.

Ao meu amor, Lis, pela sua benevolência, amor e incentivos. Obrigado por me incentivar sempre.

Ao meu filho Igor, por me trazer alegria e persistência necessária para continuar e lhe garantir um futuro melhor.

A minha sogra e sogro, Dona Cida e Sr. Juarez, e meus cunhados pelo incentivo e pela ajuda nas horas difíceis.

A minha orientadora, Prof. Dra. Poliana Dutra Maia, pela sua humanidade e esplêndida compreensão e experiências compartilhadas e pelo esforço dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dra. Valéria Regina Bellotto pela, sua inestimável ajuda, apoio e por viabilizar a utilização das dependências do Laboratório AQQUA IQ/UnB.

Aos professores Jez, Alexandre, Ana Cristi e Fernanda pela ajuda e palavras trocadas em todos os momentos.

Ao professor Fernando Sodré, por ceder-me o seu sistema extrator, alma do trabalho aqui realizado.

Ao professor Roberto do Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB, pelas inestimáveis contribuições para com esse trabalho.

Aos amigos do AQQUA em especial João, Rafael, Tati, Daniel, Carla, Gabi, Lorena, Rosy, Lilian, Everaldo, Joyce, Nancy, Arthur e aos agregado Douglas, Tony.

Aos amigos Rachel, Eduardo, Ge e Mansine pela ajuda, incentivo e atenção de todos os momentos e, também, com a ajuda na instrumentação dos equipamentos do Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB.

Aos meus amigos do NdO de Brasília, da DUni, do Grupo Gajokai, todos da Soka Gakkai por nunca terem me deixado falhar.

Ao meu avô, Sr. Hitoshi Miura, exemplo de esforço e persistência, como primeiro neto a terminar um Curso de Mestrado.

A Dra. Michelle Vilela pelos incentivos e inestimável ajudas na forma desse trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Geocronologia IG/UnB pelo uso dos equipamentos e estrutura.

Ao Instituto de Química da UnB pela oportunidade e pela estrutura.

“Não existem budas que ficam sofrendo eternamente na pobreza. Também não existem budas cruéis ou malvados como não existem budas fracos ou derrotados na vida. Buda é um outro nome para uma pessoa que está determinada a vencer não importa o que aconteça.”

Daisaku Ikeda

RESUMO

O monitoramento da concentração de nitrato (NO_3^-) e a identificação de suas fontes naturais e antrópicas em ambientes aquáticos é fundamental para assegurar a qualidade da água devido ao risco de saúde que esse íon pode representar para a população. A utilização do isótopo estável de N por meio da razão isotópica $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ é uma ferramenta importante para estudar as diferentes fontes de NO_3^- nos mananciais. No Brasil, esse tipo de análise em amostras de água ainda é incipiente, de forma que esse trabalho tem o objetivo de testar a metodologia de análise das variações isotópicas de N ($^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$) em NO_3^- provenientes de amostras de água superficiais naturais. As amostras de água foram coletadas em mananciais superficiais do Distrito Federal e no lago Paranoá em julho de 2013. Os parâmetros físico-químicos foram determinados no ato da coleta, e, depois de preparadas, as amostras foram submetidas à análise das variações isotópicas de nitrogênio em NO_3^- através de uma pré-concentração do analito por extração em fase sólida, seguido de eluição do cartucho, neutralização do eluido com Ag_2O , liofilização e medição do $\delta^{15}\text{N}$ como AgNO_3 (s) em um espectrômetro de massa de razão isotópica com fluxo contínuo. Esse procedimento também foi realizado para amostras padrões, como testemunhas. As soluções padrões foram preparadas nas concentrações 88,53, 44,27, 4,88, 4,43, 2,44 e 1,22 $\text{mg-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, a partir do sal de KNO_3 ($\delta = -4,20 \pm 0,069\text{‰}$) e tiveram uma recuperação variando 74,49 a 115,58%. A variação do $\delta^{15}\text{N}$ para as amostras padrões de concentração 4,43, 2,44 e 1,22 $\text{mg-NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ foi de -3,02 a -2,30‰, apresentando um fracionamento de cerca de 1‰ quando comparado com o valor de $\delta^{15}\text{N}$ do KNO_3 (s) ($\delta = -4,199 \pm 0,069\text{‰}$). Esse fracionamento é proveniente do método, principalmente, durante as etapas de pré-concentração e eluição do analito com HCl 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Nas amostras naturais, esse fracionamento isotópico não interferiu significativamente na interpretação das assinaturas isotópicas e apresentou $\delta^{15}\text{N}$ variando de 10,14 a 14,35‰. Assim, a sequência analítica para a determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em água se mostrou adequada e bastante interessante, pois foi possível quantificar $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras naturais com baixas concentrações desse íon (6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Palavras-chave: Nitrato, águas superficiais, razão isotópica, $\delta^{15}\text{N}$

ABSTRACT

The monitoring of the concentration of nitrate (NO_3^-) and identification of its natural and anthropogenic sources in aquatic environments is fundamental to ensuring the quality of water due to health risk that this ion can represent to the population. The use of N stable isotope by isotope ratio $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ is an important tool for studying the different sources of NO_3^- in springs. In Brazil, this type of analysis in water samples is still in its infancy, so this work aims to test the methodology to analyze the isotopic variations of N ($^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$) in NO_3^- from samples of natural surface water. Water samples were collected from surface springs of the Federal District and Lake Paranoá in July 2013. Physicochemical parameters were determined at the time of collection, and, after preparation, the samples were subjected to analysis of isotopic variations of Nitrogen from NO_3^- by pre-concentration of the analyte in a solid phase extraction followed by elution of the cartridge, neutralizing the eluate with Ag_2O , lyophilization and measurement of $\delta^{15}\text{N}$ as AgNO_3 (s) on a mass spectrometer with continuous flow isotope ratio. This procedure was also performed for samples patterns as witnesses. The standard solutions were prepared at concentrations of 88.53, 44.27, 4.88, 4.43, 2.44, and 1.22 $\text{mg-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ from the salt of KNO_3 ($\delta = -4.20 \pm 0.07 \text{ ‰}$) and had a recovery ranging from 74.49 to 115.58 %. The variation of $\delta^{15}\text{N}$ patterns for samples concentration at 4.43, 2.44, and 1.22 $\text{mg-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ was from -3.02 to -2.30 ‰, with a fractionation of about 1 ‰ when compared to the value of $\delta^{15}\text{N}$ of KNO_3 (s) ($\delta = -4.199$ to $0.069 \pm \text{‰}$). This is derived from the fractionation method, especially during the stages of pre-concentration and elution of the analyte with HCl 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In the natural samples, the isotopic fractionation from the method did not significantly interfere in the interpretation of isotopic signatures and presented $\delta^{15}\text{N}$ ranging from 10.14 to 14.35 ‰. Thus, the analytical result for determining the $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ in water was adequate and quite interesting, since it was possible to quantify $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ in natural samples with low concentration of this ion (6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Keywords: Nitrate, surface water, isotope ratios, $\delta^{15}\text{N}$

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. O ciclo do nitrogênio e implicações atuais	5
3.2. Principais compostos de nitrogênio	8
3.3. Fundamentação técnica dos isótopos estáveis.....	10
3.4. Fontes de nitrato a partir da composição isotópica do $\delta^{15}\text{N}$	12
3.5. Quantificação do $\delta^{15}\text{N}$ em amostras de água.....	14
3.6. A Cromatografia Iônica na quantificação da concentração do NO_3^- em solução aquosa.....	17
3.7. Figuras de mérito necessário para validar a análise de cromatografia	18
3.8. Trabalhos realizados com análise de isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ em água	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Principais adaptações do método de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de água superficiais.....	22
4.1.1. <i>Preparação da coluna de pré-concentração do NO_3^-</i>	24
4.1.2. <i>Pré-concentração e extração do NO_3^- na coluna</i>	26
4.1.3. <i>Eluição e neutralização do NO_3^-</i>	28
4.1.4. <i>Liofilização do nitrato de prata (AgNO_3 (aq))</i>	29
4.2. Quantificação da concentração do NO_3^- em solução aquosa.....	30
4.2.1. <i>Cromatografia Iônica e Figuras de Mérito</i>	32
4.3. Quantificação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas soluções padrões	32
4.4. Métodos analíticos e Figuras de mérito.....	34
4.5. Aplicação da metodologia de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de águas naturais superficiais.....	35
4.5.1. <i>Amostragem</i>	35
4.5.2. <i>Determinação dos parâmetros físico-químicos</i>	38
4.5.3. <i>Acondicionamento e pré-tratamento das amostras</i>	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Confecção dos cartuchos de pré-concentração.....	40
5.2. Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica – Figuras de Mérito	40

5.3.	AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DO $\delta^{15}\text{N}$	42
5.4.	VALORES DE $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES DE KNO_3	46
5.5.	Variações dos parâmetros físico-químicos nos mananciais superficiais do Distrito Federal	49
5.5.1.	<i>Parâmetros Físico-Químicos</i>	50
5.5.2.	<i>Determinação dos Ânions</i>	52
5.6.	Determinação da $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas águas superficiais dos mananciais do Distrito federal	55
6.	CONCLUSÕES	60
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAN	Bananal
CDV	Cabeça de Veado
CI	Cromatografia Iônica
Cond.	Condutividade elétrica
D.P	Desvio Padrão
EA	Elemental analyzer
EDB	Ermida Dom Bosco
EMRI	Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica
FLT	Faixa linear de trabalho
FUM	Fumal
GAM	Gama
IRMS	<i>Isotopic Ratio Mass Spectrometert</i>
LD	Limite de detecção
MDA	Mestre D'Armas
NO₃⁻	Nitrato
O.D	Oxigênio dissolvido
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i>
PB	Ponte do Bragueto
RF	Riacho Fundo
SOB	Sobradinho
TOR	Torto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Abundância, padrão internacional e razão do padrão internacional, R, para os principais isótopos de nitrogênio (modificado de Fry, 2006)	11
Tabela 2 - Soluções padrões de KNO ₃ utilizadas para os testes de pré-concentração e eluição.	26
Tabela 3 - Figuras de méritos para a determinação de F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ e SO ₄ ²⁻ utilizando a cromatografia de íons.	32
Tabela 4 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta e volume amostrado.....	37
Tabela 5 - Recuperação de NO ₃ ⁻ pré-concentrado em função dos volumes e das concentrações mínimas necessárias para a quantificação do razão isotópica ¹⁴ N/ ¹⁵ N das soluções utilizadas para pré-concentrações.....	45
Tabela 6 - Recuperação de NO ₃ ⁻ em função dos volumes e das concentrações das soluções utilizadas para pré-concentrações.	45
Tabela 7 - δ ¹⁵ N tabelados e medidos no Espectrômetro de massa de Razão Isotópica do Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB das amostras certificadas e do sal KNO ₃ utilizado para o preparo das soluções padrões.....	46
Tabela 8 – Valores de δ ¹⁵ N-NO ₃ ⁻ em ‰ nas amostras de KNO ₃ em quatro ensaios diferentes. :	48
Tabela 9 - Valores de δ ¹⁵ N (‰) nas amostras de KNO ₃ para volumes diferentes de eluente.....	49
Tabela 10-- Dados Físico-químicos das amostras naturais.....	50
Tabela 11 - Variação das concentrações dos ânions no periodo de seca (julho/2013) referente aos pontos de coleta de mananciais do Distrito Federal.....	54
Tabela 12 -- Variações isotópicas de amostras de águas naturais de mananciais do Distrito Federal coletadas no período de seca em julho de 2013.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos valores de razão isotópica do ^{15}N para diferentes amostras de diferentes lugares do mundo (adaptado de Xue <i>et al.</i> , 2009)	13
Figura 2 - Representação esquemática da separação de íons dentro da coluna cromatográfica cuja fase estacionária é um trocador aniônico.	18
Figura 3 - Esquema referente à elaboração da coluna de pré-concentração..	25
Figura 4 - Adaptação da coluna de pré-concentração para utilização do sistema de Sodré <i>et al.</i> (2010), sendo: a) cartucho de SPE reutilizado tipo Strata X sem resina e fritz; b) adaptador entre cartuchos construído a partir de um conector e mangueira de equipo de infusão; c) cartucho de pré-concentração confeccionado na Figura 3.	26
Figura 5 -Sistema utilizado para a pré-concentração de NO_3^- na coluna contendo a resina AG1 X8 sendo: a) sistema real utilizado com três extrações simultaneas; b) representação do sistema com uma extração.	28
Figura 6 -- Cromatógrafo de íon 881 Compact IC Pro (Metrohm)	30
Figura 7 - Componentes constituintes de um Cromatógrafo simples (adaptado de Monografia da Metrohm).....	31
Figura 8 - Diagrama esquemático do IRMS a) sistema Flash EA HT; b) Espectrometro de massa de Razão Isotópica. (adaptado de apresentação da Thermo Scientific ao Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB).	33
Figura 9 - Instrumentos utilizados para coletar amostra de água superficial: a) Garrafa de Van Dorn b) Balde Volumétrico..	35
Figura 10 - Localização espacial dos pontos de coleta das amostras de água coletadas durante o outubro de 2012 e julho de 2013.....	36
Figura 11 - Sistema de Filtração Sterifil – Marca: Milipore	39
Figura 12 - Linearidade baseada no aumento da razão de injeção $\text{N}_2:\text{He}$	41
Figura 13 - Valores tabelados de isótopo de nitrogênio versus valores medidos das amostras certificadas.	41
Figura 14 - a) cromatograma contendo os picos dos ânios analisados; b) cromatograma do branco do método sem o tempo de repouso após a neutralização com Ag_2O ; c) cromatograma do branco do método com o tempo de repouso após a neutralização com Ag_2O	43

Figura 15 - Eluição do NO_3^- do cartucho com HCl 3 mol.L ⁻¹ : a) solução padrão de 88,53 mg- NO_3^- .L ⁻¹ , b) solução padrão de 44,27 mg- NO_3^- .L ⁻¹ , a) solução padrão de 4,43 mg- NO_3^- .L ⁻¹	44
Figura 16 - Determinação do $\delta^{15}\text{N}$ – AgNO_3 (s) no procedimento completo (pré-concentração + eluição com HCl 3M + neutralização com Ag_2O + filtração + liofilização)	47
Figura 17 - Fracionamento do $\delta^{15}\text{N}$ da neutralização com o uso de Ag_2O (s). .	48
Figura 18 - Descrição geral da variação dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para principais fonte de nitrato (retirado de Kendall, 1998)	62

1. INTRODUÇÃO

O ciclo da água associado aos ciclos do carbono (C) e do nitrogênio (N) representam os principais processos na compreensão dos comportamentos biogeoquímicos terrestres e aquáticos (Galloway, *et al.* 2004; Lohse *et al.* 2010). Nos compartimentos aquáticos, superficiais e subterrâneos, observa-se o desequilíbrio do ciclo do N ocasionado pelo uso de corretivos agrícolas (adubação química e orgânica) e agrotóxicos (inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc), pela presença de esgotos tratados ou não tratados, pelo excesso de excremento de animais provenientes da expansão da pecuária e pelo aumento de óxidos de nitrogênio atmosférico (Aravena & Robertson 1998; Curt *et al.* 2004; Liu *et al.* 2006; Lohse *et al.* 2010).

Além disso, segundo Rockstrom e colaboradores (2009) existe uma tentativa de estabelecer valores de segurança para atividade antropogênica onde a humanidade pode operar para nove processos ambientais básicos como, mudanças climáticas, acidificação dos oceanos, esgotamento da camada de ozônio, limites máximo biogeoquímicos para os ciclos do nitrogênio e fósforo, uso global da água, mudanças no uso do solo, perda da biodiversidade, cargas de aerossóis atmosféricos e poluição química que, tendo os seus limites ultrapassados, podem ameaçar a sustentabilidade da Terra. Três desses processos ambientais apresentam seus limites de segurança ultrapassados sendo eles: mudanças climáticas, perda de biodiversidade e excesso de compostos reativos de nitrogênio no ambiente.

No que se refere ao desequilíbrio de N, as consequências são sentidas diariamente, tendo como um exemplo de consequência, o aumento das concentrações do íon nitrato (NO_3^-) em ambientes aquáticos, ocasionando a diminuição do oxigênio dissolvido (acarretando a mortandade dos organismos, inclusive peixes); a eutrofização (ocasionando a proliferação de algas que podem produzir toxinas) e a acidificação dos corpos d'água, tendo como consequência a diminuição da qualidade da água dos mananciais (Kendall 1998; Silva *et al.* 2000; Curt *et al.* 2004).

Segundo Garcia *et al.* (2010), a química do nitrogênio no ambiente provoca efeito em cascata, uma vez que sofre transformações químicas e transita entre vários compartimentos ambientais, e gerar vários problemas dentre eles: a formação de ozônio troposférico, principal poluente gasoso que afeta a saúde da população; a formação de peroxiacetilnitrato (PAN), devido a reação do gás NO₂ com moléculas orgânicas, composto tóxico que estabiliza e transporta o nitrogênio reativo para zonas rurais; a formação de ácido nítrico (HNO₃), a partir da reação de radicais OH com o NO₂, que pode retornar ao solo por processo de deposição seca ou úmida e vir a reagir com espécies básicas inertes presentes no solo, como Al₂O₃ ou PbO liberando espécies tóxicas aos vegetais (Al³⁺) ou ao homem (Pb²⁺); e várias outras que podem até causar efeitos na camada protetora do ozônio na estratosfera.

No que se refere ao uso da água para consumo humano, verifica-se que mananciais superficiais são utilizados como áreas de captação de água no Brasil. Nesse sentido, existe a necessidade de verificar a qualidade da água fornecida a população. Dessa forma, a concentração de NO₃⁻ na água representa ponto importante para identificar a possibilidade de consumo da mesma. Concentrações maiores que 10 mg-N/L, podem provocar riscos à saúde humana (Portaria MS nº 2.914/2011). Dentre os principais problemas de saúde relacionados aos valores elevados de NO₃⁻ destacam-se: a metemoglobinemia que ocorre quando a capacidade da hemoglobina de transportar oxigênio é bloqueada por nitritos, causada pela conversão de nitratos no estômago, causando privação de oxigênio e levando ao sufocamento (Harte *et al.*, 1991); câncer de estômago, devido a reação do nitrito com componentes orgânicos naturais e sintéticos produzindo compostos N-Nitroso, que são carcinogênicos; distúrbios reprodutivo (Car e Neary, 2008); e, além disso, evidências epidemiológicas apontam para risco à função tireoidiana, associados à ingestão de água com elevadas concentrações de nitrato (Van Maanen *et al.*, 1994). Atualmente, poucas agências de água adotam qualquer abordagem para diminuir os teores do componente N-Nitroso na água potável (ANA, 2011). No entanto, observando os efeitos nocivos que esse composto pode causar a humanidade, o monitoramento da concentração de NO₃⁻ e a identificação de fontes naturais e antrópicas de N em ambientes aquáticos é fundamental para assegurar a qualidade da água para abastecimento público.

Tradicionalmente os métodos para distinguir as principais fontes de nitrato nas águas requerem uma investigação do uso e ocupação do solo, bem como, um estudo das características hidrológicas e biológicas do manancial (Chang, et al 2002). Entretanto, esses resultados poderiam ser mais completos se contassem com uma outra ferramenta, o uso da geoquímica isotópica, como por exemplo, a utilização do isótopo estável de nitrogênio, por meio da razão isotópica $\delta^{15}\text{N}/\delta^{14}\text{N}$ (Heaton 1986; Kendall 1998; Silva *et al.* 2000; Curt *et al.* 2004; Petita *et al.* 2009; Lohse *et al.* 2010). Essa ferramenta oferece a oportunidade de conhecer as diferentes fontes de íon de nitrato a partir de suas concentrações. Assim, a partir dos valores de $\delta^{15}\text{N}$, é possível identificar se este é proveniente de fertilizantes sintéticos, ou se o N é proveniente de solos orgânicos (Kendall, 1998) ou se há presença de excrementos de origem humana ou animal (Rogers *et al.*, 2012) dentre outros. Esses valores irão depender diretamente de algumas características locais como, altitude (Rogers *et al.*, 2012), tipo de solo, vegetação e clima (Nardoto *et al.*, 2014) e interferências de origem antropogênicas como o despejo de esgoto humano e excrementos de animais que também está diretamente relacionado com o tipo de dieta encarada (Nardoto *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2012). Desse modo, foi verificado que os excrementos de origem animal apresentam variação do variaçãoisotópica, $\delta^{15}\text{N}$, diferente do encontrado para excremento de origem humana. Além disso, os valores para o $\delta^{15}\text{N}$ nos efluentes de aves, laticínios e porcos apresentaram diferenças significativas (Rogers *et al.*, 2012).

Diante do exposto, a geoquímica isotópica também pode fornecer informações sobre a identificação de contaminantes em ambientes aquáticos com possibilidade de traçabilidade da pluma de percolação. Essas informações são fundamentais para a elaboração de políticas públicas sobre a utilização e preservação de mananciais superficiais e subterrâneos que podem representar uma fonte de abastecimento público de água.

No Brasil, análises de $\delta^{15}\text{N}$ em amostras de água estão em crescimento. Atualmente, alguns laboratórios universitários vem implementando diversos métodos analíticos na determinação de diferentes composições isotópicas para a compreensão de processos geológicos, hidrogeológicos e hidrogeoquímicos. Traçadores isotópicos como o O, H e Sr para verificar interações entre as águas

pluviais, superficiais e subterrâneas estão sendo utilizados de forma inovadora nessas instituições.

