

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
UTILIZANDO SPE E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM ÁGUA POTÁVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Post Sabin

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
UTILIZANDO SPE E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM ÁGUA POTÁVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Post Sabin

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
UTILIZANDO SPE E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM ÁGUA POTÁVEL**

por

Guilherme Post Sabin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO UTILIZANDO
SPE E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO
DE PESTICIDAS EM ÁGUA POTÁVEL**

elaborada por
Guilherme Post Sabin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Renato Zanella, Dr.
(Presidente/Orientador)**

Profa. Cláudia Alcaraz Zini, Dra. (UFRGS)

**Profa. Martha Bohrer Adaime, Dra. (UFSM)
(Co-orientadora)**

Santa Maria, 05 de setembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Renato Zanella**, pela orientação profissional e grande aprendizado que tive, pelo incentivo, confiança e paciência. Eu te admiro muito! Obrigado por contribuir de forma tão significativa para minha vida.

À **Professora Dra. Martha Bohrer Adaime**, por auxiliar na minha formação, pela co-orientação, pela participação no exame de qualificação e como banca examinadora da defesa da dissertação. Pelo carinho e preocupação, obrigado professora!

À **Dra. Cláudia Alcaraz Zini**, pela sua participação efetiva na avaliação desta dissertação. Obrigado pelo seu grande trabalho!

Aos **Colegas do LARP**, pela receptividade, pelo carinho e pela grande ajuda que recebi neste período. Muito obrigado!

A todos os **Professores da Área de Química Analítica da UFSM**, pela grande contribuição que deram na minha formação como químico analítico. "Foram horas de encanto em sala de aula".

Aos **Funcionários do PPGQ**, em especial ao Ademir e a Valéria, pela simpatia, disposição e competência no atendimento e realizações dos seus trabalhos.

À **Professora Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider**, pelo seu incentivo, por sua ajuda e, sobretudo, por sua amizade.

Ao **Amigo Dr. Marco Flôres Ferrão**, ao qual devo grande parte do gosto que tenho pela química, **Amigo Dr. Wolmar Alípio Severo Filho** por toda a ajuda e disposição ao longo desta caminhada e ao **Amigo Me. Davi Fernando Back** pela colaboração.

Aos demais **Professores e Funcionários da Universidade de Santa Cruz do Sul**, por contribuírem com a minha formação e permanecerem sempre dispostos a me ajudar.

À **Philip Morris Brasil** pela grande oportunidade que tive de crescer profissionalmente. O meu reconhecimento para **Leôncio Lacerda, Manoel Soares, Denise Souza** e em especial à **Carina Kunkel** pelo grande incentivo e oportunidade.

A todos os **Colegas do Laboratório Central de Auditoria da Qualidade**, pela colaboração, amizade e contribuição. Obrigado aos **Colegas Anderson Neves, Deise Penha e Ginter Schwingel**, que muitas vezes me substituíram na minha ausência. Um abraço para **Daniel Malisak**, por todo seu incentivo e colaboração, através do seu trabalho de conclusão.

A **TODA MINHA FAMÍLIA** que sempre foi a base da minha vida e fonte de inspiração. A ela, ofereço o meu esforço, minha dedicação e meu sucesso!

Aos **Padrinhos: Ilo e Eliana; Primos: Leonardo, Mateus e Gabriela**, que me acolheram e incentivaram sendo sempre mais um motivo de alegria em Santa Maria.

Ao meu **Primo Leônidas** pela ajuda e apoio moral e a **Tia Sirlei** pela torcida.

Aos **Avós Sueli e Frederico** pela dedicação, motivação, contribuição e, sobretudo, pelo carinho e o amor que têm por mim. Amo vocês!

Ao meu **Irmão Gustavo** pela sua força e dedicação, pelo seu exemplo de luta e conquista e por tudo que representou na minha vida, obrigado!

À minha **Mãe Juçara**, agradeço por todo seu carinho, por sua atenção, por sua dedicação e pelo amor incondicional. Obrigado, pelo exemplo de vida e luta, pelo papel de mãe e pai. A minha vitória é tua também, te amo!

Ao meu **Pai Ernani** que foi um exemplo de idealismo, caráter, competência e dedicação. Pelo seu amor à vida e à família e por todos os seus ensinamentos. A sua luta não foi em vão! Nunca te esquecerei!

À minha **Filha Renata**, por toda sua preocupação, por todo seu carinho nos momentos difíceis, por sua ajuda, sua compreensão pela minha ausência e pelos meus problemas. O pai te ama muito!

À minha **Esposa Janice**, que sempre acreditou em mim e lutou ao meu lado, me dando força e incentivo para seguir em frente. A todas as dificuldades e expectativas que pude compartilhar contigo e principalmente pelo teu amor e compreensão, te amo para sempre!

O verdadeiro homem é aquele que tem um ideal e luta por ele até o fim

Esta conquista é dedicada aos meus pais e irmão pelo exemplo de vida e luta, aos meus avós pela dedicação incondicional e para minha esposa e minha filha pelo amor e compreensão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO UTILIZANDO SPE E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM ÁGUA POTÁVEL

AUTOR: GUILHERME POST SABIN
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de Setembro de 2007.

A contaminação dos recursos hídricos tem causado grande impacto para o meio ambiente. No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria 518 define parâmetros de potabilidade, entre eles, os limites máximos permitidos para uma série de pesticidas. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para a determinação de pesticidas em água potável, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com monitoramento seletivo de íons (GC-MS-SIM). Na separação cromatográfica foi utilizada coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com tempo total de análise inferior a 30 min. Devido ao nível de concentração exigido na determinação de alguns pesticidas, na ordem de ng L^{-1} , foi necessário atingir um fator de concentração de 400 vezes, obtido através de extração em fase sólida (SPE). Após uma avaliação inicial com diferentes sorventes e solventes foi selecionado o cartucho Strata X[®] de 30 mg/3 mL e diclorometano para eluição. Durante o desenvolvimento do método foram realizadas otimizações utilizando modelos fatoriais para avaliação de efeitos de variáveis pertinentes à sensibilidade e à etapa de extração. A validação do método envolveu todos os parâmetros usuais de validação interna, incluindo limites de detecção e quantificação, precisão (precisão instrumental, repetitividade e precisão

intermediária), exatidão (recuperação), linearidade, seletividade, robustez, incerteza de medição, limite prático de reportagem e faixa de trabalho. Os resultados obtidos apresentaram limites de quantificação instrumental entre 1 e 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de reportagem do método entre 0,003 e 0,093 $\mu\text{g L}^{-1}$, atendendo aos limites da legislação. Apenas três compostos apresentaram recuperações inferiores a 50% (hexaclorobenzeno, aldrin e permetrina). Os demais apresentaram recuperações médias entre 51 e 116%. Embora a natureza química diferenciada dos pesticidas analisados dificulte uma boa recuperação para a totalidade dos compostos avaliados, as precisões intermediárias garantiram excelentes resultados estando bem abaixo da curva de Horwitz. Fatores de correlação entre padrões de substituição e pesticidas permitem a correção de valores de recuperação em amostras, fornecendo resultados mais exatos. No estudo de robustez, o método demonstrou ser consistente à mudanças externas devendo ser tomada uma atenção especial para a etapa de evaporação do solvente antes da redissolução. Através da estimativa de incerteza foi possível verificar que as principais fontes são as repetitividades, as evaporações e a turbidez da amostra. As análises em amostras reais satisfizeram os critérios de qualificação instrumental e avaliação de adequação do sistema. A seletividade do método foi considerada adequada e avaliada através da recuperação relativa de íons de quantificação e qualificação. O método foi considerado adequado para o uso pretendido e em conformidade com a qualidade exigida para norma ISO IEC 17025.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD USING SPE AND GC-MS FOR THE MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN DRINKING WATER

AUTHOR: GUILHERME POST SABIN
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Place and Date: September 5, 2007, Santa Maria

The water resources contamination has caused great environmental impact worldwide. In Brazil, the Ministry of Health through the Law 518 defines potability parameters, between them, the maximum limits for a list of pesticides. In this work it was developed and validated a method for a pesticide determination in drinking water using gas chromatography coupled with mass spectrometry in selective ion monitoring mode (GC-MS-SIM). In the chromatographic separation a HP-5MS (30 m x 0.25 mm id x 0.25 μ m) column was used, with a total analysis time below 30 min. In agreement of the concentration level demanded in the determination of some pesticides, in the ng L⁻¹ order, a concentration factor of 400 times was necessary, carried through a solid phase extraction (SPE). After an initial evaluation with different sorbents and solvents, the cartridge Strata X[®] of 30 mg/3 mL and dichloromethane for the elution were selected. During the method development, optimizations were carried out through factorial models for evaluation of variable effects to the sensitivity and the extraction step. The method validation involved all the usual parameters of internal validation including detection and quantification limits, precision (instrumental precision, repeatability and intermediate precision),

accuracy (recovery), linearity, selectivity, robustness, uncertainty of measurement, practical reporting limit and range of application. The gotten results had presented limits of instrumental quantification between 1 and 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ and method reporting limits between 0.003 and 0.093 $\mu\text{g L}^{-1}$, attending the legislation limits. Only three compounds had presented recoveries below 50% (hexachlorobenzene, aldrin and permethrin). The others presented average recoveries between 51 and 116%. Although the differentiated chemical nature of the analyzed pesticides becomes difficult a good recovery for all the evaluated compounds, the intermediate precisions had guaranteed excellent results being well below of the Horwitz curve. Correlation factors between surrogate standards and pesticides allow the correction of recovery values in the samples, supplying more accurate results. In the robustness study, the method demonstrated to be consistent to external changes having to be taken a special attention to be solvent evaporation step before redissolution. Through the uncertainty estimate was possible to verify that the main sources are the repeatability, the evaporations and the sample turbidity. The analyses in real samples had satisfied the criteria of instrumental qualification and system suitability. The method selectivity has been considered in agreement and evaluated through the relative recovery of quantification and qualification ions. The method has been considered fitness for purpose and in compliance with the quality demanded by the ISO IEC 17025.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 –	Agrotóxicos controlados pela Portaria 518.....	7
Tabela 2 –	Identificação do grupo de compostos selecionados.....	8
Tabela 3 –	Propriedades físico-químicas do grupo de compostos selecionados.....	11
Tabela 4 –	Interpretação das propriedades físico-químicas.....	12
Tabela 5 –	Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas em água.....	43
Tabela 6 –	Teste de Youden para avaliação de robustez.....	74
Tabela 7 –	Padrões utilizados nos estudos.....	82
Tabela 8 –	Soluções estoques e de redissolução.....	84
Tabela 9 –	Soluções para estudo de validação.....	84
Tabela 10 –	Janelas de retenção e íons de monitoramento.....	91
Tabela 11 –	Modelo de Youden para estudos sensibilidade em GC-MS.....	92
Tabela 12 –	Planejamento experimental para otimização de injeção.....	93
Tabela 13 –	Preparo das soluções padrões de fortificações.....	94
Tabela 14 –	Preparo das soluções padrões de recuperações.....	96
Tabela 15 –	Qualificação da instrumentação e critérios de aceitação.....	98
Tabela 16 –	Modelo experimental para estudo de robustez	102
Tabela 17 –	Controle de qualidade em ensaios de rotina.....	103
Tabela 18 –	Condições otimizadas do sistema GC-MS.....	105
Tabela 19 –	Parâmetros cromatográficos.....	109
Tabela 20 –	Resultados normalizados dos efeitos em GC-MS.....	110
Tabela 21 –	Resumo dos resultados de otimização de injeção.....	111
Tabela 22 –	Estudos preliminares de SPE.....	113
Tabela 23 –	Resultados de qualificação instrumental.....	114
Tabela 24 –	Funções analíticas.....	115
Tabela 25 –	Diferença percentual da recuperação obtida empregando o íon de quantificação e o íon de qualificação.....	116

Tabela 26 – Limites de detecção e limite de quantificação instrumental.....	117
Tabela 27 – Precisão instrumental.....	119
Tabela 28 – Resultados de precisão e exatidão para fortificação F1 (0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	120
Tabela 29 – Resultados de precisão e exatidão do método para o nível de fortificação F3 (0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	121
Tabela 30 – Estudo de robustez da SPE - teste de Youden.....	124
Tabela 31 – Matriz de correlação entre os padrões de substituição e pesticidas.....	126
Tabela 32 – Incerteza de medição e contribuição relativa das principais fontes de incerteza.....	128
Tabela 33 – Limite prático de reportagem.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de extração em fase sólida (SPE).....	22
Figura 2 –	Curva de van Deemter.....	31
Figura 3 –	Efeito de difusão longitudinal.....	32
Figura 4 –	Efeito de transferência de massa.....	33
Figura 5 –	Efeito de caminhos múltiplos.....	33
Figura 6 –	Relação estatística do pico cromatográfico.....	34
Figura 7 –	Representação gráfica da resolução.....	35
Figura 8 –	Esquema de um analisador de massas quadrupolar.....	38
Figura 9 –	Esquema de injeção no modo <i>pulsed splitless</i>	40
Figura 10 –	Efeitos da espessura do filme e diâmetro da coluna cromatográfica sobre a eficiência da separação.....	41
Figura 11 –	Relação entre satisfação e esforço.....	50
Figura 12 –	Relação entre as medidas de qualidade.....	51
Figura 13 –	Representação gráfica entre os métodos de calibração.....	57
Figura 14 –	Determinação gráfica da linearidade e da faixa dinâmica.....	60
Figura 15 –	Gráfico da razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica.....	61
Figura 16 –	Inter-relação entre precisão e exatidão.....	62
Figura 17 –	Trombeta de Horwitz para CV_R	66
Figura 18 –	Conceitos de LC e LD em função da frequência e magnitude dos resultados.....	70
Figura 19 –	LQ por inspeção.....	72
Figura 20 –	Concentração mínima de reportagem.....	73
Figura 21 –	Processo de estimativa da incerteza.....	76
Figura 22 –	Diagrama de Ishikawa para determinação de pesticidas em água.....	101
Figura 23 –	Gráfico de temperatura do forno da coluna <i>versus</i> tempo de retenção.....	106

Figura 24 –	Primeiro e segundo estágios de temperatura.....	107
Figura 25 –	Terceiro estágio de temperatura.....	107
Figura 26 –	Quarto estágio de temperatura.....	108
Figura 27 –	Quinto estágio de temperatura.....	108
Figura 28 –	Efeito da voltagem da multiplicadora de elétrons.....	110
Figura 29 –	Modelos quadráticos gerados na otimização do sistema de injeção.....	111
Figura 30 –	Gráfico da intensidade de sinal <i>versus</i> volume de gás.....	112
Figura 31 –	Sobreposição dos cromatogramas do grupo de pesticidas nos níveis de concentração R1, R2 e R3.....	118
Figura 32 –	Comparativo de recuperações por nível de fortificação.....	122
Figura 33 –	Análise exploratória do conjunto de pesticidas.....	123
Figura 34 –	Representação multivariada do estudo de robustez.....	125
Figura 35 –	Planilha de cálculos para incerteza de medição.....	127
Figura 36 –	Sobreposição de cromatogramas de amostras reais e padrão....	131

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

μ - velocidade linear ótima

a - coeficiente angular

α - fator de separação

ABIQUIM - Associação Brasileira da Indústria Química

AcEt - acetato de etila

ACN - acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b - coeficiente linear

C18 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CORSAN - Companhia Riograndense de Saneamento

CV - coeficiente de variação

DCM - diclorometano

DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

ECD - detector por captura de elétrons, do inglês *electron-capture detector*

EEC - Comissão Ambiental Européia, em inglês *European Environmental Commission*

EI - impacto de elétrons, do inglês *electron impact*

eV - elétron volt

EM – multiplicadora de elétrons, do inglês *electron multiplier*

ETA - estação de tratamento de água

F – convencionado para soluções de fortificação

GARP - Associação Grupo Analista de Resíduos de Pesticidas

GC – cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

GC-MS - cromatografia gasosa - espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*

GLP - boas práticas de laboratório, do inglês *good laboratory practice*

H - altura equivalente a um prato teórico

H¹- constante de Henry

HCB - hexaclorobenzeno

HP-1 – designação de marca comercial de coluna capilar com 100% silicone

HP-5, DB-5, VF-5 - designação de marca comercial de colunas capilares com 5% fenil e 95%

- silicone
- HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
- IC - intervalo de confiança
- ICH - Conferência Internacional para Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonization*
- ID - diâmetro interno, do inglês *internal diameter*
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia
- ISO - Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- k - fator de retenção, constante de reação, ou constante de distribuição
- K - fator de abrangência
- K_{oc} - coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo
- K_{ow} - coeficiente de partição octanol-água
- L – comprimento
- LC – cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*
- LD - limite de detecção
- LLE - extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*
- LPME - micro extração em fase líquida, do inglês *liquid phase micro extraction*
- LQ - limite de quantificação
- LR - limite de reportagem
- m – massa
- m/m - massa por massa
- MeOH - metanol
- MS - espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
- MS - Ministério da Saúde
- N - eficiência
- n - número de medidas
- N_2 – nitrogênio
- N_{eff} - eficiência efetiva
- OECD - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*
- P – convencionado para soluções padrões

Pa – Pascal

PCA - análise de componentes principais, do inglês *principals components analysis*

PCF - pentaclorofenol

PFTBA - fluortribtilamina

PI - padrão interno

PIB - produto interno bruto

PS-DVB - copolímero de estireno divinilbenzeno

PTFE - politetrafluoretileno

QA - garantia da qualidade, em inglês *quality assurance*

QC - controle da qualidade, em inglês *quality control*

R - constante dos gases

R – convencionado para soluções de recuperação

r - limite da repetitividade

R - limite da reprodutibilidade

R – recuperação

r^2 ou R^2 - coeficiente de determinação

RP - fase reversa, do inglês *reversed phase*

Rs – resolução

RSD - desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

RSDpi - desvio padrão relativo para precisão Intermediária

RSDr - desvio padrão relativo para repetitividade

s - estimativa do desvio padrão absoluto

SBSE - extração por barras sortivas, em inglês *Stir Bar Solid Extration*

SCAN - modo de varredura

SDVB - estireno divinilbenzeno, do inglês *styrene divinylbenzene*

SIM - monitoramento do íon selecionado, do inglês *selected ion monitoring*

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola.

SPE - extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SPME - micro extração em fase sólida, do inglês *solid phase micro extraction*

S_r - desvio padrão dos resíduos, ou desvio padrão em condições de repetitividade

SR - solução de redissolução

t - valor associado ao teste de Student

t'_R - tempo de retenção ajustado

t_M - tempo de retenção do analito não retido

t_R - tempo de retenção

U - incerteza expandida

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *Environmental Protection Agency of United States*

UT - unidade de turbidez

v/v - volume por volume

V_{eff} - graus de liberdade efetivo

VMP - valor máximo permitido

V_R - volume de retenção

V_T - volume total do insensor

W_b - largura do pico na base

W_h - largura do pico a meia altura

x - concentração

x_i - valores individuais

X_m - média de medidas em réplicas

y - sinal do instrumento

Z - número de desvio padrão de uma distribuição normal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pesticidas.....	4
2.2 Legislação - Portaria 518 (MS).....	6
2.3 Análise de água potável visando à determinação de pesticidas.....	7
2.3.1 Matriz da amostra.....	7
2.3.2 Propriedades dos analitos.....	8
2.4 Análise de pesticidas na atualidade.....	12
2.5 Etapas do processo analítico.....	15
2.5.1 Amostragem e estocagem da amostra.....	15
2.5.2 Preparo da amostra.....	16
2.5.2.1 Fundamentos da extração.....	16
2.5.2.2 Técnicas de extração e pré-concentração.....	18
2.5.2.2.1 Extração em fase sólida (SPE).....	19
2.5.2.3 Aplicação de técnicas de extração.....	24
2.6 Técnicas cromatográficas.....	25
2.6.1 Cromatografia gasosa.....	27
2.6.1.1 Teoria básica.....	27
2.6.1.2 Tempo de retenção.....	27
2.6.1.3 Eficiência.....	29
2.6.1.4 Resolução.....	34

2.7 Espectrometria de massas.....	35
2.7.1 Fundamentos da espectrometria de massas.....	36
2.7.2 Analisador de quadrupolo.....	37
2.7.3 Modos de operação.....	38
2.7.4 Desenvolvimento e otimização de métodos em GC-MS.....	39
2.7.5 Aplicações em análise de pesticidas com amostras aquosas.....	42
2.8 Validação.....	48
2.8.1 Definições.....	48
2.8.2 Contextualização.....	49
2.8.3 Medidas de qualidade.....	51
2.8.3.1 Qualificação da instrumentação.....	51
2.8.3.2 Validação do método.....	52
2.8.3.2.1 Especificidade e seletividade.....	53
2.8.3.2.2 Curva de calibração, linearidade e faixa de aplicação.....	56
2.8.3.2.3 Precisão e exatidão.....	61
2.8.3.2.4 Limite de detecção, limite de quantificação e nível mínimo de reportagem.....	69
2.8.3.2.5 Robustez.....	74
2.8.3.2.6 Incerteza de medição.....	75
2.8.3.3 Adequação do sistema.....	77
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
3.1 Instrumentação, materiais e vidrarias.....	80
3.2 Solventes, padrões e amostras.....	81
3.3 Preparo de soluções analíticas.....	83
3.3.1 Soluções estoque da mistura de padrões.....	83

3.3.2 Solução estoque do padrão interno (PI).....	83
3.3.3 Solução de redissolução (SR).....	83
3.3.4 Soluções para estudo de linearidade (P1-P10).....	84
3.4 Desenvolvimento e otimização do sistema GC-MS.....	85
3.4.1 Parâmetros de separação.....	85
3.4.1.1 Escolha da coluna.....	85
3.4.1.2 Qualidade e vazão do gás de arraste.....	86
3.4.1.3 Programação de temperatura do forno.....	86
3.4.2 Parâmetros de injeção.....	87
3.4.2.1 Solvente.....	87
3.4.2.2 Pressão do injetor.....	88
3.4.2.3 Temperatura do injetor.....	88
3.4.2.4 Tipo de insersor.....	88
3.4.2.5 Tipo de septo.....	89
3.4.2.6 Volume de injeção.....	89
3.4.3 Parâmetros de detecção.....	89
3.4.3.1 Temperatura da linha de transferência.....	89
3.4.3.2 Sintonia das massas.....	89
3.4.3.3 Parâmetros de varreduras.....	90
3.4.3.4 Seleção de íons.....	90
3.4.3.5 Multiplicadora de elétrons.....	91
3.4.4 Modelo de Planckett-Burman para estudo de efeitos em GC-MS.....	92
3.4.5 Otimização do sistema de injeção.....	92
3.5 Estudo de recuperação.....	94
3.5.1 Preparo das soluções de fortificação.....	94

3.5.1.1 Solução do padrão de substituição.....	94
3.5.1.2 Solução de fortificação (F1).....	95
3.5.1.3 Solução de fortificação (F2).....	95
3.5.1.4 Solução de fortificação (F3).....	95
3.5.2 Preparo das soluções de recuperação.....	95
3.5.3 Desenvolvimento do procedimento de SPE.....	96
3.5.3.1 Pré-concentração em SPE.....	97
3.6 Validação e garantia da qualidade.....	98
3.6.1 Validação do equipamento.....	98
3.6.2 Validação do método.....	98
3.6.2.1 Função analítica e linearidade.....	99
3.6.2.2 Seletividade.....	99
3.6.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	99
3.6.2.4 Precisão instrumental.....	100
3.6.2.5 Repetitividade e precisão intermediária.....	100
3.6.2.6 Exatidão (recuperação).....	101
3.6.2.7 Estimativa de incerteza.....	101
3.6.2.8 Robustez.....	102
3.6.2.9 Limite prático de reportagem e faixa de aplicação.....	102
3.6.3 Adequação do sistema.....	103
3.7 Aplicação do método em amostras reais.....	104
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
4.1 Otimização do sistema GC-MS.....	105
4.1.1 Otimização do processo de separação.....	106
4.1.2 Parâmetros de injeção e detecção.....	110

4.2 Otimização do procedimento SPE.....	113
4.3 Validação e garantia da qualidade.....	113
4.3.1 Validação do equipamento.....	114
4.3.2 Validação do método.....	114
4.3.2.1 Função analítica e linearidade.....	114
4.3.2.2 Seletividade.....	116
4.3.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	117
4.3.2.4 Precisão instrumental.....	119
4.3.2.5 Repetitividade, precisão intermediária e exatidão (recuperação).....	119
4.3.2.6 Robustez.....	123
4.3.2.7 Estimativa de incerteza.....	126
4.3.2.8 Limite prático de reportagem e faixa de aplicação.....	130
4.4 Aplicação do método em amostras reais e Adequação do sistema.	130
5 CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a necessidade pelo aumento da produção alimentícia tem sido uma realidade mundial. Para que os produtos sejam gerados em grandes quantidades com preços competitivos, exigência de um mundo globalizado, é necessária à busca pelo desenvolvimento da ciência e tecnologia.

Neste sentido, a química orgânica tem exercido um grande papel no desenvolvimento de novos agroquímicos, cada vez mais efetivos e seletivos a um determinado grupo de pragas. Os novos produtos apresentam eficácia em concentrações cada vez menores, mas seus efeitos residuais geram grandes preocupações ambientais, representando atualmente um problema analítico em concentrações na faixa de ng L^{-1} .

Assim, a química analítica, uma ciência autônoma representada por profissionais altamente qualificados, é capaz de desenvolver estratégias analíticas utilizando-se dos princípios físicos e químicos presentes em diversas técnicas instrumentais. A busca por informações analíticas qualificadas de amostras ambientais é responsabilidade do químico com formação analítica.

Atualmente, a análise de ultra-traços é o estado da arte em química analítica, devido à necessidade da comunidade científica atender às novas demandas dos vários setores industriais, das novas regulamentações oficiais, e principalmente da pressão social. Os desafios presentes nas determinações em concentrações incrivelmente baixas têm sido um dos temas mais abordados nos últimos anos.

A necessidade de determinações em quantidades extremamente baixas de substâncias alvo em matrizes específicas, com rapidez e economicidade, tende a crescer em volume e diversidade à medida que há um desenvolvimento tecnológico e aumento de riscos ambientais. Aliado a isso, o poder da informação analítica de qualidade em conformidade com as políticas de "Garantia da Qualidade" tem sido uma prática de grande investimento por parte do setor industrial e órgãos governamentais. Assim, a valorização do químico analítico torna-se uma realidade promissora. O dever social deste profissional está associado a diversas áreas de atuação, entre elas, a química ambiental. A preocupação crescente com a preservação do meio ambiente devido à diminuição da disponibilidade dos recursos

naturais, principalmente de água potável, tem sido amplamente discutida e regulamentada. No Brasil, o ministério do meio ambiente, através do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, dispõe da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 que regulamenta as disposições dos corpos d'água e estabelece condições para lançamento de efluentes.

Especificamente sobre a qualidade da água de consumo público, o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, incluindo limites para resíduos de agrotóxicos. De acordo com essa Portaria, torna-se obrigatória o cumprimento do seu conteúdo em todo território nacional.

Para atender à legislação brasileira, é essencial a busca por métodos analíticos que apresentem elevada sensibilidade e seletividade, grande rapidez e produtividade em laboratório, e sem dúvida, alto nível de confiabilidade.

Os métodos oficiais de análise de pesticidas têm sido propostos a partir de métodos padrão de órgãos internacionais, como por exemplo, utilizados pela agência de proteção ambiental americana. No entanto, os métodos atuais são direcionados a determinados grupos de substâncias com propriedades analíticas semelhantes, fornecendo assim, diversas soluções genéricas para problemas ambientais específicos. As principais diferenças destas metodologias podem ocorrer por conta das técnicas de extração (extrações líquido-líquido e extrações em fase sólida), das técnicas de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa) e das técnicas de detecção que contribuem de forma importante para a sensibilidade e seletividade do método. Desta forma, a implementação de métodos oficiais para a análise dos compostos da Portaria 518, tem alto custo/benefício, alta diversidade instrumental, elevado tempo de análise e maior consumo de reagentes.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia analítica para determinação unificada de multirresíduo dos pesticidas presentes na Portaria 518. Para isso, foi preciso levar em consideração vários fatores, como a polaridade dos compostos para a escolha do método mais adequado de extração, a volatilidade/estabilidade para escolha das condições cromatográficas e as propriedades de detecção dos analitos para uma boa resposta instrumental.