2. OBJETIVOS

Os Objetivos deste trabalho foram:

- i. Adaptar o método analítico para a determinação do $\delta^{15}\text{N}$ proveniente do íon nitrato (NO_3^-) em amostras de águas superficiais;
- ii. Aplicar o método de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras naturais (mananciais superficiais do Distrito Federal e no lago Paranoá) com baixa concentração de nitrato.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

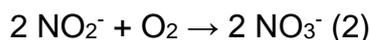
3.1. O ciclo do nitrogênio e implicações atuais

Na natureza observa-se a formação de vários compostos químicos contendo o elemento químico nitrogênio (N), pois o mesmo possui grande capacidade de fazer ligações químicas, com números de oxidação variando de (-3) a (+5) (Baird, 2002; Martins *et al.*, 2003).

Na atmosfera terrestre, o N é o elemento químico mais abundante contribuindo com aproximadamente 78% de sua composição. A molécula de N₂ é extremamente estável e quase não desempenha papel químico importante, exceto na termosfera (altitude maior que 90 km) onde pode ser fotolizada ou ionizada (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). Os constituintes minoritários, tais como óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂), ácido nítrico (HNO₃) e amônia (NH₃) são quimicamente reativos e podem influenciar na formação e precipitação ácida (chuva ácida), contribuindo para a poluição atmosférica (smog fotoquímico), aerossóis atmosféricos, com conseqüente depleção da camada de ozônio. Além disso, os óxidos de nitrogênio, NO e NO₂, são rapidamente interconversíveis e existem em equilíbrio dinâmico ($\text{NO}_x \rightleftharpoons \text{NO} + \text{NO}_2$) e, por conveniência, a soma das duas espécies é geralmente referida como NO_x. Portanto, a atmosfera é o principal reservatório de N₂, embora as plantas e animais não possam utilizar o N desta fonte diretamente. Assim, os animais necessitam do N associados aos compostos orgânicos (aminoácidos e proteínas), enquanto que plantas e algas utilizam esse N na forma do íon nitrato (NO₃⁻) ou íon amônio (NH₄⁺) (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003).

O ciclo do nitrogênio, é um dos mais importantes e complexos dos ciclos globais, pois descreve uma dinâmica entre as interfaces da atmosfera, solo e água (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). A fixação de nitrogênio consiste na transformação do N₂ da atmosfera em outros compostos de nitrogênio e pode ocorrer por diferentes processos, sendo eles: fixação biológica, fixação por meio de reação provocada por descargas de relâmpagos, quando o N₂ pode ser convertido em amônia e espécies oxidadas e fixação industrial de nitrogênio, como por exemplo a produção de amônia ou ácido nítrico.

Além disso, o nitrogênio também pode ser oxidado a nitritos (NO_2^-) ou nitratos (NO_3^-) por meio do processo de nitrificação, o qual é mediado por certas bactérias e pode ser resumido nas reações químicas 1 e 2. Os óxidos nítrico (NO) e nitroso (N_2O) são subprodutos destas reações, as quais também contribuem para a emissão destes gases para a atmosfera (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003).



As bactérias, plantas e algas convertem os compostos inorgânicos de nitrogênio a espécies orgânicas, tornando o nitrogênio disponível na cadeia alimentar. Nos animais, em processo de respiração celular, os compostos orgânicos são transformados, retornam ao solo como excremento (amônia ou íon amônio) e podem ser absorvidos por plantas. Quando os organismos morrem, certas bactérias são capazes de converter os compostos orgânicos contendo nitrogênio em nitrato, amônia ou, por uma série de reações químicas, em nitrogênio molecular, quando, então, retorna à atmosfera (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). O mesmo nitrogênio incorporado aos alimentos na forma de proteína, base da alimentação do homem, tem como destino final o ambiente, segundo a lei da conservação de massa (Garcia *et al.*, 2013). Assim, a maior parte do nitrogênio presente nos alimentos volta ao ambiente na forma de produtos resultantes da degradação biológica induzida na estação de tratamento esgoto ou por processos biogeoquímicos em corpos de água.

A importância do processo de fixação de nitrogênio vem sendo discutida há várias décadas. Crookes (1898) relatou que a fixação do nitrogênio era de vital importância para o progresso da humanidade civilizada e que a fixação do nitrogênio seria uma grande descoberta para os químicos. Esse discurso se baseava principalmente na necessidade de produção de fertilizantes, que na época era um grande problema global ameaçando o desenvolvimento da humanidade. Para a produção desses fertilizantes havia a necessidade do nitrogênio em sua forma reativa, escasso na época (Garcia *et al.*, 2013).

A necessidade de produção de fertilizantes, e de outros produtos químicos que necessitavam de nitrogênio reativo, cresceu muito e no final do século XIX, devido ao aumento expressivo da população mundial naquela época e a

necessidade de produção de alimentos em escala cada vez maiores para suprir a população. Era notório que existia algum fator que afetava o crescimento dos vegetais, dificultando a produção e produtividade. Nesse sentido, a comunidade científica se mobilizou para entender qual era o problema no solo que afetava os vegetais. A importância do nitrogênio para o desenvolvimento vegetativo então foi confirmada, sendo um passo importante para o estabelecimento das bases agroquímicas (Keeney *et al.*, 2008). A partir dessas descobertas, reconheceu-se a necessidade de repor o solo com nitrogênio após cada colheita. Essa reposição provinha de excrementos de animais e de salitre (NaNO_3 KNO_3) obtido de minas no deserto do Chile. No entanto, essas fontes não poderiam suprir toda a necessidade infinitamente. Assim, no século XX, a síntese e a produção comercial de amônia surgiu para resolver os problemas da necessidade de fertilizantes químicos (Garcia *et al.*, 2013).

Um paradoxo foi formado após aproximadamente um século do discurso de Crookes (1898). Enquanto na época a necessidade de nitrogênio reativo era a principal medida a ser tomada para o desenvolvimento da humanidade, Rockstrom *et al.* (2009) e Rockstrom (2009), com o intuito de estabelecer potenciais processos ambientais que podem comprometer a saúde do planeta, ressaltam que o excesso de nitrogênio reativo disperso no ambiente é colocado junto com dois outros processos ambientais, mudanças climáticas, perda de biodiversidade, que merecem atenção especial pelo alto potencial em interferir na capacidade do planeta de sustentar a vida humana nos próximos anos.

Nesse sentido, o entendimento do ciclo do nitrogênio e suas relações com o meio ambiente são importantes em todo o mundo. No que se refere a América Latina, Austin *et al.* (2013), observaram que existem muitos indicadores sociais na América Latina, de forma similar aos países desenvolvidos, tais como a urbanização descontrolada, a produção agrícola, a desigualdade social e a destruição de recursos naturais que são responsáveis pela alteração do ciclo do nitrogênio. Essas alterações estão relacionadas ao aumento da fixação de nitrogênio reativo total no planeta, que praticamente dobrou no último século tendo como consequência o aumento desordenado de N que afetam os solos, a atmosfera e os recursos hídricos em zonas temperadas (Galloway *et al.*, 2008). Além disso, o excesso de nitrogênio

originado de ações antropogênicas pode causar deficiência desse nutriente em outras regiões, como é o caso da utilização do salitre do Chile existente nos desertos da região que é transportado ao longo de toda América Latina.

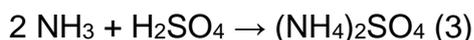
Além da prática de introdução de fertilizantes em áreas agrícolas, a queima de biomassa para preparar a terra para plantio é uma prática que transfere uma grande quantidade de nitrogênio reativo da terra para a atmosfera, que é depois redistribuído regionalmente (Trebs *et al.*, 2006). Em adição aos males da saúde que são causados com a queima de biomassa, estão os problemas causados com o retorno do nitrogênio reativo da atmosfera para os ecossistemas aquáticos e terrestres, via deposição úmida e seca (Austin *et al.*, 2013).

Outro ponto importante que é uma questão também paradoxal sobre a sustentabilidade ambiental, no que se refere a fixação de nitrogênio mundial, e também na América Latina, é a utilização de biocombustíveis os quais surgiram na tentativa de estimular a sustentabilidade ambiental, já que diminuiria a queima de combustíveis fósseis. No entanto, a produção de cana-de-açúcar teve um crescimento enorme no Brasil, aumentando o uso de corretivos e fertilizantes, sendo também causadora de aumento de fixação de nitrogênio reativo no ambiente. Segundo Garcia *et al.* (2013), estudos ainda precisam ser realizados para entender as vantagens reais do uso de biocombustíveis e de como esses devem ser produzidos para garantir a sustentabilidade do ambiente.

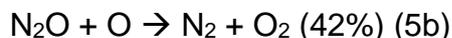
3.2. Principais compostos de nitrogênio

A amônia (NH_3), apesar de ter um tempo de degradação relativamente curto, de aproximadamente 10 dias, é o terceiro composto de nitrogênio mais abundante na atmosfera, ficando atrás apenas do N_2 e N_2O . A sua concentração é variável no espaço e no tempo, na faixa de 1-10 mL/m^3 . As suas principais fontes são a decomposição enzimática da uréia proveniente de urina e excremento de animais, emissão pelo solo, queima de biomassa e perdas durante a produção e aplicação de fertilizantes, que representam a emissão global de cerca de 104,5 Mt N/ano como amônia. Assim, o uso de fertilizantes inorgânicos e a produção de excremento, particularmente em áreas onde há concentração ou confinamento de animais, aceleram a emissão de amônia pelo solo, devido ao aumento das concentrações de

NH₃ e NH₄⁺. Além disso, a amônia é um gás naturalmente alcalino, sendo de grande importância na neutralização da chuva ácida na atmosfera (equação 3). A conversão para aerossóis, através da reação de amônia com H₂SO₄ e HNO₃, resulta, portanto, na formação de sulfatos e nitratos, sob forma de partículas, as quais são removidas do ar atmosférico por deposição seca ou úmida (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003).



O óxido nitroso (N₂O) tem um tempo de vida global na atmosfera de 130-150 anos, é considerado um gás estufa e é relativamente inerte na troposfera. Entretanto, configura-se na principal fonte de nitrogênio reativo na estratosfera. A remoção de N₂O da atmosfera ocorre primariamente através da fotólise (reação 4) e, em menor extensão, pela reação com oxigênio atômico na estratosfera (reação 5), que resulta na formação de NO e de N₂ e O₂. Através destas reações, o óxido nitroso contribui para a depleção da camada de ozônio. Além disso, esse óxido é liberado para a atmosfera do solo e da água, sendo os solos tropicais importantes fontes naturais deste gás. Várias fontes antrópicas contribuem com o aumento da concentração do N₂O atmosférico sendo elas: o uso de fertilizantes na agricultura (em maior escala), atividade industrial, queima de biomassa totalizando uma emissão global de cerca de 23,7 Mt N/ano como óxido nitroso (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003).



A grande concentração de óxido nítrico (NO) e outros óxidos de nitrogênio (NO_x) presentes na atmosfera resulta principalmente da queima de combustíveis fósseis, queima de biomassa e emissões pelo solo devido a processos biológicos (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). Outras fontes (*e.g.* descargas de relâmpago, oxidação de amônia e emissão por oceanos) contribuem, em menor escala, com o aumento da concentração de óxidos de nitrogênio na atmosfera. O conjunto destas fontes representa a emissão global de cerca de 64 MtN/ano como NO_x.

Os óxidos de nitrogênio têm um papel relevante na formação de ozônio na troposfera, que ocorre por uma sequência complexa de reações fotoquímicas, envolvendo, principalmente, dióxido de nitrogênio (NO_2), hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e luz solar (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). A fotólise do NO_2 é a principal rota conhecida na formação de ozônio na troposfera, o qual, na ausência de outras espécies oxidantes, converte o NO (óxido nítrico) a NO_2 , resultando num estado fotoquímico estacionário no qual a concentração de ozônio tende a se manter constante. Dessa forma, os óxidos de nitrogênio participam de uma série de reações que produzem ácido nítrico, contribuindo para o aumento da acidez da chuva (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003).

O ácido nítrico e nitratos presentes na troposfera são solubilizados na fase aquosa atmosférica (e.g. nuvens, chuva e neblina) e removidos da atmosfera em processo de deposição úmida (Baird 2002; Martins *et al.*, 2003). Outro exemplo de processo de remoção de óxidos de nitrogênio é a absorção por plantas. Neste, o óxido nítrico (NO) é consumido mais lentamente que o dióxido de nitrogênio (NO_2) e ácido nítrico (HNO_3).

3.3. Fundamentação técnica dos isótopos estáveis

Os isótopos são elementos químicos que ocupam a mesma posição na tabela periódica, no entanto, apresentam massas diferentes, mas, especificamente, números de nêutrons diferentes (Fry, 2006; Martinelli, *et al.*, 2009), sendo que os isótopos estáveis são aqueles que não emitem radiação, por emissão de energia ou partículas.

A abundância dos isótopos estáveis, geralmente, é inversamente proporcional a sua massa, ou seja, isótopos mais leves, com massa atômica menor, tem uma abundância maior (Martinelli, *et al.*, 2009). Além disso, por apresentarem massas atômicas diferentes, reagem de forma diferente devido à mudança de suas propriedades físicas, então, pode-se dizer que os isótopos mais pesados são “mais lentos” ou requerem uma energia maior para reagir quimicamente. Essa característica permite usá-los como traçadores ambientais, pois é possível verificar a variação da razão isotópica, conforme a mobilidade e/ou reatividade do elemento químico nos diferentes ecossistemas.

Nos isótopos estáveis a razão isotópica é expressa pela relação entre o isótopo mais raro e o isótopo mais abundante conforme a equação (6).

$$R = \frac{\text{Abundância do Isótopo mais raro}}{\text{Abundância do Isótopo mais abundante}} = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}} \quad (6)$$

Assim, uma mudança no valor de R, implica em uma mudança na razão de isótopos, leves e/ou pesados, e que, geralmente, está associado com algum fenômeno físico e/ou químico. Por exemplo, em uma reação química, a velocidade de reação é ligeiramente distinta para cada isótopo, pelo fato de possuírem massas diferentes, ou seja, as razões isotópicas do produto tender-se-ão para valores diferentes a do reagente. (Criss, 1999; Martinelli, *et al.*, 2009). Como as diferenças entre essas razões são pequenas e muito próximas, torna-se de difícil interpretação. Portanto, foi proposta a utilização de uma notação numérica que utilizasse a razão entre as Razões Isotópicas da amostra, R_{amostra} , e a razão de um padrão internacional, $R_{\text{padrão}}$ conforme explicitado na Tabela 1 a qual é representada pela letra grega δ em partes por mil. Assim, definiu-se a notação δ , expressa na equação (7).

$$\delta^{0/00} = \left(\frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (7)$$

Tabela 1- Abundância, padrão internacional e razão do padrão internacional, R, para os principais isótopos de nitrogênio (modificado de Fry, 2006)

Elemento químico	Isótopo	Abundância relativa(%)	Padrão internacional	$R_{\text{padrão}}$ (‰)
Nitrogênio	${}^{14}\text{N}$	99,635	Nitrogênio Atmosférico, N_2 (Ar)	${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} = 0,0036765$
	${}^{15}\text{N}$	0,365		

Os valores obtidos pela notação δ são consequências de reações físico-químicas e/ou biológicas que ocorrem na natureza e que alteram a razão isotópica do nitrogênio, denominado como fracionamento isotópico (Pereira, *et al.*, 2007; Martinelli, *et al.*, 2009). Isso ocorre porque as massas atômicas e as forças das ligações químicas são isotopicamente dependentes. Entretanto, isótopos de um mesmo elemento químico podem ter propriedades física e química ligeiramente

diferentes o que podem resultar em um fracionamento isotópico dependente da massa (Cravotta, 1997). Esse tipo de fracionamento é observado em baixas temperaturas e tendem a desaparecer com o aumento da temperatura (Kendall e Caldwell, 1998).

De fato, o fracionamento isotópico pode ser ocasionado por meio de:

- i) reações reversíveis de equilíbrio (Kendall, 1998) que, geralmente, estão associados às reações físico-químicas (Bohlke, 2003). Assim, durante as reações de equilíbrio, isótopos pesados, geralmente, se acumulam, preferencialmente, em espécies ou compostos químicos que apresentam elevado estado de oxidação (Kendall e Caldwell, 1998).
- ii) reações cinéticas unidirecional (irreversíveis) as quais favorecem a formação de produtos isotopicamente mais leves (Mariotti *et al.* 1981 *apud* Fenech *et al.*, 2012) e tem sido atribuído ao aumento da estabilidade das moléculas que contêm isótopos pesados, os quais precisam de maior energia de dissociação do que as moléculas que apresentam isótopos mais leves (Mariotti *et al.* 1981 *apud* Fenech *et al.*, 2012; Kendall e Caldwell, 1998). Fracionamentos cinéticos estão associados às reações bioquímica e físicoquímicas (Bohlke, 2003).

Assim, a extensão do fracionamento isotópico dependem da via de reação, da taxa de reação e das energias relativas das ligações obtidas no início e no final da reação (Kendall e Caldwell, 1998). Portanto, a composição isotópica de um elemento químico em um determinado corpo d'água reflete não somente a composição das fontes originais ou de misturas de diferentes fontes que apresentam diferentes composição isotópica, mas, também, pode indicar processos de fracionamento isotópico, durante o transporte e transformação química dos compostos (Cravotta, 1997; Kellman and Hillaire-Marcel, 1998; Nestler *et al.*, 2011).

3.4. Fontes de nitrato a partir da composição isotópica do $\delta^{15}N$

A ampla faixa de variação do número de oxidação para os compostos de nitrogênio de +5 (NO_3^-) a -3 (NH_4^+) proporciona ampla variação de sua composição

isotópica (Kendall, 1998) o que favorece na diferenciação das fontes de N. A composição do $\delta^{15}\text{N}$ para a maioria do material terrestre varia entre -10‰ e $+25\text{‰}$.

O íon nitrato é, relativamente, móvel devido à sua solubilidade e é a principal forma de nitrogênio dissolvido nos cursos d'água, à exceção de sistemas aquáticos fortemente reduzidos em que predomina a amônia (Ohte *et al.*, 2008).

Assim, o uso dos isótopos de N como traçador das principais fontes do íon nitrato tem sido utilizado em ambientes onde observa-se entrada de N a partir de diferentes fontes e também quando as quantidade de N podem ser mensuradas em um corpo d'água (Fenech *et al.*, 2012). Isso é possível porque os processos físicos, químicos e biológicos que controlam o ciclo do N atuam diferentemente para cada espécie química de N e, conseqüentemente, as diferentes fontes de N podem ser identificadas por meio de sua composição isotópica.

Desde 1970 a variação do $\delta^{15}\text{N}$ vem sendo utilizada para identificar fontes de nitrato sendo que um dos primeiros estudos utilizando essa metodologia data de 1971 (Kohl *et al.*, 1971), em trabalho realizado para verificar a contribuição de nitrogênio em fertilizantes nos Estados Unidos. Desde então, foi elaborado um quadro referencial, Figura 1, que determina, a partir dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ as várias fontes de N (Xue *et al.*, 2009).

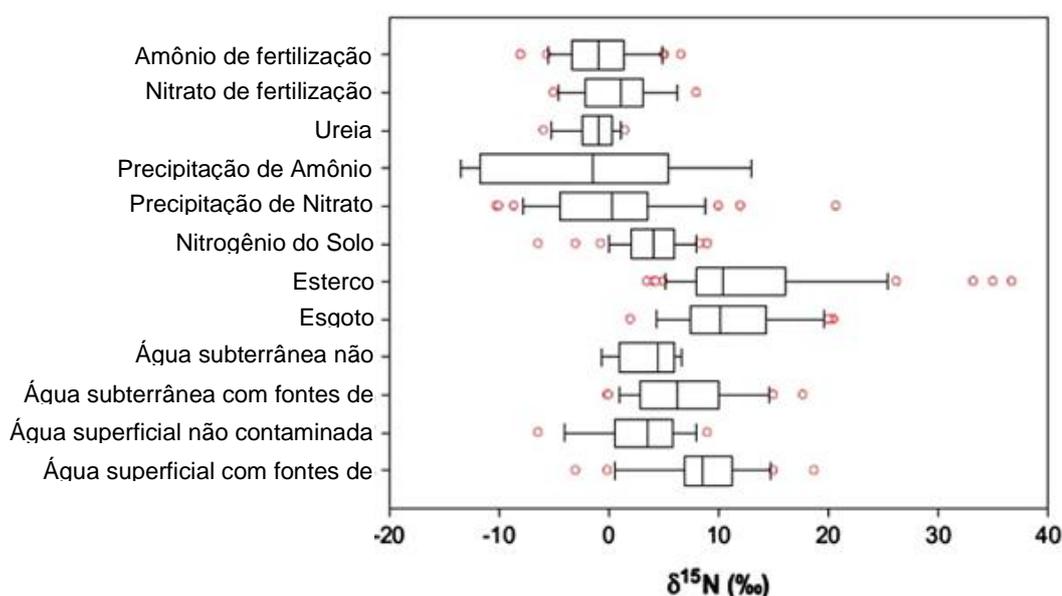


Figura 1 – Distribuição dos valores de razão isotópica do ^{15}N para diferentes amostras de diferentes lugares do mundo (adaptado de Xue *et al.*, 2009)

Alguns trabalhos, como o de Xue *et al.* (2009) mostram que, no tratamento de esgotos, em função do fracionamento isotópico, o processo de desnitrificação gera o gás N₂, o qual é isotopicamente empobrecido em $\delta^{15}\text{N}$ quando comparado com a composição desse isótopo proveniente do NO₃⁻. Portanto, NO₃⁻ residual proveniente desse processo apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais positivos, segundo Heaton (1986).

A partir do quadro gerado (Figura 1) por pesquisadores em várias regiões do mundo, é possível estimar a origem das fontes de nitrato em amostras de solo e água. Kendall (1998), por exemplo, em trabalho realizado nos Estados Unidos, encontrou valores de $\delta^{15}\text{N}$ variando de -1 a +2‰ para fertilizantes sintéticos e de +2 a +8‰ para N proveniente de solos orgânicos. Liu *et al.* (2006) observou que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ em resíduos de animais na Guiyang, China, foi aproximadamente $+7,0 \pm 3,2\%$. Já em amostras de esterco bovino os valores do $\delta^{15}\text{N}$ do NO₃⁻ variaram de +8 a +20‰, em solo (Heaton 1986; Kendall 1998). Nas águas de chuva, a espécie química de N dominante é a amônia (NH₄⁺) com valores aproximados do $\delta^{15}\text{N}$ de -12‰ (Xiao & Liu 2002). Já Rogers *et al.* (2012), trabalhando em regiões da França, com água potável, verificaram que nos excrementos de origem animal a variação do $\delta^{15}\text{N}$ foi entre +2,7 a +11,3‰ e de +4,4 a +5,9‰ para excremento de origem humana, enquanto que em efluentes próximo da criação de aves e laticínio os valores para o $\delta^{15}\text{N}_t$ foram, respectivamente, de +2,7‰, +4,4‰. Nos efluentes próximo da criação de porcos verificou-se uma variação entre +6,5 a 11,3‰. Nesse mesmo estudo, a concentração de nitrato e da razão isotópica do $\delta^{15}\text{N}$ analisadas em águas para consumo humano e em água de efluentes variaram, respectivamente, de 0,1 a 85,3 mg-N/L e de +1,2 a 14,2‰.

3.5. Quantificação do $\delta^{15}\text{N}$ em amostras de água

Para a quantificação do $\delta^{15}\text{N}$ em amostras de água é necessário ter uma massa mínima de N variando de 100 a 300 μmol para ser quantificado por um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS).

Atualmente, os principais métodos que vem sendo utilizados pela comunidade científica para quantificar $\delta^{15}\text{N}$ do nitrato oriundo de águas naturais são: (1) método envolvendo evaporação ou liofilização de amostras de filtradas (Silva *et al.*, 2000) ou (2) a conversão do nitrato para amônia utilizando a reação Kjeldahl, uma reação de

digestão com ácido sulfúrico, a qual é muito utilizado para uma grande variedade de substâncias, como carnes, alimentos grãos, águas residuais, amostras de solo e muitas outras, seguida de uma destilação com hidróxido de sódio para obtenção da amônia. As principais desvantagens são o transporte de grandes volumes de amostras para análise em laboratório, são necessários além da utilização da refrigeração, acidificação, ou adição de conservantes (HgCl_2). No entanto, são métodos que apresentam tempos de pré-tratamentos mais curtos.

Segundo Silva *et al.* (2000), existem diversos procedimentos que possibilitam a conversão da amônia, NH_3 , para nitrogênio gasoso, N_2 . Deste modo, pode-se realizar uma combustão direta do sal de amônio, ou pode-se realizar o processo de destilação do amônio seguido de um oxidação com uma solução de hipobromito e purificação utilizando um forno de Cu/CuO para obtenção do N_2 , ou, pode-se realizar a destilação continuado pela coleta do amônio através de uma zeólita específica e combustão ou, ainda, mais recentemente pode-se utilizar bactérias desnitrificadoras para o pré-tratamento da amostra ou, pré-concetação em uma resina de troca aniônica (Silva *et al.*, 2000 e Xing *et al.* 2011).

Contudo, cada abordagem apresenta vantagens e desvantagens. Assim, quando realizado a combustão direta do sal de amônio, por exemplo, observam-se desvantagens, como o transporte de grandes volumes de amostras para análise em laboratório e a utilização de agentes com alta toxicidade, como os preservantes. No entanto, esse é um dos métodos que apresenta tempo de pré-tratamento mais curto. No que se refere aos métodos que utilizam destilação continuada pela coleta do amônio através de uma zeólita específica e combustão, ou ainda a abordagem que utiliza bactérias desnitrificadoras, estes apresentam as vantagens de evitar o transporte de grandes volumes de amostra, além da vantagem de preparação dos isótopos de nitrogênio e oxigênio simultaneamente (Xing & Liu, 2011).

O método da resina de troca aniônica proposto por Silva *et al.* (2000) foi adotado em diversas pesquisas cuja finalidade era de identificar fontes de nitrato e processos de desnitrificação (Xing *et al.*, 2011). O método consiste na pré-concentração do nitrato em um cartucho contendo da resina de troca aniônica, seguido de liofilização e medição da razão isotópica. Contudo, exige um trabalho intenso (3-5 dias para o pré-tratamento da amostra) e altas concentrações de íons e

matéria orgânica dissolvida podem interferir na análise, além do Ag_2O ser um componente que eleva os custos da análise, aproximadamente 60 euros por amostra (Xing *et al.*, 2011).

Outra técnica de preparação de amostra para determinação de $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ e $\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3^-$ é chamado de método de desnitrificação bacteriana (Sigman *et al.*, 2001; Casciotti *et al.*, 2002; Rock and Ellert, 2007). Esse método permite a determinação simultânea de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de N_2O produzido pela conversão de NO_3^- por meio de bactérias desnitrificantes que naturalmente faltam na atividade de N_2O redutase. As vantagens desse método são: menor tempo para preparação de amostras, de 2-3 dias, menor custo (aproximadamente 5 euros por amostra), a técnica requer amostras de menor tamanho e o método tem níveis altos de sensibilidade. No entanto, apresentam algumas desvantagens, tais como: o crescimento bacteriano demora de 10 a 12 dias, as culturas de bactéria são potencialmente afetadas pela toxidez das amostras, dentre outras.

Além dos dois métodos apresentados, McIlvin & Altabet (2005), publicaram uma outra metodologia com o nome de “Método de redução de Cádmio”, que primeiramente converte NO_3^- em NO_2^- , utilizando a redução de cádmio, seguido por uma subsequente redução de N_2O , com azida de sódio. O resultado de N_2O é depois analisado para $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$, da mesma maneira que é realizada no método de desnitrificação. Dentre as vantagens desse método estão: a preparação toma menos tempo e trabalho, aproximadamente um dia; método com menor custo, visto que o cádmio pode ser reutilizado; pode ser realizado em baixas concentrações e amostras com volumes menores; não se observa interferências com altas concentrações e substâncias tóxicas. As principais desvantagens são: medidas de proteção de saúde e para o meio ambiente precisam ser tomadas devido a utilização de cádmio, azida de sódio e HN_3 ; os resultados precisam ser corrigidos para troca de oxigênio e fracionamento. Esse método é muito novo, e segundo Xue *et al.* (2009), precisa da realização de outros trabalhos para confirmar a viabilidade e confiabilidade.

No entanto, ainda são poucos os métodos existentes para análises de NO_3^- para $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em água. Nesse sentido, segundo (Xue *et al.*, 2009), existe a necessidade de maiores esforços por parte da comunidade científica para identificar

metodologias precisas e com menores custos para melhorar a identificação de fontes contaminantes de NO_3^- em água.

3.6. A Cromatografia Iônica na quantificação da concentração do NO_3^- em solução aquosa

A cromatografia iônica é um método físico-químico de separação de dois ou mais íons, como por exemplo F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , pela diferença existente entre seus graus de afinidade eletrostáticas pela fase estacionária (Figura 2), uma fase altamente carregada com sítios trocadores de íons.

Como é baseada em um mecanismo de adsorção reversível, os principais fatores que permitem controlá-la são o pH, possibilitando uma maior ou menor interação entre os analitos e os sítios de adsorção, e a força iônica, a qual está diretamente relacionada a concentração do íon na solução.

Os critério de seleção para adsorção dos íons depende muito das condições de operação da coluna mas podem ser destacados os seguintes aspectos:

- i. Íons com cargas elevadas são ligados mais fortemente ao trocador do que íons de carga mais baixa, para as mesmas concentrações, ou seja, a mobilidade desses íons de carga maior estará mais restrito, uma vez que a força de atração por eles é maior;
- ii. Íons com as mesmas cargas, porém com diferentes tamanhos em solução, têm graus de afinidades diferentes, ou seja, um íon menor concentra mais a carga tornando-o preferível.

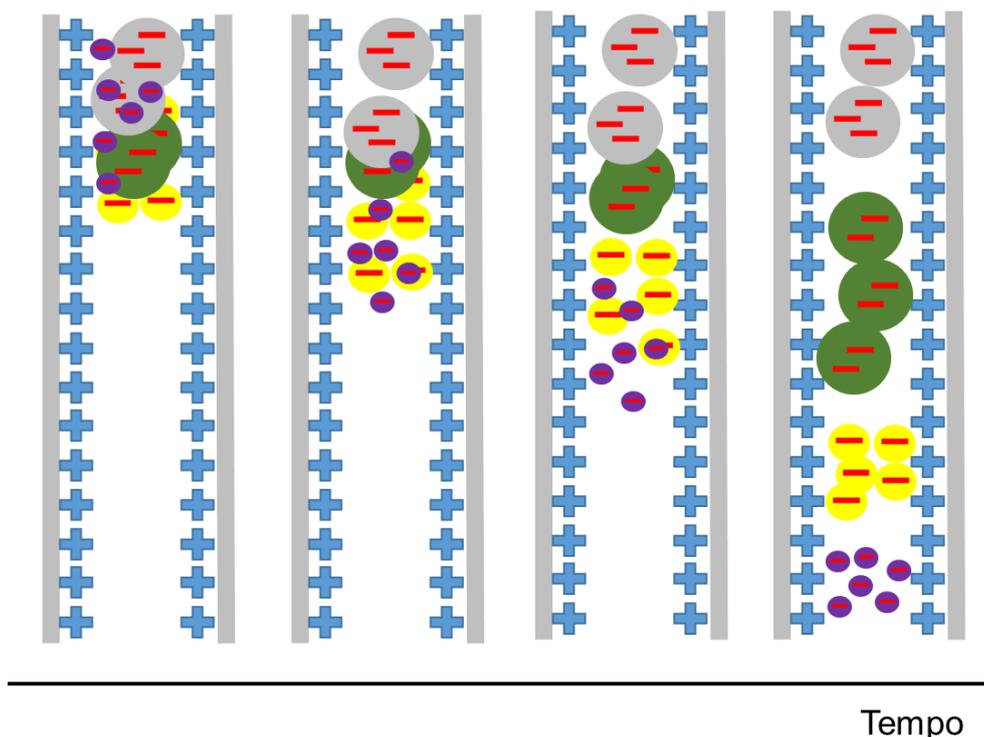


Figura 2 - Representação esquemática da separação de íons dentro da coluna cromatográfica cuja fase estacionária é um trocador aniônico.

Esta técnica analítica foi utilizada para realizar os testes de recuperação do NO_3^- proveniente da pré-concentração de amostras padrões de KNO_3 , com a finalidade de assegurar uma massa mínima do analito liofilizado para medição de razão isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

3.7. Figuras de mérito necessário para validar a análise de cromatografia

Segundo Ribani *et al.* (2004), as medições químicas necessitam de qualidade através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, já que dados analíticos não confiáveis ou resultados distorcidos podem conduzir a problemas nas decisões e prejuízos financeiros consideráveis. Observa-se a necessidade de validação, sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido, para averiguar se o método apresenta uma performance adequada para as condições nas quais serão aplicados. Essa validação pressupõe que o método atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais.

Através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito é possível realizar a validação de um procedimento analítico. Dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito, esses parâmetros podem variar. São os órgãos de fiscalização que geralmente estabelecem a maneira pela qual essas figuras de mérito devem ser determinadas. As principais figuras de mérito são: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, intervalos de confiança, teste para erros sistemáticos, extensão da faixa de trabalho ou faixa linear dinâmica (Valderrama *et al.*, 2009).

3.8. Trabalhos realizados com análise de isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ em água

Segundo Chang *et al.* (2002), os métodos para distinguir fontes de contaminação por nitrato requerem a investigação do uso e ocupação da terra e o estudo do caráter hidrológico das regiões contaminadas. No entanto, resultados obtidos dessa maneira são imprecisos. Nesse sentido, o isótopo de nitrogênio representa um fator importante na procura de contaminação na hidrosfera. Assim, muitos estudos utilizam análise deste isótopo para entender as fontes e os ciclos de nitrato na água (Lee, *et al.*, 2008).

Rogers *et al.* (2012), em trabalho realizado para identificar a altitude correspondente ao tipo de fonte de nitrogênio em água potável na França, utilizando a técnica isotópica, observaram que, baseados somente nos valores de $\delta^{15}\text{N}$, não foi possível distinguir se a contaminação de cada amostra teria como fonte atividades humanas ou animais. No entanto, utilizando a técnica de onde são determinados os isótopos $\delta^{18}\text{O}$ em água e $\delta^{15}\text{N}$ nitrato, foi possível verificar que a influência de lixo humano estaria mais evidente em elevações abaixo de 600 metros e as contaminações referentes à animais estariam em uma faixa de elevação entre 600 a 1300 metros.

Liu & Xing (2012), trabalharam em uma região árida da China para investigar a concentração e assinatura isotópica de carbono e nitrogênio em águas de rio, em materiais suspensos nas águas de rio e também em solo, durante períodos de erosão de solos. Os resultados demonstraram que a assinatura do carbono

inorgânico dissolvido variou de -9,2 a -6,7‰ em maio e de -12,9 a -9,3‰ em agosto. Além disso, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do carbono inorgânico dissolvido foram mais negativos em agosto que em maio. Essas diferenças podem estar relacionadas a mudanças na fonte e no solo provenientes de erosões. A assinatura isotópica de nitrogênio de NO_3^- das amostras de água variaram de 5,1 a 10,3‰ em maio e de 3,5 a 6,4 ‰ em agosto. A $\delta^{15}\text{N}$ do material suspenso na água também foi mais positivo. Essas tendências podem ajudar no entendimento do ciclo de N durante erosões de solo dessa região. As investigações desse trabalho sugeriram que o CO_2 /carbonos dos solos e o NO_3^- dos solos eram dissolvidos para dentro dos rios de uma região da China durante as chuvas e as erosões de solos.

Em trabalho realizado por Xue *et al.* (2012), com o objetivo de estimar contribuições proporcionais de diversas fontes de nitrato, utilizando metodologia isotópica mista, em amostras de água superficial, observaram que os valores médios de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ foram relativamente maiores no sítio A, localizado no norte da Bélgica, e variaram de 15,0 a 19,4‰. Esses valores encontrados foram maiores que valores observados na literatura, correspondentes à áreas agrícolas, da mesma magnitude do trabalho. No sítio H, também localizado no norte da Bélgica, os valores encontrados de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ variaram de 11,0 a 15,8‰, indicando que era proveniente de esgoto segundo literatura (Xue *et al.*, 2009).

Xing & Liu (2011), observaram a importância de identificar fontes de NO_3^- , para rastrear o ciclo biogeoquímico de nitrogênio, utilizando isótopos de nitrogênio e oxigênio. Nesse sentido, realizaram um trabalho para melhorar a metodologia de troca aniônica para medir $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em água natural por meio de análise de fluxo contínuo de espectrometria de massa de razão isotópica. Essa nova metodologia proposta tinha o objetivo de reduzir custos, diminuir contaminações nas amostras e aumentar a eficiência do método de resina de troca aniônica proposto por trabalhos anteriores. Foi utilizado uma coluna de resina de troca aniônica customizada por eles, junto com uma bomba peristáltica e a metodologia de liofilização. Como consequência, a quantidade de Ag_2O utilizada como neutralizante foi reduzida, houve uma diminuição no tempo e a operação ficou mais simples que a utilizada anteriormente. No entanto, a precisão analítica permaneceu idêntica à dos estudos

anteriores. Com essas mudanças, a técnica de troca aniônica por resina demonstrou ser mais sensível na mensuração de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$, que as técnicas originais.

Silva *et al.* (2002), realizaram um trabalho para detectar fontes de nitrato no ambiente urbano, utilizando análises de isótopos de nitrogênio e oxigênio, em águas superficiais no Texas e em Washington, Estados Unidos. Nos dois locais de estudo, fontes de nitrato foram relacionadas ao esgoto, além de também apresentarem contaminação derivadas de fontes de esgoto misturado com outras fontes, como provenientes de fertilizantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Principais adaptações do método de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de água superficiais

Para a determinação do $\delta^{15}\text{N}$ proveniente do NO_3^- em amostras de águas superficiais com baixa concentração desse íon ($< 6 \text{ mg.L}^{-1}$), foi necessário realizar as etapas de pré-concentração da amostra, para obter uma massa mínima variando de 300 a $1000 \mu\text{g-N.L}^{-1}$ necessária para a medição $\delta^{15}\text{N}$ no IRMS. Portanto, optou-se por adaptar as metodologias propostas por Silva *et al.* (2000) e Xing & Liu (2011). As principais adaptações foram:

- ✓ mudança/adaptação no sistema de extração em fase sólida através da confecção artesanal de uma coluna contendo a resina AG1 X8 da BioHad não descrita na literatura;
- ✓ uso de um sistema modelo proposto por Sodr e e colaboradores (2010), com adapta es que possibilitou realizar a extra ao de NO_3^- em 6 amostras de água ao mesmo tempo durante o procedimento de pr -concentra ao deste  ion em solu ao aquosa com possibilidade para 12 extra oes simultâneas. Esse modelo difere dos modelos utilizados por Silva *et al.* (2000) e Xing & Liu (2011);
- ✓ uso de quantidades menores de $\text{Ag}_2\text{O}_{(s)}$ conforme o proposto por Xing & Liu (2011), reagente com custo elevado;
- ✓ uso de fluxo diferenciado para o procedimento de pr -concentra ao do  ion nitrato na coluna: a vaz ao de extra ao utilizada nesse estudo foi de 120 mL.h^{-1} (60 rpm para a uma bomba peristáltica Minipuls Evolution, Gilson[®]), diferente do utilizado por Silva *et al.* (2000), de 500 mL.h^{-1} a 1000 mL.h^{-1} , e de Xing & Liu (2011) com fluxo de 300 mL.h^{-1} em uma frequência de 100 rpm.

Segundo Silva *et al.* (2000), o método para a determina ao do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de águas superficiais consiste, basicamente, em 6 etapas:

1. condicionamento da coluna de pré-concentração com 2 mL de HCl 6 mol.L⁻¹ para a eluição de possíveis interferentes.
2. quantificação da concentração de NO₃⁻ nas amostras naturais para estimar a volume mínimo de amostra necessária para reter de 100 a 200 μmol de nitrato na coluna de pré-concentração que é feita por gotejamento a partir de um funil de separação, onde essa é a quantidade mínima necessária para a quantificação do δ¹⁵N-NO₃⁻ por IRMS.
3. filtração das amostras de águas naturais em uma membrana de policarbonato de porosidade de 0.45 μm para remover partículas que podem aderir a resina e obstruí-la;
4. inserção da amostra em uma coluna de pré-concentração que tem uma resina de extração modelo AG1-X8, 200–400 mesh, onde a adsorção do íon nitrato ocorre por meio de uma troca entre o cloreto da fase estacionária e nitrato da fase móvel no sítio catiônico da resina, em que se utiliza um fluxo de 500 mL.h⁻¹ a 1000 mL.h⁻¹ nessa etapa. Esse procedimento tem a finalidade de evitar o manuseio de grandes volumes de água ao laboratório, podendo realizar essa etapa no campo;
5. o íon nitrato é eluído da coluna por uma solução de HCl 3 mol.L⁻¹ de volume variado;
6. adição do Ag₂O_(s) para a formação do AgNO₃_(aq) o qual será submetido à um processo de liofilização para a obtenção do AgNO₃_(s) que é utilizado para análise de isótopo de nitrogênio.

Xing & Liu (2011), basearam na metodologia proposta por Silva *et al.* (2000) para a determinação do δ¹⁵N-NO₃⁻ em amostras de águas e as principais modificações realizadas por esses autores foram: confecção de sistema de extração por coluna de resina; utilização de menores quantidades de Ag₂O (economizando aproximadamente 3 g do proposto por Silva *et al.*, 2000); utilização de fluxo de 300 mL.h⁻¹.

No presente trabalho, quatro etapas precedentes à determinação do δ¹⁵N-NO₃⁻ foram realizadas: i) elaboração da coluna de pré-concentração do NO₃⁻, ii) condicionamento da coluna de pré-concentração; iii) pré-concentração e extração do NO₃⁻ pela coluna; iv) eluição e neutralização do NO₃⁻; e iv) liofilização do nitrato de

prata (AgNO_3 (aq)) formado para obtenção do (AgNO_3 (s)). Os detalhes dessas etapas estão descritas nos itens a seguir.