Após um estudo detalhado das propriedades físico-químicas dos analitos e dos princípios nos quais estão baseadas as diversas técnicas instrumentais, foi traçada uma estratégia analítica com a intenção de atender os limites estipulados pela legislação vigente, com menor custo e tempo possível e alto nível de confiabilidade analítica.

Neste sentido, algumas necessidades surgiram: a escolha de uma técnica de extração e pré-concentração para compostos de uma ampla faixa de polaridade; uma técnica de separação com alta eficiência permitindo análises rápidas e conseqüentemente, maior produtividade para o laboratório; e uma técnica de detecção com boa sensibilidade e seletividade para os compostos do escopo.

Para a preparação da amostra, técnicas como extração líquido-líquido e micro extração em fase sólida apresentam desvantagens quando comparadas à extração em fase sólida. Na primeira, o processo de partição é dificultado devido às polaridades dos analitos, o que exigiria várias etapas de extração para uma boa pré-concentração. Na segunda, também considerada uma técnica de equilíbrio, a robustez da extração é prejudicada frente às mudanças de matriz da mostra, como por exemplo, a força iônica e principalmente a quantidade de material particulado em suspensão. Assim, a técnica de extração em fase sólida foi a mais indicada, pois permite bons níveis de recuperação, boa robustez e excelente fator de pré-concentração.

Na análise instrumental, um método único utilizando cromatografia líquida seria pouco promissor devido aos custos e tempos de análises, elevados. Desta forma, a cromatografia gasosa capilar foi escolhida pela eficiência, possibilitando separações de um grande número de compostos em tempos de análises adequados. A detecção por espectrometria de massas, operando pelo modo de monitoramento seletivo de íons, garante bons níveis de sensibilidade e seletividade analítica, substituindo detectores seletivos como de nitrogênio e fósforo e captura de elétrons.

Após o desenvolvimento do método, foi realizada a validação em três níveis de abrangência: qualificação instrumental, validação do método e adequação do sistema. A qualidade da informação foi garantida através da estimativa da incerteza de medição e robustez do método.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas

A terminologia atribuída a compostos químicos empregados no controle de pragas que atacam a produção agrícola tem gerado discussões e controvérsias. O uso da palavra pesticida tem sido amplamente difundido entre os povos de língua portuguesa e o vocabulário equivalente “*pesticide*” é usual na língua inglesa. No entanto, LARINI (1999) considera o termo inadequado, pois literalmente é algo que tem o poder de destruir a peste, ou seja, qualquer doença epidêmica grave, trazendo uma conotação mais de doença do que de praga. Devido a estas razões, sugere o uso do termo praguicida. Outros termos bastante comuns entre fabricantes ou fornecedores são defensivos agrícolas e agroquímicos, ambos com sentido bem mais amplo e menos “agressivo” à opinião pública (SINDAG, 2007).

Em citação, a legislação brasileira através da lei 7802 de 1989 define:

Agrotóxicos e afins: produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2007).

Desconsiderando-se o rigor das definições acima, nesta dissertação faz-se o uso de qualquer um dos termos citados, assumindo para os mesmos, significados equivalentes.

Definições a parte, uma breve retrospectiva nos traz registros da utilização de agrotóxicos desde 1000 anos antes de Cristo, onde Homero, na Grécia antiga escreveu sobre o uso de enxofre elementar no controle de pestes agrícolas. Desde então, diversos outros relatos de compostos inorgânicos surgiram até a descoberta das propriedades inseticidas do DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano por Paul Muller na Basileia, Suíça em 1939, embora Othmar Zeidler tenha sido o primeiro a sintetizar o DDT em 1873, com outros objetivos. A importância do DDT no combate de uma enormidade de vetores de doenças, bem como pragas que atacavam lavouras e animais rendeu a Paul Muller o prêmio Nobel de medicina em 1948 e este

composto é considerado um marco na metodologia de controle de pragas (RIOS DO BRASIL, 2002; LARINI, 1999).

Assim, este novo período marcado pela Segunda Grande Guerra revolucionou a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos orgânicos com propriedades praguicidas. Atualmente, existem mais de 1100 nomes usuais de pesticidas aprovados pela ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*, sendo divididos em 24 grandes grupos e subdivididos em inúmeras classes químicas, evidenciando a busca por especificidade no combate a organismos nocivos para a produção econômica e saúde pública. As informações oficiais sobre nomenclatura e classificação de pesticidas devem estar de acordo com a ISO 1750, que foi estabelecida com o objetivo de guiar a comercialização e as publicações científicas e populares em todo o mundo (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2007).

Para um melhor entendimento, a classificação dos praguicidas é geralmente relacionada com os organismos vivos envolvidos em sua aplicação e sua estrutura química. Neste contexto, existem grupos de inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas entre outros. Estes grupos são subdivididos de acordo com suas funções químicas podendo ser, por exemplo, inseticidas organoclorados, inseticidas organofosforados, inseticidas carbamatos, etc. (LARINI, 1999).

Após esta rápida introdução conceitual e histórica do desenvolvimento de pesticidas é importante registrar a enorme importância que estes compostos têm exercido no modelo de produção atual. A aplicação de defensivos agrícolas age diretamente no aumento da produção de alimentos e na diminuição de custos de produção e mão-de-obra. Além disso, os pesticidas podem atuar de forma decisiva no combate a epidemias como malária, dengue e outras doenças transmitidas por insetos (MARTINS, 2004).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Química, o Brasil apresentou um faturamento de 72 bilhões de dólares em 2005, ocupando a nona posição da indústria química mundial, contribuindo com 3,5% do PIB – Produto Interno Bruto, brasileiro. Deste faturamento, 4,0 bilhões de dólares foram contribuições da produção de defensivos agrícolas (ABIQUIM, 2007).

De acordo com GALLI et al. (2006), dados estatísticos recentes mostram que a produção mundial de pesticidas cresce intensamente ano a ano, colocando o

Brasil como o oitavo maior consumidor do mundo. Somente no ano de 2003, nosso país lançou ao meio ambiente 160,1 mil toneladas de agroquímicos.

Embora seja evidente a importância de agrotóxicos no sistema produtivo, sua aplicação pode gerar grandes problemas para saúde e meio ambiente. Os pesticidas são tóxicos, podendo ser carcinogênicos, mutagênicos e mimetizadores de hormônios; são aplicados em grandes quantidades, em áreas bastante extensas, e geralmente possuem persistência no meio ambiente. A Organização Mundial da Saúde calcula em 20 mil o número anual de óbitos em consequência da manipulação, inalação e consumo indireto de pesticidas, a maioria em países de terceiro mundo (MARTINS, 2004; CRQ-V, 2006).

Desta forma, a contaminação de recursos hídricos que outrora foi subestimada, tanto para águas subterrâneas como para águas de superfície, hoje representa uma preocupação ambiental presente devido aos novos compostos com maior solubilidade em água, como por exemplo, os herbicidas (MARTINS, 2004). Assim, novas políticas foram criadas para reduzir a contaminação hídrica e limites legais foram estabelecidos por órgãos internacionais como a US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *Environmental Protection Agency* e EEC – Comissão Ambiental Européia, em inglês, *European Environmental Commission* (US EPA, 2006; EEC, 2006).

No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente através da Resolução nº 357 estabelece condições para lançamento de efluentes, enquanto o Ministério da Saúde, através da Portaria 518, estabelece o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e obriga o cumprimento do seu conteúdo em todo território nacional (CONAMA, 2005; MS, 2004).

Novas iniciativas, como a criação da Câmara de Agrotóxicos do Conselho Regional de Química da 5ª Região em 2006, reforçam também a importância de estudos no âmbito da química analítica ambiental na região (CRQ-V, 2006).

2.2 Legislação - Portaria 518 (MS)

A Portaria 518, de 25 de Março de 2004, de autoria do Ministério da Saúde dispõe sobre procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano.

Os padrões de potabilidade abrangem uma série de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos. No artigo 14, a norma relaciona um conjunto de substâncias químicas que representam risco à saúde. A Tabela 1 mostra o conjunto de agrotóxicos e seus VMP - Valores Máximos Permitidos, previstos pela Portaria 518.

Tabela 1 – Agrotóxicos controlados pela Portaria 518

AGROTÓXICOS	Valor Máximo Permitido (VMP), $\mu\text{g L}^{-1}$
Alaclor	20,0
Aldrin e Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Bentazona	300
Clordano (isômeros)	0,2
2,4 D	30
DDT (isômeros)	2
Endossulfan	20
Endrin	0,6
Glifosato	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	0,03
Hexaclorobenzeno	1
Lindano (γ -BHC)	2
Metolacloro	10
Metoxicloro	20
Molinato	6
Pendimetalina	20
Pentaclorofenol	9
Permetrina	20
Propanil	20
Simazina	2
Trifluralina	20

Fonte: MS, Portaria 518 (2005)

2.3 Análise de água potável visando à determinação de pesticidas

Ao definir uma estratégia analítica para determinação de pesticidas é importante observar não somente as propriedades dos analitos, mas também as características da matriz da amostra, neste caso, água potável.

2.3.1 Matriz da amostra

A legislação brasileira define água potável como: “água para consumo humano, cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereçam riscos à saúde.” Esta definição é rigorosamente sustentada por uma diversidade de parâmetros que, se atendidos, caracterizam a potabilidade de uma amostra de água (MS, 2004).

Segundo o MS – Ministério da Saúde (2004) por meio da Portaria 518, a turbidez é um importante parâmetro para garantir a qualidade da água, tendo como limite 5 UT e devendo estar abaixo de 1 UT em mais de 95% das amostras. Em análise de pesticidas, a turbidez (parâmetro indicativo de material particulado em suspensão), está associada à carga de matriz da amostra aceitável dentro dos padrões de potabilidade.

Outro parâmetro importante é o pH, que deve estar entre 6,0 e 9,5, já que é conhecido seu efeito no deslocamento do equilíbrio químico em processos de extração (MS, 2004). Assim, amostras nestas condições podem ser consideradas aptas para as análises de pesticidas previstas na legislação.

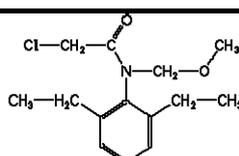
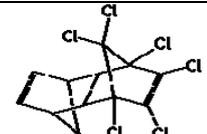
2.3.2 Propriedades dos analitos

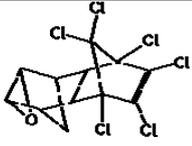
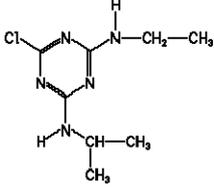
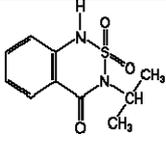
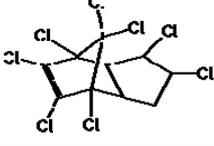
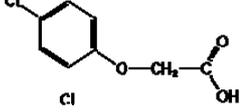
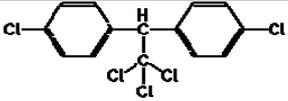
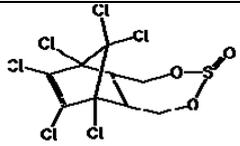
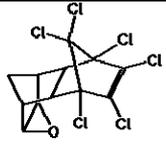
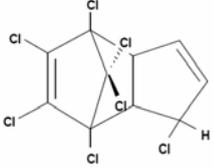
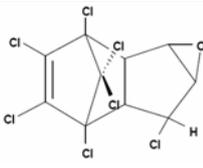
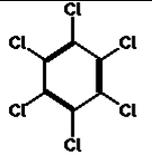
Os compostos relacionados neste estudo foram escolhidos com base na necessidade do monitoramento de água para consumo humano e cumprimento da legislação vigente. Este grupo de agrotóxicos apresenta características físico-químicas distintas, no que se refere à polaridade, volatilidade ou ainda nas propriedades de detecção.

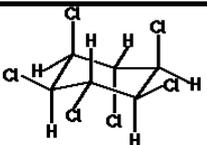
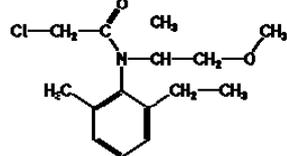
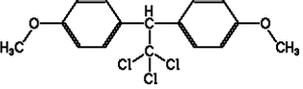
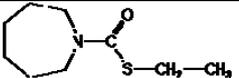
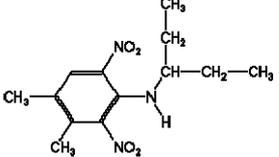
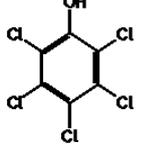
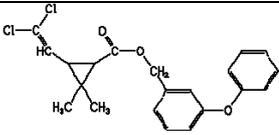
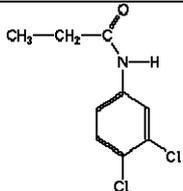
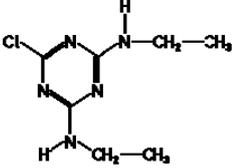
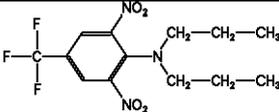
Assim, para o desenvolvimento de métodos analíticos, deve-se explorar as propriedades físico-químicas dos analitos visando alta seletividade e sensibilidade na detecção, melhores desempenho de extração e pré-concentração, maior rapidez no procedimento analítico e menor custo de análise.

A seguir, a Tabela 2 mostra a identificação do grupo de compostos estudados.

Tabela 2 – Identificação do grupo de compostos selecionados

Nome Comum	Grupo	Classe	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Estrutura
Alaclor	herbicidas	cloroacetanilida	269,8	
Aldrin	inseticidas	ciclodieno	364,9	

Dieldrin	inseticidas	ciclodieno	380,9	
Atrazina	herbicidas	clorotiazina	215,7	
Bentazona	herbicidas	-	240,3	
Clordano	inseticidas	ciclodieno	409,8	
2,4 D	herbicidas	fenoxiacético	221,0	
DDT	acaricidas inseticidas	organoclorado	354,5	
Endossulfan	acaricidas inseticidas	organoclorado	406,9	
Endrin	inseticidas	organoclorado	380,9	
Heptacoloro	inseticidas	organoclorado	373,3	
Heptacoloro epóxido	inseticidas	organoclorado	389,3	
Hexaclorobenzeno	fungicidas	aromático	284,8	

Lindano (γ -BHC)	acaricidas inseticidas rodencidas	organoclorado	290,8	
Metolaclo	herbicidas	cloroacetanilida	283,8	
Metoxicloro	inseticidas	organoclorado	345,7	
Molinato	herbicidas	tiocarbamato	187,3	
Pendimetalina	herbicidas	dinitroanilina	281,3	
Pentaclorofenol	fungicidas herbicidas inseticidas	organoclorado	266,3	
Permetrina	acaricidas inseticidas	piretróide	391,3	
Propanil	herbicidas	anilida	218,1	
Simazina	algicidas herbicidas	clorotriazina	201,7	
Trifluralina	herbicidas	dinitroanilina	335,3	

Fonte: Compendium of Pesticide Common Names (2007).

Algumas das propriedades físico-químicas de interesse ambiental e analítico destes compostos podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas do grupo de compostos selecionados.

Nome Comum	Solubilidade em água (20 °C, mg L ⁻¹)	Log P (Kow)	pKa	Pressão de Vapor (20 °C, mPa)	Constante de Henry (25 °C, Pa m ³ mol ⁻¹)	Meia vida água	Constante de sorção (Koc)	Potencial de lixiviação
Alaclor	240	3,09	0,62	2,9	3,20 10 ⁻³	0,5 ^{a,b}	124	2,19
Aldrin	0,027	6,50	-	3	1,72 10 ¹	-	17500	-0,35
Dieldrin	0,14	3,7	-	0,024	6,50 10 ⁻²	-	12000	-0,25
Atrazina	35	2,7	1,7	0,04	1,50 10 ⁻⁴	86 ^a 2,6 ^b	100	3,75
Bentazona	570	-0,46	3,28	0,17	7,20 10 ⁻⁵	4 ^b	51	2,55
Clordano	0,1	2,78	-	1,3	5,33 10 ⁰	-	20000	-0,77
2,4 D	44558	-0,83	2,87	0,0187	1,30 10 ⁻⁵	13 ^b	56	2,25
DDT	0,00001	6,91	-	0,025	8,43 10 ⁻¹	-	100000	-3,79
Endossulfan	0,32	3,13	-	0,83	1,48 10 ⁰	20 ^a	11500	-0,10
Endrin	0,24	3,2	-	0,09	1,48 10 ⁻¹	-	10000	0
Heptacloro	0,056	5,44	-	53	3,53 10 ²	-	24000	-0,93
Heptacloro epóxido	-	-	-	-	-	-	-	-
HCB	0,005	3,93	-	1,45	1,03 10 ¹	-	50000	-2,31
Lindano	8,52	3,69	-	4,34	1,50 10 ⁻¹	467 ^a 28 ^b	1100	2,00
Metolacloro	530	3,4	-	1,7	2,40 10 ⁻³	-	200	2,21
Metoxicloro	0,1	5,83	-	0,08	2,00 10 ⁻²	-	80000	-1,88
Molinato	1100	2,86	-	500	6,87 10 ⁻¹	28 ^{a,b}	190	2,49
Pendimetalina	0,33	5,2	2,8	1,94	2,73 10 ⁻³	21 ^b	15744	-0,39
PCF	1000	3,32	4,71	16000	4,30 10 ⁻¹	0,03 ^b	30	4,54
Permetrina	0,2	6,1	-	0,045	1,89 10 ⁻¹	31 ^a 1 ^b	100000	-1,11
Propanil	225	2,29	-	0,02	1,74 10 ⁻⁴	365 ^a 0,5 ^b	400	0,42
Simazina	5	2,3	1,62	8,13	5,60 10 ⁻⁵	96 ^a 1,9 ^b	130	3,69
Trifluralina	0,221	5,27	-	9,5	10,2	365 ^a 0,4 ^b	8765	0,13

^a hidrólise neutra, ^b fotoxidação

Fonte: FOOTPRINT Pesticide Properties Database (2007)

Para melhor entendimento das propriedades físico-químicas apresentadas na Tabela 3, um resumo da interpretação dos parâmetros é fornecido na Tabela 4.

Tabela 4 – Interpretação das propriedades físico-químicas

Propriedades físico-químicas	Critérios para interpretação	Significado
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	≤ 50 = Baixa 50 - 500 = Moderada > 500 = Alta	Quantidade máxima por volume de água.
Coefficiente de partição octanol-água (log P)	< 2,7 = Baixa 2,7 – 3 = Moderada > 3,0 = Alta	Bioacumulação
Constante de dissociação (pKa à 25 °C)	Não classificado	Indica o equilíbrio químico para a dissociação ácida em solução aquosa (sensível ao pH)
Pressão de vapor (20 °C, mPa)	> 1 10 ⁻⁶ = não-volátil 1 10 ⁻⁴ - 1 10 ⁻⁶ = estado intermediário < 1 10 ⁻⁴ = volátil	Indica volatilidade da substância pura à temperatura de referência.
Constante de Henry (25 °C, Pa m ³ mol ⁻¹)	> 100 = volátil 0,1 - 100 = moderadamente volátil < 0,1 = não-volátil	Indica volatilidade da substância em solução à temperatura de referência.
Degradação em fase aquosa (meia vida)	< 1 = rápida 1 - 14 = moderadamente rápida 14 - 30 = Lenta > 30 = estável	Importante parâmetro ambiental e analítico (estabilidade de amostra)
Constante de sorção carbono-orgânico (Koc)	< 15 = muito móvel 15 - 75 = móvel 75 - 500 = moderadamente móvel 500 - 4000 = levemente móvel > 4000 = não-móvel	Indica a tendência de sorção em partículas, retardando mobilidade e podendo aumentar persistência e proteção à degradação.
Potencial de lixiviação	> 2,8 = lixiabilidade alta 2,8 - 1,8 = estado de transição < 1,8 = lixiabilidade baixa	Dissolução e transporte de material por percolação de água.

Fontes: FOOTPRINT Pesticide Properties Database (2007) e OSU Extension Pesticide Properties Database (2007)

As informações obtidas através das Tabelas 3 e 4 fundamentam propriedades importantes que darão suporte para estratégia analítica desenvolvida neste trabalho. Informações complementares podem ser obtidas na internet através dos sites PAN (2007), NIST (2007), Codex Alimentarius (2007) e US EPA (2007), em meio impresso LARINI (1999) e digital Pesticide Manual (2000-2001).

2.4 Análise de pesticidas na atualidade

Atualmente, devido a diversidade de pesticidas, surgiu a necessidade de análises multirresiduais de uma grande variedade de princípios ativos de classes químicas diferentes. A sensibilidade de métodos analíticos capazes de garantir controle em níveis aceitáveis de eco toxicidade melhorou tanto em técnicas instrumentais, como em metodologias de extração e pré-concentração.

A química analítica ambiental vem estabelecendo um importante papel sócio-científico, interagindo diretamente com as políticas ambientais, com a necessidade de produção alimentícia e combate às doenças. Atualmente, o monitoramento ambiental tem exigido procedimentos analíticos rápidos, de baixo custo e de alta confiabilidade.

Neste sentido, as abordagens são geralmente direcionadas conforme o problema e a demanda. No caso do monitoramento de água para consumo humano, a exatidão é fundamental, pois os riscos e os custos de recuperação ambiental são elevados (MARTINS, 2004). Porém, a produtividade laboratorial deve ser elevada, permitindo atender uma grande demanda com baixo custo. A faixa de trabalho deve ser ampla, pois em um mesmo ensaio os níveis de monitoramento variam de miligramas à nanogramas por litro de acordo com os VMP dos analitos (MS, 2004).

Para atender as novas demandas, uma série de técnicas de extração, pré-concentração e purificação da amostra, assim como técnicas de identificação e quantificação dos analitos têm sido exploradas na literatura (LAPRW, 2007).

As técnicas de SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction* têm se desenvolvido em uma diversidade de formas, fases estacionárias, automação e configurações. Atualmente, metodologias empregando SPE têm sido preferidas em substituição à extração líquido-líquido clássica. Além disso, as extrações em fase sólida permitem boa aplicabilidade em uma ampla faixa de polaridade e elevados fatores de pré-concentração (LANÇAS, 2004).

Após um bom processo de extração, pré-concentração e purificação da amostra, surge a necessidade de técnicas analíticas rápidas e de baixo custo, sensíveis, de modo a atender as exigências legais, e seletivas para garantir uma resposta qualitativa e quantitativa segura.

Neste sentido, a cromatografia apresenta-se como técnica de separação fundamental para uma boa detecção. As técnicas cromatográficas estão divididas em dois importantes grupos: cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Quando possível, a cromatografia gasosa é preferida, pois via de regra apresenta melhor eficiência e rapidez, além de menores custos de operação e menor consumo de solventes orgânicos. No entanto, compostos não-voláteis, de alta polaridade ou degradáveis termicamente devem ser analisados através da cromatografia líquida ou por meio de derivatizações que possibilitam sua volatilização estável.

A detecção e quantificação de analitos são realizadas após a separação cromatográfica e devem levar em consideração as propriedades físico-químicas dos compostos de interesse, minimizando a resposta de interferentes presentes na matriz da amostra.

Para explorar um pouco mais as características dos detectores, podemos pensar em sua universalidade, ou seja, sua capacidade de produzir respostas a todas as substâncias eluídas. Neste caso, em cromatografia gasosa um exemplo de detector universal é o detector de condutividade térmica e outro “quase” universal é o detector de ionização em chama, que responde a qualquer composto com ligações carbono-hidrogênio. No entanto, estes detectores são relativamente pouco sensíveis e suscetíveis ao efeito da matriz da amostra.

Como alternativa aos detectores universais em análises de traços são preferidos os detectores seletivos, ou seja, aqueles que produzem respostas apenas a determinadas características dos analitos. Como exemplos destes detectores em cromatografia gasosa são citados os detectores de captura de elétrons, que produzem boas respostas apenas a compostos halogenados (ricos em elétrons) e detectores de nitrogênio e fósforo, que por sua vez produzem boas respostas à presença destes átomos em compostos sob análise. Na cromatografia líquida, os detectores seletivos são, por exemplo, o eletroquímico que responde às reações de oxi-redução em potenciais específicos, o de fluorescência que responde as estas propriedades de emissão do analito e o ultravioleta que responde apenas aos grupos cromóforos em compostos aromáticos ou com duplas conjugadas.

Porém, na última década a espectrometria de massas tem exercido papel fundamental na análise de traços e ultra-traços de uma infinidade de pesticidas em matrizes complexas. O volume de publicações científicas utilizando a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida e gasosa vem crescendo muito nos últimos anos. Atualmente eventos importantes da área evidenciam esta popularidade, trazendo, na maioria dos trabalhos, a utilização destes detectores (LAPRW, 2007). E toda esta procura apresenta uma razão bastante compreensível. Os detectores de massas apresentam uma dualidade interessante, pois podem ser universais e seletivo-específicos ao mesmo tempo, além de extremamente sensíveis. As características e vantagens destes equipamentos serão exploradas adiante. Outra razão para o seu sucesso é o desenvolvimento de espectrômetros

mais “baratos” como os quadrupolos, que são acessíveis para laboratórios universitários e de empresas de médio porte.

As novas tendências na análise de resíduos de pesticidas apontam para a diversificação de configurações e otimização dos espectrômetros de massas como detectores de disseminação mundial. Outras tendências apontam para uma maior eficiência de separações em cromatografia líquida e gasosa com maior velocidade de aquisição de dados permitindo análises mais rápidas. Análises multidimensionais já estão sendo comercializadas com melhora de seletividade em matrizes complexas (LAPRW, 2007). A cromatografia unificada LC/GC está sendo estudada e promete um grande campo para aplicações futuras (MÜHLEN, et al., 2004).

2.5 Etapas do processo analítico

O processo analítico pode ser dividido em quatro etapas que são igualmente importantes na determinação do resultado final: amostragem, preservação da amostra, preparo da amostra e análise.

2.5.1. Amostragem e estocagem da amostra

A informação analítica de qualidade depende de vários fatores. O primeiro passo para um bom resultado é o conhecimento teórico sobre as propriedades do analito e da matriz da amostra. Em análises ambientais é importante ter também, um conhecimento da dinâmica ambiental e das variáveis que podem afetar os níveis de analito na amostra. Assim, no monitoramento de pesticidas é importante ter em mente fatores como, local de coleta, época do ano, cultivos associados, períodos de chuvas entre outros.

O processo de amostragem é extremamente importante, pois a amostra deve ser homogênea e representativa. Um plano de amostragem deve ser estatisticamente estabelecido para monitoramento de rotina (CAC/GL 50-2004, 2004). A Portaria 518 estabelece a frequência e número mínimo necessário de amostras para seu cumprimento (MS, 2004).

Porém, não é apenas a representatividade da amostra que interessa ao analista, mas também a sua integridade até o momento da análise. A preservação, os cuidados com contaminações e a manipulação são pontos essenciais para

resultados confiáveis. Sobre a etapa de preservação da amostra, MITRA et al. (2003) traz uma excelente abordagem. Especificamente sobre a preservação e estocagem de amostras de água, um bom artigo foi publicado por SLIWKA-KASZYNSKA et al. (2003).

Outro aspecto importante é a preservação dos padrões analíticos. Atualmente está sendo discutida, com maior ênfase, a revalidação de padrões, onde estudos têm demonstrado a grande estabilidade de um elevado número de pesticidas ao longo dos anos (KOK et al., 2007; MASTOVSKÁ et al., 2004).

2.5.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra é parte indispensável no processo analítico, já que dificilmente as amostras podem ser analisadas diretamente na forma em que se encontram. Por vezes, esta preparação envolve inúmeros passos de manipulação, como transferências, diluições, extrações e enriquecimentos. Conseqüentemente, estes procedimentos contribuem para maiores erros randômicos e sistemáticos durante o preparo da amostra, do que durante a análise instrumental. Segundo MITRA et al. (2003), uma detalhada análise de erros mostrou que 75% da incerteza foi atribuída ao processo de SPE, enquanto 24% foi devido à calibração e 1% à aferição de volumes. Neste sentido, é conveniente considerar os aspectos estatísticos dos erros, como a regra de propagação de incerteza. Ao minimizar o número de etapas estaremos contribuindo para melhores resultados, assim como ao utilizar técnicas e materiais adequados nas diversas etapas da marcha analítica (MITRA et al., 2003).

2.5.2.1 Fundamentos da extração

Os princípios que governam os procedimentos de extração foram publicados de forma extensiva por WELLS (2003). Segundo a autora é importante conhecer as propriedades químicas dos analitos, assim como, as propriedades do meio líquido em que estão dissolvidos e a fase extrativa gasosa, líquida, supercrítica ou sólida utilizada para promover a separação.

De todas as propriedades dos analitos, cinco são consideradas fundamentais para a teoria das extrações: pressão de vapor, solubilidade, peso molecular,

hidrofobicidade e dissociação ácida. Estas propriedades determinam o transporte de substâncias no corpo humano, no sistema ambiental ar-água-solo e no transporte entre fases imiscíveis no processo de extração analítica (WELLS, 2003).

Assim, um soluto X dissolvido em uma fase líquida A em contato com uma fase imiscível B estabelece um equilíbrio químico:



A constante de equilíbrio ou lei de distribuição de Nernst é representada por:

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} \quad (2)$$

A função do analista é promover o deslocamento do equilíbrio químico para a direita, Equação (1), de forma a conseguir um maior valor de K_D na Equação (2), ou seja, maior eficiência de extração.

Assim para estudo de fugacidade de uma substância X da fase líquida L para a fase gasosa G aplica-se a lei da constante de Henry (H') expressa pela Equação (3):

$$H' = K_D = \frac{[X]_G}{[X]_L} \quad (3)$$

A pressão de vapor não deve ser confundida com a lei de Henry, pois se refere ao equilíbrio da substância pura em estado sólido ou líquido com seu estado gasoso, ou seja, a pressão de vapor diz respeito às forças de atração intermoleculares da substância pura.

Outro importante parâmetro é a solubilidade, que representa a quantidade máxima que uma substância pode ser dissolvida em outra. A solubilidade pode ser determinada experimentalmente ou estimada pela estrutura molecular.

Estudos sobre a hidrofobicidade também tem despertado interesse tanto no entendimento de processos de extração, como nos processos de transporte ambiental e biodisponibilidade. Ainda são bastante discutidos os mecanismos para o entendimento destes efeitos. No passado atribuía-se à atrações não polares, mas a idéia de “semelhante-atrai-semelhante” não é a mais importante atualmente. A principal causa da hidrofobicidade tem sido atribuída a grande força de atração das moléculas de água (WELLS, 2003).

O parâmetro estudado para avaliar este efeito, equações (4) e (5), é o coeficiente de partição n-octanol-água K_{OW} :

$$K_{OW} = K_D = \frac{[X]_o}{[X]_w} \quad (4)$$

Ou em escala logarítmica

$$\log K_{OW} \text{ ou } \log P \quad (5)$$

Em uma outra abordagem, o caráter ácido-base do soluto e o pH da fase aquosa determinam a distribuição da espécie ionizada-neutra em solução. Uma forma de estabelecer a relação entre pH e a distribuição das espécies neutras HA e ionizadas A^- é utilizando a equação de Henderson-Hasselbach, Equação (6):

$$pH = pK_A + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (6)$$

Ou seja, quanto mais ácida a solução mais favorecida estará a forma neutra e mais solúvel na fase orgânica em um processo de extração por partição.

2.5.2.2 Técnicas de extração e pré-concentração

Após a amostragem, o manuseio e a estocagem é preciso transformar a amostra de forma que ela fique adequada para análise. Nesta etapa surge a extração dos constituintes em análise, de uma matriz complexa, a concentração dos constituintes diluídos em níveis que eles possam ser medidos e as eventuais derivatizações para que possam ser detectados (HARRIS et al., 2001).

Existe atualmente uma infinidade de técnicas de extração empregadas em análises de pesticidas (FERNANDEZ-ALBA, 2005). Os métodos oficiais têm sofrido revisões e adaptações visando atender novos objetivos analíticos, porém sempre existe um atraso nas atualizações metodológicas de grandes instituições. LEBLANC (2001) escreveu uma revisão de técnicas de preparo da amostra publicadas pela US EPA.

Uma das técnicas mais difundidas nas últimas décadas foi a LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*, que está baseada nas teorias de equilíbrio químico descritas anteriormente. A LLE convencional é realizada por meio de dois solventes imiscíveis, geralmente uma fase aquosa e outra orgânica. A fase

original, contendo o analito e a fase extratora, são colocadas em um funil de separação e agitadas para promover a interação e transferência de analito entre as fases (LANÇAS, 2004). A eficiência da extração envolve a constante de equilíbrio do soluto entre as fases e suas quantidades relativas. Por se tratar de estágios de equilíbrio, geralmente este processo é repetido algumas vezes para que haja maior transferência de analito. Os analistas que empregam a LLE têm experimentado dificuldades, como a exposição a grandes volumes de solventes orgânicos, formação de emulsões, geração de resíduos e uso excessivo de vidraria. Com o objetivo de minimizar estes problemas e aumentar a eficiência de extração, criaram-se processos que utilizam ultra-som ou microondas.

Mais recentemente, a extração acelerada com solvente, ou ainda, extração com solvente pressurizado são alternativas mais eficientes. Estas técnicas utilizam temperatura e pressão elevada diminuindo a viscosidade dos solventes e aumentando a interação entre as moléculas, utilizam menor quantidade de solvente e produzem extrações seqüenciais totalmente automatizadas (WELLS, 2003).

Avanços recentes no desenvolvimento de técnicas de extração disponibilizaram uma vasta gama de possibilidades e associações. Para solutos voláteis, técnicas como *Purge&Trap*, *Headspace* e dessorção térmica são utilizadas. No entanto, a SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extration*, SPME - Micro Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extration* e SBSE - Extração por Barras Sortivas, do inglês *Sortive Bar Solid Extration* têm sido as técnicas mais promissoras e amplamente estudadas em análise de pesticidas na última década (MAJORS, 2003).

2.5.2.2.1 Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE refere-se a uma técnica de não-equilíbrio, de alto poder de retenção dos compostos presentes em um líquido e subsequente recuperação, através da eluição de analitos de interesse. Esta técnica utiliza os mesmos princípios da cromatografia líquida, porém com material simplificado e de menor custo (WELLS, 2003).

Matematicamente, a forte afinidade do analito com a fase sólida gera um valor de K_D , Equação (2), tendendo ao infinito. Quando um volume de solvente apropriado é utilizado na eluição, o valor de K_D tende a zero, e os analitos são eluídos. Neste

sentido, a SPE é considerada uma “cromatografia digital” por representar extremos de “tudo-ou-nada” (fazendo uma analogia às informações digitais: “zero-e-um”) (WELLS, 2003).

Desde a década de 1970, quando a *Waters Corporations* colocou em prática a SPE, as principais vantagens em relação LLE tem sido:

- Redução do tempo de análise;
- Redução de custos;
- Diminuição do consumo de solventes e geração de resíduos;
- Diminuição da exposição do analista a solventes orgânicos;
- Redução do potencial de formação de emulsões;
- Aumento de produtividade devido à automação simplificada;
- Elevado fator de pré-concentração;
- Elevadas recuperações;
- Elevada repetitividade;
- Possibilidade de extrações seletivas;
- Possibilidade de aplicação *on-line*;
- Possibilidade de isolamento de matriz;
- Aplicável a uma ampla faixa de polaridade.

KURZ (2007) fez um levantamento bibliográfico mostrando o crescimento a utilização da técnica de SPE no período entre 1983 e 2006. Este estudo mostrou que o número de publicações de 2006 foi de aproximadamente 700, enquanto em 2000 era em torno de 350 e em 1993, menor que 150. Outro dado interessante é o número de publicações desta técnica em relação à amostra, mostrando sua grande utilização em amostras de água. No período de 1995 a 1999, foram aproximadamente 450 correspondendo a um terço do número total de publicações no período. No mesmo período, o número de publicações relacionadas à SPE em pesticidas foi de aproximadamente 220, sendo responsável pela grande maioria dos analitos extraídos por este tipo de técnica.

As comparações de SPE *versus* LLE podem ser encontradas na literatura (WELLS, 2003; LANÇAS, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Segundo LANÇAS (2004), as etapas da SPE podem ser divididas em:

- Condicionamento do cartucho: É uma etapa de ativação do material do cartucho com solvente apropriado, geralmente indicado pelo fabricante, pois depende do material da “fase sólida”. Assim como na cromatografia líquida, é importante que o material contido no cartucho não seque, pois problemas como caminhos preferenciais comprometerão a reprodutibilidade da extração.
- Adição da amostra (percolação): A transferência da amostra deve ser quantitativa para não comprometer a reprodutibilidade da extração. A velocidade de aplicação da amostra pode ser crítica e idealmente deve ser lenta com fluxo de 2 mL min^{-1} . Isto pode ser conseguido pelo controle de vácuo ou pressão aplicada.
- Remoção dos interferentes: Esta etapa também conhecida como lavagem com solvente, visa eliminar os interferentes com um solvente que não tenha força suficiente para eluir os analitos. A escolha ideal é o próprio solvente da amostra e fatores como quantidade de solvente orgânico, concentração salina e ajuste de pH podem favorecer esta etapa.
- Eluição do Analito: Na etapa de eluição, geralmente os analitos de interesse são recuperados em um pequeno volume de solvente apropriado. A escolha do solvente deve permitir eluição dos analitos, mantendo retidos interferentes remanescentes. O procedimento deve ser executado pela passagem de, no mínimo, duas alíquotas permitindo um tempo de interação. Quando há imiscibilidade entre solventes, uma etapa de secagem do cartucho é realizada antes da etapa de eluição.

As diferenças entre os diversos formatos de SPE, assim como suas vantagens, podem ser melhor compreendidas através dos artigos de MAJORS (2001) e POOLE (2003).

O esquema da extração em fase sólida é mostrado na Figura 1.

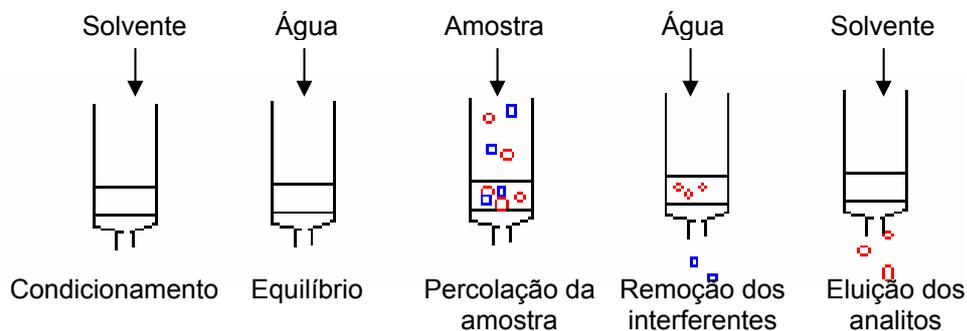


Figura 1 – Esquema de extração em fase sólida (SPE)

Para o bom entendimento do mecanismo de separação é preciso entender as principais forças químicas existentes entre as moléculas do analito e as moléculas da fase sólida:

- Forças iônicas: São forças de caráter eletrostático que ocorrem principalmente em processos de troca iônica, entre grupos polares existente em uma matriz polimérica e íons presentes em solução.
- Ligações de hidrogênio: Acontece quando o átomo de hidrogênio faz ligações covalentes com átomos bastante eletronegativos e relativamente pequenos. Este tipo de interação é muito forte e representa um problema na extração com sorventes a base de sílica, pois vários analitos são fortemente adsorvidos pelos grupos silanóis. Geralmente os fabricantes utilizam técnicas de “capeamento” destes grupamentos polares.
- Forças do tipo dipolo-dipolo: resultam de forças de dipolo permanentes entre moléculas polares em consequência da diferença de eletronegatividade entre os átomos e a geometria da molécula. Por exemplo, em ligações carbono-oxigênio existe um dipolo, pois o oxigênio mais eletronegativo atrai para si os elétrons envolvidos. Os conceitos de polaridade são regidos por este fenômeno.
- Forças de dispersão: São forças do tipo van der Waals e de London e ocorrem entre moléculas apolares, no entanto, na presença de outras moléculas podem ter suas nuvens eletrônicas deformadas com conseqüente aparecimento de um dipolo, induzido pela interação.

Os mecanismos de separação são similares aos da cromatografia líquida, sendo os principais: adsorção, partição, troca-iônica e exclusão por tamanho.

A adsorção tem sido utilizada para a separação de compostos polares. As principais fases são: sílica, alumina e para análise de pesticidas, o Florisil®. No entanto há casos em que, o analito é adsorvido de forma irreversível.

Uma evolução neste sentido foi a aplicação do mecanismo de partição, baseados no conceito de solubilidade. A partição pode ocorrer em fase normal ou fase reversa. Devido a grande diversidade de estruturas quimicamente ligadas, tanto a uma base de sílica quanto a uma matriz polimérica, a partição tem sido o mecanismo de separação mais explorado atualmente.

Quando a separação envolve compostos de caráter ácido ou básico a melhor opção é o mecanismo de troca iônica. Os principais fatores que influenciam uma separação de troca iônica são: pH, seletividade do contra-íon, força iônica, solvente e fluxo. A ionização de um composto depende do seu pKa, para um analito de caráter ácido a ionização será quase completa quando o pH for duas unidades acima do pKa. Neste momento a fase trocadora de íons reterá o composto, e para eluí-lo basta diminuir o pH para duas unidades abaixo do pKa. No que diz respeito a analito de caráter básico o pH deve ser diminuído para promover a ionização e aumentado para deslocar o equilíbrio para a forma neutra.

Além dos mecanismos químicos vistos anteriormente, existe o mecanismo físico de separação: exclusão por tamanho. Este mecanismo é propiciado através do desenvolvimento de polímeros com tamanho de poros bem controlados. Moléculas maiores são excluídas da interação e eluídas rapidamente.

Como visto, existe uma teoria complexa por trás das técnicas de extração. Na extração em fase sólida estes conceitos fundamentais da química também devem ser considerados no desenvolvimento de métodos. Porém, não são apenas os conceitos teóricos que devem despertar a atenção dos analistas, a tecnologia envolvida também deve ser observada.

Tipos de sorventes na SPE

O mais popular sorvente de SPE é o octadecil (C18) ligado a sílica. O mecanismo de partição rege o processo de separação, onde interações apolares entre ligações C-H do analito e do sorvente promovem a retenção na fase sólida.

Estas fases apresentam boa reprodutibilidade, mas são limitadas a pH entre 2 e 8. Outra característica importante é a limitação a compostos hidrofóbicos e a retenção baixa de 1-5% da massa do sorvente (KURZ, 2007).

Uma alternativa são os compostos poliméricos de estireno-divinilbenzeno que apresentam retenção de massa maior, entre 10-15% e afinidade a interações hidrofóbicas e aromáticas. Recentemente, cartuchos poliméricos como Strata X[®], Nexus[®] e Oasis[®] apresentam vantagens devido à modificação da superfície polimérica possibilitando também a interação de ligações polares (KURZ, 2007). Outras técnicas mais específicas, como sorventes de reconhecimento molecular, podem ser encontradas na literatura (LANÇAS, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.5.2.3. Aplicações de técnicas de extração

Na seqüência, um conjunto de artigos de revisão mostram aplicações da técnicas de extração vistas anteriormente.

LOUTER et al. (1996) desenvolveram um sistema *on-line* SPE-GC-MS para análise de traços de pesticidas em água, totalmente automatizado. As amostras foram retiradas de diversos rios distribuídos em vários países do mundo. Utilizando-se apenas 10 mL de amostra, vários micropoluentes puderam ser identificados e quantificados em concentrações abaixo de 0,1 µg L⁻¹. Compostos não-alvo puderam ser identificados utilizando-se o modo varredura, enquanto que empregando-se monitoramento seletivo de dois íons por analito, os limites de detecção melhoraram em duas ordens de grandeza.

HATRÍK et al. (1996) publicaram um artigo de revisão explorando os métodos cromatográficos e de extração utilizados na determinação de diversas classes de pesticidas em água. Os autores deram ênfase às análises multirresiduais com limites de quantificação e recuperações, abaixo de 0,1 µg L⁻¹. Neste estudo foram introduzidos conceitos de toxicidade e potencial de contaminação de água de acordo com propriedades dos pesticidas.

HENNION (1999) aborda a extração em fase sólida enfatizando o desenvolvimento de métodos e sorventes. Nesta publicação a autora aplica diversos conceitos teóricos como fator de retenção, efeitos de solvatação, coeficiente de partição octanol-água e efeitos da energia de interação no processo de retenção e eluição em fase sólida, de acordo com a natureza das forças de ligação.

HUCK et al. (2000) explora a extração em fase sólida com sorventes de base polimérica. Nesta revisão os autores discutem a inclusão de grupos funcionais em sorventes de base polimérica poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) e seus efeitos na recuperação de diversas classes de compostos. Em outro momento faz uma comparação entre recuperações de pesticidas em PS-DVB com material monolítico e C-18, demonstrando melhores resultados com o sorvente polimérico.

SABIK et al. (2000) revisa as técnicas de extração em fase sólida aplicadas a métodos multirresiduais de triazinas e seus subprodutos em águas de profundidade e de superfície. Neste trabalho os autores relatam aplicações de fases sólidas baseadas em reconhecimento molecular como imuno-afinidade e reconhecimento tridimensional pelo polímero.

PICHON (2000) traz uma revisão sobre análises multirresiduais de contaminantes orgânicos em água, utilizando extração em fase sólida. Neste artigo a autora traz a dificuldade de trabalhar com alta faixa de polaridade, onde analitos polares são eluídos em baixos volumes de amostra e analitos apolares são facilmente adsorvidos em tubos e conexões. A solução apresentada pela autora foi a adição de um volume otimizado de modificador orgânico.

LISKA (2000) apresenta um histórico de cinquenta anos de extração em fase sólida em análise de água. Nesta revisão, a autora enfoca o desenvolvimento de materiais e das técnicas concluindo que a evolução da extração em fase sólida está em ascensão e prevê um aumento na pesquisa e desenvolvimento nesta área.

2.6. Técnicas cromatográficas

Em um breve artigo, relatando uma apresentação de 1903 para a Warsaw Science Society, publicado em 1905, o botânico russo Mikhael Semenovich Tswett descrevia o uso de pequenas colunas utilizadas para separar extratos vegetais em bandas coloridas. Em resposta aos questionamentos de outros pesquisadores sobre a técnica utilizada, Tswett publicou em 1906 no *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* um artigo detalhado sobre o procedimento utilizado, indicando o mecanismo de adsorção e sugerindo, pela primeira vez na literatura impressa, o termo cromatografia (COLLINS, 2004).

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação, na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases em contato

íntimo. Uma das fases permanece fixa denominada fase estacionária, enquanto a outra é um fluido que percola através dela, sendo por isso, denominada fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases sendo seletivamente retidos, resultado de migrações diferenciais (COLLINS et al., 1995).

Como a análise química é geralmente seletiva, mas raramente específica, a separação dos analitos de potenciais interferências torna-se uma etapa crucial nos procedimentos analíticos. Na segunda metade do século XX, as separações por métodos clássicos, como precipitação, destilação e extração foram gradativamente sendo substituídas por técnicas cromatográficas e eletroforéticas (SKOOG et al., 2002).

Segundo LANÇAS (1993), “dentro dos modernos métodos de análise química, a cromatografia ocupa, sem dúvida, um lugar de merecido destaque no que concerne à separação, identificação e quantificação de espécies químicas”. Após 14 anos esta afirmação é muito atual.

Assim, o sucesso das técnicas cromatográficas se deve à necessidade crescente de caracterização de compostos em misturas complexas, e da possibilidade de acoplamento com outras técnicas de análises, como espectrofotometria e espectrometria de massas (SKOOG et al., 2002).

O impacto da cromatografia tem sido atestado pelo prêmio Nobel de 1952 concedido a A. J. Martin e R. L. M. Synge pelas suas descobertas neste campo e por outros diversos prêmios Nobel nos quais, a cromatografia tem exercido um papel fundamental (SKOOG et al., 2002).

A ascensão das técnicas instrumentais de separação ocorreu de forma espetacular e a história da ciência vem modificando-se a cada ano. A criação de diferentes tipos de cromatografia esteve baseada principalmente no tipo de fase móvel e nos mecanismos de separação com a fase estacionária. Assim, uma grande variedade de técnicas surgiu de forma a contemplar soluções adequadas a inúmeros problemas analíticos. Nos últimos anos, a unificação da cromatografia vem sendo estudada de forma a prover uma única e poderosa ferramenta em química analítica (MÜHLEN et al., 2004).

2.6.1. Cromatografia gasosa

O crescimento acelerado da cromatografia em fase gasosa data de 1952, com o surgimento da cromatografia gás-líquido, por James e Martin. O interesse pela técnica possibilitou um desenvolvimento de instrumentação e métodos, tornando-se atualmente uma técnica indispensável em laboratórios de análises químicas (COLLINS et al., 1995).

Na cromatografia gasosa, a amostra é introduzida na coluna contendo uma fase estacionária, por um sistema de injeção. A utilização de temperaturas convenientes, no injetor e na coluna, possibilita a vaporização das substâncias, que de acordo com as propriedades da fase estacionária e de suas volatilidades, percorrem a coluna em tempos distintos. A detecção e quantificação dos analitos são realizadas no final da coluna por um detector adequado e registrados por um sistema de aquisição de dados (COLLINS et al., 1995; HARRIS et al., 2001).

2.6.1.1. Teoria básica

A teoria da cromatografia gasosa foi bem estabelecida no início da década de 60 e apenas um componente tecnológico tem contribuído para o desenvolvimento desta técnica. Os parâmetros cromatográficos introduzidos aqui têm grande relevância na pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos e servem como diagnóstico em “garantia da qualidade” (LANÇAS, 1993).

Através do cromatograma, registro gráfico da análise cromatográfica é possível estudar e desenvolver métodos baseados em teorias fundamentais que regem a cromatografia gasosa.

Assim, a teoria da cromatografia está baseada principalmente em duas características: a posição do pico e a velocidade de alargamento durante a corrida. (LANÇAS, 1993).

2.6.1.2. Tempo de retenção

A posição do pico é determinada pela velocidade da fase móvel e pelo fator de retenção (k), ou seja, pela relação de distribuição de massa (m) do analito entre as fases líquida e gasosa conforme a Equação (7):

$$k = \frac{m_{liq}}{m_{gas}} \quad (7)$$

Sua relação com o tempo de retenção está na Equação (8):

$$t_R = t_M + t_M k \quad (8)$$

Onde o tempo de retenção (t_R) é o tempo transcorrido do momento da injeção da amostra até a altura máxima do pico. Este tempo é característico das propriedades do analito, da fase estacionária, do fluxo de gás de arraste e da temperatura de separação, ou seja, das condições cromatográficas. Por isso, em condições reprodutíveis, o tempo de retenção é um parâmetro importantíssimo, pois possibilita a identificação de um composto. O tempo morto (t_M) é o tempo transcorrido do momento da injeção até obter-se um pico de um composto não retido, ou seja, é o tempo que a fase móvel leva para percorrer o caminho entre a injeção e a detecção (LANÇAS, 1993).

Nota-se que o tempo de retenção (t_R) na Equação (9) é simplesmente a soma dos tempos em que o analito permanece nas fases móvel t_M e estacionária t'_R :

$$t_R = t_M + t'_R \quad (9)$$

Assim, o tempo de retenção ajustado (t'_R) pode ser medido do pico de um composto não retido, por exemplo, ar, até o tempo de retenção do analito.

O fator de retenção ou fator de capacidade (k) pode ser relacionado com a constante de distribuição (K), Equação (10), que é a constante termodinâmica que mede a solubilidade da amostra na fase líquida. Assim:

$$K = k\beta \quad (10)$$

Onde

$$\beta = \frac{v_{gas}}{v_{liq}} \quad (\text{relação das fases}) \quad (11)$$

Então,

$$K = \frac{C_{liq}}{C_{gas}} \quad (12)$$

Esta solubilidade é afetada pela temperatura, e geralmente, um aumento na temperatura provoca uma diminuição do valor de K e conseqüentemente uma diminuição do tempo de permanência do analito na fase líquida, o que leva a diminuição dos tempos de retenção em cromatografia gasosa.

Outro fator importante na determinação da posição do pico é o volume de retenção (V_R) que representa o volume de gás de arraste desde o momento da injeção até a eluição. Veja a relação na Equação (13):

$$V_R = t_R Fc \quad (13)$$

Onde Fc significa fluxo constante

O mesmo conceito de tempo de retenção ajustado e tempo morto, pode ser utilizado para obtenção do volume de retenção ajustado e volume morto de gás de arraste.

O fator de retenção, Equação (14), conhecido também como fator de separação, α , é a relação do tempo de retenção ajustado entre dois picos, sendo proporcional aos coeficientes de partição:

$$\alpha = \frac{t'_R B}{t'_R A} \quad (14)$$

A utilidade deste conceito é fornecer a seletividade da fase estacionária em relação a dois componentes. Quanto maior o valor de α maior será a seletividade da fase estacionária e melhor será a separação dos compostos.

2.6.1.3. Eficiência

De acordo com os princípios fundamentais da cromatografia, a amostra injetada na forma de um estreito perfil de concentração no momento da injeção, sofre um alargamento gradual à medida que realiza partição entre as fases na coluna cromatográfica. Este efeito toma a forma de uma distribuição normal, ou gaussiana, e aumenta em função do tempo de permanência do analito na coluna (LANÇAS, 1993).

Assim, o conceito de eficiência de separação está relacionado ao tempo de retenção (t_R) e a largura do pico (w_b). A eficiência da coluna é tratada em termos de número de pratos teóricos (N). Um prato teórico é definido com sendo um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases. Assim, quanto maior o número de equilíbrios melhor será separação. A relação matemática que define o número de pratos teóricos foi descrita, Equação (15), por LANÇAS (1993):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (15)$$

Nos casos onde é difícil estabelecer a largura do pico na base (w_b) pode-se calcular (N) a partir da largura do pico na meia-altura (w_h), Equação (16):

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (16)$$

Uma variação deste conceito é o número de pratos teóricos efetivos (N_{eff}), Equação (17), a partir do tempo de retenção ajustado (t'_R):

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t'_R}{w_h} \right)^2 \quad (17)$$

Os fatores operacionais de uma coluna podem ser mais bem avaliados por seu efeito sobre a altura equivalente a um prato teórico (H), equação (18):

$$H = \frac{L}{N} \quad (18)$$

Onde L é o comprimento da coluna

Assim, H é o comprimento necessário de uma coluna para gerar um prato teórico. Quanto maior N , menor H .

A eficiência de separação está relacionada com a difusão do analito na fase móvel, com o tempo de equilíbrio do analito entre as fases e com as diferentes trajetórias percorridas pelo analito. A velocidade linear média da fase móvel está relacionada com a eficiência da separação. Estas constatações geraram uma equação que explica os principais conceitos envolvidos neste fenômeno, chamada equação de van Deemter.

Uma simplificação dos estudos realizados por van Deemter pode ser demonstrada a seguir, Equação (19) (LANÇAS, 1993; HARRIS et al., 2001).

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (19)$$

Onde:

H = Altura equivalente a um prato teórico

A = Efeito dos múltiplos caminhos (fase estacionária)

B = Difusão molecular (longitudinal)

C = Resistência a transferência da massa (tempo de equilíbrio)

μ = Velocidade linear média do gás de arraste = L/t_M

Os termos A , B e C são constantes de uma dada coluna. Veja na Figura 2, o gráfico experimental da curva de van Deemter:

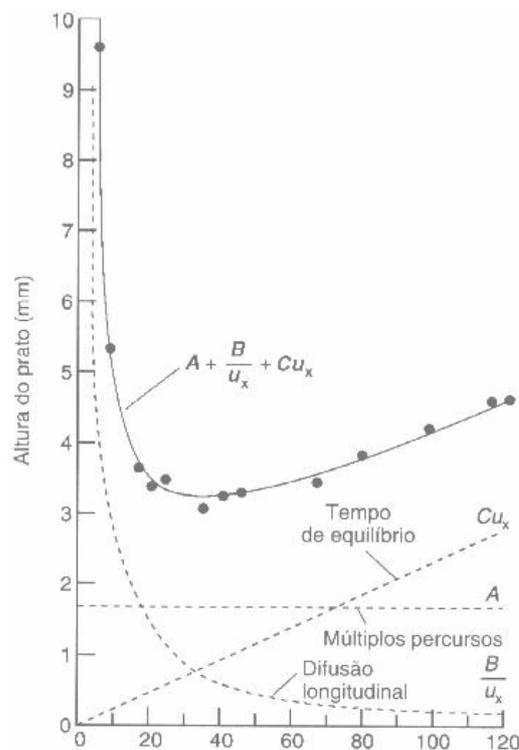


Figura 2 – Curva de van Deemter (HARRIS et al., 2001)

A difusão molecular (B) pode ser explicada como a migração de soluto de um meio de maior concentração dentro da banda para um meio de menor concentração nas extremidades. A variância resultante da difusão, Equação (20) é expressa por:

$$\sigma^2 = 2D_m t \quad (20)$$

Onde D_m é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel e t é o tempo. Assim, uma diminuição na velocidade linear do gás de arraste ocasiona maior dispersão do soluto. Por outro lado, um aumento na densidade do gás de arraste, seja pelo aumento de sua massa molecular ou pela sua pressão, causa uma diminuição na difusão do soluto e aumento da eficiência.