4.1.1. Preparação da coluna de pré-concentração do NO_3^-

A partir da metodologia realizada por Xing & Liu (2011), procedeu-se a etapa de elaboração da coluna de extração com devidas adaptações, de posse das especificações, mesmo não sendo relatados os procedimentos para a sua construção. Para tanto, utilizou-se uma seringa esterilizada de volume máximo igual a 1 mL, sendo que na parte inferior adicionou-se um disco de politetrafluoretileno (PTFE) com o auxílio do próprio êmbolo. Esse disco poroso, foi cortado com uma vazadora de couro para um diâmetro de 5 mm e espessura de 0,5 mm e teve como finalidade a retenção da resina de troca aniônica sob a forma de cloreto (AG1-X8 de 200 – 400 mesh marca Bio-rad). A seringa foi preenchida com 0,9 mL de uma suspensão da resina aniônica compactada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Minipuls Evolution, Gilson®) a uma vazão $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, evitando a formação de bolhas no interior do cartucho. Todo procedimento está esquematizado na Figura 3. A composição química da resina AG1-X8 é estireno divinil-benzeno com um grupo funcional de um sal quaternário de amônio, N,N,N-trimetilaquilamônio. Tem elevada afinidade pelo íon nitrato e apresenta uma capacidade de troca de $1,2 \text{ meq/mL}$.

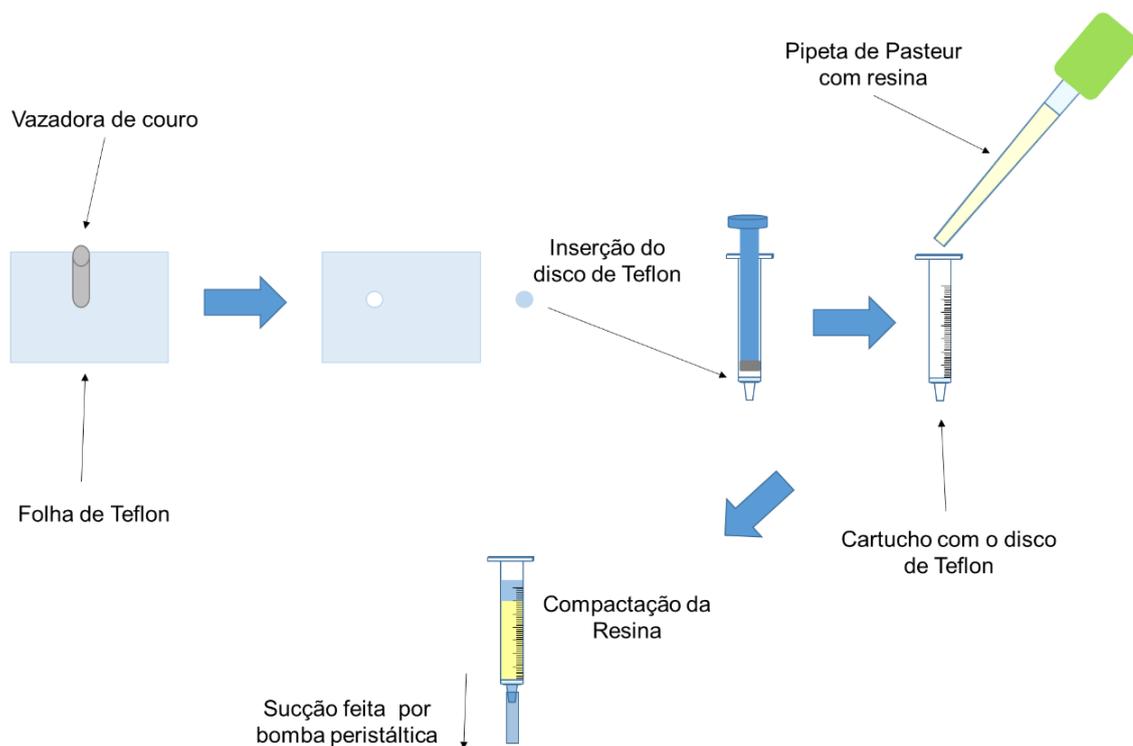


Figura 3 - Esquema referente à elaboração da coluna de pré-concentração.

A coluna proposta foi adaptado ao sistema de extração em linha, utilizado nesse estudo, conforme proposto por Sodré e colaboradores (2010) (Figura 4). A prerrogativa por utilizar esse sistema foi a da capacidade dos frascos reservatórios de amostra, que são capazes de carregar 1 ou 4L por vez, e a sua disponibilidade no laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA) do Instituto de Química, UnB. Entretanto, esse sistema foi desenvolvido para cartuchos tipo *strata X*, e para essa pesquisa optou-se por reutilizar esses cartuchos, sem resina e fritz, como uma espécie de adaptador para a coluna selecionada para a pré-concentração do NO_3^- .

Para verificar se havia escoamento da resina pelas paredes laterais, o volume da resina contida no cartucho foi observado, sob uma diferença de pressão aplicada através da bomba peristáltica. Caso houvesse perda de material, um novo disco era feito e inserido no cartucho ao qual era submetido novamente aos testes.

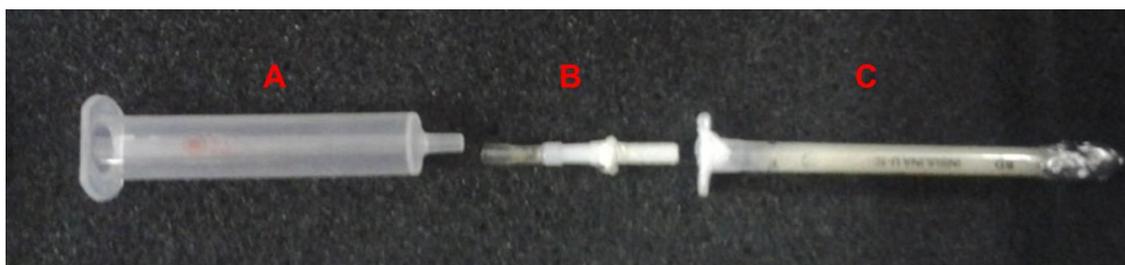


Figura 4 - Adapta o da coluna de pr -concentra o para utiliza o do sistema de Sodré *et al.* (2010), sendo: a) cartucho de SPE reutilizado tipo Strata X sem resina e fritz; b) adaptador entre cartuchos construído a partir de um conector e mangueira de equipo de infusão; c) cartucho de pr -concentra o confeccionado na **Figura 3**.

4.1.2. Pr -concentra o e extra o do NO_3^- na coluna

Para a otimiza o dessa etapa foram elaboradas seis soluçoes padrões de nitrato de potássio (KNO_3) (

Tabela 2) a partir do sal com 99% de pureza (marca Sigma Aldrich). As concentra oes de 88,53; 44,27 e 4,43 $\text{mg}\cdot\text{NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$ foram escolhidas com base no proposto por Silva *et al.* (2000) e Xing *et al.* (2011) e preparadas a partir de uma soluço estoque de 2013,32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pois, para quantificar $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ no espectrômetro de massa de fluxo contínuo   necessário de 100 a 200 μmol de NO_3^- . Apesar disso, como nos mananciais do DF as concentra oes de nitrato variam naturalmente do limite de detec o do equipamento (cromatógrafo de íons), que   de 0,334 mg/L , a 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, foi necessário testar soluçoes padrões de KNO_3 menos concentradas, onde foram preparadas as soluçoes sub-estoque a partir de uma pesagem da massa de KNO_3 direta sem dilu oes de uma soluço estoque e, para tanto, foram utilizados os valores de 4,88; 2,44 e 1,22 $\text{mg}\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Solu oes padrões de KNO_3 utilizadas para os testes de pr -concentra o e elui o.

$[\text{NO}_3^-]$ [a] $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Volume [b] L
88,53	0,25
44,27	0,50
4,43	1,00
4,88	2,00
2,44	2,00
1,22	2,00

[a] – Concentra o de nitrato com base nas medidas de padroniza o. [b] Volume utilizado para pr -concentra o

Antes de iniciar a etapa de pré-concentração do íon nitrato na coluna, foi realizado o condicionamento da coluna por meio da adição de 6 mL de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ com consecutiva lavagem com água deionizada, com fluxo de 0,1 mL.min⁻¹, até pH próximo de 7 (~50 mL) conforme proposto por Silva *et al.* (2000). Além disso, para assegurar que todos os sítios de troca da resina estivessem ocupados por íons cloreto, os mesmos autores sugerem, também, a adição de 2 mL de uma solução de cloreto de cálcio, CaCl₂ 1,25 mol.L⁻¹. Entretanto, essa etapa não foi realizada nesse trabalho, pois o cloreto de cálcio disponível (marca Vetec) apresentava teores de íons nitratos (0,003% de NO₃⁻), que poderiam interferir na medição do δ¹⁵N-NO₃⁻ e no teste de recuperação.

As “garrafas” foram enchidas com as soluções padrões e adaptadas ao sistema de extração em linha (Figura 5) de Sodr e *et al.* (2010). Em seguida, realizou-se a extração por meio de uma bomba peristáltica (Minipuls Evolution, Gilson®), a um fluxo de 120 mL.h⁻¹, o qual foi inferior aos valores recomendados por Silva *et al.* (2000) e Xing & Liu (2011) que sugerem, respectivamente, um fluxo de extração entre 500 mL.h⁻¹ a 1000 mL.h⁻¹.e de 300 mL.h⁻¹. A utilização de extrações simultâneas   um diferencial realizado nesse trabalho, quando observa-se os trabalhos anteriores, como o de Xing & Liu (2011), onde as extrações eram realizadas isoladamente. Como o volume de amostras   muito superior, o preparo de mais de uma amostra possibilita a economia de tempo. Nesse sentido, uma otimiza o dos resultados pode ser verificada.

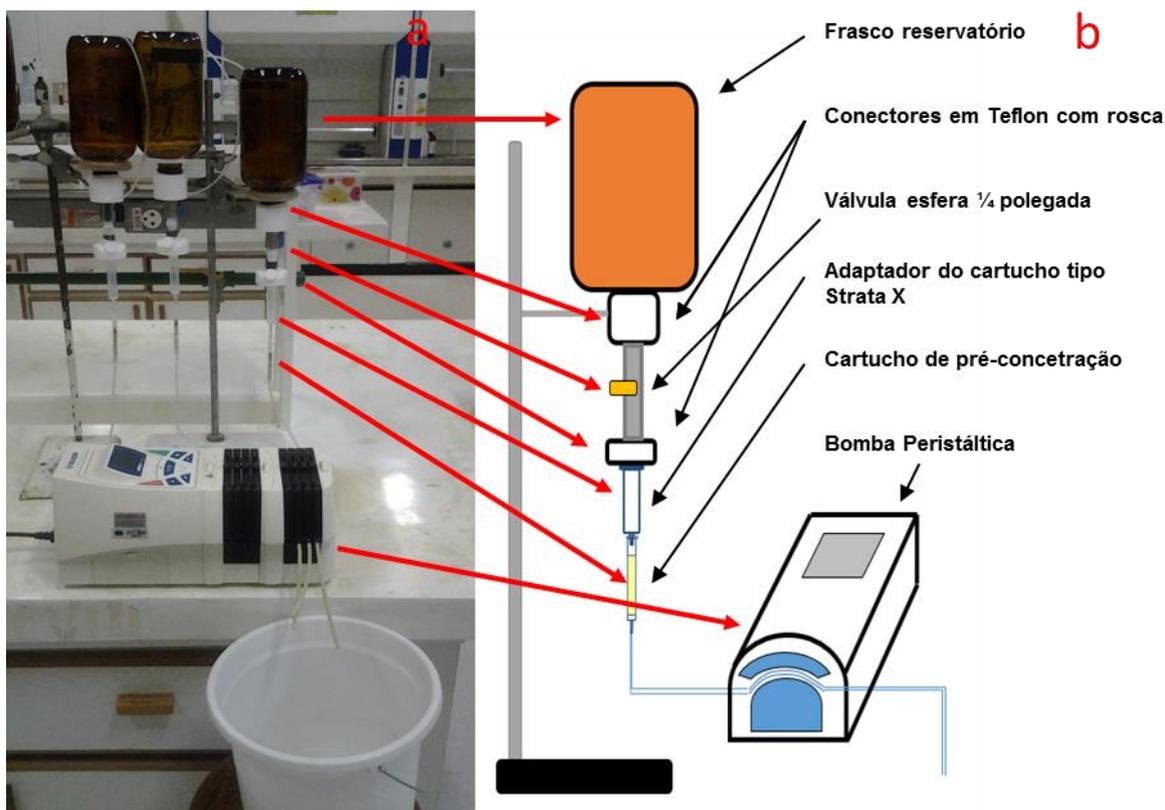
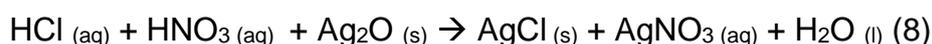


Figura 5 -Sistema utilizado para a pré-concentração de NO_3^- na coluna contendo a resina AG1 X8 sendo: a) sistema real utilizado com três extrações simultaneas; b) representação do sistema com uma extração.

4.1.3. Eluição e neutralização do NO_3^-

A eluição do íon nitrato retido na resina aniônica foi realizado por meio do sistema Manifold (Modelo *Preppy™ Vaccum Manifold Collection Rack*) sob pressão reduzida (em até -20 kPa). O volume do eluente utilizado foi 6 mL de HCl 3 mol L^{-1} , pois conforme Silva *et al.*, (2000) essa concentração de HCl apresentou uma recuperação de 98% do íon nitrato. Os cartuchos foram eluidos e lavados de forma a obter um volume final de 25 mL em balões volumétricos a qual uma pequena alíquota era utilizado para medição concentração de NO_3^- e o restante era colocado em um tubo de ensaio. Em seguida realizou-se a etapa de neutralização que consistiu na adição de oxido de prata ($\text{Ag}_2\text{O}_{(s)}$) até a massa de 3,1 g em tubo de ensaio de PTFE com tampa de 50 mL. Esse procedimento foi realizado sob agitação, em banho de gelo, afim de evitar-se a formação de vapor de HNO_3 (Equação 8) e conseqüente perda do analito por volatilização (SILVA *et al.*, 2000; XING & LIU, 2011).



O Ag₂O (Marca: Merk) utilizado no procedimento de neutralização foi previamente tratado para remover possíveis interferentes de NO₃⁻. Para tanto, seguiu-se a proporção de 2L de água deionizada para 500g do óxido de prata adicionados a um Erlenmeyer de 4L, a qual foi submetida a agitação por 6 horas seguido de filtração (porosidade 0,45 µm) e secagem em estufa a 50 °C. A água de lavagem foi coletada e analisada por cromatografia iônica. Esse procedimento foi repetido até que os níveis de nitratos estarem abaixo do limite de detecção do cromatógrafo de íons.

Observando o trabalho de Silva *et al.* (2000), onde utilizou-se água de diversos pontos dos Estados Unidos no estudo, e o trabalho realizado por Xing *et al.* (2011), que trabalharam com amostras de água de um rio próximo a cidade de Xi'an na China, o presente estudo utilizou quantidades de Ag₂O iguais às de Xing *et al.* (2011), quantidade reduzida pela metade da utilizada por Silva *et al.* (2000). Segundo Fukada *et al.* (2003), quanto menor for a necessidade de Ag₂O, menores serão os custos de uma análise para quantificar contaminação de nitrato por isótopo de nitrogênio. As amostras de água utilizadas nesse trabalho referiam-se à água com baixa concentração do íon nitrato (valor máximo de 6 mg-NO₃⁻.L⁻¹), valor este que estaria mais próximo dos limites inferiores das amostras testadas por Silva *et al.* (2000) e Xing *et al.* (2011).

4.1.4. Liofilização do nitrato de prata (AgNO₃ (aq))

O processo de liofilização o qual consiste na retirada de água por meio do processo de sublimação sob pressão reduzida de 200 mmHg no estágio inicial e cerca de 80 mmHg no término do processo, foi utilizado para obtenção do nitrato de prata (AgNO₃) no estado sólido, pois para a quantificação do δ¹⁵N-NO₃⁻ no equipamento *Delta V Plus* a amostra deve estar nesse estado físico. Para tanto, utilizou-se o liofilizador modelo L101 (Marca Liotop), onde 20 mL de AgNO₃ (aq) foram previamente congeladas. O tempo utilizado entre as etapas de neutralização, filtração e liofilização foi de aproximadamente 60 horas, com a obtenção do AgNO₃(s).

4.2. Quantificação da concentração do NO_3^- em solução aquosa

A quantificação da concentração do NO_3^- , e demais aniões (fluoreto, cloreto, fosfato e sulfato), que são realizadas de forma simultânea, foi realizada por cromatografia iônica (modelo 881 *Compact IC pro* marca *Metrohm* - Figura 6) por meio de uma coluna do tipo *Metrosep A Supp 5 - 250/4.0*, a qual a tem como fase móvel uma solução de Na_2CO_3 ($3,2 \text{ mmol.L}^{-1}$)/ NaHCO_3 (1 mmol.L^{-1}), sob um fluxo de $0,7 \text{ mL/min}$, a uma pressão de $\sim 14 \text{ MPa}$ e um volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. O programa do equipamento utilizado foi o *MagIC NET 2.2* da *Metrohm*. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Estudos Geocronológicos e Geodinâmicos Ambientais IG/UnB (Eith *et al.*, 2008).



Figura 6 -- Cromatógrafo de íon 881 Compact IC Pro (Metrohm)

Esta técnica analítica foi utilizada para quantificar a concentração de NO_3^- obtidas em: i) na eluição do analito (KNO_3 (aq)) pré-concentrado na coluna com a finalidade de realizar os testes de recuperação do NO_3^- e consecutiva realização do perfil de eluição; ii) nas amostras de águas naturais provenientes dos mananciais do DF, com a finalidade de verificar qual o volume mínimo de água seria necessário para assegurar uma quantidade mínima (entre 100 a $200 \mu\text{mol}$) do íon nitrato para medição do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$.

A concentração inicial do NO_3^- antes da pré-concentração (como KNO_3 (aq)) foi verificada a partir de uma alíquota da solução padrão (15 mL). Já a concentração do NO_3^- pré-concentrado como KNO_3 (aq), eluído com 6 mL de HCl 3 mol.L⁻¹ como HNO_3 (aq) e neutralizado com Ag_2O (s) foi quantificado por cromatografia iônica como AgNO_3 (aq). Para tanto, foi necessário diluir essas amostras para que as mesmas estivessem na faixa linear de trabalho da curva de calibração para nitrato que variou 1 a 15 mg.L⁻¹. Assim, uma alíquota de 1 mL do eluído foi diluída em balão volumétrico de 100 mL, e a partir dessa solução uma alíquota de 15 mL foi utilizada para a quantificação do nitrato a qual foi injetada automaticamente (858 Professional Sampler Processor – Metrohm) e a fase móvel que foi carregada até a alça de amostragem de 20 μL , segue para a fase estacionara onde ocorre a separação dos íons os quais são detectadas em função da relação concentração e condutividade (Figura 7).

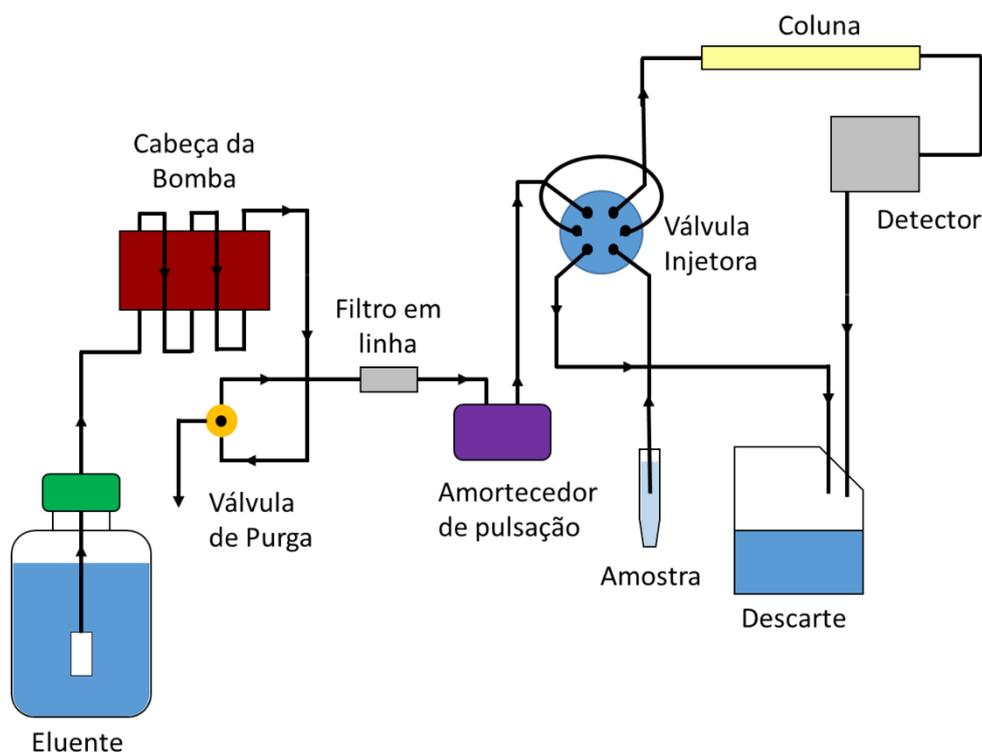


Figura 7 - Componentes constituintes de um Cromatógrafo simples (adaptado de Monografia da Metrohm)

Para traçar o perfil de eluição que consiste em identificar qual é o volume final de HCl onde observa-se a saída completa do íon nitrato, coletou-se alíquotas de 1 mL da eluição dos padrões até que a soma final dos volumes resultassem em 8 mL, semelhante ao procedimento realizado por Xing & Liu (2011).