Como a difusão longitudinal de um gás é muito mais rápida que a de um líquido a taxa ótima de fluxo na cromatografia gasosa é maior do que na cromatografia líquida.

A seguir, na Figura 3, é possível visualizar este efeito:

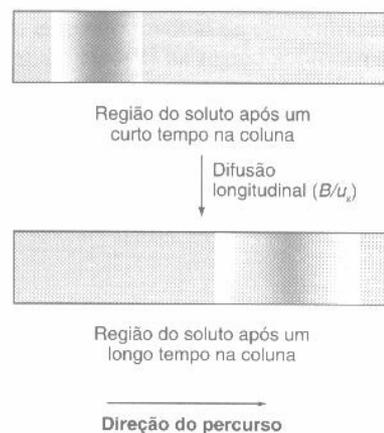


Figura 3 – Efeito de difusão longitudinal (HARRIS et al., 2001)

O termo $C\mu$ é proveniente do limite de tempo necessário para o soluto estar em equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. A Equação (21) descreve esta relação é:

$$C\mu = \frac{kd^2}{(k+1)^2 D_e} \quad (21)$$

Onde D_e é o coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária d é a espessura da fase estacionária e k é o fator capacidade. Assim, quanto maior for a espessura da fase estacionária menor será a eficiência da coluna, já que o termo está relacionado com a transferência de massa do soluto entre as fases. A Figura 4 demonstra a transferência de massa:

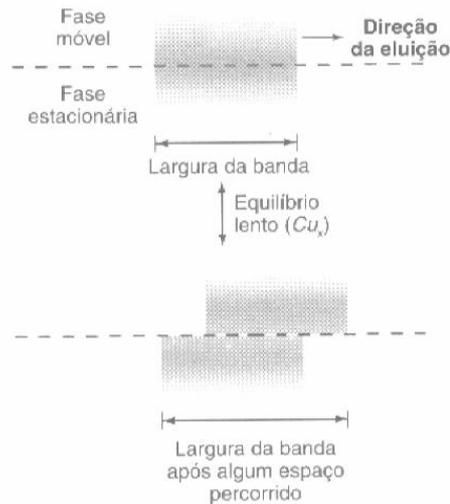


Figura 4 – Efeito de transferência de massa (HARRIS et al., 2001)

O termo A da equação de van Deemter refere-se à diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto na fase estacionária. A Figura 5 mostra como isto acontece.

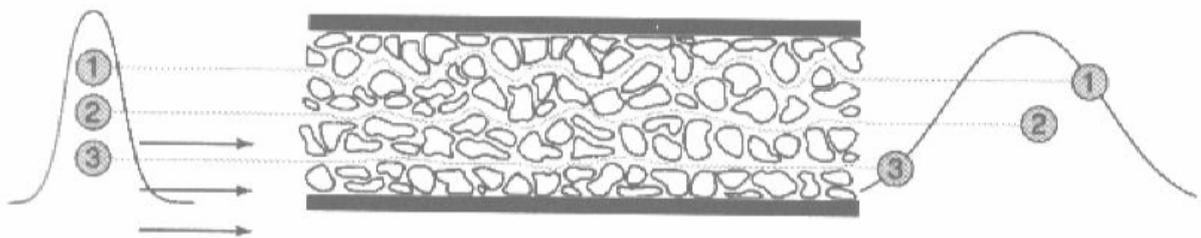


Figura 5 – Efeito de caminhos múltiplos (HARRIS et al., 2001)

Estes efeitos sobre a altura do prato independem do fluxo do gás de arraste e podem ser descritas em função a seguinte Equação (22):

$$H = 2\lambda d_p \quad (22)$$

Onde λ é o fator relacionado com as irregularidades do recheio e d_p diâmetro médio das partículas de suporte. Em colunas tubulares abetas, este último termo não tem efeito o que a torna muito mais eficiente. Neste tipo de coluna, a resistência ao fluxo de gás de arraste é obtida pelo grande comprimento da coluna e pequeno

diâmetro, já que não há recheio que promova um aumento de pressão e taxa de fluxo linear (HARRIS et al., 2001).

2.6.1.4. Resolução

A resolução é uma combinação de características de posição e de dispersão dos picos de eluição. Assim, quanto maior a diferença entre os tempos de retenção de picos adjacentes, melhor será a separação. Por outro lado, quanto mais largos forem os picos, pior será a separação (HARRIS et al., 2001).

Desta forma, a resolução é, provavelmente, o parâmetro cromatográfico mais observado em desenvolvimento de métodos qualitativos e principalmente quantitativos. A teoria envolvida na determinação da resolução está baseada na forma gaussiana dos picos e em função de seus desvios padrão. Na Figura 6 está representado o pico cromatográfico e suas relações estatísticas (HARRIS et al., 2001).

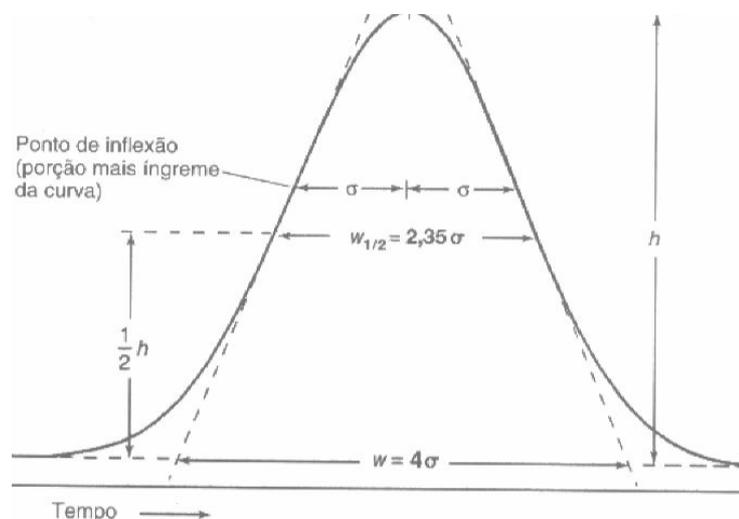


Figura 6 – Relação estatística do pico cromatográfico (HARRIS et al., 2001)

De acordo com a Figura 6, é possível observar que a largura do pico à meia altura equivale a $2,35\sigma$, enquanto a largura do pico na base é de 4σ . Estes valores estão relacionados com um fator de abrangência de 95,45% da área do pico e equivale à resolução igual à unidade. Na figura 7 estão representadas graficamente a resolução de duas situações (HARRIS et al., 2001)

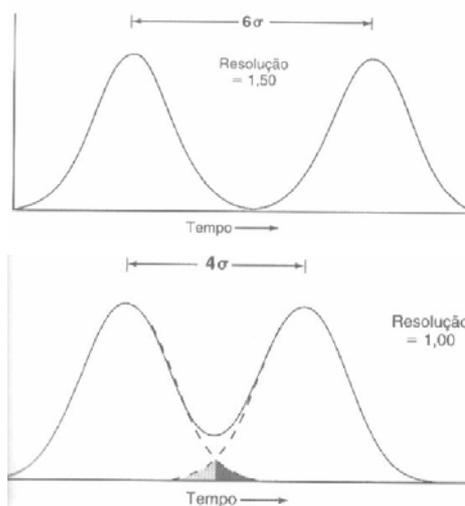


Figura 7 – Representação gráfica da resolução (HARRIS et al., 2001)

Então, a resolução é a medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos. Assim, a variação dos tempos de retenção Δt_R e a largura na base w_b são empregadas na Equação (23), da resolução:

$$R_S = \frac{2\Delta t_R}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad (23)$$

A utilização da largura a meia altura (w_h) será possível considerando $2,35\sigma$ ao invés de 4σ . O que resultará na Equação (24):

$$R_S = \frac{1,18\Delta t_R}{(w_{h1} + w_{h2})} \quad (24)$$

2.7. Espectrometria de massas

As contribuições para a formação de conceitos físico-químicos que possibilitaram o desenvolvimento da espectrometria de massas não são recentes. De acordo com os estudos de Faraday, em 1833, e posteriormente de Thompson e Millikan sobre a natureza das partículas, surge o fundamento principal da técnica: a medida da relação massa/carga (m/z). Assim, a partir de conhecimentos de eletrostática, da lei de Lorentz, e de mecânica clássica foi possível construir

instrumentos para controlar as trajetórias de íons em campos elétricos e magnéticos (USP, 2007).

O impacto da espectrometria de massas para a química geral e fundamental rendeu o Prêmio Nobel em 1922 para Francis William Aston pela invenção do espectrômetro de massas e mais recentemente, em 2002, para John Fenn pelos estudos da ionização “*electrospray*” que possibilitaram aplicações às macromoléculas biológicas elucidando informações estruturais sem precedentes (QMC, 2007). Porém, embora sejam significativas as contribuições da espectrometria de massas, os acoplamentos com técnicas cromatográficas foram fundamentais para o desenvolvimento da química analítica ambiental. Atualmente a espectrometria de massas é considerada indispensável para identificação de pesticidas em amostras ambientais e no atendimento dos limites máximos permitidos estipulados pela União Europeia e outros organismos legislativos que limitam a presença de pesticidas (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.7.1 Fundamentos da espectrometria de massas

Em um espectro de massas, as moléculas neutras são ionizadas e decompostas em fragmentos de íons. A massa de íons é uma função de suas razões massa-carga. Devido a carga ser mais comumente “um positivo” (ou seja, é mais fácil perder um elétron do que dois, ou ainda, do que ganhar elétrons) a relação massa-carga é geralmente reduzida à denominação “massa”. (SILVERSTEIN et al., 1998).

Os espectros de massas não ocorrem necessariamente de decomposição seqüenciais, pois cada espectro é composto por muitas moléculas decompostas em múltiplas vias e caminhos competitivos. Assim, a obtenção de um espectro de massas pode ser analisada como uma probabilidade de formação de determinados íons que permanecem estáveis, sob condições bem definidas, até o momento da detecção (AGILENT, 2000).

A ionização por impacto de elétrons ocorre quando um filamento aquecido produz uma função trabalho disponibilizando elétrons em abundância na sua superfície. Estes elétrons livres são acelerados por uma diferença de potencial elétrico na ordem de 70 eV e atingem as moléculas neutras retirando-lhes um elétron e formando um cátion radical chamado íon molecular e representado pela

maior razão massa-carga. Após a ionização é gerada uma instabilidade onde ocorrem fragmentações sucessivas para a estabilização das forças intramoleculares. A partir da geração de íons positivos, imediatamente o “*repeller*”, lente com potencial positivo, acelera os cátions para fora da fonte de íons, no sentido da detecção. Assim, cada cátion fragmento tem uma probabilidade de ocorrer que depende de seu tempo de sobrevivência na fonte de íons e é proporcional a sua abundância no espectro de massas, o mais abundante é denominado pico base (AGILENT, 2000; FERNANDEZ-ALBA, 2005).

A fragmentação não é um processo aleatório, e sim, previsível e baseado em princípios químicos como: localização da carga, mecanismos de clivagem e estabilidade de produtos. Assim, as interpretações de espectros podem levar a estrutura molecular (AGILENT, 2000).

Enquanto não tivermos uma ferramenta computacional capaz de construir um espectro de massas a partir de uma estrutura química *ab initio* ou que converta um espectro de massas em estrutura química, devemos ser capazes de entendermos suficientemente bem, para propormos íons que podem ser gerados em determinados compostos ou estruturas que podem ter gerado um espectro de massas. Estes aspectos são complementares e devem ser considerados na interpretação de espectros de massas (AGILENT, 2000).

2.7.2 Analisador de quadrupolo

Este instrumento é considerado o mais barato, compacto e robusto espectrômetro de massas do mercado sendo considerado um filtro de massas de alta velocidade de varredura (SKOOG et al., 2002).

O filtro de massas é constituído por quatro barras paralelas conectadas eletricamente e submetidas a uma condição eletromagnética em que apenas uma determinada razão massa-carga possa ser transmitida (FERNANDEZ-ALBA, 2005; SKOOG et al., 2002). O processo de varredura de massas é a somatória dos estágios individuais de seleção de massas. Por esta razão, o monitoramento seletivo de íons é muito mais sensível que o modo de varredura, pois a sensibilidade é dedicada a apenas dois ou três íons.

A Figura 8 mostra um esquema do analisador de massas quadrupolar e abaixo o sistema de seleção de massas, onde no eixo x são transmitidas razões

massa-carga inferior a um determinado valor e no eixo y superior. Isto ocorre de forma que apenas uma unidade de massa seja estável em sua trajetória até o detector.

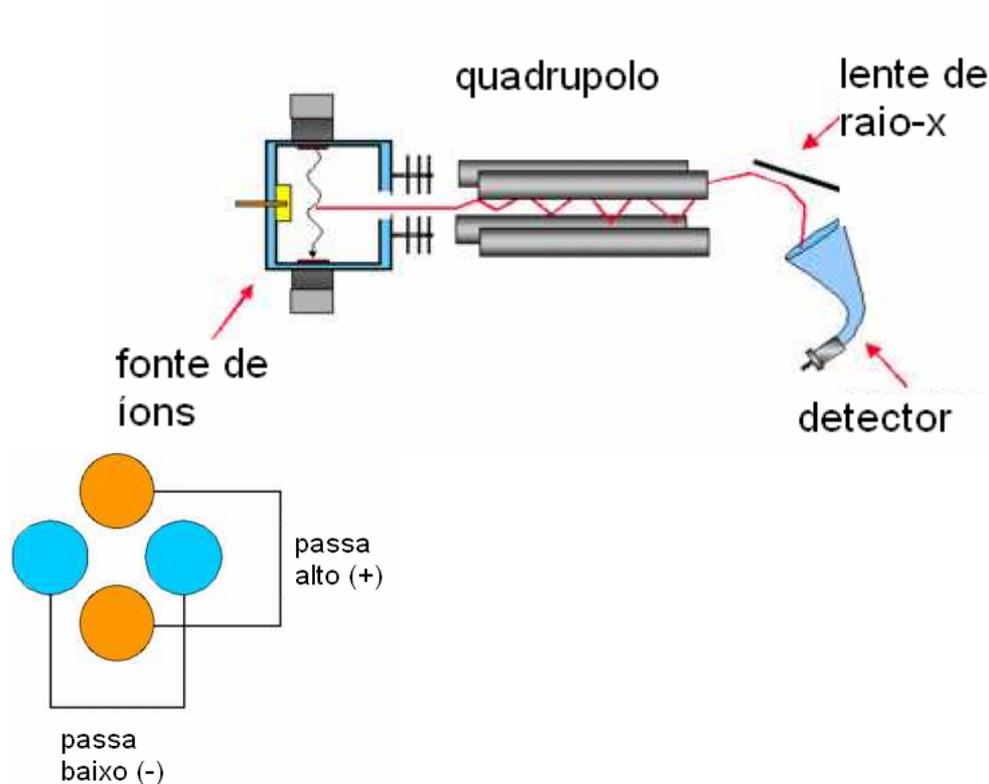


Figura 8 – Esquema de um analisador de massas quadrupolar

2.7.3. Modos de operação

Em analisadores quadrupolo existem dois modos de operação.

No modo SCAN é realizada uma varredura onde uma faixa extensa de massas é analisada. O objetivo é uma informação estrutural precisa de um determinado composto, ou análise retrospectiva. No entanto, devido a baixa sensibilidade deste modo de operação no quadrupolo, a tendência para análise retrospectiva é a utilização de espectrômetro por tempo-de-vôo que não apresenta perda de sensibilidade no modo SCAN.

No modo SIM (do inglês, *single ion monitoring*) o analisador quadrupolar apresenta elevada sensibilidade sendo a técnica ideal para análise de ultra-traços de pesticidas em amostras ambientais. Usualmente criam-se janelas de retenção onde são monitorados íons característicos dos compostos de interesse. A relação entre os

íons monitorados é utilizada para confirmação da presença da substância alvo (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.7.4 Desenvolvimento e otimização de métodos em GC-MS

O desenvolvimento de métodos visando aumento de sensibilidade exige uma avaliação criteriosa do sistema do sistema GC-MS. Sem uma otimização adequada do cromatógrafo a gás, a sensibilidade do espectrômetro de massas pode não atingir as expectativas. Assim, quanto mais amostra deixar o sistema de injeção e atingir a fonte de íons, maior será o sinal. A produção de ruído também deve ser minimizada, pois diminui a relação sinal-ruído e conseqüentemente a possibilidade de detectar pequenas concentrações de analito (DOHERTY, 1999; DOHERTY, 2003).

Uma boa sensibilidade pode começar com a qualidade do gás de arraste, geralmente He com 99,999% de pureza. A utilização de *filtro* de purificação de gás é recomendada, pois auxilia na retirada de traços de água, oxigênio e hidrocarbonetos que podem levar ao aumento de *background* (DOHERTY, 2003).

Outro parâmetro de grande importância é o injetor *splitless*. Neste sistema, existe uma série de aspectos que devem ser observados. Em análise de traços, o insersor deve ser: desativado, com restrição simples na sua parte inferior e de grande volume (geralmente 0,9 mL) para garantir maior quantidade de injeção da amostra. Os selos *O-ring* devem ser substituídos para evitar vazamentos e alteração em tempos de retenção. O selo de ouro reduz a degradação térmica dos analitos via catálise metálica. O septo deve ser de baixo sangramento e devidamente condicionado para minimizar ruído. Sua substituição periódica evita liberação de material que produz sangramento demasiado e efeitos indesejáveis no *background*. É conveniente observar qual a temperatura máxima de utilização, para manter boa com qualidade de ruído (DOHERTY, 2003).

A temperatura do injetor também deve ser um compromisso entre a volatilização rápida dos compostos menos voláteis e a degradação dos compostos menos estáveis (LANÇAS, 1993).

O controle eletrônico de pressão é recomendado para repetitividade dos tempos de retenção e áreas dos picos. O modo *pulsed splitless* permite transferência de grandes volumes de amostra para coluna, isto ocorre devido à

utilização de um pulso de pressão por um período de tempo pré-determinado, Figura 9. A linha tracejada mostra a temperatura do forno (no eixo y à direita) que deve ser baixa no período do pulso de modo que os analitos sejam focalizados no começo da coluna. A linha cheia mostra a pressão do injetor (no eixo y à esquerda) ao longo do tempo (no eixo x). A seta, na origem, indica o momento da injeção.

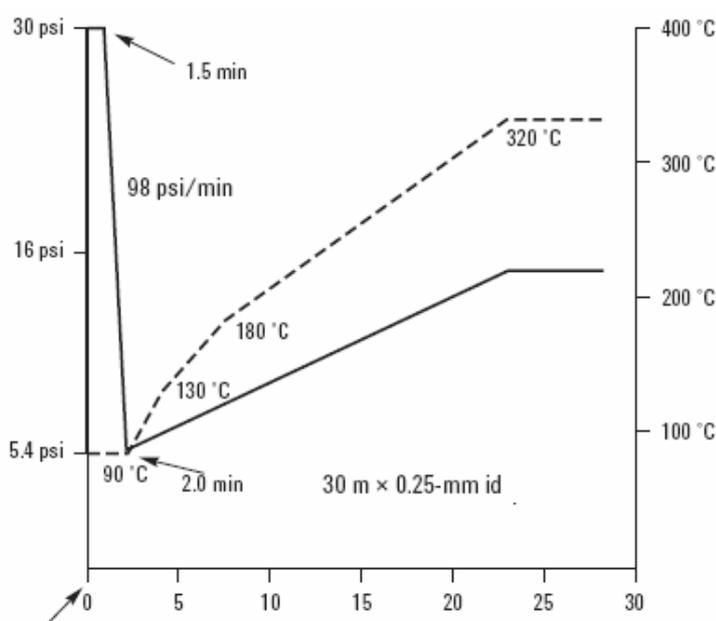


Figura 9 – Esquema de injeção no modo *pulsed splitless* (DOHERTY, 2003)

A teoria fundamental deste processo de otimização pode ser melhor compreendida através de um estudo da lei dos gases ideais e dos princípios teóricos desenvolvidos por Charles, Boyle, Gay-Lussac e Avogadro (FILHO et al., 1992). Resumidamente, como 1 mol de solvente em estado gasoso ocupa um volume constante de 22,4 L, independente de sua massa molecular, a massa de matéria contida em um volume qualquer é proporcionalmente maior para compostos de maior massa molecular. Assim, para um mesmo volume de amostra líquida injetada no insersor, o coeficiente de expansão será menor para solventes de maior massa molecular, sendo assim, maior a quantidade de analito no volume do insersor.

Além da escolha de solventes com alta massa molecular, a elevação da pressão no modo pulsado permite um aumento do volume injetado. A temperatura tem efeito direto sobre o volume do gás, porém devido a magnitude das mudanças de temperatura estes efeitos têm menor impacto prático na otimização dos parâmetros de injeção (RESTEK, 2007).

Quando disponível, a utilização de um vaporizador de temperatura programável permite a eliminação de grande volume de solvente e a concentração dos analitos (DOHERTY, 2003; RESTEK, 2007).

Na seqüência, a escolha da coluna depende da aplicação. Em nível de traços, a coluna deve ter baixa espessura de filme, pequeno diâmetro e baixo sangramento. Uma coluna de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme com fase 5% fenil – 95% metil silicone é considerada muito versátil para compostos de polaridades variadas (DOHERTY, 2003). A seguir, a Figura 10 mostra a influência do diâmetro (a) e da espessura de filme (b). No eixo das abscissas está a velocidade linear média do gás (cm s^{-1}) e no eixo das ordenadas a altura do prato teórico.

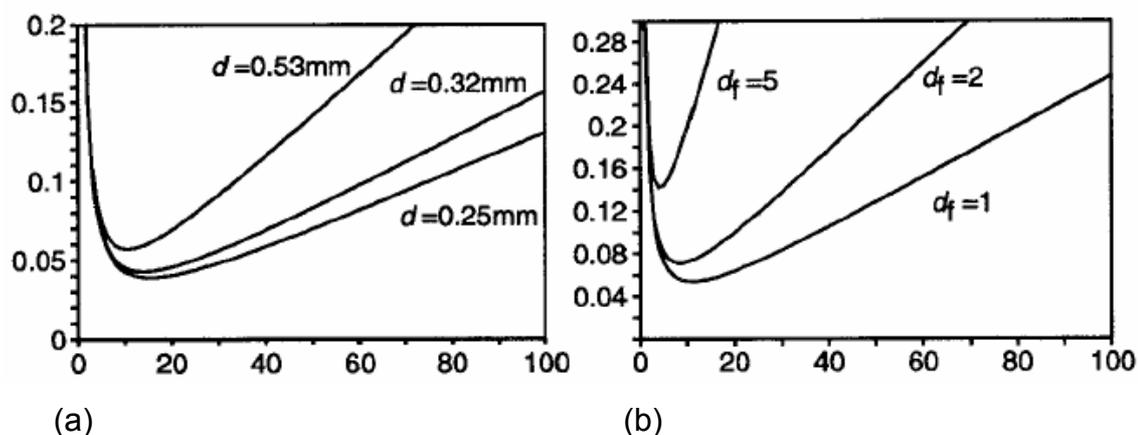


Figura 10 – Efeitos da espessura do filme e diâmetro da coluna cromatográfica sobre a eficiência da separação (JIMENEZ, 2003).

A programação de temperatura do forno é importante, pois é o principal fator ligado à mobilidade e velocidade de deslocamento dos compostos na coluna. A temperatura inicial do forno deve estar pelo menos 10°C abaixo do ponto de ebulição do solvente evitando um efeito de alargamento de banda indesejável (DOHERTY, 2003). Segundo LANÇAS (1993) a temperatura deve ser suficientemente alta para garantir menor tempo de análise e baixa o bastante, para promover as separações necessárias. A programação de temperatura em rampas multilineares pode estabelecer separações adequadas e promover altas velocidades de saída dos compostos no momento da detecção, favorecendo assim, picos altos e estreitos, e com isso, maior sensibilidade e eficiência do sistema.

Na porção final da coluna, a interface deve apresentar uma temperatura entre 10 e 15°C superior que a temperatura máxima da programação do forno evitando condensação de compostos na porção final da coluna (DOHERTY, 2003).

Eluídos do cromatógrafo, os compostos chegam à fonte de íons, onde ocorrerá o processo de ionização e fragmentação. Em um equipamento portador de quadrupolo com fonte de ionização por impacto de elétrons, as moléculas neutras são ionizadas em picosegundos. A estabilização de energia e a fragmentação ocorrem na ordem de nanosegundos e a análise de massas completa em microsegundos. Neste período é importante que se obtenha um sistema de vácuo altamente eficiente evitando a neutralização dos íons formados da fonte. Quanto maior o vácuo (usualmente na ordem de 10^{-5} Torr) maior será o caminho médio livre entre as moléculas e maior a chance que elas atinjam o detector aumentando a sensibilidade (AGILENT, 2000).

Outro aspecto importante é a seleção de íons no modo SIM, que devem ser abundantes e específicos. É importante evitar íons interferentes, comuns no sangramento da coluna, ftalatos, etc. Usualmente são utilizados dois íons de massa-carga maior que 200 m/z ou três íons de massa-carga maior que 100 m/z. A intensidade relativa deve ser de 20% para confirmação do analito. Em alguns casos próximos do limite de detecção esta tolerância pode aumentar e a decisão pode ser subjetiva, baseada no histórico e experiência do analista (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

A velocidade de aquisição deve garantir um mínimo de 9 pontos necessários para definição gaussiana do pico. O tempo de permanência em cada íon pode ser calculado em função da largura do pico cromatográfico (AGILENT, 2000).

A sintonia de massas é otimizada automaticamente pela função *a-tune* onde, um padrão interno com fragmentação e abundâncias relativas conhecidas, ajustam as voltagens das lentes de forma a atingirem os centros de massas e suas respectivas intensidades. No final, a multiplicadora de elétrons pode ser ajustada para amplificar o sinal do analito. Este tipo de otimização deve ser estudado caso a caso pois da mesma forma que aumenta a sensibilidade do sinal de interesse pode aumentar o ruído de fundo, não alterando a relação sinal-ruído.

2.7.5. Aplicações em análise de pesticidas com amostras aquosas

A Tabela 5 apresenta a revisão bibliográfica realizada sobre a análise de pesticidas em água.

Tabela 5 – Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas em água

Finalidade	Preparo da amostra	Determinação	Resultado	Referência
Determinação de 32 pesticidas e metabólitos de diferentes classes, entre eles: molinato, trifluralina, simazina, atrazina, lindano, alaclor, metolacloro e metoxicloro, em águas superficiais.	SPE automático. O cartucho foi condicionado com acetato de etila, metanol e água, após percolação de 500 mL de amostra com 1 mL de metanol contendo padrões deuterados, secagem 18 min com N ₂ e eluição com acetona e misturas de acetato de etila/hexano.	Sistema GC-MS quadrupolo. Coluna DB-5 60 m, 0,25 mm, 0,25 µm. Forno 70-310 °C em programação multilinear de temperatura, injeção sem divisão de 1 µL. O tempo total de análise foi de 53 min. Foram monitorados dois íons por pesticida em nove janelas de aquisição.	O método foi avaliado quanto à faixa linear ($r > 0,999$, em 1 ordem de grandeza), LD do método entre 1-9 ng L ⁻¹ . As recuperações (80-120%) foram corrigidas pelo método de diluição isotópica. A incerteza expandida foi determinada abaixo de 40%.	PLANAS et al., 2006.
Análise de pesticidas organoclorados, entre eles: lindano, heptacloro, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin e DDT, em águas de profundidade.	Foram avaliadas três fibras de SPME. Os parâmetros de otimização foram: agitação, tempo de extração, pH, força iônica, tempo e temperatura de dessorção.	Foram utilizados dois sistemas cromatográficos: GC-ECD e GC-MS. Em ambos foram empregadas colunas SPB-5 30 m, 0,32 mm, 0,25 µm e fornos entre 70-260 °C. Injeções de 1 µL em modo sem divisão de amostra.	O método apresentou boa sensibilidade com níveis de ng L ⁻¹ . A linearidade foi testada entre 1-1000 ng L ⁻¹ apresentando $r > 0,97$. e precisão abaixo de 10%.	PÉREZ-TRUJILLO et al., 2002.
Desenvolvimento de método para determinação de HCB, Lindano, Heptacloro, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Endossulfan, DDD, DDT, Endrin aldeído e Metoxicloro por GC-MS-SIM em água do mar.	A extração ocorreu pela técnica de LPME levando 30 min sob agitação constante. O volume de amostra utilizado foi de 5 mL e a recuperação ocorreu em 5 µL. O solvente escolhido foi o tolueno por apresentar baixa solubilidade em água e baixa volatilidade.	A determinação por GC-MS utilizou coluna DB-5 de 30 m, 0,32 mm, 0,25 µm com vazão de 1,5 mL L ⁻¹ e forno 50-300 °C. A temperatura do injetor foi de 250 °C com injeção de 1 µL. A voltagem do detector foi de 1,5 kV e 3 íons para monitoramento. Tempo total: 30 min.	A linearidade foi determinada entre 5-100 µg L ⁻¹ com $r > 0,9884$ e RSD < 14%. Fator de concentração entre 63-155 vezes. Os LD variaram entre 0,013-0,059 µg L ⁻¹ e foram adequados quando comparados ao <i>EPA Method 508</i> .	BASHEER et al., 2002.

<p>Analisar traços de 12 pesticidas, entre eles dieldrin, em amostras de água por GC-ECD e GC-MS e GC-MS-MS utilizando SPE.</p>	<p>O preparo da amostra foi realizado por SPE com C18. Condicionamento: acetonitrila-diclorometano, após metanol e água. Percolação com 500 mL de amostra. Secagem 15 min ar, mais 15 min N₂. Eluição: acetonitrila - diclorometano e após hexano. Evaporação e redissolução em 1 mL acetona-hexano (1:9).</p>	<p>GC-ECD: coluna HP-1 60 m, 0,25 mm, 0,25 µm, injetor operando sem divisão, temperatura do forno entre 130-300 °C. Injeção de 1 µL. GC-MS: coluna DB-5MS, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, temperatura do forno entre 80-280 °C. Injetor operando sem divisão e temperatura programada possibilitando 5 µL de injeção.</p>	<p>Os resultados foram considerados adequados com LD entre 2 e 26 ng L⁻¹. A linearidade foi realizada por duas curvas de calibração por pesticida de forma a manter bons coeficientes de correlação. As recuperações ficaram entre 70-133% em fortificações de 100 ng L⁻¹ e precisões de 5,3-17,4%.</p>	<p>VIDAL et al., 2000.</p>
<p>Monitoramento de pesticidas em águas da região norte da Grécia, cujas fontes de abastecimento estão localizadas em localidade próxima a produção agrícola.</p>	<p>Foram utilizados cartuchos C18 de 200 mg para SPE. Na eluição foi utilizado 5 mL de acetato de etila e secagem com sulfato de sódio anidro. O eluato foi concentrado entre 100-1000 µL, com fatores de concentração de até 10.000 vezes.</p>	<p>GC-MS com injetor sem divisão, condição isotérmica de 230 °C e 2 µL de injeção. Coluna DB-5MS 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm. O método prevê análise de 130 pesticidas em diferentes classes.</p>	<p>A faixa de LQ é de 0,005-0,010 exceto simazina com 0,050 µg L⁻¹. Em três anos de monitoramento foram detectados com frequência pesticidas com alto índice de lixiviação, como, atrazina, alaclor, prometrina, propanil e carbofuran.</p>	<p>PAPADOPOULOU-MOURKIDOU et al., 2004.</p>
<p>Monitoramento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e pesticidas entre eles, simazina, atrazina e alaclor no rio Paraíba do Sul no Brasil.</p>	<p>SPE com C18 e polimérico Oasis de 60 mg (escolhido). Condicionamento em seqüência utilizando diclorometano, acetonitrila e água. Percolação: 200 mL de amostra e lavagem 1 mL de água. Secagem: 30min no vácuo.</p>	<p>GC-MS com coluna DB-5, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm. Forno: 60-300 °C e injetor com 280 °C. Tempo total: 45 min. O detector operou no modo SIM com apenas 1 íon por pesticida.</p>	<p>Os níveis de recuperação (precisão) foram de 82-119% (20%) para os pesticidas e 55-78% (18) para os HPAs. Em amostras reais, níveis de atrazina com 0,231 µg L⁻¹ fora encontrados em dois sítios.</p>	<p>AZEVEDO et al., 2004.</p>

<p>Monitoramento de 32 pesticidas, entre eles simazina e atrazina em água e solo no sul da Espanha.</p>	<p>SPE: condicionamento com diclorometano, metanol e água. Percolação: 200 mL de amostra acidificada à pH 3,5 e condutividade ajustada para 50 mS com HCl/NaCl. Fase polimérica Oasis HLB 200 mL. Secagem 30 min, eluição com metanol e redissolução 2 mL fase móvel.</p>	<p>HPLC com desgaseificador. Coluna C18 de 150 mm, 2,0 mm, 5 µm. Fase móvel: metanol com 0,01% ácido acético (A) e 0,01% ácido acético em água (B). Vazão de 2 mL min⁻¹ com gradiente entre 20-90% de A para B. Tempo: 50 min. Detector de massas com monitoramento de dois íons por pesticida.</p>	<p>Faixa linear: 0,05-1,00 µg L⁻¹, com R² > 0,98. recuperações entre 60-109,9% e precisões entre 4,7-15%. Os LQs ficaram na faixa de 0,025-0,050 µg L⁻¹.</p>	<p>VEGA et al., 2005.</p>
<p>Monitoramento de pesticidas incluindo trifluralina, simazina, atrazina, lindano, alaclor, metolacoloro, pendimentalina e endossulfan, em águas potáveis utilizando SPE-GC-MS.</p>	<p>Para SPE foram utilizadas 200 mg de copolímero estireno divinilbenzeno, Condicionamento: acetato de etila, metanol e água. Percolação: 500 mL de amostra com adição de 5 mL de metanol. Secagem: 20 min. Eluição: acetato de etila, evaporação e aferição com isooctano (0,5 mL).</p>	<p>GC-MS com coluna DB-5MS de 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm. Vazão 1,5 mL min⁻¹. Forno: 85-250 °C em programação multilinear. Injeção: 1 µL em modo sem divisão. A detecção foi realizada por 5 janelas de monitoramento com utilização de dois íons por pesticida.</p>	<p>Recuperações entre 47-131% (concentração de 0,100 µg L⁻¹). LDs entre 0,05-060 µg L⁻¹. Faixa linear entre 0,025-0,500 ng L⁻¹. Reprodutibilidade entre 5,5-20,5%. A recuperação e a massa injetada no GC foram as maiores fontes de incerteza. As triazinas foram os principais compostos detectados.</p>	<p>QUINTANA, et al., 2001.</p>
<p>Determinação de pesticidas, entre eles molinato, endossulfan, bentazona, heptacloro atrazina, aldrin, simazina, lindano e dieldrin, utilizando GC-MS e GC-ECD.</p>	<p>SPE polimérico 200 mg condicionado com hexano, acetato de etila e água. Percolação: 500 mL de amostra com adição de 15 g L⁻¹ de NaCl e vazão de 20 mL min⁻¹. Eluição: hexano e acetato de etila. Após evaporação ficou 1 mL.</p>	<p>GC-MS com coluna HP-1 de 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, temperatura de forno entre 60-205 °C (31,1 min). Injetor a 250 °C com injeção de 1 µL e vazão de 2 mL min⁻¹. O MS operou entre 50-425 m/z e em modo SIM.</p>	<p>GC-MS apresentou LD entre 0,02-0,10 µg L⁻¹ (bentazona 5 µg L⁻¹) no modo SIM e em torno de 500 vezes mais altos em SCAN. As recuperações após otimização ficaram entre 33-102%</p>	<p>AGUILAR et al., 1997.</p>

<p>Determinação de pesticidas organoclorados e organofosforados, entre eles: alaclor, endossulfan, endrin e DDT, por GC-MS-MS em água de superfície.</p>	<p>LLE utilizou 500 mL de amostra e três etapas de extração com solvente orgânico (10 min de agitação cada). Em SPE o disco de C18 foi condicionado por solvente orgânico e água. A percolação ocorreu com adição de 2,5 mL de metanol/500 mL. Após eluição o volume final para ambas as técnicas ficou entre 2-3 mL.</p>	<p>Na separação foi utilizada coluna DB-5.625 (MS), com dimensões 30 m e 0,25 mm. Forno: 70-244 °C em programação multilinear. Injetor a 255 °C, vazão de 0,7 mL min⁻¹ e 1 µL injetado em modo sem divisão. O MS operou em modo varredura entre 50-410 m/z.</p>	<p>O método foi considerado linear entre 0,048-1,20 µg L⁻¹ Para 9 pesticidas e entre 0,024-0,60 µg L⁻¹ para os outros 5 pesticidas. Os limites de identificação foram adequados segundo os autores. As recuperações e precisões foram equivalentes pelos dois métodos e adequadas.</p>	<p>TAHBOUB et al., 2005.</p>
<p>Otimização e validação para determinação simultânea de diferentes tipos de pesticidas, entre eles: trifluralina, lindano, HCB, alaclor, heptacloro, epóxido, endossulfan, metolacloro, heptacloro aldrin, endrin, DDT e metoxicloro, em água utilizando a técnica de GC-MS.</p>	<p>SPME com fibra de polidimetilsiloxisano com divinilbenzeno condicionada por 2 h à 300 °C. Condições de operação: 18 mL de amostra, temperatura 60 °C e tempo 45 min fixados, agitação de 500 rpm e nenhuma correção de pH e força iônica.</p>	<p>GC-MS por armadilha de íons com coluna VF-5MS de 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm com vazão de 1 mL min⁻¹. Forno entre 80-290 °C, em programação multilinear. Operando em modo SCAN entre 55-430 m/z e multiplicadora de elétrons com 1475 V.</p>	<p>O método foi aplicado a 46 pesticidas, sendo validado para 29 deles. A validação seguiu recomendações da ISO/IEC 17025 incluindo o cálculo de incerteza de medição. Os LDs encontram-se entre 4-17 ng L⁻¹. repetitividade entre 6,9-20,5%. Recuperações entre 58-105% em água de superfície.</p>	<p>BECEIRO-GONZÁLES et al., 2007.</p>

<p>Determinação de pesticidas entre eles: trifluralina. A análise foi aplicada a amostras de águas ambientais sem tratamento.</p>	<p>A etapa de preparo da amostra utilizou o método SPME em tubo. Este método utiliza uma coluna capilar para o enriquecimento dos analitos em um sistema <i>on line</i> acoplado ao HPLC.</p>	<p>A determinação por HPLC utilizou coluna Zorbax SB C18 de 150 mm, 0,5 mm, 5 µm, Os analitos foram eluídos com um gradiente de água e água e acetonitrila. O tempo de corrida foi > que 50 min.</p>	<p>Foram destacados pontos positivos como, mínima manipulação da amostra, baixo custo, velocidade, e aumento de sensibilidade. Os LDs baixaram de 50-1000 µg L⁻¹ para 0,1-10 µg L⁻¹.</p>	<p>CHÁFER-PERICÁS et al. 2007.</p>
---	---	---	--	------------------------------------

2.8. Validação

2.8.1 Definições

“Validação: *ato ou o efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado*” (LANÇAS, 2004). O primeiro período desta definição pode ser encontrado facilmente em dicionários de língua portuguesa, mas é em seu complemento que surge a visão de qualidade ligada à informação analítica. Neste contexto, são inúmeras as definições desenvolvidas por órgãos competentes a cerca de validação de métodos:

- Estabelecimento, mediante estudos sistemáticos de laboratório, que as características de um respectivo método cumprem as especificações relativas ao uso previsto dos resultados analíticos (ISO 8402, 1994).

- Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM, 1998).

- A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

- Confirmação por exames e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025:2005, 2005).

De acordo com estas definições, podemos dizer que a validação de método é aplicada ao procedimento analítico com um escopo claro e definido, tendo como objetivo, garantir a confiabilidade dos resultados gerados, assegurando um nível adequado de precisão e exatidão e demonstrando aptidão ao uso pretendido. Esta comprovação deve ser feita de maneira empírica, em laboratório, sob condições reais de trabalho, fornecendo evidências claras e rastreáveis dos parâmetros de desempenho obtidos.

2.8.2 Contextualização

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação da enorme variabilidade de resultados obtidos em estudos interlaboratoriais na década setenta. A partir da iniciativa de instituições do governo americano, como FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e EPA (do inglês, *Environmental Protection Agency*), criou-se o sistema denominado ISO/IEC-25 (do inglês, *International Standardization Organization / International Electrotechnical Commission*). O principal objetivo dessas organizações é a padronização das exigências a serem seguidas pelos laboratórios, a fim de demonstrarem competência na realização dos serviços, assim como tornarem os resultados internacionalmente aceitos e passíveis de reprodução em outros laboratórios (LANÇAS, 2004).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis, podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem para resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

Na prática, a adequação ao uso (em inglês: *fitness for purpose*) dos métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação de métodos. Tais estudos produzem dados quanto ao desempenho total e aos fatores de influência que podem ser aplicados a estimativa de incerteza associada aos resultados do método em uso normal (EURACHEM, 2002).

Uma visão atual sobre validar, em análise química, foi muito bem elaborada por LEITE (2002), segundo ele: "validação a 100% é utopia, sempre haverá um critério pessoal, ou seja, aceitar sempre gerará um conflito. É importante lembrar que não existe um modelo pronto para sistemas de validação, portanto, o interessado deve fazer adaptações, adequando as recomendações às suas necessidades". E complementa afirmando que este processo sempre envolverá um cliente e este sempre estará ávido, não só pela confiabilidade do resultado, mas também pelo

menor custo e prazo. A Figura 11 procura mostrar a situação do esforço aplicado na obtenção de um resultado que idealmente seria um esforço reduzido e satisfação ampliada (LEITE, 2002).

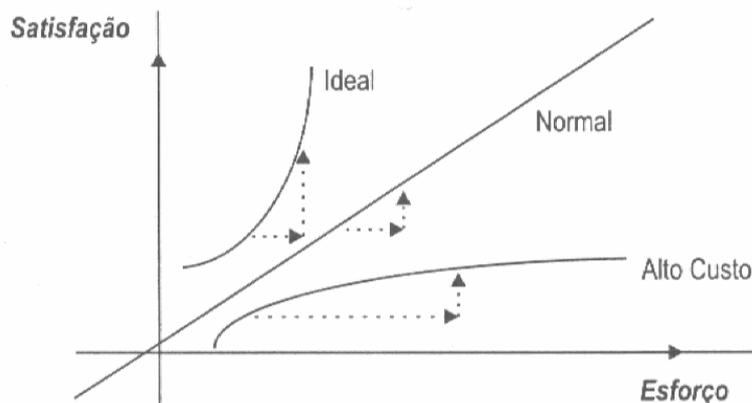


Figura 11 – Relação entre satisfação e esforço (LEITE, 2002)

Nesta situação, fica clara a importância do estudo de validação, pois é através dos parâmetros de desempenho e da estimativa de incerteza de medição que as decisões deverão ser tomadas. Assim, é possível concentrar os esforços nos pontos críticos e diminuir impedimentos burocráticos e custos desnecessários.

Quando LEITE (2002) escreve sobre a administração de mudanças, fica clara a visão empresarial do autor: "validar não é um processo gratuito, porém é considerado como um investimento e não como despesa. Como existem custos, se faz validação por algum interesse: por exigência de clientes ou de fiscalização, para reduzir custos de re-análise, porém, muito pouco por vontade própria. O certo é que por sobrevivência, ou por visão futura, a validação será feita".

Assim, é na união de esforços entre visão administrativa e competência técnica, que surgem os chamados "Sistemas da Qualidade". Assim, programas de Garantia da Qualidade (*Quality Assurance*, QA) visam programar ações sistemáticas necessárias para prover um serviço de adequada confiabilidade e, de maneira a satisfazer suas finalidades. A QA engloba o Controle de Qualidade (*Quality Control*, QC), o qual está relacionado aos procedimentos executados no laboratório para garantir o controle do sistema de medidas (LANÇAS, 2004).

O sistema da qualidade é necessário para as duas maiores organizações internacionais que normatizam laboratórios de ensaio: ISO / IEC 17025 e a OECD GLP (do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development Good Laboratory Practice*). A comparação dos requerimentos técnicos e administrativos

entre as duas organizações foi publicada mostrando uma maior necessidade de estudos e planejamentos institucionais para a OECD GLP e exigindo mais serviços que demonstrem competência técnica na acreditação pela ISO / IEC 17025.

2.8.3 Medidas de Qualidade

Segundo LANÇAS (2004), para garantir que as análises estejam corretas, o laboratório deve seguir diferentes medidas de qualidade:

- Qualificação instrumental;
- Validação do método no equipamento testado;
- Adequação do sistema (em inglês, *System Suitability*), envolvendo o equipamento e o método validado.

A Figura 12 ilustra a relação entre as três medidas:



Figura 12 – Relação entre as medidas de qualidade

2.8.3.1 Qualificação da Instrumentação

O teste do equipamento inclui protocolo sobre os componentes do cromatógrafo, os quais devem ser testados rotineiramente, em intervalos de tempo predeterminados (LANÇAS, 2004).

A verificação de equipamentos pode ser feita observando se suas variáveis de análise estão eficientes. As variáveis de análises a serem consideradas são:

temperaturas, fluxo de fluídos vetores, eficiência da separação e a detectabilidade / sensibilidade dos detectores (LEITE, 2002).

No entanto, é de conhecimento dos cromatografistas que todas as variáveis de análise, podem ser monitoradas através dos cromatogramas, considerados a impressão digital (em inglês: *fingerprint*) da análise cromatográfica. Um bom diagnóstico poderá ser realizado através do conhecimento da teoria básica da cromatografia gasosa por meio dos parâmetros de performance. (AGILENT, 2001; LEITE, 2002; LANÇAS, 1993).

2.8.3.2 Validação do método

Atualmente é vasta a literatura abordando o tema validação. O interesse começa na universidade, fornecendo a base teórica envolvida, e continua nos laboratórios dos diversos setores industriais e governamentais. Assim, os grandes fabricantes de equipamentos, redes metrológicas e o meio acadêmico, contribuem para a formação de profissionais capazes de atender os requerimentos que regem a validação de métodos.

Neste sentido RIBANI et al. (2004), sugere duas grandes esferas no âmbito da validação de métodos analíticos:

- A primeira é a chamada validação no laboratório (em inglês: *in house validation*), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório. Nesta fase o laboratório avalia todas as características de desempenho do método sem levar em consideração a reprodutibilidade, ou seja, sem a participação em estudos interlaboratoriais.

- A segunda trata-se da validação completa (em inglês: *full validation*), que envolve as características de desempenho do método e um estudo interlaboratorial. Só assim, a metodologia torna-se oficial apresentando dados de reprodutibilidade e incerteza expandida associada à metodologia como um todo.

Na validação interna, as características de desempenho do método (ou parâmetros da validação) devem estar claramente declaradas no procedimento documentado e incluir, quando aplicável: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (bias), precisão, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2003).

2.8.3.2.1 Especificidade e seletividade

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz a resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz a resposta para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2003).

Segundo RIBANI et al. (2004), o emprego dos termos especificidade e seletividade geram confusão desnecessária e isto pode ser evitado utilizando somente o termo seletividade. Isto acontece, porque há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância.

Assim, se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. Por isso, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI et al., 2004).

De acordo com LANÇAS (2004), a seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas, como resíduos de pesticidas em alimentos.

Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos testes e achar soluções para os problemas encontrados. A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, esses problemas podem ser superados através de adição-padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação e detecção (INMETRO, 2003).

Dependendo da técnica analítica utilizada, a quantidade relativa da matriz pode diminuir conforme a amostra é processada durante as etapas do ensaio. A matriz está presente nas fases de amostragem, no pré-tratamento da mostra e nas etapas de preparação. Alguma porção da matriz entra no sistema de separação e

alguns componentes podem ainda estar presentes na fase de detecção (INMETRO, 2003).

Em geral uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analítico de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Neste caso, devem-se empregar várias amostras, e a ausência de picos próximos o tempo de retenção do analítico de interesse deve ser observado. Entretanto, para matrizes complexas, somente este critério poderá não ser suficiente para atestar a seletividade do método. Deve-se ainda demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o componente, ou seja, é realmente o analito procurado. Isso é importante em decorrência da possibilidade de co-eluição do composto com outros interferentes, principalmente em análises contendo muitos compostos (LANÇAS, 2004).

Há duas maneiras mais comuns de verificar co-eluição em cromatografia. A primeira consiste em analisar a amostra em duas colunas com características diferentes. A segunda é com o uso de detectores denominados seletivos. Na análise de resíduos de pesticidas, durante muitos anos foi bastante popular o uso de duas colunas de dois detectores diferentes com o propósito de minimizar, tanto quanto possível, o problema provocado pela co-eluição. Atualmente, a forma mais segura é pelo uso de um detector seletivo de massas (LANÇAS, 2004).

De acordo com a AOAC (2002), o analito isolado deve demonstrar que não há evidência de outros compostos quando cromatografados em outros sistemas com diferentes colunas e solventes ou quando examinados por outras técnicas utilizadas para especificidade (infravermelho, ressonância nuclear magnética ou espectrometria de massas).

No entanto, no documento orientativo do INMETRO (2003), a matriz da mostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no modelo anterior. Neste sentido, vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade.

- Se a matriz da amostra sem analito estiver disponível:
 - Testes-F (*Snedecor*) e Teste-t (*Student*)

Preparam-se dois grupos de amostras teste, um com a matriz e outro sem, ambos com as concentrações dos analitos idênticas em cada nível de concentração

de interesse. Um número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a sete para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida. Os estudos estatísticos poderão levar em consideração: testes-F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste-t (*Student*) de comparação de médias (INMETRO, 2003).

- Recuperação Média

Segundo BARROS et al. (2005), uma forma simples de avaliar a seletividade é comparar uma curva padrão com e sem matriz através do método de recuperação média. Neste método, plotam-se os resultados em uma tabela, onde para cada nível de concentração é calculada a recuperação média do analito com a matriz em relação ao analito sem a matriz.

Um bom critério para verificar se a recuperação média é adequada pode estar baseado em um parâmetro de precisão, como por exemplo, o intervalo de confiança de 95%.

- Regressão Linear

Outra maneira de avaliar o efeito de matriz da amostra é através da regressão linear. Plota-se no eixo y a concentração obtida do analito com a matriz da mostra e no eixo x a concentração obtida do analito em solução padrão. Então plota-se a reta de regressão $y = ax + b$. Reporta-se o coeficiente linear da reta (b); e o coeficiente angular da reta (a); desvio padrão (s) de “a” e de “b”; e intervalo de confiança de “a” ($IC_a = a \pm ts_a$; ideal conter “um”) e de “b” ($IC_b = b \pm ts_b$; ideal conter “zero”) (BARROS et al., 2005).

Segundo a IUPAC (2002), a seletividade pode ser quantificada através de um índice de seletividade obtido pela razão entre a_{an}/a_{int} . Onde a_{an} é a sensibilidade do método (inclinação da função analítica) e a_{int} é a inclinação produzida independentemente por um interferente potencial.

- Se a matriz da amostra sem analito não estiver disponível:

- Teste de adição padrão

Poderá ser feita uma curva analítica com a edição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparando-se então duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo (RIBANI et al., 2004).

A aplicação de testes estatísticos poderá ser utilizada a exemplo dos estudos descritos anteriormente. Embora neste caso, somente o coeficiente angular da equação da reta seja estudado, tendo em vista que o coeficiente linear corresponderá ao analito presente originalmente na amostra.

2.8.3.2.2 Curva de calibração, linearidade e faixa de aplicação

Curva de calibração

A função calibração de um processo de medição química é a relação funcional entre o valor esperado para o sinal ou resposta e a quantidade de analito. (BARROS et al., 2005). Esta relação empírica pode ser visualizada através de um gráfico relacionando as respostas do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. A variável independente (eixo x) relaciona as várias concentrações preparadas do padrão analíticos da substância de interesse, e a dependente (eixo y), ao sinal analítico obtido para cada concentração do padrão (LANÇAS, 2004).

Existem vários métodos para construir uma função de calibração:

- Padronização Externa

Neste método, a massa de analito é determinada diretamente por interpolação do gráfico de calibração ou através da equação que descreve o comportamento do sinal analítico em função dos padrões que o geraram. Este método é sensível a erros de preparo das soluções e de injeção (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

- Padronização Interna

Este método consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, as quais se adicionam a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. A curva analítica é obtida relacionando a razão dos sinais (analito / padrão interno) com a concentração do analito. Este método é bastante útil, pois independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais como, por exemplo, o volume injetado em cromatografia gasosa (RIBANI et al., 2004).

- Superposição de Matriz

Consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da mostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Este método pode estar associado a padronização externa ou interna. O objetivo é compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes nas etapas de pré-concentração, extração, separação e detecção (RIBANI et al., 2004).

- Adição Padrão

Neste método, adicionam-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada à quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada. (RIBANI et al., 2004).

Na a Figura 13, pode-se observar a relação entre os métodos. De forma geral, pode-se dizer que o método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto o método de superposição de matriz compensa o efeito matriz e o método de adição padrão corrige o efeito da matriz e as mudanças da resposta do instrumento (RIBANI et al., 2004).

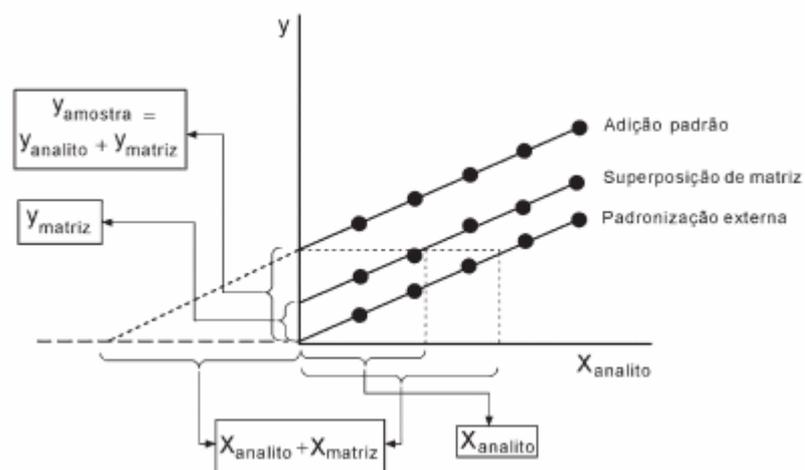


Figura 13 – Representação gráfica entre os métodos de calibração (RIBANI et al., 2004).

Linearidade

É a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito, dentro de uma dada faixa (BARROS et al., 2005).

De acordo com INMETRO (2003), a equação da reta (25) relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (25)$$

Onde:

y = resposta medidas

x = concentração

a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade)

b = intersecção com eixo y , quando $x = 0$.

A regressão geralmente utilizada para análise é a dos quadrados mínimos, sendo a equação da reta obtida registrada. O cálculo de regressão é insuficiente para estabelecer a linearidade do método. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico e uma dispersão aleatória dos resíduos em torno do zero, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados. A correlação é, normalmente, calculada por intermédio do coeficiente r de *Pearson*, ou pelo coeficiente de determinação r^2 (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; EURACHEM, 1998).

Segundo LEITE (2002), o coeficiente de correlação r é expresso pela equação (26):

$$r = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\sqrt{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2} \cdot \sqrt{n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2}} \quad (26)$$

Neste caso, o r indica o grau de ajuste do modelo de regressão. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, quanto mais próximo de um, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados a e b . Normalmente um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004).