O cálculo da recuperação do íon nitrato foi realizado em função do número de moles iniciais e do número de moles da fração do eluído conforme a equação 13.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{N^{\circ} \text{ de moles final}}{N^{\circ} \text{ de moles inicial}} \times 100 \quad (13)$$

4.2.1. Cromatografia Iônica e Figuras de Mérito

As análises realizadas através da técnica de cromatografia iônica possibilitaram, a partir do software *MagIC NetTM*, a obtenção de dados referentes as figuras de mérito (Tabela 3).

O LD foi calculado pelo programa estatístico do equipamento utilizando as múltiplas medidas realizadas em diferentes concentrações das soluções de calibração contendo os íons F⁻, Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ e SO₄²⁻. A faixa linear de trabalho foi o valor mínimo e máximo da curva analítica.

Tabela 3 -Figuras de méritos para a determinação de F⁻, Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ e SO₄²⁻ utilizando a cromatografia de íons.

	LD (mg/L)	FLT (mg/L)	R ²
F ⁻	0,447	1-10	0,9930
Cl ⁻	0,269	1-10	0,9997
NO ₃ ⁻	0,334	1-10	0,9998
PO ₄ ³⁻	0,533	4-15	0,9988
SO ₄ ²⁻	0,396	4-15	0,9983

4.3. Quantificação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas soluções padrões

Para a quantificação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$, utilizou-se um espectrômetro de massa Delta V Plus acoplado ao um forno do tipo Flash EA HT (*Elemental Analyzer at High Temperature*) (Figura 8), ambos da marca *Thermo Scientific*. Esse equipamento utiliza um sistema ConFlo IV, que tem a finalidade de gerenciar automaticamente as injeções dos gases de referência (N₂) e arraste (He). O programa utilizado pelo equipamento foi o Isodat 3.0.

As amostras de AgNO_{3(s)} foram pesadas em um cadinho de estanho (cerca de 0,001 mg) e foram inseridas em um amostrador automático, que as introduziram no

sistema Flash EA HT (Figura 8a), onde ocorreram combustão e redução do AgNO_3 em N_2 , CO_2 e H_2O à uma temperatura de $1020\text{ }^\circ\text{C}$. Os gases N_2 e CO_2 foram transferidos através de corrente de hélio (pureza 99,999 % e fluxo de 100 mL/min), para uma coluna de CG à temperatura de $40\text{ }^\circ\text{C}$ (para uma boa separação entre o pico de N_2 e CO_2). Em seguida, os gases foram transferidos para o sistema de FC-EMRI (Figura 8b) (Espectrometro de massa de razão Isotópica com fluxo contínuo de Hélio). As amostras naturais, e as padrões, foram analisadas em duplicatas, e todas as amostras foram corrigidas do valor do branco (cápsula de estanho vazia). Todos os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram reportados em partes por mil relativos a N_2 atmosférico de referência.

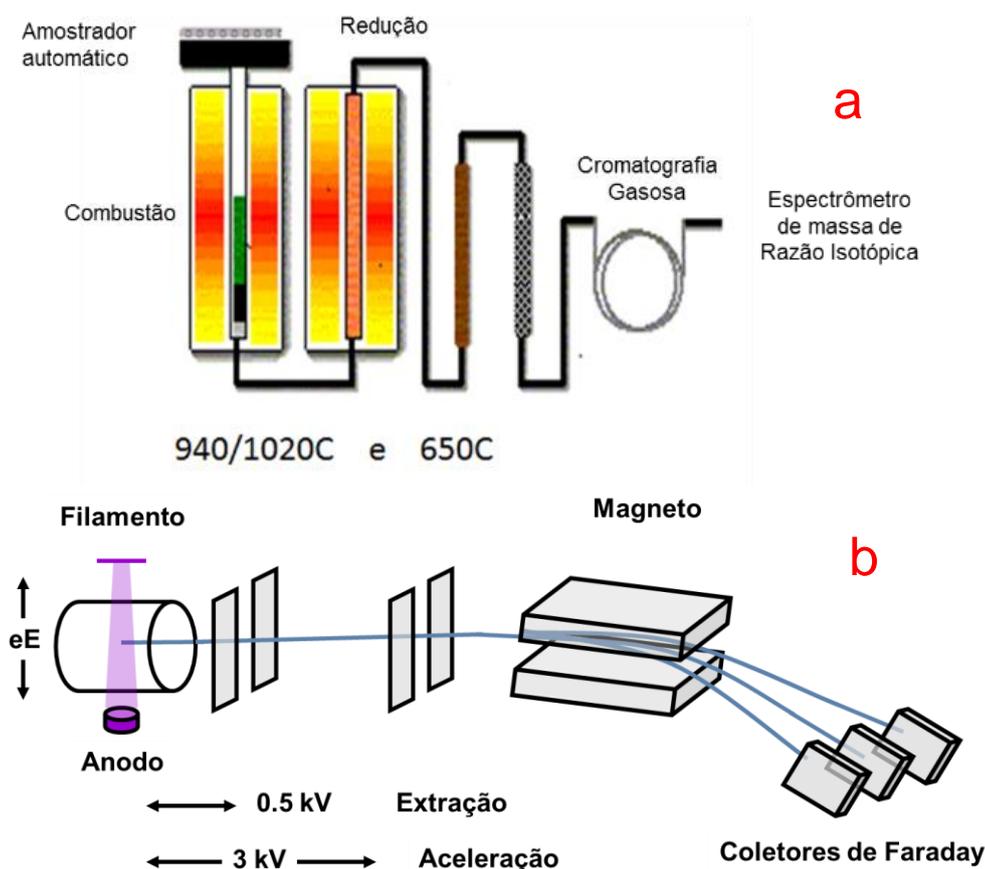


Figura 8 - Diagrama esquemático do IRMS a) sistema Flash EA HT; b) Espectrometro de massa de Razão Isotópica. (adaptado de apresentação da Thermo Scientific ao Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB).

As moléculas neutras N_2 , CO_2 e H_2O do sistema de entrada foram introduzidas na fonte, ionizando-se por impacto de elétrons, e foram aceleradas,

com a aplicação de um campo elétrico em KVolts, e focalizadas através do uso de lentes iônicas. Os feixe dos íons foram selecionados por um campo magnético e detectados por coletores do tipo Faraday posicionados ao longo do plano focal do espectrômetro.

A quantificação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ foi realizada somente para as concentrações de 4,88; 2,44, e 1,22 $\text{mg-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Para verificar a ocorrência de fracionamento isotópico do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ proveniente do método analítico realizou-se três ensaios diferentes:

- i) soluções de KNO_3 (aq) submetido exclusivamente ao processo de liofilização: para isso pesou-se 40 mg de KNO_3 (s), diluindo-o em um balão de 50 mL, a mesma foi congelada, liofilizada;
- ii) fracionamento isotópico proveniente da reação de neutralização com Ag_2O (s): pesou-se 3,98; 7,96 e 15,91 mg de KNO_3 (s) e a elas foram adicionada um volume de 10 mL de HCl 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em seguida, a solução foi submetida a um banho de gelo com agitação através de uma barra magnética e pequenos incrementos de Ag_2O foram adicionados para neutralizar a reação, precipitando AgCl (s) e formação do AgNO_3 (aq). Essa solução foi filtrada (membrana de policarbonato de porosidade 0,45 μm (marca Sartorius Stedim Biotech) e em seguida foi congelada e liofilizada. O $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ foi quantificado no AgNO_3 (s);
- iii) fracionamento isotópico proveniente do procedimentos da pré-concentração e eluição do nitrato: que consiste na realização da metodologia completa (pré-concentração + eluição + neutralização + filtração + liofilização).

4.4. Métodos analíticos e Figuras de mérito

Os resultados foram expressos por meio das médias, máximos, mínimos e desvios padrões. As figuras de mérito como o limite de detecção (LD), faixa linear de trabalho (FLT), coeficiente de correlação (R^2), foram utilizados para avaliação da metodologia empregada.

4.5. Aplicação da metodologia de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de águas naturais superficiais

Para aplicação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras naturais foram coletadas amostras de água em mananciais superficiais do Distrito Federal e no Lago Paranoá. Além disso, determinou-se as variáveis ambientais como os parâmetros físico-químicos, pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido em conjunto com os ânions – fluoreto, cloreto, sulfato e fosfato.

As amostras de água foram coletadas por um balde volumétrico ou pela garrafa de *Van Dorn* (Figura 9) em função da dificuldade de acesso ao local de amostragem.

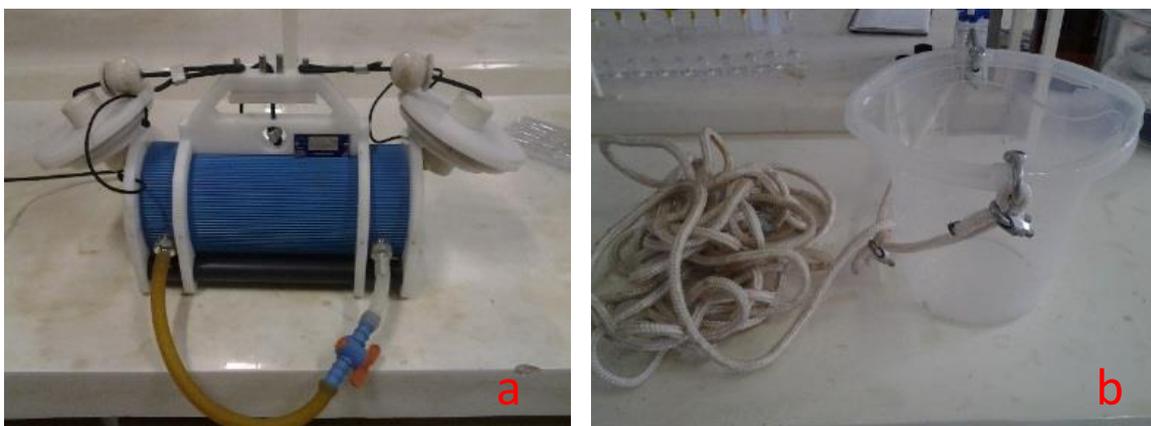


Figura 9 - Instrumentos utilizados para coletar amostra de água superficial: a) Garrafa de Van Dorn b) Balde Volumétrico..

4.5.1. Amostragem

Foram realizadas duas coletas de amostras de águas superficiais:

- i) Na primeira, realizada em outubro de 2012, período chuvoso, coletou-se amostras de água em 6 pontos: Ponte do Braguelo - PB, Ribeirão Bananal - BAN, Ribeirão do Torto - TOR, Ribeirão do Gama - GAM, Córrego Cabeça de Veado - CDV, e Erminda Dom Bosco - EDB. Essa coleta teve a finalidade de avaliar somente a variação da concentração do íon nitrato para estimar o volume mínimo necessário a ser passado na coluna de pré-concentração para assegurar uma quantidade mínima de nitrogênio necessário para a quantificação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$

- ii) Na segunda, realizada em julho de 2013, período seco, coletou-se amostras de água em 9 pontos: Ribeirão Bananal - BAN, Ribeirão do Torto - TOR, Ribeirão do Gama - GAM, Córrego Cabeça de Veado - CDV, Erminda Dom Bosco - EDB, Ribeirão Mestre D'Armas - MDA, Córrego do Fumal - FUM, Ribeirão de Sobradinho - SOB, Ribeirão do Riacho Fundo - RF, e teve a finalidade de determinar a concentração dos ânions (fluoreto, cloreto, sulfato e fosfato) e do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$.

Os pontos de amostragem selecionados estão na Figura 10. Suas coordenadas geográficas, o volume de amostra coletada e o uso e ocupação da bacia encontram-se na Tabela 4.



Figura 10 - Localização espacial dos pontos de coleta das amostras de água coletadas durante o outubro de 2012 e julho de 2013.

Tabela 4 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta e volume amostrado.

	Siglas	Latitude	Longitude	Volume de amostra (L)*
Ponte do Bragueto	PB	-15° 43' 53,8"	-47° 53' 24,9"	1,00
Ribeirão Bananal	BAN	-15° 43' 43,9"	-47° 54' 33,1"	4,50
Ribeirão do Torto	TOR	-15° 42' 54,7"	-47° 52' 36,6"	3,50
Ribeirão Mestre D'Armas	MDA	-15° 36' 25,8"	-47° 41' 27,9"	3,50
Córrego do Fumal	FUM	-15° 35' 44,9"	-47° 40' 7,6"	3,50
Ribeirão de Sobradinho	SOB	-15° 39' 57,4"	-47° 48' 33,4 "	3,30
Córrego Cabeça de Veado	CDV	-15° 51' 16,4"	-47° 51' 31,3"	4,30
Ribeirão do Gama	GAM	-15° 51' 29,4"	-15° 51' 29,9"	4,50
Ribeirão do Riacho Fundo	RF	-15° 51' 22,4"	-47° 56' 2,6"	4,50
Ermida Dom Bosco	EDB	-15° 47' 35,9"	-47° 48' 32,8"	4,50

* Volume de amostra de água passado na coluna de pré-concentração

Sobre os locais onde as amostras foram coletadas, no que se refere ao Ribeirão Bananal, os córregos Poço Fundo e Acampamento são seus afluentes. Apresenta vazão média anual de 2,51m³/s, possui uma área de drenagem de 17,74km² e deságua diretamente no Lago Paranoá. A drenagem desse ribeirão está situada no Parque Nacional de Brasília, sendo o seu curso principal de 19,1km (Ferrante *et al.*, 2001).

Segundo Ferrante *et al.* (2001) e a CODEPLAN (1994), o Ribeirão do Torto tem vazão média anual de 2,89m³/s, possui uma área de drenagem de 249,76 km², sendo seu curso principal de 20 km, a declividade média é de 7,8m/Km e deságua diretamente no Lago Paranoá. Os córregos Tortinho e Três Barras são seus principais afluentes. O regime hídrico natural foi alterado devido a presença das barragens de Santa Maria/Torto. Tem predominância de área rural, constituída pelo Lago Oeste e a Granja do Torto, que cruzam áreas urbanas, como o Varjão.

O Ribeirão do Gama deságua diretamente no Lago Paranoá com vazão média anual de 1,85m³/s, possui uma área de drenagem de 142,40km², sendo seu curso principal de 14km. A nascente fica na área Mata do Catetinho e seus principais afluentes são os córregos Mato Seco, Cedro, Capetinga e Taquara. Apresenta áreas preservadas como os córregos Roncador, Taquara e Capetinga; área de atividade agrícola como o córrego Mato Seco que corta a região de Vargem

Bonita e área residencial como as Mansões do Park Way, que é cortado pelo córrego Cedro (Ferrante *et al.*, 2001; CODEPLAN,1994).

As sub-bacias Pípiripau, Mestre D´Armas e Sobradinho pertencem a Bacia Hidrográfica do Rio São Bartolomeu. O Ribeirão do Gama margeia a área agrícola de Vargem Bonita.

4.5.2. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos temperatura, pH, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio dissolvido, condutividade e sólidos totais dissolvidos foram determinados por uma sonda do tipo multiparâmetros (Marca Oakton e Modelo PCD 650) no local de amostragem com o auxílio de um balde volumétrico.

Os eletrodos da sonda foram calibrados antes da coleta, durante as manhãs dos dias de coleta conforme consta no manual de instrução do equipamento. O eletrodo de pH foi calibrado com soluções tampão pH 7,1 e pH 4,1, o eletrodo de oxigênio dissolvido, com ar atmosférico e uma solução de sulfito de sódio 50 g/L e o eletrodo de condutividade, com uma solução de condutividade 12,88 mS.

4.5.3. Acondicionamento e pré-tratamento das amostras

Para a primeira coleta, utilizou-se frascos de polietileno de 1L para o armazenamento das amostras e para a segunda coleta, utilizou-se bombonas de polietileno de 5L. Todos os frascos foram lavados com água deionizada por cinco vezes e secos em um ambiente limpo no dia que antecedeu a coleta. Durante a coleta, os frascos foram ambientalizados pelas amostras naturais e em seguida foram acondicionados em caixas térmicas com gelo.

Decorrido no máximo 6 horas após a coleta, ao término do campo, as amostras foram filtradas no laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA) da Universidade de Brasília – UnB, utilizando uma membrana de policarbonato (porosidade 0,45 µm, marca Sartorius Stedim Biotech) e um sistema de filtração Sterifil (Figura 11 - marca: Millipore), acoplados a uma bomba de vácuo (Modelo 121 da Prismatec) com a finalidade de remover material particulado em suspensão que poderia obstruir o cartucho de concentração (XING *et al.*, 2011) ou a coluna de cromatografia iônica. Em seguida, as amostras de água foram

estocadas em frascos de polietileno para análise de ânions e/ou pré-concentração do analito.



Figura 11- Sistema de Filtração Sterifil – Marca: Milipore

Com base na concentração dos íons nitratos obtidos nas amostras de água coletadas em outubro de 2012 e quantificados por cromatografia de iônica, estimou-se o volumes necessários que deveriam ser carregados na coluna de pré-concentração para as amostras coletadas em julho de 2013. No entanto, para essas amostras optou-se por adicionar um volume superior ao volume de uma amostra padrão (KNO_3 em diferentes concentrações), praticamente o dobro de volume, para obter maior quantidade de massa de nitrato, ainda que na amostra real o valor da concentração do íon nitrato estivesse abaixo do limite de detecção. Esse aumento de volume implica em uma garantia maior de obtenção do analito, uma vez que, é uma amostra de origem dinâmica e que possivelmente poderia conter mais interferentes do que as amostras sintéticas. Assim, optou-se por passar 2,5 a 4 L da amostra coletadas na coluna de pré-concentração para a extração do íon nitrato.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. **Confecção dos cartuchos de pré-concentração**

A confecção do cartucho de extração teve êxito na adaptação ao sistema de extração em linha de Sodré *et al.* (2010), pois o disco de PTFE agiu como contenção da resina e da água, não apresentando vazamentos. O fluxo utilizado foi estável e visualmente não foram observados caminhos preferenciais nem bolhas dentro do cartucho.

5.2. **Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica – Figuras de Mérito**

As análises realizadas no espectrômetro de massa de razão isotópica tiveram Faixa Linear de Trabalho (FLT) variando na amplitude de 849 a 11956 mV. A sensibilidade analítica do método, ou seja a menor diferença de sinal que pode ser distinguida, foi obtida através do desvio padrão do branco (n=10) (Valderrama *et al.*, 2009), e apresentou um valor de 3,5 mV.

A linearidade do método foi verificado através da rela o do $\delta^{15}\text{N}$ do N_2 de referência em fun o da razão $\text{N}^{15}:\text{N}^{14}$ coletada no espectrômetro e transformada em um sinal elétrico, mV. Desta maneira, o gás de referência, uma mistura de Nitrogênio e Hélio, foi introduzida no equipamento onde, o aumento razão $\text{N}_2:\text{He}$ provoca o aumento de sinal. Com isso, foi possível construir uma curva que expressa a linearidade do método (Figura 12) onde obteve-se um coeficiente de correla o, R^2 , de 0,9591 superior ao recomendado pelo INMETRO, $R^2 = 0,90$.

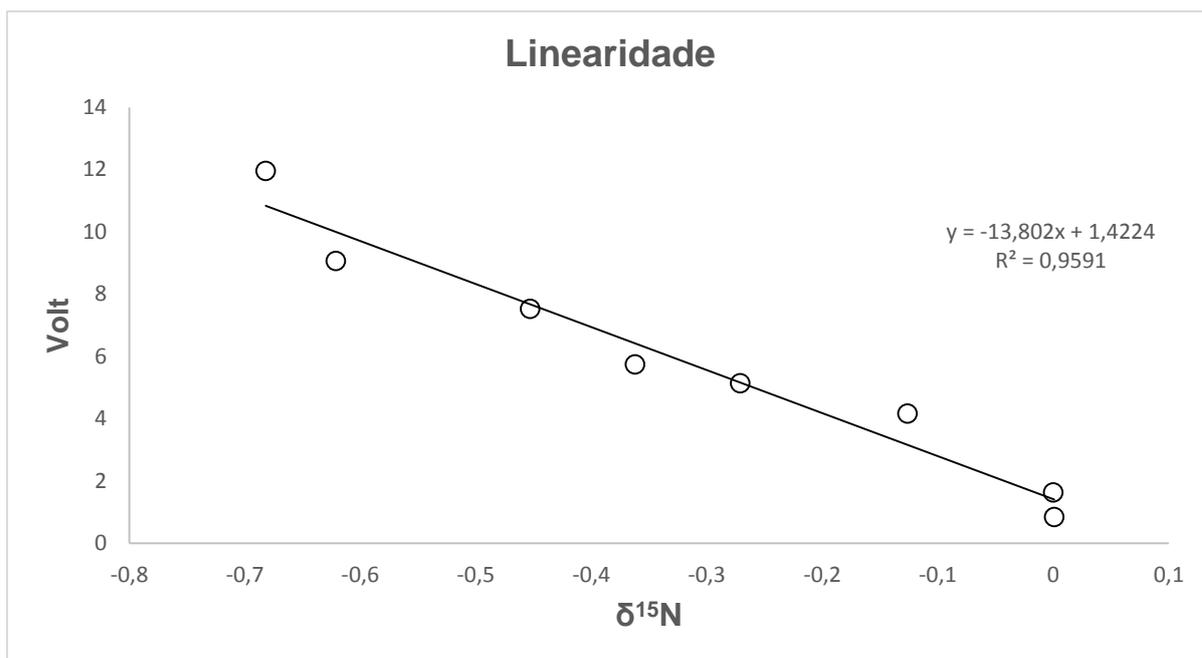


Figura 12 - Linearidade baseada no aumento da razão de injeção N₂:He.