Em alguns casos, não é possível explicar o comportamento de uma função analítica através de modelos lineares. Nestes casos devem ser adotados modelos polinomiais de segunda ordem, equação (27) (EURACHEM, 1998).

$$y = ax^2 + ax + b \quad (27)$$

Da mesma forma que o modelo linear, o polinomial deve ser avaliado visualmente pela aleatoriedade na análise dos resíduos e pelo coeficiente de correlação. É importante lembrar que o desvio de um modelo polinomial também deve ser observado, já que a equação matemática de um modelo não-linear também é capaz de prever os valores de $X = f(Y)$.

Faixa de aplicação

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito para a qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2003).

Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica. Pode ser definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003).

Conforme INMETRO (2003), os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de t pela equação (28):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{S_r / \sqrt{n}} \quad (28)$$

Onde:

$$\text{resíduo} = |x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$$

S_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

Se o valor de t calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t unilateral, para a confiança desejada e $(n-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto permanece à curva e a faixa até ele é linear.

Outra forma de estabelecer a faixa linear foi proposta por LANÇAS (2004), segundo critérios da IUPAC. Neste modelo é realizada uma determinação gráfica da linearidade como mostra a Figura 14.

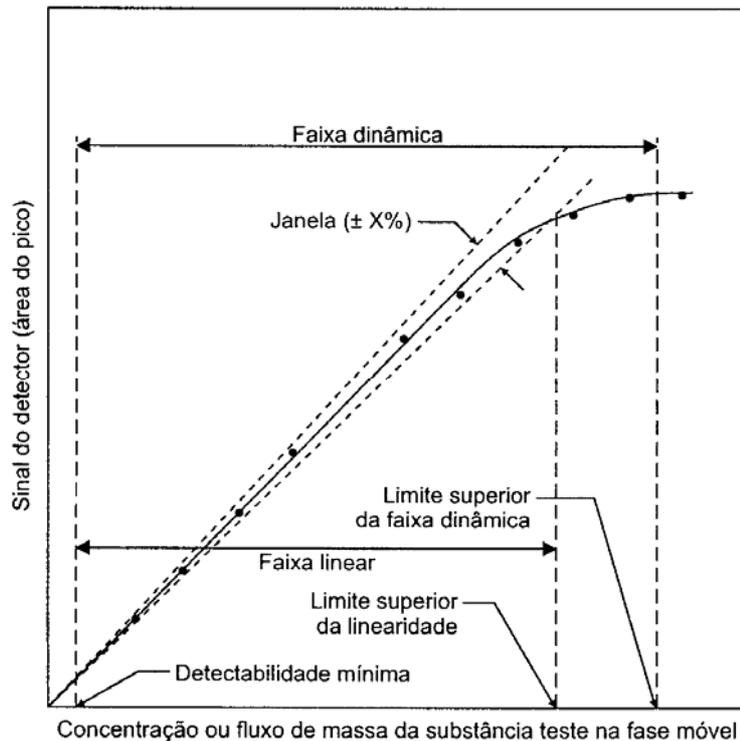


Figura 14 – Determinação gráfica da linearidade e da faixa dinâmica (LANÇAS, 2004).

Uma abordagem gráfica de melhor visualização foi publicada por RIBANI et al. (2004). Neste caso, é construído um gráfico onde são plotadas as razões (sinal / concentração) no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x . Na figura 15, está representado este modelo onde a linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear, dentro dos limites estabelecidos.

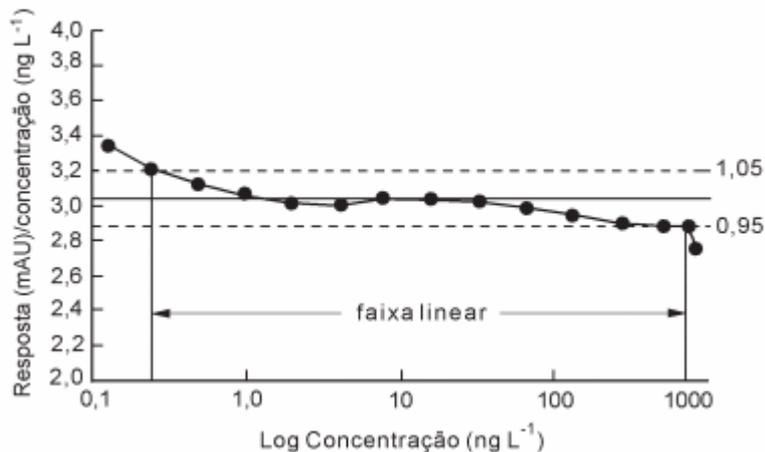


Figura 15 - Gráfico da razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica (RIBANI et al., 2004).

A faixa de aplicação está relacionada ao intervalo entre o valor superior e inferior que atenda aos requisitos mínimos de precisão e exatidão. Para a análise de resíduos de pesticidas, o GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do limite de quantificação. Além disso, sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração no mínimo três vezes cada, com estimativa de desvio padrão relativo entre as injeções inferior a 5% (RIBANI et al., 2004).

2.8.3.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão são conceitos confundidos com muita frequência. Enquanto a precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si, a exatidão mede o quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como verdadeiro. A Figura 16 mostra a inter-relação entre exatidão e precisão (LANÇAS, 2004).

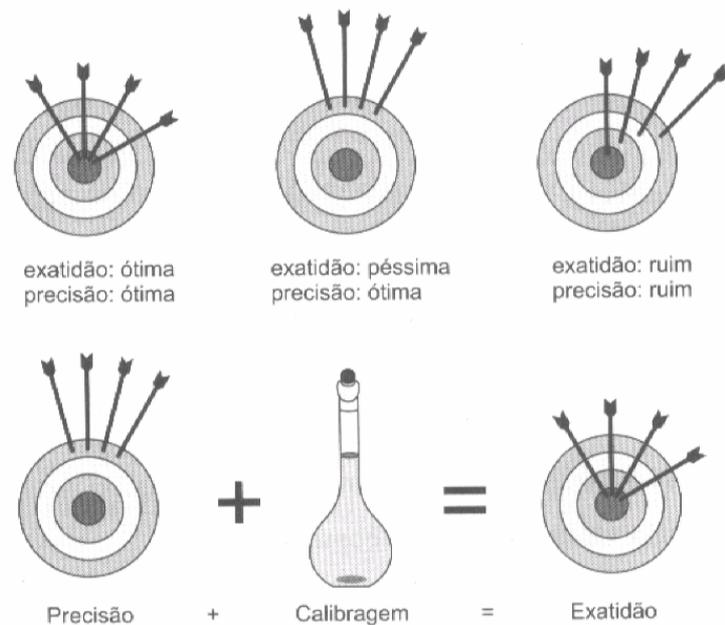


Figura 16 – Inter-relação entre precisão e exatidão (LANÇAS, 2004)

Precisão

Como visto, a precisão é o grau de concordância entre resultados independentes sob condições estipuladas. Com relação à precisão, a definição da quantidade de algarismos significativos (dígito isento de dúvida mais o primeiro algarismo duvidoso) a serem trabalhados na análise é ponto fundamental, não só para a emissão de resultados, mas principalmente para a definição de custos, equipamentos, ambiente laboratorial, ou seja, em função da precisão uma estrutura organizacional será exigida (RIBANI et al., 2004; e LEITE, 2002).

Na prática, a precisão pode ser determinada através da estimativa do desvio padrão absoluto (s), equação (29) (RIBANI et al., 2004):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (29)$$

Onde \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de

se encontrar certo valor de uma variável, calculada pela equação (30)(RIBANI et al., 2004):

$$IC_{\bar{x}} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (30)$$

Em que:

$IC_{\bar{x}}$ é o intervalo de confiança da média; t_{n-1} é o valor crítico da distribuição de *Student* com n-1 graus de liberdade; e o valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), também conhecido como coeficiente de variação (CV), Equação (31) (RIBANI et al., 2004):

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (31)$$

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos *RSD* de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.

A fidelidade analítica pode ser obtida em três níveis. Quando a validação é feita em um único laboratório (em inglês, *single-laboratory validation*), duas condições são relevantes: precisão sob condições de repetitividade e precisão intercorridas ou precisão intermediária. Um nível mais nobre de precisão é a reprodutibilidade, obtida em procedimentos de validação completa (em inglês, *full-validation*), através de estudos interlaboratoriais (LANÇAS, 2004; IUPAC, 2002; LEITE, 2002).

Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (VIM, 1995).

As condições de repetitividade incluem: o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo. Não se deve confundir repetitividade (determinações independentes do procedimento analítico) com precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetidas, seqüenciais da mesma amostra (IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004).

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sobre condições de repetitividade S_r é aconselhável calcular o limite de repetitividade r que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma mostra, determinada sobre condições de repetitividade, é significativa (INMETRO, 2003; e VIM, 1995).

O limite de repetitividade r é avaliado pela Equação (32):

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_r$$

Para um nível de confiança de 95%: (32)

$$r = 2,8 \cdot S_r$$

Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são mudados. Este tipo de variação pode ser empregado para determinar a contribuição relativa de cada fator para a variabilidade do resultado final.

Uma forma simples de avaliar a precisão intermediária é através da estimativa do desvio padrão relativo. No entanto, um estudo mais detalhado sugere uma análise de variância (ANOVA), onde é realizada a soma quadrática das variâncias entre os grupos S_{entre}^2 e dentro dos grupos S_{dentro}^2 , conforme mostrado na Equação (33) (RIBANI et al., 2004; BARROS et al., 2005):

$$S_{PI} = \sqrt{S_{entre}^2 + S_{dentro}^2} \quad (33)$$

Onde:

$$S_{entre}^2 = \frac{M_1 - M_0}{n}$$

$$S_{dentro}^2 = M_0$$

M_0 : Média Quadrática – MQ, dentro do grupo.

M_1 : Média Quadrática – MQ, entre grupos.

Estes dados podem ser obtidos no Excel: ANOVA.

São sugeridos: $k(n-1) \geq 15$

k grupos e n repetições

Avaliação da Precisão

Na revisão dos estudos de cerca de 150 laboratórios com constituintes diferentes medidos por técnicas diferentes, foi observado que o coeficiente avaliação dos valores médios relatados aumentou com a diminuição da concentração do constituinte. Na melhor das hipóteses, o coeficiente de variação nunca pareceu ser melhor do que a curva de Horwitz, representada pela Equação (34)(HARRIS et al., 2001; e AOAC, 2002):

$$CV_R = 2C^{-0,15} \quad (34)$$

Onde:

CV_R é o coeficiente de variação em condições de reprodutibilidade.

C é a concentração em fração decimal.

O coeficiente de variação em condições de repetitividade pode ser avaliado através da Equação (35):

$$CV_r = C^{-0,15} \quad (35)$$

Onde:

CV_r é o coeficiente de variação em condições de repetitividade.

C é a concentração em fração decimal.

A Trombeta de Horwitz para condições de reprodutibilidade pode ser visualizada conforme a Figura 17. Os resultados experimentais podem variar da curva de Horwitz ideal por um fator de cerca de 2 na direção vertical e um fator de 10 na direção horizontal. A Equação (36) descreve o critério de aceitação é:

$$\text{HORRAT}_{R \text{ ou } r} = \frac{CV_{R \text{ ou } r \text{ (obs)}}}{CV_{R \text{ ou } r \text{ (cal)}}} \leq 2 \quad (36)$$

Onde: $CV_{R \text{ ou } r \text{ (obs)}}$ e $CV_{R \text{ ou } r \text{ (cal)}}$ são os coeficientes de variação observados e calculados respectivamente

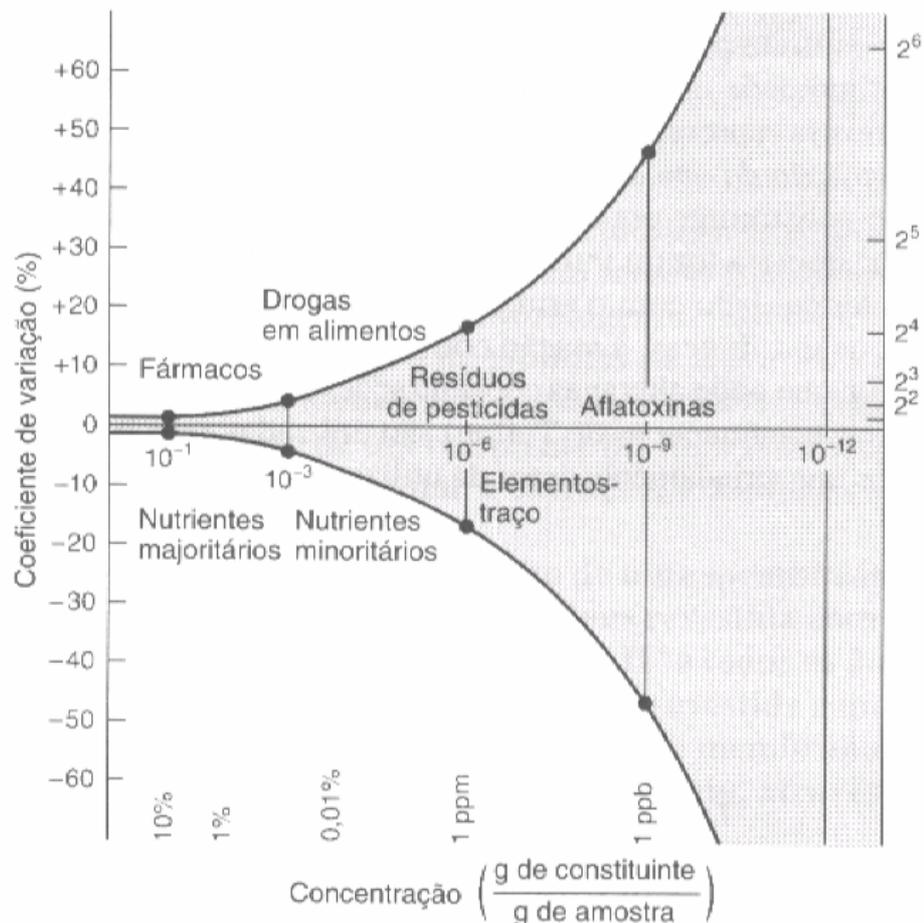


Figura 17 – Trombeta de Horwitz para CV_R (HARRIS et al., 2001)

Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2003).

Assim, a exatidão está sempre associada a valores de precisão, então estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços, a exemplo dos estudos de Horwitz (RIBANI et al., 2004).

A literatura traz várias abordagens para avaliar a exatidão de um método. Diferentes autores concordam nas seguintes abordagens: uso de Materiais de Referência Certificados (CRM, do inglês *Certificatad Reference Material*), comparação com um método de referência (ou técnicas ortogonais) com exatidão conhecida, estudos interlaboratoriais ou ensaios de fortificação / recuperação.

Materiais de Referência Certificados (CRMs)

São materiais de referência, fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, acompanhados de um certificado que possui um parâmetro para o valor e uma estimativa de incerteza associada. Os valores obtidos pelo laboratório devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método (RIBANI et al., 2004).

Devido à baixa estabilidade de pesticidas em amostras de água, materiais de referência certificados não são usuais para estas aplicações.

Comparação de métodos

Um método de referência pode ser usado para testar a tendência de outro método sob validação. Outra forma de validação da exatidão num procedimento analítico, bastante empregado atualmente, é o uso de uma “técnica ortogonal” baseada em princípios diferentes. É importante que a comparação seja realizada com métodos validados (LANÇAS, 2004; INMETRO, 2003; IUPAC, 2002).

Estudos interlaboratoriais

O processo colaborativo é uma forma especial de ensaio para avaliar o desempenho de um método nas condições normais de trabalho em vários laboratórios, através de ensaio de amostras homogêneas preparadas cuidadosamente. (INMETRO, 2003).

Recuperação

A recuperação é definida com uma proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A informação de recuperação pode ser estimada através da fortificação de uma quantidade conhecida de um padrão de referência, ou de um composto substituto (em inglês, *surrogate*). É recomendável que fatores de correção de recuperação sejam aplicados às substâncias de interesse (RIBANI et al., 2004).

O GARP – Associação Grupo Analista de Resíduos de Pesticidas recomenda a que se trabalha nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos geralmente estão entre 70 % em 120 %, podendo variar de acordo com o nível da concentração dos analito (RIBANI et al., 2004; BARROS et al., 2005).

A recuperação, Equação (37) é o método mais utilizado para a determinação da exatidão de um método em análise de traços. O INMETRO (2003) estabelece:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (37)$$

Onde:

C_1 é a concentração determinada na amostra fortificada

C_2 é a concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 é a concentração determinada do padrão fortificação

Avaliação da exatidão

Para uma avaliação da exatidão de um método, é preciso demonstrar a aceitabilidade dos dados obtidos experimentalmente com os limites de uma tabela de referência, como por exemplo, da AOAC para estudos de recuperação média (BARROS et al., 2005; AOAC, 2002).

A compatibilidade das médias através de ferramentas estatísticas adequadas pode ser requerida para comparação com um método de referência, com valores de materiais de referência certificados ou ainda em estudos interlaboratoriais.

O índice Z, geralmente é utilizado para comparar o valor médio encontrado em laboratório e a especificação do CRM, Equação (38) (INMETRO, 2003; BARROS et al., 2005).

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu}{s} \quad (38)$$

Onde:

Z é o número de desvios padrão de uma distribuição normal.

\bar{X} é a média experimental.

μ é o valor verdadeiro convencional (do CRM)

s é o desvio padrão (do CRM)

Condições:

$|Z| \leq 2$ = satisfatório

$2 < |Z| < 3$ = questionável

$|Z| > 3$ = insatisfatório

Uma forma habitual de comparação é através do teste de hipótese (*t-Student*), entre pares de resultados. Estes estudos são especialmente úteis para comparação entre métodos (INMETRO, 2003; BARROS et al., 2005).

Outra maneira atualmente utilizada para comparação de resultados ou estudos de recuperação é através da regressão linear. Os resultados objetos de comparação são dispostos nos eixos x (valor de referência) e y (valor investigado). Os coeficientes da equação da reta são avaliados dentro de um determinado intervalo de confiança, onde o coeficiente angular deve conter “um” e o coeficiente linear deve conter “zero”.

2.8.3.2.4 Limite de detecção, quantificação e nível mínimo de reportagem

Limite de detecção

O limite de detecção LD é a menor quantidade de um analito que pode ser reportado como presente com razoável certeza. Como a probabilidade da detecção não muda de "zero" para "um" quando seu limiar é ultrapassado, o problema tem sido tratado estatisticamente e a solução depende do risco desta afirmação ser um erro. (HORWITZ, 2003; INMETRO, 2003).

Neste sentido, CURRIE (1997) publicou um dos mais importantes trabalhos sobre o tema, em uma compilação de dados gerados da força-tarefa ISO / IUPAC, mensurou matematicamente os conceitos utilizados atualmente. Nas bases desta discussão foram levados em consideração os riscos de falso positivo (concluir que o analito está presente, quando não está - erro α) e de falso negativo (concluir que o analito não está presente, quando está - erro β).

Assim, surgiram as definições:

- LC valor crítico que distingue o sinal do analito do ruído de base, correspondente a “decisão da detecção” - é definido em função do erro α .

- LD: valor mínimo detectável; medida da "capabilidade de detecção"; limite de detecção - é definido em função do erro β .

Segundo critérios da IUPAC para LC e LD as probabilidades são $\alpha=\beta=0,05$ (5%). Assim, o valor crítico LC é tal que, a decisão de "detectado" tem 5% de ocorrência quando o analito está ausente e o LD é tal que, se a concentração do analito for LD, em 50% das vezes haverá resposta maior que LD em 45% das vezes haverá uma resposta menor que LD, porém ainda no domínio de "detectado" e em 5% das vezes haverá resposta abaixo do LC, Figura 18 (BARROS et al., 2005).

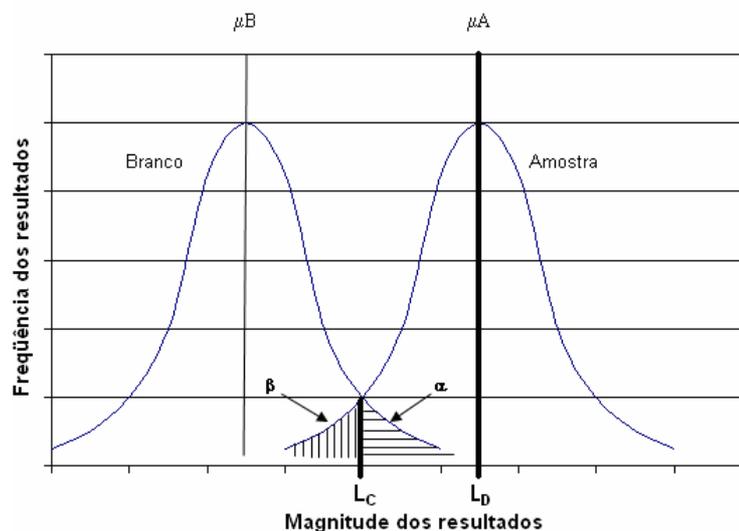


Figura 18 – Conceitos de LC e LD em função da frequência e magnitude dos resultados

Na base da discussão está a distribuição *gaussiana* do sinal de ruído ou branco representado pela estimativa do desvio padrão s_b e a probabilidade do sinal do analito não ser confundido com o “zero”. Assim, o fator de abrangência k será guiado pelo tipo de abordagem desenvolvida em relação ao nível de confiança de α e/ou β .

A equação fundamental para as diferentes teorias é a Equação (39):

$$LD_s = ks_b \quad (39)$$

Onde:

LD_s = Limite de detecção no domínio do sinal.

k = fator de abrangência: valor de *t-Student* unilateral, que depende dos riscos α e/ou β .

s_b = é a estimativa do desvio padrão calculada a partir do *background*.

Os valores de k para as diferentes abordagens foram resumidos (BARROS et al., 2005):

- $k = 3$; EURACHEM, LGC, THOMPSON e ANVISA.
- $k = 3,3$ IUPAC (quando se conhece o desvio padrão populacional), USP.
- $k = 2t$ ($\alpha=0,05_{\text{unilateral, } GL=n-1}$) IUPAC (quando se conhece o desvio padrão amostral)
- $k = t$ ($\alpha=0,01_{\text{unilateral, } GL=n-1}$) EPA e INMETRO.

Lembrando que k é usualmente chamado de relação *signal / ruído*.

Na prática a conversão do LD_s no domínio do sinal, para LD_c no domínio da concentração de analito, Equação (40), é adequado usar os parâmetros da curva de calibração (RIBANI et al., 2004; BARROS et al., 2005):

$$LD_c = \frac{ks_b}{S} \quad (40)$$

Onde:

LD_c = Limite de detecção no domínio da concentração.

S = é a sensibilidade ou coeficiente angular da curva analítica.

Em análise de traços é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Dessa forma deve ser estabelecida uma diferença entre limite de detecção do equipamento L_{DE} e do método L_{DM} . Neste caso é fundamental que todas as etapas do método sejam incluídas para a determinação do limite de detecção do método analítico.

Limite de quantificação

O limite de quantificação LQ é a menor concentração de analito que pode ser determinado com nível aceitável de precisão e veracidade, ou ainda, corresponde a

menor quantidade que pode ser quantificada com exatidão e fidelidade determinada (INMETRO, 2003; LANÇAS, 2004).

É importante notar, que os parâmetros de precisão utilizados para estabelecer os limites de detecção, não são mais as únicas fontes de interesse para estabelecer um limite de quantificação adequado, mas a confiabilidade dos resultados também exige certo grau de exatidão. Estas variáveis devem ser tratadas conforme o nível de concentração do analito (curva de Horwitz) e as legislações vigentes ou objetivos analíticos.

No entanto, muitas referências ainda estabelecem um limite de quantificação tratado apenas pela relação sinal / ruído utilizando a mesma base teórica dos limites de detecção. Valores de $k = 10$ são usualmente descritos (CURRIE, 1997; RIBANI et al., 2004; BARROS et al., 2005; ANVISA, 2003).

Uma solução mais adequada sugere uma comparação entre a estimativa de incerteza em função da concentração e comparar esta função, com critérios de “adequação para o uso”, estabelecidos entre o laboratório e o usuário final dos dados. A Figura 19 ilustra este critério (IUPAC, 2002; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

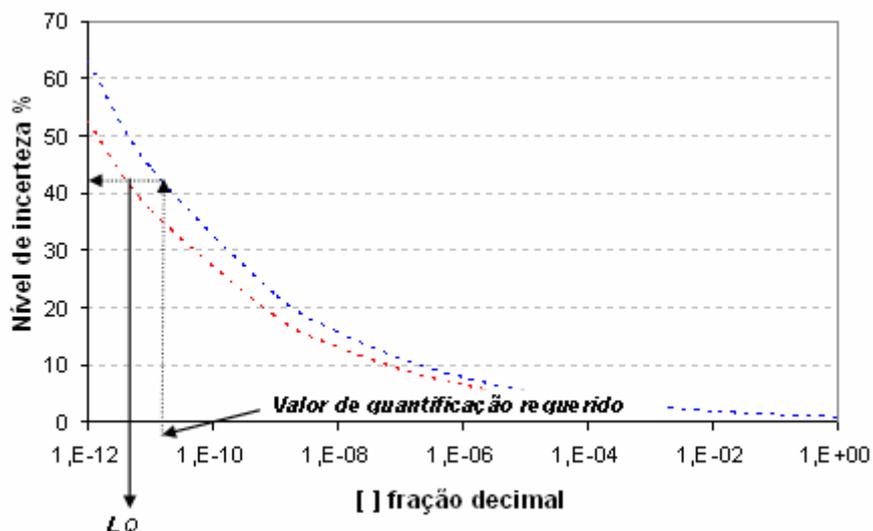


Figura 19 – LQ por inspeção

Neste modelo é construída uma curva de aceitabilidade (em azul) entre níveis de incertezas e as concentrações, baseadas, por exemplo, nos estudos de Horwitz ou em critérios estabelecidos por convenção entre os prestadores de serviços e os clientes. Um valor de quantificação requerido, para as exigências do método, terá seu nível de incerteza permitido. Assim, o procedimento analítico é submetido ao

estudo (em vermelho) onde o limite de quantificação será a menor concentração que garanta a incerteza máxima permitida.

Nível mínimo de reportagem

Segundo MARTINS (2004), um conceito cada vez mais utilizado chama-se “limite de reportagem”, bem mais conservador que o limite de quantificação, é a forma mais segura de garantir um resultado em análise de rotina.

Neste sentido, a Agência de Proteção Ambiental Americana (em inglês, *United States Environmental Protection Agency – US EPA*) elaborou um protocolo estatístico para determinação da concentração mínima de reportagem (em inglês, *Lowest Concentration Minimum Reporting Level – LCMRL*), para atender o sistema de abastecimento público (US EPA, 2004).

Este novo conceito, Figura 20, é uma alternativa para o “limite de quantificação prático”, onde além da precisão em baixas concentrações, também é requerida exatidão através da recuperação. O LCMRL é a mais baixa concentração verdadeira que tem uma recuperação predita com alto nível de confiança 99% entre 50 e 150%. O LCMRL calculado não pode ser menor que o padrão de menor concentração (US EPA, 2004).

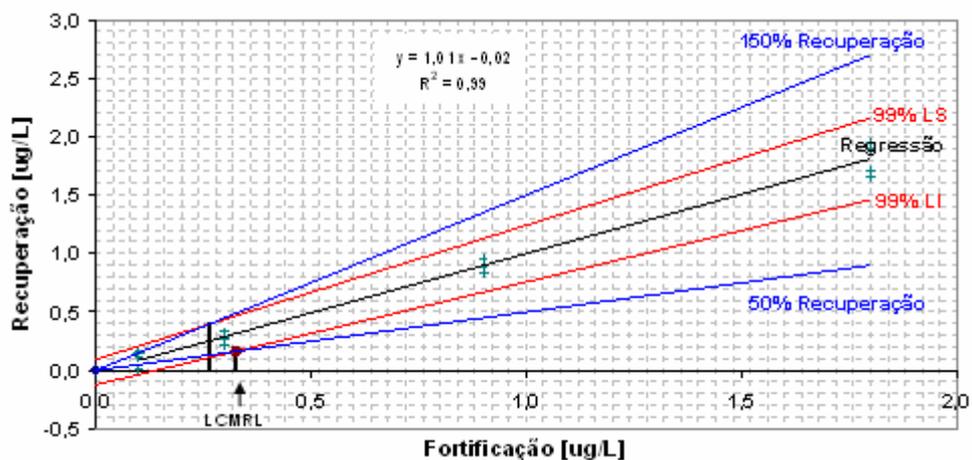


Figura 20 – Concentração mínima de reportagem

As etapas para o cálculo da LCMRL começam pela construção do gráfico com valores de recuperação (eixo y) em função dos níveis de fortificação (eixo x). Assim, são traçados os intervalos de predição com 99% de confiança em relação à curva de

regressão (parâmetro de precisão). Então, são acrescentadas no gráfico, linhas correspondentes a 50 e 150% de recuperação (parâmetro de exatidão). Linhas verticais são traçadas onde o intervalo superior de predição intercepta 150% e o intervalo inferior de predição intercepta 50%. O maior nível de concentração interceptado pela linha vertical é considerada a LCRML (US EPA, 2004).

2.8.3.2.5 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método é robusto quando se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2003).

Segundo BARROS et al. (2005), a robustez demonstra a habilidade de reproduzir o método em diferentes laboratórios ou sob diferentes condições, dentro de limites estabelecidos sem que haja alterações nos resultados obtidos.

O INMETRO (2003) recomenda o “teste de Youden” para determinação da robustez. Neste estudo é feito um levantamento dos fatores críticos que podem afetar o método e seus níveis de monitoramento. Este estudo pode ser representado na Tabela 6:

Tabela 6 – Teste de Youden para avaliação de robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Onde:

As letras (*A, B, C, D, E, F e G*) representam os níveis superiores ensaiados e as letras (*a, b, c, d, e, f e g*) representam os níveis inferiores. Os resultados dos ensaios (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) são representados pelos valores (*s, t, u, v, w, x, y e z*).

Para determinar a variação de um fator, calcula-se a diferença da média dos valores obtidos pelos níveis superiores e inferiores, como por exemplo, Equação (41):

$$EfeitoC/c = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4} \quad (41)$$

Os fatores podem ser ordenados para revelar efeitos significantes nos resultados. Uma análise crítica servirá para um controle rigoroso dos fatores de maior influência (INMETRO, 2003).

2.8.3.2.6 Incerteza de medição

Segundo VIM (1995), a incerteza de medição pode ser definida como: “Parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos a um mensurando”.

A expressão da incerteza de medição é uma exigência da NBR ISO/IEC 17025:2005. Atualmente a determinação de incerteza não se resume apenas em objetivos técnicos, mas também é a base para redução de custos e aumento de produtividade. Conhecer profundamente os fatores que causam dispersões e desvios de resultados é fundamental para o direcionamento de recursos e a eliminação de burocracias analíticas.

O Processo de estimativa da Incerteza de medição foi descrito em 4 etapas, Figura 21 (EURACHEM, 2002):

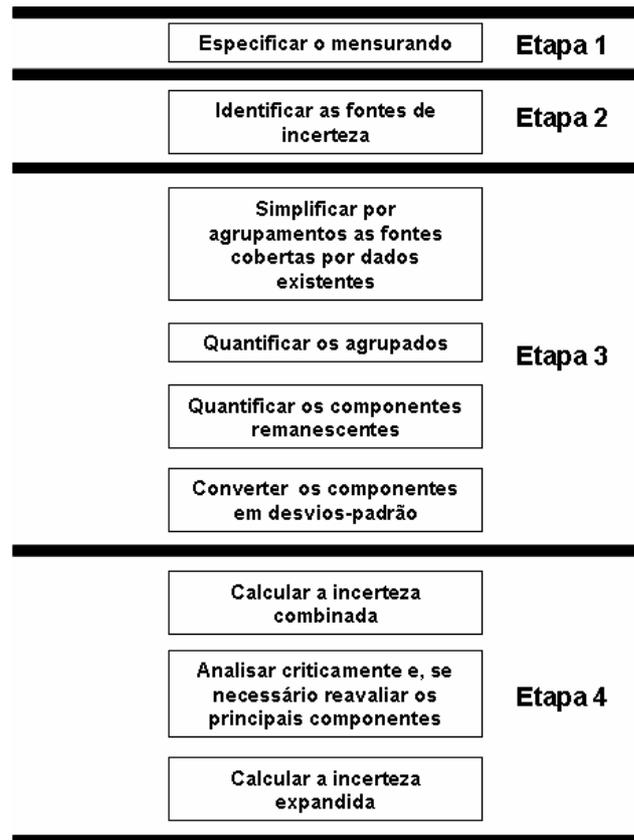


Figura 21 – Processo de estimativa da incerteza

- Na etapa 1, deve-se declarar claramente o que está sendo medido, incluindo a relação entre o mensurando e as grandezas de entrada das quais ele depende. Quando possível, a relação matemática entre as grandezas de entrada e de saída deve ser fornecida.

- Após estabelecido o “problema analítico”, a etapa 2 consiste em listar as possíveis fontes de incerteza que contribuem com as grandezas de entradas. Na prática a análise estruturada necessária é efetuada por um “diagrama de causa e efeito” também conhecido como “diagrama de Ishikawa” ou “espinha de peixe”.

- O “diagrama de Ishikawa” deve ser avaliado criticamente na etapa 3. As componentes relevantes devem ser agrupadas e quantificadas através de medições (incertezas do tipo A), estimativa ou publicações (incertezas do tipo B). Todas as componentes de incerteza associadas às fontes potencialmente relevantes devem ser expressas em incerteza padrão $u(x_i)$.

- Na última etapa, é calculada a incerteza padrão combinada, através da “lei da propagação das incertezas”. Então, o fator de abrangência apropriado k deve ser aplicado para obtenção da incerteza expandida U .

A expressão geral da incerteza de medição, Equação (42) é:

$$U = k \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{\partial y^2}{\partial x_i} u^2(x_i)} \quad (42)$$

Onde:

U = incerteza expandida da medição;

k = fator de abrangência usado para calcular a incerteza expandida;

$\frac{\partial y}{\partial x_i} = C_i$ = derivada parcial da função y em relação à grandeza de entrada x_i ;

$u(x_i)$ = incerteza padrão da grandeza de entrada estimada x_i .

Para o cálculo de k deve-se obter o valor de graus de liberdade efetivos, Equação (43):

$$V_{eff} = \frac{uc^4}{\sum_{i=1}^N \frac{u(x_i)^4}{v_i}} \quad (43)$$

Onde:

V_{eff} = graus de liberdade efetivos;

uc = é a incerteza combinada;

v_i = é o grau de liberdade de $u(x_i)$.

Para as incertezas do Tipo B, $v_i = \infty$, portanto $u(x_i)$ é igual à zero. Considera-se então para equação acima somente as do Tipo A, onde, $v_i = n-1$.

Assim, k é obtido pelo cruzamento de V_{eff} com a probabilidade desejada (usualmente 95,45%) na tabela *t-Student*_{bilateral}.

2.8.3.3 Adequação do sistema

A adequação do sistema é a garantia que tanto o equipamento, quanto o método validado estão de acordo com seus requisitos. Geralmente este parâmetro é verificado por intermédio de um *software* de aquisição de dados para cromatografia. Com a frequência desejada, o operador pode verificar o tempo de retenção, a

resolução, a simetria do pico e outros parâmetros, incluindo a linearidade e limites de detecção e quantificação. Em geral o *software* também inclui uma documentação gráfica adequada e de fácil visualização, a qual permite determinar se o instrumento e o método estão operando dentro do definido para o teste de *suitability*, ou seja, se ambos estão adequados aos propósitos do experimento (LANÇAS, 2004).

De acordo com a necessidade específica de uma metodologia, serão selecionados os parâmetros de performance que poderão ser controlados para garantir a adequação do sistema. Segundo requerimentos da AOAC para validação de métodos é preciso que se tenham controles em trabalhos contínuos. Este controle pode ser realizado através de uma carta de controle. Este método está baseado em uma coleta inicial de 20 a 30 valores de determinado parâmetro, onde é calculada a média e o desvio padrão que serão utilizados como base estatística para o sistema de controle. Neste modelo, um valor de equivalentes à média $\pm 2s_r$ são considerados limites de alerta e a média $\pm 3s_r$ limites de rejeição. O processo analítico estará sob controle se menos de 5% dos valores estiverem na faixa de alerta e será considerado fora de controle se algum valor estiver além do limite de rejeição ou dois valores consecutivos estiverem na zona de alerta. Neste caso, o sistema requer investigação e ação corretiva (AOAC, 2002). Um estudo mais aprofundado sobre Controle Estatístico de Processo (CEP) foi muito bem desenvolvido pela Rede Metodológica do Estado de São Paulo.

Na cromatografia gasosa é possível monitorar a qualidade do gás de arraste através do sinal analítico, pois a presença de impurezas pode modificar o ruído do sistema e, conseqüentemente, alterar o limite de detecção ou de quantificação (LANÇAS, 2004).

No sistema de injeção, pode-se controlar, por exemplo, a área do pico do padrão interno e estipular uma variação aceitável dentro de um limite de confiança conhecido. O controle do fluxo e/ou pressão e da temperatura do forno são outros parâmetros de grande importância, pois afetam diretamente a precisão dos tempos de retenção usualmente utilizados para identificação do analito (LANÇAS, 2004).

A coluna cromatográfica deverá ser monitorada frequentemente devido à modificação de suas características ao longo do tempo, fatores como, tempo de retenção, área do pico, assimetria e número de pratos teóricos, podem estar ligados diretamente a modificações na fase estacionária (AGILENT, 2001; LANÇAS, 2004).

Por fim, o sistema de detecção, também pode ser diagnosticado pela diminuição da sensibilidade através da função analítica e pelo aumento no ruído do sinal. Quando a detecção for realizada por um espectrômetro de massas, o monitoramento poderá ser feito através dos parâmetros de ajuste automático (em inglês: *autotune*) com base em um padrão. No *autotune*, é possível monitorar a distribuição, a abundância relativa, a razão isotópica e a simetria das massas. Além disso, pode-se monitorar o nível de impurezas da fonte de íons pela voltagem da multiplicadora de elétrons, e presença de impurezas no gás de arraste ou as condições da coluna pelo monitoramento direto da razão massa/carga do *background* (LANÇAS, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação, materiais e vidrarias

- Empregou-se cromatógrafo a gás HP 6890N Agilent (Wilmington, Estados Unidos), equipado com injetor para divisão do fluxo "*Split/Splitless*", septo com baixo sangramento (5181-3383) e insersor de quartzo silanizado modelo *splitless* (5062-3587) com volume efetivo de 0,493 mL.
- Sistema de injeção composto por seringa cromatográfica de 10 μ L, Agilent (5181-1267), torre de injeção automática e amostrador automático para 100 frascos Agilent série 7683 (Wilmington, Estados Unidos).
- Na separação de compostos utilizou-se coluna analítica capilar de baixa polaridade HP5-MS de baixo sangramento, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme (fase estacionária) de 0,25 μ m, Agilent (19091S-433).
- Para detecção utilizou-se espectrômetro de massas HP 5973N Agilent (Palo Alto, Estados Unidos), com analisador de massas quadrupolar capaz de varrer de 1-800 m/z e fonte de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.
- A aquisição de dados foi feita pelo software ChemStation G1701DA (versão D.00.00.38 de 19 de Novembro de 2001) e o tratamento dos dados pelo Microsoft Office Excel 2003 (versão 11.5612.5606).
- Nas pesagens utilizou-se balança analítica AG285 Mettler Toledo (Zurich, Suíça), com resolução de 0,01 mg (até 81 g) e 0,1 mg (até 210 g). Verificaram-se as balanças com padrões de massas Throemner certificados pela RBC (Rede Brasileira de Calibração).
- No procedimento de extração em fase sólida e pré-concentração utilizou-se sistema *manifold* (aparelho para extração a vácuo) com capacidade de 12 amostras simultâneas Phenomenex, e bomba de vácuo para pressão negativa de 760 mmHg modelo TE-058, Tecnal (São Paulo, Brasil).
- Os sorventes utilizados para estudos iniciais de extração em fase sólida foram: Strata-X[®] de 30 mg, Phenomenex; Nexus[®] de 60 mg, Varian; Oasis[®] de 30 mg, Waters; e C18 de 500 mg, Phenomenex. Posteriormente foram

utilizados cartuchos Strata-X 30 mg com volume de 3 mL, Phenomenex (8B-S100-UBJ) para a validação do método. Foram utilizadas colunas de 1 metro DB 35% fenil e 65% metil silicone para conexões no processo de extração.

- Sistema para purificação de água MilliQ composto por cilindro de pressurização, filtro primário, sistema RIOS, tanque PE030 e sistema com filtro 0,22 μm , Millipore (Bedford, Estados Unidos), garantindo resistividade de 18,2 M Ω .
- Para o preparo das soluções utilizaram-se vidrarias volumétricas Classe A calibradas conforme critérios da norma ISO DIN 1042. Transferidores com capacidade entre 100 e 1000 μL Brand e ponteiras.
- Frascos para amostras 2 mL em vidro transparente com tampa e septo de teflon, HP.

3.2. Solventes, padrões e amostras

- Água com qualidade MilliQ.
- Diclorometano grau HPLC LICHROSOLV, Merck.
- Metanol grau HPLC, JT Baker.
- Acetato de etila PA-ACS 99,5%, Quimex.
- Acetona PA-ACS 99,5%, Quimex.
- Extran Neutro, Merck.
- Hélio UP 99,999%, AGA.

Os padrões analíticos foram adquiridos conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Padrões utilizados nos estudos

Nome dos padrões	Fornecedor	Pureza (%)
Alaclor	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Aldrin	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Dieldrin	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Atrazina	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Bentazona	Dr. Ehrenstorfer	98,0
Clordano (isômeros)	Dr. Ehrenstorfer	60,0
DDT (isômeros)	Dr. Ehrenstorfer	98,0
Endossulfan α	Dr. Ehrenstorfer	97,0
Endossulfan β	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Endrin	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Heptacloro	AccuStandard, Inc. New Haven	99,0
Heptacloro epóxido	Pestanal	99,7
Hexaclorobenzeno	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Lindano (g-BHC)	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Metolacloro	Dr. Ehrenstorfer	97,0
Metoxicloro	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Molinato	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Pendimetalina	Dr. Ehrenstorfer	98,4
Pentaclorofenol	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Permetrina (isômeros)	Dr. Ehrenstorfer	94,0
Propanil	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Simazina	Dr. Ehrenstorfer	98,0
Trifluralina	Nortox	99,5
Padrão interno*	Milênia	99,9
Padrões de substituição**	Chem Service (mistura # 8)	-

* 1,3-difenoxibenzeno

** 1,4-diclorobenzeno-d4; naftaleno-d8; acenafteno-d10; antraceno-d10; criseno-d12 e perileno-d12.

Os padrões de pesticidas foram preparados a partir de padrões sólidos constituindo soluções estoques de 1000 mg L⁻¹. O padrão interno é sólido e os padrões de substituição (*surrogate*) são misturas padrão de 4000 mg L⁻¹ dos

compostos: 1,4-diclorobenzeno-d4; naftaleno-d8; acenafteno-d10; antraceno-d10; criseno-d12 e perileno-d12.

3.3 Preparo de soluções analíticas

O preparo de soluções estoques e soluções padrão empregadas nos estudos de validação estão descrito a seguir.

3.3.1 Soluções estoque da mistura de padrões

A partir de 0,5 mL das soluções estoques individuais de 1000 mg L^{-1} de cada pesticida da Tabela 7, preparou-se 50 mL de solução estoque SA na concentração de 10 mg L^{-1} .

A partir de 5 mL da solução estoque SA, preparou-se 50 mL de solução estoque SB na concentração de 1 mg L^{-1} .

A partir de 5 mL da solução estoque SB, preparou-se 50 mL de solução estoque SC na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

3.3.2 Solução estoque do padrão interno (PI)

Pesou-se 10 mg de PI e dissolveu-se em 10 mL de acetato de etila. Diluiu-se esta solução transferindo-se 1mL para balão de 100mL, obtendo-se assim a solução estoque de PI na concentração de 10 mg L^{-1} .

3.3.3 Solução de redissolução (SR)

Para a obtenção da solução de redissolução, transferiu-se 5 mL da solução estoque PI e completou-se a 100 mL com acetato de etila obtendo-se a solução de redissolução SR na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Utilizou-se a mesma concentração de padrão interno nos padrões de P1 a P10.

O preparo das soluções analíticas utilizadas para estudo de validação abrange ampla faixa de concentração. As soluções estoques das misturas de pesticidas e a solução de redissolução podem ser visualizadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Soluções estoques e de redissolução.

Padrões	SA	SB	SC	SR
Solução estoque individual [1000 mg L^{-1}]	0,5			
Volume (mL) solução estoque SA [$10.000 \mu\text{g L}^{-1}$]		5		
Volume (mL) solução estoque SB [$1.000 \mu\text{g L}^{-1}$]			5	
Volume (mL) solução estoque PI [$10.000 \mu\text{g L}^{-1}$]				5
Volume final da solução (mL)	50	50	50	100
Concentração final de PI [$\mu\text{g L}^{-1}$]				500
Concentração final de pesticidas [$\mu\text{g L}^{-1}$]	10000	1000	100	

3.3.4 Soluções para estudo de linearidade (P1-P10)

As soluções para estudo de linearidade foram obtidas transferindo-se 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mL de solução estoque SC em balões de 10 mL, para os pontos P1, P2, P3 e P4 respectivamente. Pela adição de 0,25; 0,5 e 1 mL de solução estoque SB em balões de 10 mL obtiveram-se os padrões P5, P6 e P7 respectivamente. E com 0,25; 0,5 e 1 mL de solução estoque SA em balões de 10 mL obtiveram-se os padrões P8, P9 e P10 respectivamente.

Em todos os padrões foram adicionados 0,5 mL de solução estoque PI. Na aferição do volume utilizou-se acetato de etila.

As concentrações finais dos padrões P1-P10 são: 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Todos os padrões apresentam $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de padrão interno.

A Tabela 9 mostra de forma resumida o preparo das soluções.

Tabela 9 - Soluções para estudo de validação

Padrões	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Volume (mL) solução estoque SA								0,25	0,5	1
Volume (mL) solução estoque SB					0,25	0,5	1			
Volume (mL) solução estoque SC	0,1	0,25	0,5	1						
Volume (mL) solução estoque PI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume final da solução (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentração final de PI [$\mu\text{g L}^{-1}$]	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Concentração final de pesticidas [$\mu\text{g L}^{-1}$]	1	2,5	5	10	25	50	100	250	500	1000

Para a obtenção das soluções analíticas empregou-se acetato de etila para a diluição das soluções estoques. Os padrões foram estocados em refrigerador a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegidos de luz.

3.4. Desenvolvimento e otimização do sistema GC-MS

O desenvolvimento e otimização do sistema GC-MS foi iniciado pela escolha das condições de separação incluindo características da fase estacionária, programação de temperatura e parâmetros da fase móvel, buscando-se sempre aumento de sensibilidade, seletividade e redução de tempo de análise. Em seguida foi realizada a escolha dos íons de quantificação e de qualificação de forma a garantir melhor relação sinal-ruído e seletividade. Por fim, foram avaliados os parâmetros de injeção e detecção de forma conjunta em um planejamento fatorial fracionário para estudos de efeitos e, com base nos resultados obtidos, foi criado um modelo quadrático para as principais variáveis.

3.4.1 Parâmetros de separação

Os parâmetros de separação considerados no desenvolvimento do método incluem a escolha da coluna para separação dos compostos em estudo, a escolha do gás de arraste e vazão ótima, e um estudo detalhado sobre a programação de temperatura do forno observando o comportamento dos analitos em função da temperatura.

3.4.1.1 Escolha da coluna

A escolha da coluna é fundamental para uma boa análise cromatográfica e foi realizada com base nos objetivos do método. Assim, para uma análise de resíduos em níveis de ultra-traços utilizou-se uma coluna capilar de 0,25 mm de diâmetro interno e baixa espessura de filme 0,25 μm , pois quanto menor o volume de fase estacionária, menor o ruído e a difusão na fase estacionária, melhorando assim, a sensibilidade na detecção. Por se tratar de uma análise multirresíduo de difícil separação, foi escolhida uma coluna com 30 m de comprimento para obter-se alta eficiência, ou seja, elevado número de pratos teóricos. A baixa polaridade fornecida pela presença de 5% fenil e 95% de dimetilpolisiloxano com tecnologia de sangramento minimizado (HP5-MS) foi preferida por atender uma ampla faixa de polaridade dos analitos e permitir separações e detecções adequadas.

3.4.1.2 Qualidade e vazão do gás de arraste

A qualidade do gás de arraste é fundamental em análise de ultra-traços, pois o nível de ruído interfere nos limites de detecção dos analitos, à medida que diminui a relação sinal-ruído. Assim, utilizou-se gás hélio com 99,999% de pureza e *filtro* (para remoção de traços de água, oxigênio e hidrocarbonetos) específico para detecção de massas. Os critérios de adequação foram monitorados no *Autotune*.

A vazão do gás de arraste para obtenção da eficiência máxima é descrita pela curva de van Deemter e encontra-se na faixa de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, sendo impraticável para análises via GC-MS que devem trabalhar entre $0,8$ e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Assim, foi utilizada a vazão ótima prática, descrita pelo fabricante, de 1 mL min^{-1} . Com esta demanda de gás, o sistema de vácuo, composto por bomba mecânica e outra difusora, é capaz de manter um vácuo entre $3,0$ e $3,3 \cdot 10^{-5}$ Torr na fonte de íons. Assim, um grande caminho médio livre entre moléculas permite maior tempo de estabilidade de íons e conseqüentemente maior número de fragmentos atingem o detector garantindo alta sensibilidade do método.

3.4.1.3. Programação de temperatura do forno

Na cromatografia gasosa, a temperatura é um fator fundamental que possibilita uma boa separação e rege o tempo total de análise. Assim, para compostos de diferentes volatilidades e difícil separação trabalhou-se com programação de temperatura multilinear. A temperatura inicial, bem abaixo do ponto de ebulição do analito mais volátil, possibilitou a retenção dos analitos na parte inicial da coluna e menor dispersão dos compostos. Enquanto a temperatura final, suficientemente alta, garantiu a eluição dos compostos menos voláteis.

Para o desenvolvimento da programação de temperatura foi realizado um estudo que pode fornecer rapidamente uma visualização do tempo de permanência dos analitos em função da temperatura. Assim foi possível avaliar de forma racional qual a estratégia para separação do conjunto de compostos. Este estudo se fez necessário, pois os pesticidas em questão apresentam volatilidades e polaridades diferenciadas, o que freqüentemente alterava a ordem de eluição dos picos dificultando a busca pela seletividade.

O procedimento utilizado para a construção do gráfico tempo de retenção *versus* temperatura do forno foi realizado da seguinte forma:

- Preparou-se uma solução de alta concentração (1 mg L^{-1}) composta de todos os compostos envolvidos no estudo.
- Selecionou-se o modo de varredura (SCAN: 33-500 uma) no detector de massas para identificar os compostos eluídos.
- Criou-se uma série de métodos seqüenciais com temperaturas iniciais variando entre 40 e 270 °C (de 10 em 10 °C totalizando vinte e quatro métodos). Cada método teve sua temperatura inicial mantida por trinta minutos (tempo de coleta de informações). Após, uma rampa de 50 °C min^{-1} até 270 °C, esta temperatura final foi mantida por 10 min para eluição de todos os compostos, evitando-se assim que picos referentes às injeções anteriores interferissem na próxima injeção.
- Todos os compostos eluídos em trinta minutos de temperatura constante em cada um dos vinte e quatro métodos foram utilizados para construção do gráfico tempo de retenção *versus* temperatura do forno.
- Após avaliar o comportamento do conjunto de dados projetou-se a programação de temperatura do forno.

3.4.2 Parâmetros de injeção

Os parâmetros de injeção da amostra considerados no desenvolvimento do método incluem: solvente utilizado, pressão e temperatura do injetor, tipo de *insensor* e septo, modo de injeção, purga do injetor e volume de injeção.

3.4.2.1 Solvente

Acetato de etila foi considerado a melhor opção de solvente por sua polaridade moderada (fornece boa solubilidade para todos os padrões), baixa toxicidade (segurança no laboratório), baixo custo (para análise de rotina), temperatura de ebulição moderada de 77 °C (permitindo uma temperatura inicial com baixa dispersão dos analitos em estudo na coluna cromatográfica, entre 45 e 65

°C) e massa molecular relativamente alta, possibilitando um menor coeficiente de expansão térmica.

3.4.2.2 Pressão do injetor

Este parâmetro foi otimizado conforme item 3.4.5, assumindo um modo sem divisão pulsado (*pulsed splitless*) de 15 psi por 1,5 min possibilitando maior volume de injeção. No período de pulso de pressão a vazão é de 3 mL min⁻¹, e após este período a pressão baixa para 7,53 psi e varia de acordo com a temperatura do forno para possibilitar uma vazão constante do gás de arraste de 1 mL min⁻¹.

3.4.2.3 Temperatura do injetor

Este parâmetro foi otimizado conforme item 3.4.5, sendo escolhida a temperatura de 250 °C, pois é alta suficiente para garantir boa volatilização dos analitos sem degradação e relativamente baixa para proporcionar um volume de expansão adequado.

3.4.2.4 Tipo de insersor

Utilizou-se insersor do tipo *splitless* com 0,493 mL de volume efetivo (V_f), ou seja, a metade do volume total do insersor (V_T) obtido pela área interna, onde r é 2 mm, vezes o comprimento (L), 78 mm e $\pi = 3,1415$, pela Equação (44).

$$V_T = L \cdot \pi \cdot r^2 \quad (44)$$

Este insersor proporciona grande volume de injeção e é silanizado para minimizar interação com os analitos mais polares. Não foi utilizada lã de vidro no interior do insersor e recomenda-se a troca deste, a cada 200 injeções. O diagnóstico para o momento da troca de insersor pode ser obtido pelo aumento da linha de base em temperaturas elevadas, o que acontece quando pequenos fragmentos de septo entram no insersor e na coluna. Recomenda-se agulha de ponta cônica por aumentar a vida útil do insersor.

3.4.2.5 Tipo de septo

Foi utilizado septo de baixo sangramento, ideal para detectores de massas, já que compostos como dimetilpolisiloxano são fontes potenciais de interferências fornecendo altos ruídos na linha de base.

3.4.2.6 Volume de injeção

O volume de injeção foi escolhido de acordo com o estudo de otimização do item 3.4.5. e ficou estabelecido em 2 μL como sendo o valor máximo que pode ser injetado sem ocorrência de *backflush* (capacidade amostra em fase gasosa).

3.4.3. Parâmetros de detecção

Os parâmetros de detecção considerados no desenvolvimento do método incluem: temperatura da linha de transferência, sintonia de massas, parâmetros de varreduras, seleção de íons e energia da multiplicadora de elétrons.

3.4.3.1 Temperatura da linha de transferência

Este acoplamento localiza-se entre o forno e a fonte de íons e tem como pré-requisito uma temperatura superior a temperatura máxima de separação (utilizou-se 280 °C), evitando-se a possível condensação dos analitos no final da coluna.

3.4.3.2. Sintonia das massas

O ajuste das massas foi realizado através dos parâmetros de “*autotune*” utilizando-se um padrão de perfluortributilamina (PFTBA) para regular as resoluções e abundâncias das massas. Neste processo, a otimização é feita automaticamente e os parâmetros são aceitos dentro de um nível de adequação do sistema. A energia de ionização foi ajustada em 70 eV.

3.4.3.3. Parâmetros de varreduras

O número de ciclos (compreendido pelo número de vezes que o equipamento realiza uma varredura completa) e tempo de espera (período de aquisição de dados de cada íon) é definido em função da largura do pico e da sensibilidade esperada respectivamente. Foram garantidos no mínimo nove pontos de aquisição para definição gaussiana de cada pico.

3.4.3.4. Seleção de íons

O método para análise de ultra-traços utiliza o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), onde foi selecionado um íon de quantificação e outro de qualificação, considerando-se a relação sinal-ruído e priorizando-se massas mais elevadas. Um resumo das janelas de detecção e dos íons de monitoramento pode ser visualizado na Tabela 10.