O grau de concordância entre o valor estimado e medido (VALDERRAMA *et al.*, 2009) pôde ser verificado através da medição da razão isotópica de 4 amostras certificadas (Figura 13): NIST 8549 (IAEA-NO-3), USGS25, ambos sulfatos de amônio, (NH₄)₂SO₄, USGS40, USGS41, que são L-Ácidos Glutâmicos, C₅H₆NO₄, cujos $\delta^{15}\text{N}$ de referência são, respectivamente: **4,7**, **-30,4**, **-4,5** e **47,6 ‰** e apresentaram um desvio padrão relativo variando de 0,06 a 4,98 %.

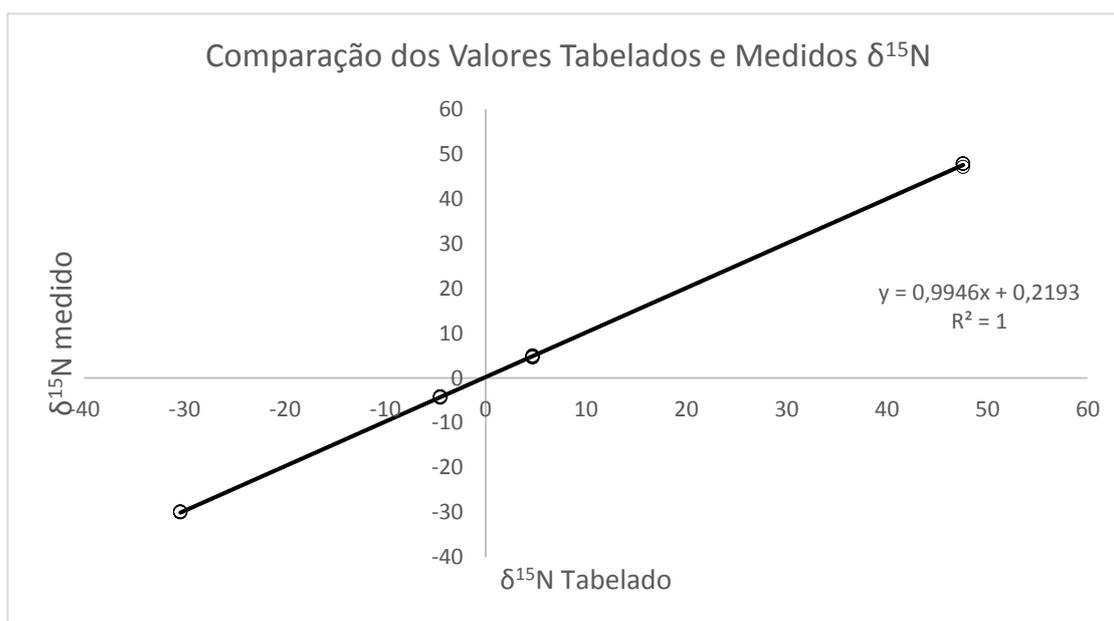


Figura 13 - Valores tabelados de isótopo de nitrogênio versus valores medidos das amostras certificadas.

5.3. AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DO $\delta^{15}N$

Comparando as figuras 14a, cromatograma com os tempos de retenção dos ânions analisados por cromatografia iônica, com a 14b, cromatograma referente ao branco do método (procedimento completo realizado com água ultrapura sem a presença do NO_3^- proveniente do sal para a preparação das soluções padrão) filtrado logo após a reação de neutralização com Ag_2O , observa-se a permanência do pico do íon Cl^- . Esse cromatograma indica que não houve neutralização completa de Cl^- proveniente do ácido clorídrico utilizado na eluição através da adição de Ag_2O . Na Figura 14c, que representa o cromatograma do branco do método com tempo de 3 horas repouso entre a adição de Ag_2O e a filtração para remoção do precipitado de cloreto de prata, observa-se ausência de cloreto mostrando uma maior eficiência.

No que se refere ao perfil de eluição do nitrato da coluna de troca aniônica, para as concentrações 88,53, 44,27 e 4,43 $mg-NO_3^- \cdot L^{-1}$, observou-se que o volume de 6 mL de HCl 3 $mol \cdot L^{-1}$ foi suficiente para a desorção do nitrato (Figura 15). Além disso, verificou-se que a maior fração do analito foi retirada entre 2- 4 mL do eluente semelhante aos resultados apresentados por Xing & Liu (2011). Ainda, na Figura 15, observa-se que há uma tendência de deslocamento do pico de eluição para completa desorção do analito para as amostras mais diluídas.

Xing & Liu (2011), verificaram que 6 mL de HCl 3 $mol \cdot L^{-1}$ podem eluir 80,0%, 98,4% e 99,8% de NO_3^- , em soluções padrões com 4,43, 44,27, 88,53 $mg-NO_3^- \cdot L^{-1}$, respectivamente. No presente trabalho verificou-se um comportamento de eluição semelhante. Dessa forma, para a eluição das concentrações menores de nitrato (4,88; 2,44 e 1,22 $mg-NO_3^- \cdot L$) utilizou-se também 6 mL de HCl 3 $mol \cdot L^{-1}$.

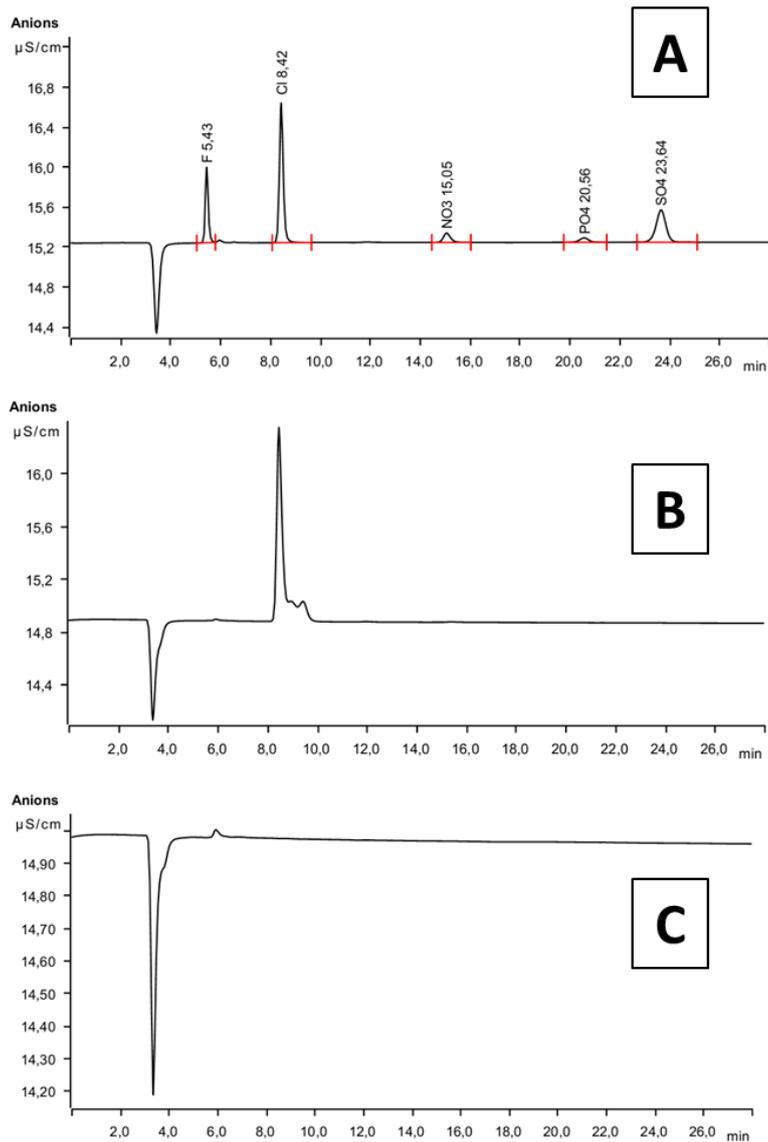


Figura 14 - a) cromatograma contendo os picos dos ânions analisados; b) cromatograma do branco do método sem o tempo de repouso após a neutralização com Ag₂O; c) cromatograma do branco do método com o tempo de repouso após a neutralização com Ag₂O.

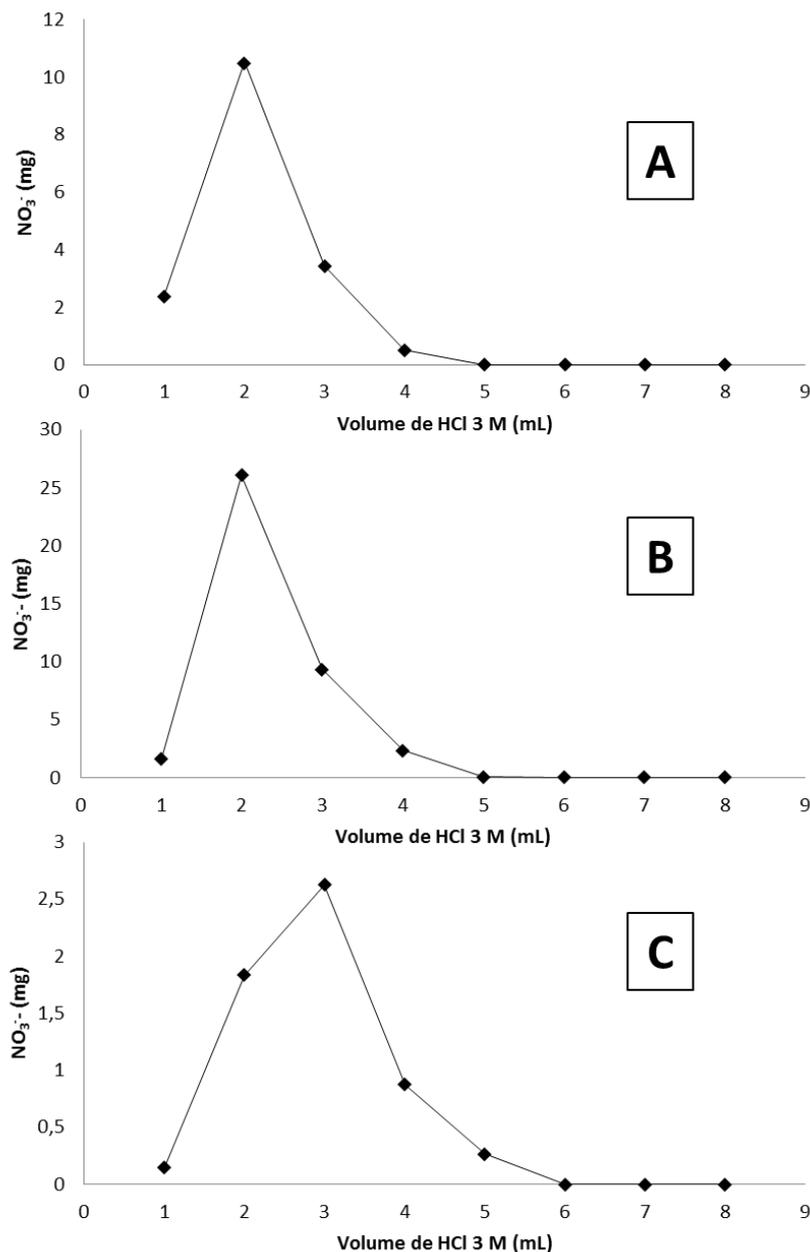


Figura 15 - Eluição do NO_3^- do cartucho com HCl 3 mol.L⁻¹: a) solução padrão de 88,53 mg- NO_3^- .L⁻¹, b) solução padrão de 44,27 mg- NO_3^- .L⁻¹, a) solução padrão de 4,43 mg- NO_3^- .L⁻¹.

Os resultados na Tabela 5 mostram recuperações em diferentes concentrações, que foram escolhidas com base no artigo de Silva *et al.* (2000) e Xing & Liu (2011). É importante salientar que, para essas concentrações, uma solução estoque de 2013,32 mg/L foi preparada, e a partir dela, foram preparadas as soluções sub-estoque que foram utilizadas para pré-concentração do analito. Para as concentrações elevadas do íon nitrato (88,53 e 44,27 mg- NO_3^- .L⁻¹) apresentados na Tabela 5, observou-se resultados nos testes de recuperação de 112,18%, 115,58% e 83%. Para os percentuais superestimados levantou-se a hipótese de

uma possível fonte de contaminação, no entanto, ao verificar os cromatogramas dos brancos não se observou picos ou bandas próximas ao tempo de retenção do nitrato, descartando essa possibilidade. Segundo o Conselho Regional de Química IV Região (SP), o teste de recuperação é um dos procedimentos importantes para se validar um protocolo de análise química. A análise do branco é normalmente utilizada justamente para identificar a qualidade do procedimento.

Tabela 5 - Recuperação de NO_3^- pré-concentrado em função dos volumes e das concentrações mínimas necessárias para a quantificação do razão isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ das soluções utilizadas para pré-concentrações.

mg- $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$	Volume ^[a] (L)	Eluido	
		% Recuperação ^[b]	DPR ^[c]
88,53	0,200	112,18	2,62
44,27	0,450	115,58	1,54
4,43	0,950	83,00	8,11

[a] Volume de amostra passada na coluna de pré-concentração [b] valores percentuais da recuperação do analito [c] Desvio Padrão Relativo das recuperações.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de recuperações para as soluções preparadas com base nas concentrações de NO_3^- de amostras reais (4,88; 2,44; e 1,22 mg- $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$), descritas por AZEVEDO *et al.* (2002). Estas soluções foram preparadas diretamente pesando o sal de KNO_3 (em balança analítica de 6 casas), sem etapa de diluição. A média de recuperação desse ensaio foi de +87,10%. Resultados similares foram observados por Xing & Liu (2011), que trabalharam com amostras de água natural de um rio na China, onde verificaram altos valores de recuperação em diferentes concentrações (95.0%, 96.3%, e 99.4%) com média de recuperação de 96,9%.

Tabela 6 - Recuperação de NO_3^- em função dos volumes e das concentrações das soluções utilizadas para pré-concentrações.

mg- $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$	Volume ^[a] (L)	Eluido	
		% Recuperação ^[b]	DPR ^[c]
4,88	1,95	74,49	1,67
2,44	1,95	85,37	17,86
1,22	1,95	101,17	11,04

[a] Volume de amostra passada na coluna de pré-concentração [b] valores percentuais da recuperação do analito [c] Desvio Padrão Relativo das recuperações.

Para os dois ensaios realizados no presente trabalho, os testes de recuperação apresentaram intervalos aceitáveis, entre 70% e 130%, para substâncias com essa ordem de grandeza de concentração (U.S.EPA, 2010).

5.4. VALORES DE $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES DE KNO_3

O valor de $\delta^{15}\text{N}$ obtido para o sal KNO_3 (s) foi de $-4,20 \pm 0,069$ ‰, o qual apresenta valor próximo à amostra certificada USGS 40 (Tabela 7). A vantagem da amostra certificada apresentar um valor próximo ao da amostra das soluções padrão possibilita observar as variações do equipamento ao longo das medições e estabelecer relações e possíveis correções para uma melhor exatidão nas medidas (Valderrama *et al.*, 2009).

Tabela 7 - $\delta^{15}\text{N}$ tabelados e medidos no Espectrômetro de massa de Razão Isotópica do Laboratório de Estudos Geocronológicos Geodinâmicos e Ambientais IG/UnB das amostras certificadas e do sal KNO_3 utilizado para o preparo das soluções padrões.

Padrão	$\delta^{15}\text{N}$ Tab ‰ ^[a]	Média $\delta^{15}\text{N}$ ‰ ^[b]	Desv. Pad ‰ ^[c]	Replicatas
USGS 40	-4,5	-4,28	0,124	5
Padrão KNO_3	-	-4,20	0,069	10

[a] valores de $\delta^{15}\text{N}$ certificadas [b] média dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ aferidos no Laboratório IG/UnB [c] desvio padrão das amostras medidas.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ obtidos nas amostras padrões de KNO_3 para as concentrações de 4,88; 2,44 e 1,22 mg- $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ variou de -2,309‰ a -3,212‰ (Tabela 8). Esses valores estão cerca de -1,890‰ a -0,987‰ maior do que o valor observado para o sal de KNO_3 (s) ($-4,20\text{‰} \pm 0,07\text{‰}$). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ para esses padrões nessas concentrações foram obtidos pelo procedimento metodológico completo, sem etapa de diluição para preparo das soluções sub-estoques, ou seja, com o preparo das soluções sub-estoques direto do sal de KNO_3 seguido da pré-concentração, eluição com HCl 3 mol.L⁻¹, neutralização com Ag_2O (s) para obtenção do AgNO_3 (aq), filtração para retirar o AgCl (s) e liofilização para obtenção do AgNO_3 (s). Portanto, conforme a Figura 16, observa-se que, para essas concentrações, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontram-se mais enriquecidas, ou seja, mais pesadas, quando comparado com o valor obtido para o sal KNO_3 (s), indicando um fracionamento isotópico proveniente da metodologia.

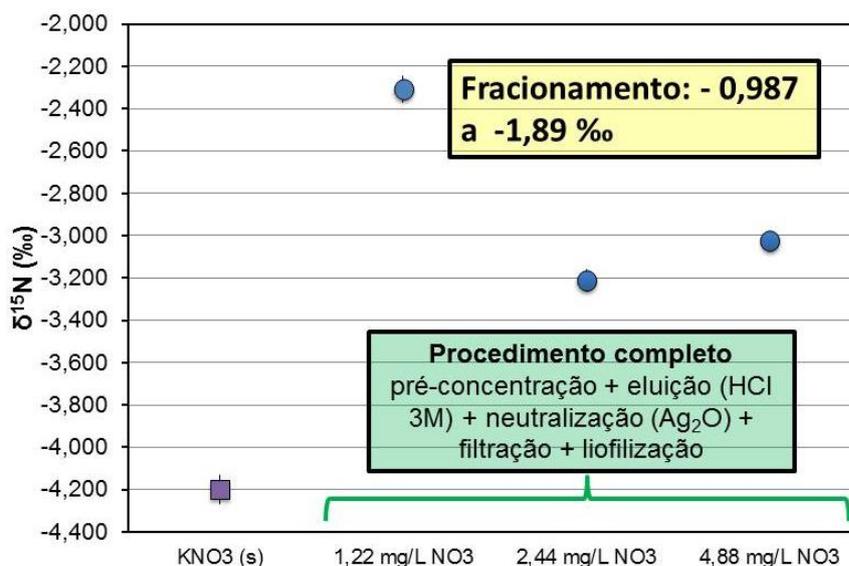


Figura 16 - Determinação do $\delta^{15}\text{N}$ – AgNO_3 (s) no procedimento completo (pré-concentração + eluição com HCL 3M + neutralização com Ag_2O + filtração + liofilização).

Para verificar em quais etapas da adaptação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ esse fracionamento isotópico foi gerado, foram realizados dois ensaios diferentes: 1) solução de KNO_3 submetida exclusivamente ao processo de liofilização e 2) às soluções de KNO_3 de 4,88; 2,44 e 1,22 $\text{mg}\text{-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$ foram adicionadas 6 mL de HCl 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e em seguida neutralizadas com Ag_2O para obtenção do, AgNO_3 (aq), filtradas para retirar o AgCl (s), liofilizadas para obter AgNO_3 (s), e as razões isotópicas aferidas, ou seja, essas soluções não foram pré-concentradas e nem eluidas das colunas. Portanto, aqui o teste de investigação do fracionamento do $\delta^{15}\text{N}$ foi realizado somente para a reação de neutralização.

Para o ensaio 1 e de acordo com a Tabela 8 (valor do $\delta^{15}\text{N} = -4,194 \pm 0,056$ ‰) observa-se que a liofilização não ocasionou fracionamento isotópico significativo. Já no segundo ensaio, observa-se uma composição isotópica do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ variando de $-4,048$ ‰ a $-4,154$ ‰, sendo que esses valores estão cerca de $0,151$ ‰ a $0,045$ ‰ maior do que o valor observado para o sal de KNO_3 (s) ($-4,199$ ‰ $\pm 0,069$ ‰). Entretanto, a variação dos valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ obtidos para essas concentrações estão dentro da variação isotópica observada para o sal de KNO_3 (s) (Tabela 9 e Figura 17). Assim, nesta etapa o fracionamento isotópico também foi pouco significativo, quando comparado com o fracionamento isotópico verificado nas amostras que foram pré-concentradas e eluídas na coluna.

Tabela 8 – Valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em ‰ nas amostras de KNO_3 submetidas em diferentes procedimentos metodológicos:

Etapas para as amostras de KNO_3	Concentração de NO_3^- (mg/L)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) ^[a]	D.P. ^[a]	Varição ^[b]	Replicatas
Procedimento completo	4,88	-3,024	0,620	0,280	3
pré-concentração + eluição (HCl 3M) + neutralização (Ag_2O) + filtração + liofilização	2,44	-3,212	0,351	0,235	3
	1,22	-2,309	0,425	0,450	3
Ensaio 1: solução de KNO_3 + liofilização	4,88	-4,194	0,056	0,001	3
Ensaio 2: adição de HCl (3M) + neutralização (Ag_2O) + filtração + liofilização	4,88	-4,154	0,022	0,011	3
	2,44	-4,112	0,054	0,021	3
	1,22	-4,048	0,062	0,036	3
Padrão de KNO_3 sólido	-----	-4,199	0,069	0,000	10

[a] médias dos $\delta^{15}\text{N}$ para as amostras [b] Desvio padrão das amostras [c] Diferença entre o valor da amostra e o padrão de KNO_3 .

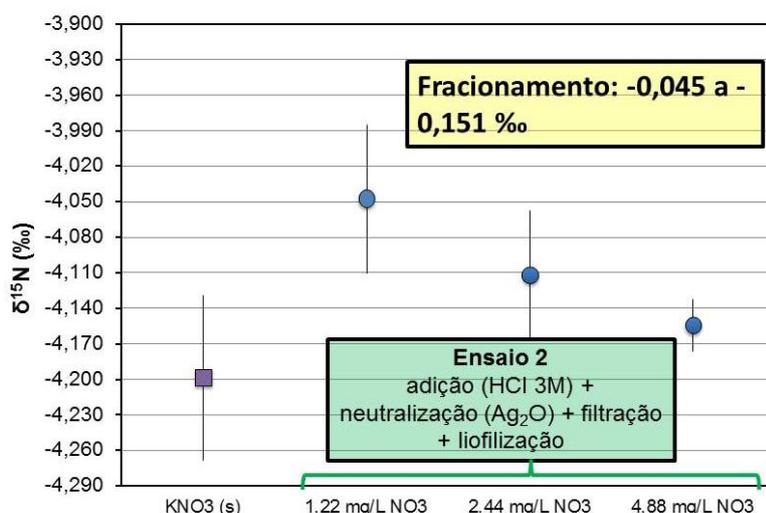


Figura 17 - Fracionamento do $\delta^{15}\text{N}$ da neutralização com o uso de Ag_2O (s).

Portanto, a partir desses dois ensaios, verificou-se que o principal fracionamento isotópico do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ está relacionado principalmente a etapa de pré-concentração e eluição na coluna. Segundo Silva *et al.* (2000), o fracionamento isotópico do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de água é devido, principalmente, a incompleta eluição do nitrato a partir da coluna. Além disso, esses autores observaram que durante o processo de eluição as primeiras alíquotas são isotopicamente mais ricas de ^{15}N , conseqüentemente, as alíquotas finais são mais empobrecidas e para cada 3% de NO_3^- deixados na coluna, observa-se um fracionamento isotópico com conseqüente aumento do $\delta^{15}\text{N}$ em 0,3‰. Ainda segundo esses autores, para amostras naturais, o fracionamento isotópico do nitrogênio irá variar de acordo com as condições de pré-concentração, dentre elas o volume e a concentração dos demais íons que influenciarão na competição pela ocupação dos sítios iônicos.

Tabela 9 - Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nas amostras de KNO_3 para volumes diferentes de eluente (n=3).

Etapas para as amostras de KNO_3	Concentração de NO_3^- (mg/L)	$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ (‰) ^[a]	D.P. ^[a]	Varição ^[b]
pré-concentração + eluição (6 mL de HCl 3M) + neutralização (Ag_2O) + filtração + liofilização	4,88	-3,024	0,620	0,28
	2,44	-3,212	0,351	0,24
	1,22	-2,309	0,425	0,45

5.5. Variações dos parâmetros físico-químicos nos mananciais superficiais do Distrito Federal

Para a aplicação do método de determinação do $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras naturais, foram coletadas amostras de água superficial em diferentes mananciais do DF. Para realizar um estudo prévio sobre algumas características das águas dos mananciais, durante as coletas, foram verificados os parâmetros físico-químicos (temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvidos, e porcentagem de oxigênio dissolvido) e composição aniônica foram avaliadas (Tabela 10).

Tabela 10-- Dados Físico-químicos das amostras naturais superficiais.

Pontos de Coleta	Cod.	Temp. oC	pH	Cond. $\mu\text{S.cm}^{-3}$	O.D mg/L	TDS, ppm
Bananal	BAN	19,7	6,30	43,87	5,90	18,76
Torto	TOR	18,5	6,12	42,24	6,78	17,02
Gama	GAM	16,4	6,54	29,18	6,63	11,96
Cabeça de Veado	CDV	18,7	7,46	10,80	6,78	4,45
Ermida Dom Bosco	EDB	21,9	6,51	104,90	6,57	50,03
Sobradinho	SOB	19,8	6,45	134,20	2,76	58,80
Mestre D'Armas	MDA	20,8	6,98	9,39	6,73	4,05
Fumal	FUM	20,9	6,07	62,65	5,78	28,13
Riacho Fundo	RF	18,5	6,33	195,90	5,81	58,78

Onde: Temp= temperatura, pH= pH, Cond = condutividade elétrica, O.D.= oxigênio dissolvido, TDS= sólidos totais dissolvidos.

5.5.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os maiores valores de temperatura foram observado durante o período de outubro de 2012 (chuva) variando de 27,4 °C a 20,3 °C. Essas variações são características do regime climático natural, oriundos de variações sazonais, período do dia assim como estratificação vertical (ANA, 2005). No de período de seca, a variação foi de 21,9 °C a 16,4 °C. A temperatura é utilizada no índice de qualidade da água e está previsto na resolução N° 430 do CONAMA, pois um aumento significativo desse parâmetro pode ocasionar um aumento das velocidades de reações, mais especificamente das de natureza bioquímica como a decomposição de compostos orgânicos.

Os valores de pH obtidos nesse estudo estão dentro da faixa de normalidade, sendo o valor máximo e mínimo, de 7,63 e 6,07 respectivamente, obtidos no período de chuva no ponto Ermida Dom Bosco (EDM), e do ponto Ponte do Braguetto (PB). Segundo a Resolução do Conama 357/2005, água potável apresenta uma faixa de pH variando entre 6,0 e 9,0 para águas naturais.

O parâmetro condutividade elétrica está diretamente relacionado com a concentração de íons, proveniente de sais dissolvidos na água. Como resultado, isto implica em um aumento da salinidade da água e em alguns casos extremos podem interferir em solos onde se aplica a cultura irrigada, atividades de piscicultura, processos industriais e saúde humana (ANA, 2005). No presente estudo, verificou-se variações temporais de condutividade elétrica, com maiores e menores valores

obtidos, respectivamente, no período de chuva e seca (207,50 e 9,39 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$). O maior valor no período de chuva pode estar associado à lixiviação do solos para os leitos dos mananciais. Já na variação espacial, os valores máximos de condutividade estão localizados no lago Paranoá, na Ponte do Bragueto (PB) e na Ermida Dom Bosco (EDB), com 207,50 e 201,0 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, respectivamente, onde recebem aporte de águas de diferentes mananciais, bem como, lançamento de efluentes procedentes de estações de tratamento de esgoto. O ponto que apresentou o menor valor de condutividade foi o Ribeirão Mestre D'Armas (MDA), no período de seca com 9,39 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$.

No que se refere aos sólidos totais dissolvidos (SDT), observou-se variações temporais significativas, com o maior valor (60,51 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) registrado no ponto Ponte do Bragueto (PB) na época de chuva e menor valor (4,05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) registrado no Ribeirão Mestre D'Armas (MDA) no período de seca. Os valores obtidos de SDT estão condizentes com os valores de condutividade apresentadas nas norma brasileiras, com quantidades de sólidos dissolvidos dentro da faixa de qualidade da água (resolução 357/2005 do CONAMA e Portaria, nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde).

O oxigênio dissolvido, proveniente da atmosfera através da diferença de pressões parciais, é um parâmetro fundamental para assegurar a qualidade da água e é imprescindível para a biota desse ecossistema. Nas amostras coletadas observou-se variações temporais e espaciais significativas, com o valor máximo de oxigênio dissolvido de 7,18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ no ponto Ponte do Bragueto (PB) durante o período chuvoso, ocasionado pela recirculação de água favorecido pela chuva. Um valor mínimo de 2,76 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi observado para o ponto do Ribeirão de Sobradinho (SOB) durante o período de seca, possivelmente devido ao consumo oxigênio para decomposição de matéria orgânica, caracterizando em um ambiente redutor, e tal fato é respaldado pela concentração elevada do íon sulfato, SO_4^{2-} . Na legislação, as águas são classificadas, classes 1, 2 e 3, de acordo com a concentração de oxigênio dissolvido, não inferior 6, 5 e 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e podem ser empregadas ao abastecimento e consumo humano desde que recebam o tratamento adequado para esse fim (CONAMA 357/2005).

5.5.2. Determinação dos Ânions

Conforme observa-se na Tabela 11, os maiores valores de Cl^- foram obtidos em PB (8,186 mg.L^{-1} no período de chuva) e em SOB (7,794 mg.L^{-1} , no período de seca), enquanto que os menores valores foram observados no ponto GAM (0,35 mg.L^{-1} e 0,708 mg.L^{-1} no período chuvoso e seco, respectivamente). As principais fontes natural de cloreto, segundo Piveli *et al.* (2006), estão relacionados aos solos e rochas. No entanto, ações antrópicas como descargas de esgoto sanitário e descargas de efluentes industriais originados na indústria de petróleo, farmacêutica, cortumes, etc., tem contribuído de forma significativa para o aumento das concentrações desse íon nas águas. Segundo a Portaria 36 do Ministério da Saúde e resolução do CONAMA 357/2005, o valor de 250 mg.L^{-1} de Cl^- é tomado como padrão de potabilidade. Desta forma, as concentrações dos pontos de coleta estão dentro da faixa segundo os regulamentados por lei.

A menor concentração de NO_3^- , dentre as que estiveram acima do LD de 0,334 mg.L^{-1} foi apresentada no TOR (0,547 mg.L^{-1}) no período de chuva e no BAN (0,350 mg.L^{-1}) no período de seca, e foi maior em MDA (4,069 mg.L^{-1}) e PB (2,774 mg.L^{-1}) nos mesmo períodos, respectivamente.

As fontes naturais de nitrogênio suscitam da atmosfera através de vários mecanismos. Dentre eles estão: a fixação biológica realizada pelas bactérias e algas, que incorporam o nitrogênio atmosférico em sua estrutura celular, auxiliando para a presença de nitrogênio orgânico nas águas; e a fixação química, dependente da presença de luz, pleiteando a presença de amônias e nitratos. Em contrapartida, as principais fontes antrópicas de nitrogênio são os lançamentos de proteínas (nitrogênio orgânico) através do sistema de esgotos sanitários, bem como, de ureia que é hidrolisada gerando o nitrogênio amoniacal. Além do mais, há ainda as chuvas, que apesar de serem um fenômeno natural, lavam a atmosfera poluída das cidades somados a um escoamento pluvial deficiente, aumentando a presença material particulado de nitrogênio orgânico e possibilita a dissolução da amônia e nitrato mas assinalam uma fonte difusa de difícil caracterização. Nas áreas agrícolas, o escoamento pluvial através dos solos fertilizados, também contribui para a presença de diversas formas de nitrogênio (PIVELI *et al.*, 2006).

No processo de auto depuração dos mananciais, em águas superficiais, a forma mais encontrada do nitrogênio é o nitrato. Deste modo, a resolução do CONAMA 357/2005 e a Portaria Nº 2.914/2011 do MS normatizam a capacidade máxima de nitrato em 10 mg-N.L⁻¹. Portanto, nenhum dos pontos de coleta apresentaram concentrações de nitrato superiores aos admitidos.

A presença de sulfatos pode ser detectada em apenas três dos nove pontos amostrados: PB (8,423 mg.L⁻¹) e EDB (6,024 mg.L⁻¹) no período da chuva e EDB (6,805 mg.L⁻¹) e SOB (13,993 mg.L⁻¹) no período da seca.

As fontes naturais desse íon, um dos mais abundantes na natureza, surge da dissolução de solos e rochas, como sulfato de cálcio e o sulfato de magnésio bem como da oxidação a sulfatos (ex.: pirita ou dissulfeto de ferro, FeS₂). Em águas superficiais, a sua ocorrência pode proceder das descargas de esgoto doméstico, dos efluentes industriais e do próprio tratamento dessas águas com o emprego de coagulantes como o sulfato de alumínio, sulfato de ferroso, sulfato férrico e caparrosa clorada (PIVELI *et al.*, 2006). O seu excesso nas águas destinadas ao abastecimento desencadeiam um efeito laxativo sendo que o seu padrão de potabilidade é fixado em 400 mg.L⁻¹ pela Portaria Nº 36/1990 do MS e 250 mg.L⁻¹ pela Resolução Nº 357/2005 do CONAMA. Os valores encontrados para esse íon estiveram abaixo do limite superior regulamentado.

Tabela 11 - Variação das concentrações dos ânions no período de seca (julho/2013) referente aos pontos de coleta de mananciais do Distrito Federal.

Pontos de Coleta	Cod.	Cl⁻ (mg.L⁻¹) Seca	NO₃⁻ (mg.L⁻¹) Seca	SO₄²⁻ (mg.L⁻¹) Seca
Ponte do Bragueto	PB	-	-	-
Bananal	BAN	n.d.	0,350	n.d.
Cabeça de Veado	CDV	2,165	0,634	n.d.
Erminda Dom Bosco	EDB	6,283	2,274	6,805
Gama	GAM	0,708	n.d.	n.d.
Torto	TOR	1,776	0,679	n.d.
Riacho Fundo	RF	1,214	n.d.	n.d.
Sobradinho	SOB	7,794	4,055	13,933
Mestre D'Armas	MDA	5,815	4,069	n.d.
Fumal	FUM	1,066	0,554	n.d.

Onde: n.d.= não detectável, e - = pontos que não tiveram as variações das concentrações dos ânions detectadas.

5.6. Determinação da $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas águas superficiais dos mananciais do Distrito federal

O método em estudo foi utilizado para verificar o $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ das amostras de água superficial nos mananciais do Distrito Federal. Assim, averiguar a possibilidade de determinação isotópica. Essa quantificação foi realizada somente nas amostras coletadas em julho de 2013 (período de seca), pois as amostras coletadas em outubro de 2012 foram utilizadas somente para verificar a variação da concentração do íon nitrato.

Os valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ nos mananciais superficiais apresentaram valores positivos, variando de + 2,643 ‰ a +13,68‰, diferente do observado no sal $\text{KNO}_{3(s)}$ (- 4,199 ± 0,069‰). Observou-se uma variação espacial entre as amostras com maior valor (+14,35 ‰) registrado no Ribeirão do Riacho Fundo e o menor (+2,643‰) no Ribeirão Bananal (Tabela 12).

Tabela 12 -- Variações isotópicas de amostras de águas naturais de mananciais do Distrito Federal coletadas no período de seca em julho de 2013.

	Pontos de Coleta	$[\text{NO}_3]$ ^[a] mg/L	Volume Pré-Concentrado ^[b] L	Ampl 28 ^[c] mV	$\delta^{15}\text{N}$ ^[d]
Parte Norte do DF	Bananal	0,35	4,00	500	2,64
	Torto	0,679	2,70	2827	12,80
	Sobradinho	4,055	2,80	-	-
	Mestre D'Armas	4,069	3,00	6387	12,68
	Fumal	0,554	3,00	6179	10,14
Parte Sul do DF	Riacho Fundo	n.d	3,90	5652	14,35
	Gama	n.d	4,00	5166	13,68
	Cabeça de Veado	0,634	3,80	3009	13,36
Parte central lago Paranoá	Ermida Dom Bosco	2,274	4,00	105	4,04

[a] Concentração de nitrato do ponto de coleta verificado por cromatografia iônica [b] Volume utilizado na concentração de nitrato no cartucho [c] amplitude do sinal, em mV, para a massa atômica 28 [d] Razão isotópica das amostras liofilizadas.

Esses valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ observados no atual trabalho, são semelhantes aos encontrados por Liu & Xing (2012), que trabalharam em uma

região árida da China para investigar a concentração e assinatura isotópica de carbono e nitrogênio em águas de rio, em materiais suspensos nas águas de rio e também em solo, durante períodos de erosão de solos, e observaram que a assinatura isotópica de nitrogênio de NO_3^- das amostras de água variaram de 5,1 a 10,3‰ em maio e de 3,5 a 6,4 ‰ em agosto.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ obtidos na parte sul do DF foram isotopicamente mais pesados (+14,35; +13,68; e +13,36‰) que os encontrados na parte norte (+2,64; +12,80; +12,68; e +10,14‰) (Tabela 12). Essa diferença, pode estar relacionada ao uso e ocupação do solo, observados que o $\delta^{15}\text{N}$ variou entre +10,14‰ e +13,68‰, bem como por interferência antrópica.

Em um trabalho realizado por Alves (2012) na região do cerrado do Brasil central (região administrativa de Planaltina-DF), região próxima aos pontos de coleta dos mananciais superficiais na parte norte, verificou o valor de $\delta^{15}\text{N}$ variando de 6,3 a 7,4‰ a medida em que a profundidade aumentava. Esse fracionamento é originado durante a mineralização da matéria orgânica, que enriquece o solo com o isótopo de ^{15}N . Dessa forma, observa-se que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ obtidos no solo são menores do que os valores obtidos nesse estudo para as amostras de água superficiais da mesma região. Provavelmente essa diferença de valores é resultante de um fracionamento isotópico entre os diferentes compartimentos (solo e água). Assim, os resultados do $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ nas águas superficiais do DF, obtidos nesse estudo, são importantes para a constituição de um banco de dados e para futuras interpretações.

Segundo Alves (2012), o ânion NO_3^- é raramente adsorvido no solo, pois tem grande mobilidade na solução do solo, e sua perda é influenciada via lixiviação e emissão gasosa aumentando sua mobilidade entre os diversos compartimentos do ecossistema.

Na parte sul, a sub bacia do Riacho Fundo apresenta a maior densidade e diversidade de ocupação. As regiões administrativas do Riacho Fundo, Núcleo Bandeirante, Guará, Candangolândia além de outras áreas como Mansões Park Way e Águas Claras, compõem o perímetro de urbanização entorno desses mananciais. No entanto, encontramos, também um setor de

indústria e abastecimento além de áreas com atividades rurais (Ferrante *et al.*, 2001; CODEPLAN,1994).

O Ribeirão do Gama, em contra partida, apresenta afluentes que se encontram em áreas preservadas como córregos Roncador, Taquara e Capetinga; em áreas de atividade agrícola e hortigranjeiros, como o córrego Mato Seco que corta a região de Vargem Bonita; e em área residencial, como as Mansões do Park Way, que é cortado pelo córrego Cedro (Ferrante *et al.*, 2001; CODEPLAN,1994). Assim, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ foi de +13,68 ‰ (Tabela 12).

Vale ressaltar que mesmo com a concentração de NO_3^- nos ribeirões do Riacho Fundo e Gama abaixo do limite de detecção ($\text{LD-NO}_3^- = 0,334 \text{ mg.L}^{-1}$), foi possível pré-concentrar o nitrato no cartucho e determinar os valores de razão isotópica nesses mananciais.

Os ribeirões do Gama e Cabeça de Veado são utilizados como áreas de captação de água para abastecimento público. As concentração de nitrato nesses mananciais esteve inferior ao valor máximo permitido pela Portaria MS 2.914/2011, e verificou-se valores de $\delta^{15}\text{N}$ de +13,68‰ e de +13,36‰, respectivamente.

Na parte norte, o córrego Fumal e o Ribeirão Mestre D'Armas também são utilizados como áreas de captação de água para abastecimento público e também apresentaram concentração de nitrato inferiores ao valor máximo permitido pela Portaria MS 2.914/2011, apresentando valores de $\delta^{15}\text{N}$ de +10,14‰ e +12,68‰, respectivamente. Pinelli (1999) verificou que dentre os mananciais da Bacia Hidrográfica do Rio São Bartolomeu (Pipiripau, Mester D'Armas e Sobradinho), o Fumal apresentou os valores mais baixos de concentração de nitrato sendo justificada pela ocorrência predominante de atividades agrícolas. O carreamento de nutrientes decorrentes das áreas fertilizadas via galeria de águas pluviais ou diretamente pelo escoamento superficial podem ter uma relação com o valor de $\delta^{15}\text{N}$ encontrado.

Ainda, na parte norte, o Ribeirão do Torto, que tem como seus principais afluentes os córregos Tortinho e Três Barras, não possui mais um regime hídrico natural, pois está alterado pela presença das barragens de Santa

Maria/Torto. Ele apresenta área predominantemente rural constituída pelo Lago Oeste e a Granja do Torto, contudo, observa-se o cruzamento de áreas urbanas, como o Varjão (Ferrante *et al.*, 2001; CODEPLAN,1994). O valor de $\delta^{15}\text{N}$ desse ribeirão (12,80 ‰) não difere significativamente do $\delta^{15}\text{N}$ do Ribeirão Mestre D'Armas (Tabela 12).

Encontram-se na literatura alguns trabalhos que proporcionam um entendimento da dinâmica isotópica e interferências antrópicas do íon nitrato. Segundo Xue *et al.* (2012), os valores médios de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras de água superficial foram relativamente elevados, e variaram de 15,0 a 19,4‰. Esses valores encontrados foram maiores que valores observados na literatura, correspondentes à áreas agrícolas, da mesma magnitude do trabalho. Já em outro sítio (H) os valores encontrados de $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ variaram de 11.0 a 15.8‰, indicando que era proveniente de esgoto (Xue *et al.*, 2009). Esses valores de razão isotópica encontrados por esses autores tem semelhança aos encontrados no trabalho atual.

O Ribeirão Bananal apresentou um $\delta^{15}\text{N}$ de +2,64‰. Esta área deve ser pouco impactada, pois, segundo Ferrante *et al.* (2001), o Ribeirão Bananal, tem a drenagem situada no Parque Nacional de Brasília, uma área de preservação, sendo o seu curso principal de 19,1km. Já para o para o ponto de coleta próximo da Erminda Dom Bosco, no Lago Paranoá, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ foi de +4,04‰ (Tabela 12), pode estar relacionado a uma contribuição difusa proveniente de diferentes fontes, já que no lago Paranoá desagua uma grande mistura de água provenientes de locais diversos.

Entretanto, nos pontos de coleta Ribeirão Bananal e Erminda Dom Bosco, respectivamente, observou-se uma baixa amplitude do sinal (500 mV e 105 mV), ou seja, abaixo do limite inferior para a linearidade (Tabela 12). Esses dados não contribuem para os resultados das medidas de $\delta^{15}\text{N}$ desses locais, indicando baixa confiabilidade dos mesmos. As baixas amplitudes observadas podem estar relacionadas a baixa concentração de N_2 gerado e detectado pelo FC- EMRI vindo do analisador elementar. Fato este, que pode ter sido ocasionado por algum interferente, uma vez que na amostra da Ermida Dom Bosco apresentou concentração de nitrato de 2,274 mg/L, maior do que o

observado nas amostras Riacho Fundo e Gama, onde o íon nitrato não foi detectado pela cromatografia de íons (Tabela 11). Silva *et al.* (2000) descrevem possíveis interferentes que poderiam ocasionar a perda ou o fracionamento isotópico, sendo eles, os íons Cl^- , SO_4^{2-} e o carbono orgânico dissolvido em concentrações superiores a 200 mg.L⁻¹, 2000 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, respectivamente. Entretanto, nas amostras coletadas para essa pesquisa os valores de Cl^- e SO_4^{2-} foram inferiores à 8 mg/L e a 14mg/L, respectivamente, e o carbono orgânico dissolvido não foi quantificado (Tabela 11).

Portanto, os valores do $\delta^{15}\text{N}$ obtidos para as amostras naturais podem ser considerados nesse estudo de adaptação de metodologia, uma vez que o fracionamento isotópico proveniente do processo de eluição da coluna observado na adaptação do método (variando de cerca de -1,890‰ a -0,987‰ maior do que o valor observado para o sal de KNO_3 (s) = -4,199‰ \pm 0,069‰), não interfere significativamente na interpretação das assinaturas isotópicas obtidas.

Entretanto, para certificar a diferenciação das fontes do íon nitrato recomenda-se a determinação conjunta do $\delta^{15}\text{N}$ e do $\delta^{18}\text{O}$ provenientes do íon nitrato (Fenech *et al.*, 2012), uma vez que a amplitude de $\delta^{18}\text{O}$ corrobora para uma maior separação dos valores relacionados aos tipos de fonte, $\pm 80\%$, do que o $\delta^{15}\text{N}$, $\pm 35\%$.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados, foi possível concluir que a adaptação do método analítico proposto foi adequada pois i) houve êxito na confecção do cartucho de pré-concentração com ausência de escoamento lateral, formações de caminhos preferenciais e bolhas; ii) eficácia no uso do sistema de pré-concentração em linha que permitiu 6 extrações simultâneas, e tem possibilidade de expansão para até 12 extrações devido ao modelo da Bomba peristáltica; iii) fracionamento pouco significativo para as amostras sintéticas, cerca de 1‰; iv) o fracionamento isotópico proveniente do processo de eluição da coluna observado na adaptação do método (variando de cerca de -1,890‰ a -0,987‰ maior do que o valor observado para o sal de KNO_3 (s) = -4,199‰ \pm 0,069‰), não interfere significativamente na interpretação das assinaturas isotópicas obtidas para as amostras naturais dos mananciais do Distrito Federal; v) foi possível quantificar o $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ em amostras naturais com baixa concentração de nitrato.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo foi realizado de forma preliminar, sugerindo-se assim a realização de novos estudos para a obtenção de respostas totalmente conclusivas.

Estudos verificando a interferência de matérias orgânicas e íons dissolvidos aumentaria a robustez do método, visto que as concentrações de nitrato são baixas.

Além disso, para a confirmação dos resultados encontrados no que se refere às fontes de nitrato, trabalhos posteriores poderiam ser realizados com a análise conjunta de isótopos de nitrogênio e oxigênio, pois os resultados podem apresentar margens para dúvidas no que se refere as fontes contaminantes. A combinação de dois métodos, traçadores isotópicos com marcadores químicos, seria uma metodologia mais adequada para determinar se um corpo de água está contaminado e quais seriam as fontes dessa

contaminação (Fenech *et al.*, 2012). Tendo em vista que algumas fontes de nitrato não podem ser diferenciadas, tal como esterco e esgoto, somente pelos valores de $\delta^{15}\text{N}$, o uso de marcadores químicos, tem sido utilizado, bem como a determinação conjunta dos isótopos $\delta^{15}\text{N}$ e do $\delta^{18}\text{O}$ provenientes do íon nitrato (Fenech *et al.*, 2012) e que podem fornecer as seguintes informações:

- i) a separação do isótopo de oxigênio para várias fontes é melhor do que a do isótopo de nitrogênio, com a extensão do $\delta^{18}\text{O}$ por volta de 80‰ enquanto que para o $\delta^{15}\text{N}$ vai até 35%, assim o uso desses dois traçadores permitem melhor compreensão das fontes (Figura 18).
- ii) algumas fontes de nitrato não podem ser identificadas somente pelo $\delta^{15}\text{N}$, pois apresentam valores similares (nitrato de fertilizantes e solo; nitrato de origem atmosférico e de solo), mas podem ser separados quando os valores de $\delta^{18}\text{O}$ do nitrato é adicionado;
- iii) a composição isotópica do oxigênio proveniente do nitrato varia sistematicamente com a composição isotópica do nitrogênio durante a desnitrificação. Assim, em sistemas onde as fonte dominantes de nitratos são diferentes isotopicamente, contribuições de diferentes fontes (em teoria) pode ser determinada ainda que haja uma desnitrificação significativa.

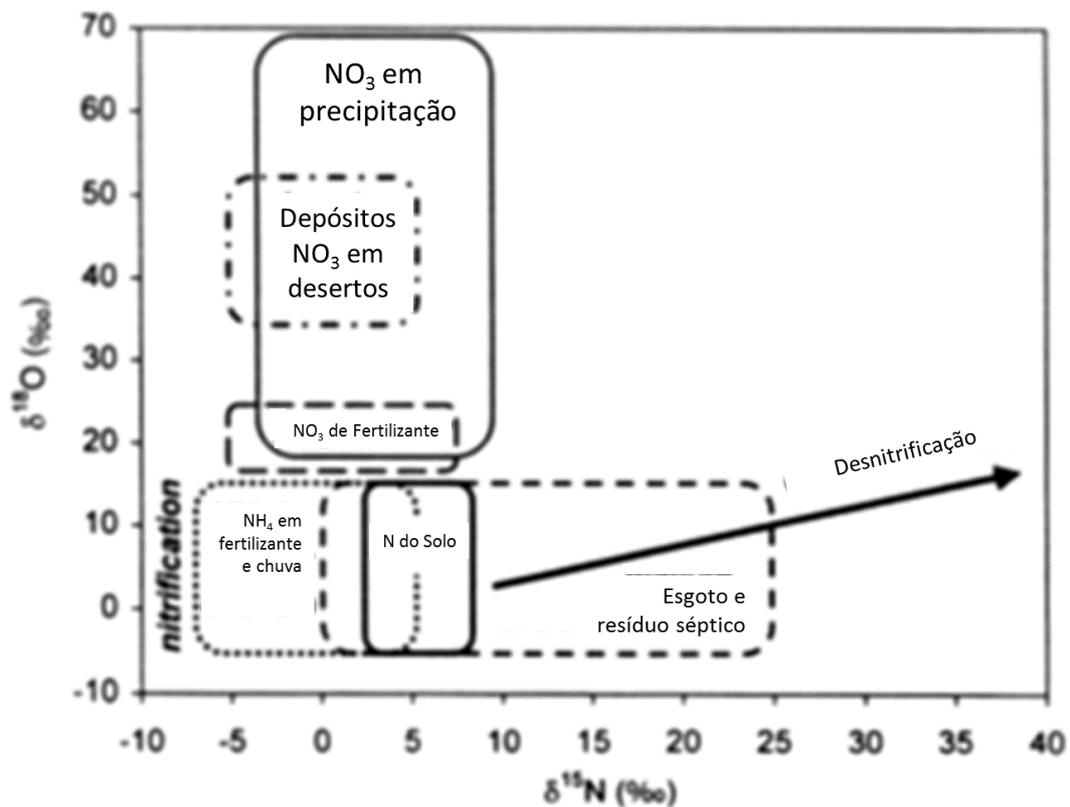


Figura 18 - Descrição geral da variação dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para principais fonte de nitrato (adaptado de Kendall, 1998)

Uma maior amplitude dos pontos de amostragem nos mananciais locais durante os diferentes períodos pluviométricos, da área onde as coletas de água podem ser realizadas, seria interessante, visto que poderia corroborar para resultados mais conclusivos sobre possíveis interferências antrópicas nos mananciais superficiais do Distrito Federal.

Estudar a relação entre os compartimentos terrestre e aquático possibilitaria um melhor entendimento da dinâmica do N e possibilitaria a formação de um banco de dados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(BRASIL), A. N. D. Á. Panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil. Brasília: Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos, 2005. ISBN 85-89629-06-6.

(BRASIL), M. D. S. PORTARIA Nº 2.914. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_2914_12_12_2011.pdf>.

(BRASIL), M. D. S. PORTARIA Nº 2.914. Diário Oficial 2011.

AHN, S. C.; OH, S.-Y.; CHA, D. K. Enhanced reduction of nitrate by zero-valent iron at elevated temperatures. *Journal of Hazardous Materials*, v. 156, n. 1–3, p. 17-22, 8/15/ 2008. ISSN 0304-3894.

ALVES, R. P.; NARDOTO, G. B. DINÂMICA DE NITROGÊNIO EM SISTEMA AGROFLORESTAL NA REGIÃO DE CERRADO (BRASIL CENTRAL). Planaltina - DF: 2012. 66

AMBIENTE, M. D. M. Resolução nº 357. AMBIENTE, M. D. M. Brasília 2005.

ARAVENA, R.; ROBERTSON, W. D. Use of Multiple Isotope Tracers to Evaluate Denitrification in Ground Water: Study of Nitrate from a Large-Flux Septic System Plume. *Ground Water*, v. 36, n. 6, p. 975-982, 1998. ISSN 1745-6584.

AUSTIN, A. T. et al. Environment. Latin America's nitrogen challenge. *Science*, v. 340, n. 6129, p. 149, Apr 12 2013. ISSN 1095-9203

AZEVEDO, J. A. D.; SHIBANO, K.; GOMES, A. C. Comunicado Técnico 82: Análise da Qualidade da Água Utilizada para Irrigação em Algumas Localidades do Distrito Federal. Planaltina, DF, Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2002.

BAIRD, C. Química Ambiental. Bookman. Porto Alegre: 2002. 607 ISBN 85-363-0002-7.

BLANCH, A. R. et al. Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 9, p. 5915-5926, September 1, 2006 2006.

BÖHLKE, J. K. et al. Atomic weights of the elements. *Pure Appl. Chem.*, v. 75, n. 6, p. 683-800, 2003.

BORDELEAU, G. et al. Determination of the origin of groundwater nitrate at an air weapons range using the dual isotope approach. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 98, n. 3–4, p. 97-105, 6/6/ 2008. ISSN 0169-7722.

CARR, G. M.; NEARY, J. P. *Water Quality for Ecosystem and Human Health*. 2008. ISBN 92-95039-51-7.

CASCIOTTI, K. L. et al. Measurement of the Oxygen Isotopic Composition of Nitrate in Seawater and Freshwater Using the Denitrifier Method. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 19, p. 4905-4912, 2002/10/01 2002. ISSN 0003-2700.

CHANG, C. C. Y. et al. Nitrate stable isotopes: tools for determining nitrate sources among different land uses in the Mississippi River Basin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 59, n. 12, p. 1874-1885, 2002/12/01 2002. ISSN 0706-652X.

CHANG, C. C. Y. et al. A method for nitrate collection for $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ analysis from waters with low nitrate concentrations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 56, n. 10, p. 1856-1864, 1999/10/01 1999. ISSN 0706-652X.

CHIRON, N.; GUILLET, R.; DEYDIER, E. Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto a grafted silica: isotherms and kinetic models. *Water Research*, v. 37, n. 13, p. 3079-3086, 7// 2003. ISSN 0043-1354.

CRAVOTTA, C. A. Use of stable isotopes of carbon, nitrogen, and sulfur to identify sources of nitrogen in surface waters in the lower Susquehanna River Basin, Pennsylvania. Washington and Denver CO 1997.

CRISS, R. E. *Principals of Stable Isotope Distribution*. New York: Oxford, 1999.

CURT, M. D. et al. Nitrogen Isotope Ratios of Synthetic and Organic Sources of Nitrate Water Contamination in Spain. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 151, n. 1-4, p. 135-142, 2004/01/01 2004. ISSN 0049-6979.

EDGE, T. A. et al. Experience with the antibiotic resistance analysis and DNA fingerprinting in tracking faecal pollution at two lake beaches. *Water Sci Technol*, v. 56, n. 11, p. 51-8, 2007. ISSN 0273-1223.

FAYCAL, B.; BRUNA, G.; ALBERTO, A. Nutrient Discharge from Rivers to Seas for Year 2000. European Commission, 2009. ISBN 978-92-79-13577-4.

FENECH, C. et al. The potential for a suite of isotope and chemical markers to differentiate sources of nitrate contamination: A review. *Water Research*, v. 46, n. 7, p. 2023-2041, 5/1/ 2012. ISSN 0043-1354.

FERRANTE, J. E. T.; RANCAN, L.; NETTO, P. B. Olhares sobre o lago Paranoá. (SEMARH), S. D. M. A. E. R. H. Brasília, DF: 45-55 p. 2001.

FERRAZ, E. S. D. B. et al. Desvendando Questões Ambientais com Isótopos Estáveis. 2009. 144 ISBN 9788586238857.

FRY, B. *Stable Isotope Ecology*. Springer Book Archives, 2006. ISBN 978-0-387-33745-6.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004/09/01 2004. ISSN 0168-2563.

GALLOWAY, J. N. et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, v. 320, n. 5878, p. 889-892, May 16, 2008 2008.

GARCIA, G.; ALLEN, A. G.; CARDOSO, A. A. Development of a sensitive passive sampler using indigotrisulfonate for the determination of tropospheric ozone. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 12, n. 6, p. 1325-1329, 2010. ISSN 1464-0325.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. D. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. *Química Nova*, v. 36, n. 9, p. 8, 2013.

GLASSMEYER, S. T. et al. Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 14, p. 5157-5169, 2005/07/01 2005. ISSN 0013-936X.

GOURMELON, M. et al. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res*, v. 44, n. 16, p. 4812-24, Sep 2010. ISSN 1879-2448

HEATON, T. H. E. Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: A review. *Chemical Geology: Isotope Geoscience section*, v. 59, n. 21, p. 87-102, // 1986. ISSN 0168-9622.

KELLMAN, L. M.; HILLAIRE-MARCEL, C. Evaluation of nitrogen isotopes as indicators of nitrate contamination sources in an agricultural watershed. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 95, n. 1, p. 87-102, 4// 2003. ISSN 0167-8809.

KENDALL, C.; MCDONNELL, J. J. *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier, 1998.

KENDALL, C.; MCDONNELL, J. J. *Fundamentals in Isotope Geochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1998. 36

LEE, K.-S. et al. Tracing the sources of nitrate in the Han River watershed in Korea, using $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3^-$ values. *Science of The Total Environment*, v. 395, n. 2-3, p. 117-124, 6/1/ 2008. ISSN 0048-9697.

LIU, C. Q. et al. Using delta15N- and delta18O-values to identify nitrate sources in karst ground water, Guiyang, southwest China. *Environ Sci Technol*, v. 40, n. 22, p. 6928-33, Nov 15 2006. ISSN 0013-936X.

LOHSE, K. A. et al. Interactions Between Biogeochemistry and Hydrologic Systems. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 34, n. 1, p. 65-96, 2009.

MARTINS, C. R. et al. Ciclos Globais de Carbono, Nitrogênio e Enxofre: a Importância na Química da Atmosfera. *Quimica Nova*, v. 5, n. 3, p. 28-41, 2003.

MICHENER, R.; LAJTHA, K. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing, 2007.

MIRVISH, S. S. The Significance for Human Health of Nitrate, Nitrite and N-Nitroso Compounds. In: BOGÁRDI, I.;KUZELKA, R., et al (Ed.). *Nitrate Contamination: Springer Berlin Heidelberg*, v.30, 1991. cap. 18, p.253-266. (NATO ASI Series). ISBN 978-3-642-76042-6.

NESTLER, A. et al. Isotopes for improved management of nitrate pollution in aqueous resources: review of surface water field studies. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 18, n. 4, p. 519-533, 2011/05/01 2011. ISSN 0944-1344.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. *Revista Biociências*, v. 13, p. 16-27, 2007.

PETITTA, M. et al. Application of isotopic and geochemical tools for the evaluation of nitrogen cycling in an agricultural basin, the Fucino Plain, Central Italy. *Journal of Hydrology*, v. 372, n. 1–4, p. 124-135, 6/15/ 2009. ISSN 0022-1694.

PIVELI, R. P.; KATO, M. T. *Qualidade das águas e Poluição: Aspectos Físico-Químicos*. São Paulo: 2006. ISBN 85-905897-1-4.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 9, 2004.

ROCKSTROM, J. et al. A safe operating space for humanity. *Nature*, v. 461, n. 7263, p. 472, 2009.

ROGERS, K. M.; NICOLINI, E.; GAUTHIER, V. Identifying source and formation altitudes of nitrates in drinking water from Réunion Island, France, using a multi-isotopic approach. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 138–139, n. 0, p. 93-103, 9// 2012. ISSN 0169-7722.

SCOTT, T. M. et al. Potential Use of a Host Associated Molecular Marker in *Enterococcus faecium* as an Index of Human Fecal Pollution. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 1, p. 283-287, 2005/01/01 2004. ISSN 0013-936X.

SIGMAN, D. M. et al. A Bacterial Method for the Nitrogen Isotopic Analysis of Nitrate in Seawater and Freshwater. *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 17, p. 4145-4153, 2001/09/01 2001. ISSN 0003-2700.

SILVA, S. R. et al. A new method for collection of nitrate from fresh water and the analysis of nitrogen and oxygen isotope ratios. *Journal of Hydrology*, v. 228, n. 1–2, p. 22-36, 2/21/ 2000. ISSN 0022-1694.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistemas Limpos em Linha para a Extração em Fase Solida de Contaminantes Emergentes em Águas Naturais. *Quimica Nova*, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2009.

TORAN, L. ISOTOPES IN GROUND-WATER INVESTIGATIONS. *Ground Water*, v. 20, n. 6, p. 740-745, 1982. ISSN 1745-6584.

TREBS, I. et al. Dry and wet deposition of inorganic nitrogen compounds to a tropical pasture site (Rondônia, Brazil). *Atmos. Chem. Phys.*, v. 6, n. 2, p. 447-469, 2006. ISSN 1680-7324.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. ESTADO DA ARTE DE FIGURAS DE MÉRITO EM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. *Quimica Nova*, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VAN MAANEN, J. M. S. et al. Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicology Letters*, v. 72, n. 1-3, p. 365-374, 6// 1994. ISSN 0378-4274.

XIAO, H. Y.; LIU, C. Q. Sources of nitrogen and sulfur in wet deposition at Guiyang, southwest China. *Atmospheric Environment*, v. 36, n. 33, p. 5121-5130, 11// 2002. ISSN 1352-2310.

XING, M.; LIU, W. An improved method of ion exchange for nitrogen isotope analysis of water nitrate. *Analytica Chimica Acta*, v. 686, n. 1-2, p. 107-114, 2/7/ 2011. ISSN 0003-2670.

XUE, D. et al. Present limitations and future prospects of stable isotope methods for nitrate source identification in surface- and groundwater. *Water Research*, v. 43, n. 5, p. 1159-1170, 3// 2009. ISSN 0043-1354.

YOUNG, T. A. et al. Ab initio and in situ comparison of caffeine, triclosan, and triclocarban as indicators of sewage-derived microbes in surface waters. *Environ Sci Technol*, v. 42, n. 9, p. 3335-40, May 1 2008. ISSN 0013-936X