Tabela 10 – Janelas de retenção e íons de monitoramento

Nome dos padrões	Janela de retenção	Íons de quantificação	Íons de qualificação
Alaclor	17,14-18,00	160	188
Aldrin	18,00-18,16	263	261
Dieldrin	20,50-21,00	79	277
Atrazina	14,10-14,29	200	215
Bentazona	18,50-19,10	119	198
Clordano (isômero I)	19,72-20,01	373	375
Clordano (isômero II)			
Clordano (isômero III)	20,11-20,20	373	375
DDT (isômero I)			
DDT (isômero II)	21,50-23,20	235	165
Endossulfan α	20,01-20,11	195	241
Endossulfan β	21,27-21,50	195	241
Endrin	21,00-21,27	263	261
Heptacloro	17,00-17,14	272	274
Heptacloro epóxido	19,26-19,72	183	353
Hexachlorobenzeno	13,00-13,80	284	286
Lindano	14,42-14,66	181	219
Metolacloro	18,16-18,50	162	238
Metoxicloro	23,43-24,20	227	228
Molinato	9,30-12,20	126	187
Pendimetalina	19,10-19,26	252	253
Pentaclorofenol	14,29-14,42	266	264
Permetrina (isômero I)			
Permetrina (isômero II)	24,20-25,80	183	163
Propanil	16,30-17,00	161	163
Simazina	13,80-14,10	201	186
Trifluralina	12,20-13,00	306	264
Padrão interno	Janela de retenção	Íons de quantificação	Íons de qualificação
1,3-difenoxibenzeno	20,20-20,50	141	262
Mistura padrão (<i>surrogate</i>)	Janela de retenção	Íons de quantificação	Íons de qualificação
1,4-Diclorobenzeno-d4	4,50-5,90	150	152
Naftaleno-d8	5,90-8,50	136	137
Acenafteno-d10	8,50-9,30	162	164
Antraceno-d10	14,66-16,30	188	189
Criseno-d12	23,20-23,43	240	236
Perileno-d12	25,80-29,67	260	264

3.4.3.5. Multiplicadora de elétrons

A voltagem da multiplicadora de elétrons é ajustada automaticamente pelo *autotune* e indica a condição da fonte de ionização. Neste caso, é aceitável trabalhar até 1600 V.

3.4.4. Modelo de Younden para estudo de efeitos em GC-MS

Para avaliar os principais parâmetros que são potencialmente capazes de prover aumento de sensibilidade do sistema GC-MS utilizou-se um planejamento fatorial fracionário perfeitamente equilibrado conhecido como modelo experimental de Younden. A Tabela 11 mostra um resumo do modelo estudado.

Tabela 11 – Modelo de Younden para estudos sensibilidade em GC-MS

NÍVEL DO FATOR	NÚMERO DE EXPERIMENTOS - MODELO EXPERIMENTAL							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume injetado (μL)	5	5	5	5	2	2	2	2
Temperatura do injetor ($^{\circ}\text{C}$)	280	280	230	230	280	280	230	230
Pressão do injetor (psi)	25	7,6	25	7,6	25	7,6	25	7,6
Purga (mL)	3	3	0	0	0	0	3	3
Tempo (minutos)	5	0,2	5	0,2	0,2	5	0,2	5
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	6000	1000	1000	6000	6000	1000	1000	6000
Voltagem da multiplicadora (V)	400	0	0	400	0	400	400	0

O principal objetivo com este estudo foi avaliar as principais variáveis em situações extremas, de forma a obter uma visão dos efeitos gerados por cada fator estudado.

3.4.5. Otimização do sistema de injeção

De acordo com os estudos realizados com o modelo de Younden para o sistema GC-MS, foram selecionadas três variáveis para otimização do sistema de injeção visando um acréscimo de sensibilidade instrumental. O estudo foi dividido da seguinte forma:

- **Primeira etapa:** elaboração de um planejamento experimental para criação de um modelo quadrático. A Tabela 12 mostra o planejamento utilizado.

Tabela 12 – Planejamento experimental para otimização de injeção

Pressão (psi)	Temperatura (°C)	Volume líquido (μL)
7,5	240	1
7,5	260	1
7,5	240	3
15	250	1
7,5	250	2
15	240	2
15	250	2
25	260	3
25	260	2
15	260	3
25	250	3
25	240	1

- **Segunda etapa:** simulação dos volumes de gás obtidos a partir das condições experimentais de cada um dos métodos da Tabela 12, segundo a lei dos gases ideais de Charles, Boyle, Gay-Lussac e Avogadro.

O cálculo para o volume de expansão foi realizado partindo da Equação (45):

$$V = mRT / pM \quad (45)$$

Onde:

V = Volume de expansão do solvente injetado (mL);

m = massa do solvente injetado (g). Como o solvente é injetado em μL, converte-se o volume para mL e multiplica-se pela densidade do solvente utilizado. Assim:

m = [volume injetado (mL) × densidade do solvente (g mL⁻¹)];

R = constante de proporcionalidade, que vale 8,31×10⁶ (Pa mL mol⁻¹K⁻¹);

T = Temperatura absoluta do injetor (K), obtida por (K = °C + 273);

p = Pressão absoluta no injetor = medida de pressão (Pa) + 101325 Pa (que indica 1 atm), onde 1 psi = 6895 Pa;

M = massa molecular do solvente (g mol⁻¹);

Para o cálculo do volume de *backflush* (V_B), Equação (46):

$$V_B = V_L/2 \quad (46)$$

E V_L=V_T, Equação (44), V_T = volume total do insersor.

- **Terceira etapa:** realização das análises com cada um dos métodos da Tabela 12 e avaliação de três compostos com diferentes retenções: baixa, moderada e alta.

- **Quarta etapa:** Construção de modelos quadráticos utilizando como variáveis independentes pressões, temperaturas e volumes de cada um dos métodos da Tabela 12, e como variáveis dependentes as respostas de intensidade de sinal dos compostos de diferentes volatilidades. O objetivo aqui é avaliar o comportamento das respostas em função dos parâmetros de otimização e a dependência ou não das características de retenção.
- **Quinta etapa:** avaliação dos resultados através de um gráfico de intensidade do sinal *versus* volume de expansão, tendo como referência o volume de *backflush*. Outro objetivo é examinar os efeitos *backflush* nos cromatogramas.

3.5 Estudos de recuperação

3.5.1 Preparo das soluções de fortificações

As soluções de fortificações foram preparadas conforme a Tabela 13. Uma mistura acetona:acetato de etila (6:4) foi utilizada como solvente na fortificação, pois tem boa solubilidade em água e nos compostos em estudo.

Tabela 13 - Preparo das soluções padrões de fortificações

Concentração final	F1	F2	F3
Fortificações [$\mu\text{g L}^{-1}$ em água]	0,030	0,100	0,300
Soluções de fortificações [$\mu\text{g L}^{-1}$ no padrão]	30	100	300
Padrões de substituição [$\mu\text{g L}^{-1}$ em água]		0,100	
Padrões de substituição [$\mu\text{g L}^{-1}$ no padrão]		100	
Volume (mL) solução SC	3		
Volume (mL) solução SB		1	3
Volume (mL) solução SU [$1.000 \mu\text{g L}^{-1}$]	1	1	1
Volume final do padrão (mL)*	10	10	10

*acetona:acetato de etila (6:4)

3.5.1.1 Solução do padrão de substituição (SU)

Diluiu-se a mistura de padrões de 4000 mg L^{-1} para uma solução de $40.000 \mu\text{g L}^{-1}$ pela adição de 1 mL em balão de 100 mL e completou-se o volume com acetato de etila. Esta última foi diluída 40 vezes (2,5 mL em 100 mL) obtendo-se SU ($1.000 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.5.1.2 Solução de fortificação (F1)

Preparou-se 10 mL de solução de fortificação de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ que foi utilizada para preparar amostras de água de 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos. Este nível de fortificação representa o limite máximo permitido para o menor nível exigido na legislação. Este padrão não apresenta padrão interno.

3.5.1.3 Solução de fortificação (F2)

Preparou-se 10 mL de solução de fortificação de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ que foi utilizada para preparar amostras de água de 0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos. Este padrão não apresenta padrão interno.

3.5.1.4 Solução de fortificação (F3)

Preparou-se 10 mL de solução de fortificação de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ que foi utilizada para preparar amostras de água de 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos. Este padrão não apresenta padrão interno.

3.5.2 Preparo das soluções de recuperação

Para o preparo das soluções de recuperação é preciso levar em conta o fator de pré-concentração da amostra fortificada. As soluções de fortificações são adicionadas em volume de 1 mL por litro de água. Os volumes de amostras fortificadas são de 200 mL na etapa de percolação e a recuperação em 0,5 mL. A seguir está a relação entre as fortificações e as concentrações de recuperação está na Equação (47):

$$CR = \frac{VF * VA * CF}{VT * VR} \quad (47)$$

Onde:

CR é a concentração de recuperação;

VF é o volume de fortificação (0,2 mL);

VA é o volume da amostra (200 mL);

CF é a concentração de fortificação no padrão;

VT é o volume total da fortificação (200 mL);

VR é o volume de recuperação (0,5 mL).

A Tabela 14 mostra o preparo de soluções de recuperações, ou seja, aquelas empregadas para comparação do estudo de recuperação.

Tabela 14 - Preparo das soluções padrão de recuperações

Concentração final	R1	R2	R3
Concentração [$\mu\text{g L}^{-1}$]	12	40	120
Padrões de substituição [$\mu\text{g L}^{-1}$]		100	
Volume (mL) solução SC	3		
Volume (mL) solução SB		1	3
Volume (mL) solução estoque PI [$10.000 \mu\text{g L}^{-1}$]	1,25	1,25	1,25
Volume (mL) solução SU [$1.000 \mu\text{g L}^{-1}$]	1	1	1
Volume final do padrão (mL)*	25	25	25

* acetato de etila

As soluções de recuperações: R1 ($12 \mu\text{g L}^{-1}$), R2 ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) e R3 ($120 \mu\text{g L}^{-1}$) representam os níveis de fortificação em água: F1 ($0,030 \mu\text{g L}^{-1}$), F2 ($0,100 \mu\text{g L}^{-1}$) e F3 ($0,300 \mu\text{g L}^{-1}$) multiplicados pelo fator de pré-concentração de 400 vezes.

3.5.3 Desenvolvimento do procedimento de SPE

Em uma avaliação inicial do procedimento de extração em fase sólida foram escolhidos quatro tipos de cartuchos disponíveis comercialmente: Strata-X[®] 30 mg, Nexus[®] 60 mg, Oasis[®] 30 mg e Strata[®] C18 500 mg. Dois tipos de solventes foram avaliados: acetato de etila e diclorometano. As amostras foram fortificadas na concentração de $0,300 \mu\text{g L}^{-1}$ em duplicatas.

A quantidade de amostra foi definida em função da necessidade de pré-concentração que multiplicada com os limites de quantificação atingissem os requisitos apresentados na Portaria 518. Assim 200 mL foi escolhido como volume de amostra de água fortificada para recuperação em 0,5 mL obtendo-se uma pré-concentração de 400 vezes.

Utilizou-se metanol para condicionamento dos cartuchos em função da solubilidade em água na etapa de equilíbrio, antes da percolação da amostra. Na etapa de eluição utilizou-se diclorometano ou acetato de etila, pois são solventes de

polaridades intermediárias que apresentam grande afinidade pelos analitos estudados.

As fases estacionárias dos cartuchos para SPE foram escolhidas em função do tipo e da quantidade de fase. Fatores como: porcentagem de recuperação, praticidade de manipulação, necessidade de ajuste de pH e secagem foram avaliados para a escolha do material utilizado (KURZ, 2007; MARTINS, 2004).

3.5.3.1 Pré-concentração em SPE

Definidas as melhores condições para o procedimento de extração e pré-concentração as seguintes etapas foram desenvolvidas:

a) Procedimento de condicionamento e equilíbrio

Condicionou-se cada cartucho pela passagem de dois volumes de metanol com vácuo desligado. Fechou-se a torneira antes que o nível de solvente atingisse a fase estacionária. Completou-se o volume com água de qualidade Milli-Q para o equilíbrio e eluiu-se lentamente até o nível do sorvente por duas vezes.

b) Procedimento de percolação da amostra

Preparou-se 200 mL de cada amostra de água. Conectaram-se as amostras para extração com vazão entre 1 e 2 mL min⁻¹. Equivalente a 2 h de extração. Após a passagem da amostra, lavou-se o cartucho com um volume de água de qualidade Milli-Q. Secaram-se os cartuchos por 30 minutos no *manifold* com vácuo.

c) Procedimento de eluição e redissolução

Eluíram-se os analitos por adição de 2 mL de diclorometano em duas etapas com tempo de interação de 1 minuto para cada etapa. Secaram-se os extratos a 55 °C por aproximadamente 20 minutos, em alternativa à corrente de He branda por aproximadamente 30 minutos. Redissolveram-se os analitos pela adição de 0,5 mL de solução de redissolução.

3.6 Validação e garantia da qualidade

3.6.1 Validação do equipamento

A validação de equipamentos críticos foi realizada de acordo com um programa de garantia da qualidade que atenda os requisitos da ISO 17025. Foram realizados programas de manutenção preventiva, calibrações e verificações periódicas conforme programa de garantia da qualidade do laboratório. Para o sistema GC-MS, a Tabela 15 mostra um resumo da qualificação instrumental definida em função das condições normais de operação e validação do método.

Tabela 15 - Qualificação da instrumentação e critérios de aceitação

Cromatógrafo a gás acoplado ao detector seletivo de massas - GC/MS

Sistema GC-MS	Monitoramento	Critérios
1) Gás e vazamentos	<i>Autotune</i>	m/z: 18 < 5% do pico base; 32 e 28 < 15% do pico base.
2) Background	<i>Autotune</i>	<150 picos;
3) Sensibilidade	<i>Autotune</i>	EM: < 1600 V
4) Resolução de massas	<i>Autotune</i>	0,5 ± 0,15
5) Razão isotópica C ¹² / C ¹³	<i>Autotune</i>	m/z = 70 (1,1 ± 0,1)
6) Energia (EI)	<i>Autotune</i>	70 ± 1 eV
7) Vácuo	Medidor digital	< 4.10 ⁻⁵ Torr

3.6.2 Validação do método

Após as etapas de desenvolvimento e otimização das condições de separação e detecção, o procedimento foi submetido ao processo de validação conforme padrões aceitos por normas internacionais como a ISO 17025. Os critérios de validação descritos na fundamentação teórica foram selecionados de forma a atenderem as necessidades em análise de traços de pesticidas em água potável. Assim, os parâmetros de desempenho selecionados foram:

- Função analítica e linearidade;
- Limite de detecção, limite de quantificação;
- Seletividade;
- Precisão instrumental, precisão intermediária e exatidão (recuperação)
- Incerteza de medição;
- Robustez;
- Limite prático de reportagem e faixa de aplicação.

3.6.2.1 Função analítica e linearidade

As funções analíticas foram avaliadas em amplitude de 3 ordens de grandeza, entre 1 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, contendo no máximo 10 níveis de concentração. Cada solução padrão entre P1 e P10 foi injetada 7 vezes. Foram geradas equações de regressão linear e polinomial como modelo de predição utilizando Microsoft Office Excel[®] 2003. A calibração foi realizada pelo método da padronização interna conforme descrito na revisão bibliográfica. A faixa de aplicação foi definida em função da linearidade do método e dos limites de quantificação e reportagem.

3.6.2.2 Seletividade

A análise por GC-MS é considerada de alta seletividade e muitas vezes específica. A seletividade do método foi assegurada pela ausência dos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos em uma amostra em branco. Em amostras reais a seletividade é assegurada pela relação entre íons de quantificação e qualificação com tolerância de 20%. Próximo ao limite de quantificação essa tolerância pode ser aumentada para 30%.

3.6.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação do LD e LQ foi estabelecida a partir da relação sinal-ruído dos íons selecionados (íons de quantificação e íons de qualificação) para cada composto em estudo.

Foram consideradas 7 injeções do padrão P4 de concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com exceção de clordano, DDT e permetrina que são misturas isoméricas consideradas nos cálculos). Para bentazona e pentaclorofenol foi utilizado o padrão P8 de concentração 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os níveis de concentração foram empregados em função da proximidade aos limites de quantificação dos compostos. Os resultados médios da altura dos picos foram utilizados como referência para o cálculo do coeficiente de sensibilidade (denominador que converte o sinal em concentração).

Na seqüência do estudo foi injetado 7 vezes o padrão P0 equivalente ao branco. O desvio padrão do ruído foi determinado e os valores médios reportados. Em função da alta estabilidade do sinal no monitoramento seletivo de íons, que na

totalidade dos compostos apresentaram um desvio menor que a unidade de abundância, foi estabelecido o ruído mínimo como sendo a própria unidade.

A determinação do LD foi estabelecida como sendo a concentração que o íon de menor abundância apresenta quando a altura do pico cromatográfico corresponde a 3 vezes a relação sinal-ruído. Para o LQ foi considerado 10 vezes a relação sinal-ruído para o íons de quantificação, desde que o íon de qualificação fosse igual ou maior que 6 vezes esta relação. Assim, ambos os limites são garantidos de forma confirmatória.

3.6.2.4 Precisão instrumental

A precisão instrumental foi avaliada pela injeção de 7 réplicas por nível de concentração do estudo de linearidade. Os resultados foram expressos em RSD e comparados com a trombeta de Horwitz.

3.6.2.5 Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade em ensaios químicos em um curto espaço de tempo, muitas vezes não representa a precisão dos resultados de um procedimento utilizado em rotina. Neste sentido, um estudo de precisão intermediária foi adotado com o intuito de apresentar de forma mais representativa a situação vivenciada em uma rotina de análise.

A precisão intermediária ou reprodutibilidade interna foi realizada pela execução do procedimento completo de forma independente. Neste estudo foram realizadas 30 extrações. Estas extrações foram distribuídas em 3 níveis de concentração (0,030; 0100 e 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$) em 3 dias diferentes. No primeiro nível foram realizadas 12 extrações em 2 dias distintos (6 extrações por dia), o mesmo ocorreu com o terceiro nível de concentração. No nível intermediário foram realizadas 6 extrações em 1 dia apenas, para confirmação de compostos com limites de quantificação mais altos. Cada dia de estudo uma nova calibração de massas (*autotune*) foi realizada em GC-MS.

3.6.2.6 Exatidão (recuperação)

A exatidão foi determinada conforme o estudo de recuperação. As amostras foram fortificadas em 3 níveis: 0,030, 0100 e 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$, que são limites próximos aos limites mais baixos estabelecidos pela Portaria 518.

O cálculo de recuperação foi expresso pela Equação (48):

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (48)$$

Onde:

C_1 é a concentração determinada na amostra fortificada

C_2 é a concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 é a concentração determinada do padrão fortificação

Os dados de recuperação foram avaliados utilizando-se análise por componentes principais.

3.6.2.7 Estimativa de incerteza

Para atender as exigências da norma ISO 17025, foi realizada a estimativa de incerteza do procedimento adotado em rotina. Assim, através do “*diagrama de Ishikawa*”, Figura 22, foram representadas as principais fontes de incerteza presentes na determinação dos pesticidas estudados.

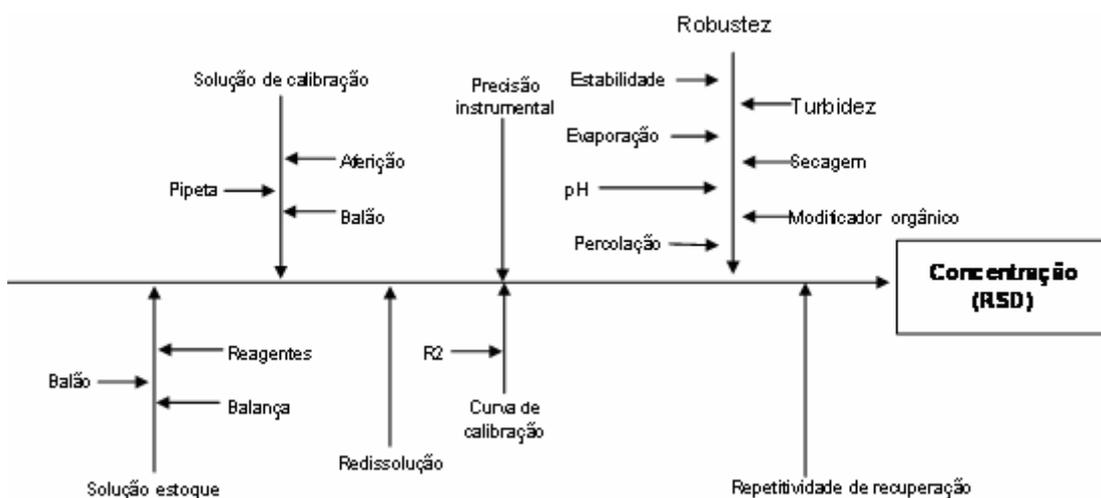


Figura 22 – Diagrama de Ishikawa para determinação de pesticidas em água

Para a determinação de incerteza seguiram-se as recomendações do EURACHEM (2002).

3.6.2.8 Robustez

A robustez do método foi testada conforme variáveis consideradas importantes para o desempenho do método. Na Tabela 16, encontra-se o modelo experimental para avaliação da robustez.

Tabela 16 – Modelo experimental para estudo de robustez

Fatores	NÍVEL DO FATOR							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Turbidez (UT)	5	5	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5
pH	9	9	5,5	5,5	9	9	5,5	5,5
Percolação (h)	4	2	4	2	4	2	4	2
Estabilidade (h)	24	24	0	0	0	0	24	24
Tempo de secagem (min)	60	15	60	15	15	60	15	60
Volume de modificador (mL)	0,2	0	0	0,2	0,2	0	0	0,2
Evaporação (min)	15	0	0	15	0	15	15	0

Após a etapa de SPE, foram realizadas análises em GC-MS de acordo com o procedimento estabelecido. O estudo de efeitos foi realizado conforme revisão bibliográfica. Foram estabelecidos fatores de correlação entre analitos e padrões de substituição de forma a corrigir efeitos de evaporação e retenção no processo de SPE.

3.6.2.9 Limite prático de reportagem e faixa de aplicação

O limite prático de reportagem foi definido em função dos estudos do fator de pré-concentração e do LQ. Assim, para que o resultado de um ensaio seja reportado quantitativamente é necessário que o sinal seja compatível ao LQ definido no estudo e que apresente recuperações adequadas (quando comparadas com a curva de Horwitz) neste nível de determinação.

Em alguns casos, recuperações baixas, porém reproduzíveis e com boa robustez podem ser utilizadas com segurança. Quando possível, fatores de correlação estabelecidos por padrões de substituição podem corrigir efeitos de variáveis como evaporação excessiva, pH, turbidez, etc.

Em análise de rotina a determinação é limitada pela curva analítica entre 0,030 e 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Devido à larga faixa de VMP na Portaria 518, entre 0,030 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos estudados, extratos com concentrações acima de 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$ devem ser diluídos com solução de redissolução e submetidos à nova análise por GC-MS a fim de serem interpoladas pela curva de calibração descrita acima. Com isso, não há necessidade de utilizar equações polinomiais (como as utilizadas nos estudos de linearidade com 3 ordens de grandeza) já que os pontos máximo e mínimo diferem em apenas uma ordem de grandeza e podem ser encarados como a derivada em um ponto da função analítica.

Esta estratégia de análise foi adotada a fim de garantir maior atenção nos níveis mais baixos da Portaria 518 e pelo fato histórico da grande maioria das análises apresentarem resultados negativos para todos os compostos.

3.6.3 Adequação do sistema

Em ensaios de rotina são estabelecidos parâmetros que devem ser verificados periodicamente para garantir a validade dos resultados. A adequação do sistema tem por objetivo o controle das variáveis instrumentais, manipulações e desvios da normalidade que podem afetar a qualidade dos ensaios realizados na rotina. De acordo com esse objetivo alguns fatores chave podem garantir resultados conformes e, portanto, confiáveis. A Tabela 17 mostra parâmetros de monitoramento periódico para controle de qualidade dos ensaios em rotina.

Tabela 17 – Controle de qualidade em ensaios de rotina

Parâmetros	Monitoramento	Critérios
Volume de injeção ^d	Área _{RSD}	Sinal do PI: $\pm 40\%$
Tempo de retenção PI (t_R) ^a	t_R IC (99%)	$20,29 < t_R < 20,31$
Eficiência (N_{eff}) ^a	N_{eff}	$N_{\text{eff}} > 90\%$ (condições iniciais)
Sensibilidade do método (a) ^d	Coef. Angular (a) IC (99%)	Limite inferior $< a <$ limite superior
Coef. de determinação (R^2) ^d	R^2	$R^2 > 0,99$
Limite de Reportagem (LR) ^d	LR	$LR > \text{VMP}$
Recuperação íon _{quantificação} e íon _{qualificação} ^d	Diferença entre íons	$< 20\%$, $< 30\%$ (LQ)
Recuperação (R%) <i>surrogate 3 e 4</i> ^d	R% IC (99%)	Limite inferior $< R\% <$ limite superior

^d diário; ^a anual

3.7 Aplicação do método em amostras reais

O método foi aplicado em 5 amostras reais com diferentes características. A primeira amostra foi retirada da estação de tratamento de água (ETA) que abastece a região central do município de Vera Cruz, cuja fonte tem origem no Arroio Andreas. A segunda amostra foi obtida em Linha Capão interior de Vera Cruz, no ponto de coleta Corredor B, tratando-se de um poço artesiano. A terceira amostra foi obtida na ETA da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) de Rio Pardo, cidade abastecida pelo rio Jacuí. A quarta amostra foi retirada da ETA da CORSAN de Santa Cruz do Sul abastecida pelo Lago Dourado (a água estava com turbidez de 2,0 UT acima do usual 0,5 UT devido à chuva). A quinta amostra foi obtida na região central do município de Sinimbu, sendo abastecido por um conjunto de vertentes superficiais.

O objetivo da amostragem foi abranger amostras de águas de diferentes características, de forma a representar fontes de abastecimento (arrosios, rios, lagos, vertentes e poços artesianos), condições do tempo (prevendo o aumento de turbidez em dias de chuva, nas duas últimas amostras), tratamento de água (clarificada em ETA ou bruta) que naturalmente conferem diferentes níveis de sais minerais, pH, turbidez, ácidos fúlvicos e húmicos, etc.

As coletas foram feitas em recipientes de vidro sendo armazenadas em local protegido da luz e em temperaturas entre 1 e 4 °C, evitando assim, o congelamento da amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do sistema GC-MS

A otimização do sistema é apresentada de forma resumida na Tabela 18. Os critérios que levaram às decisões tomadas estão descritos nos itens: parâmetros de injeção, separação e detecção.

Tabela 18 – Condições otimizadas do sistema GC-MS

Parâmetros de injeção			
Lavagem solvente A:	5 vezes		
Lavagem solvente B:	5 vezes		
Descarte da amostra:	3 vezes		
Tempo de sucção:	1 s		
Volume de injeção:	2 μL		
Velocidade de injeção:	6000 $\mu\text{L s}^{-1}$		
Parâmetros do injetor			
Modo:	<i>Pulsed splitless</i>		
Temperatura:	250 °C		
Pulso de pressão:	15,00 psi		
Tempo de pulso:	1,50 min		
Pressão:	7,53 psi		
Tempo de purga:	0,00 min		
Parâmetros da coluna			
Coluna:	Capilar HP-5MS - 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm		
Modo:	Fluxo constante		
Vazão:	1 mL min^{-1}		
Velocidade linear:	36 cm s^{-1}		
Parâmetros do Forno			
Temperatura inicial:	50 °C		
Tempo inicial:	2,00 min		
Rampas:			
Taxa ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo final (min)	
30,00	160	5,00	
5,00	180	0,00	
10,00	270	6,00	
Tempo total:	29,67 min		
Linha de transferência:	280 °C		
Parâmetros do detector			
Modo:	SIM		
Tempo de espera do solvente:	4,50 min		
Multiplicadora de elétrons:	1400-1600 V		
Temperatura da fonte:	230 °C		
Temperatura do quadrupolo:	150 °C		
Tempo por íon:	100 ms		

4.1.1. Otimização do processo de separação

De acordo com os objetivos descritos no item Materiais e Métodos, as etapas de aquecimento foram otimizadas com base no gráfico da Figura 23.

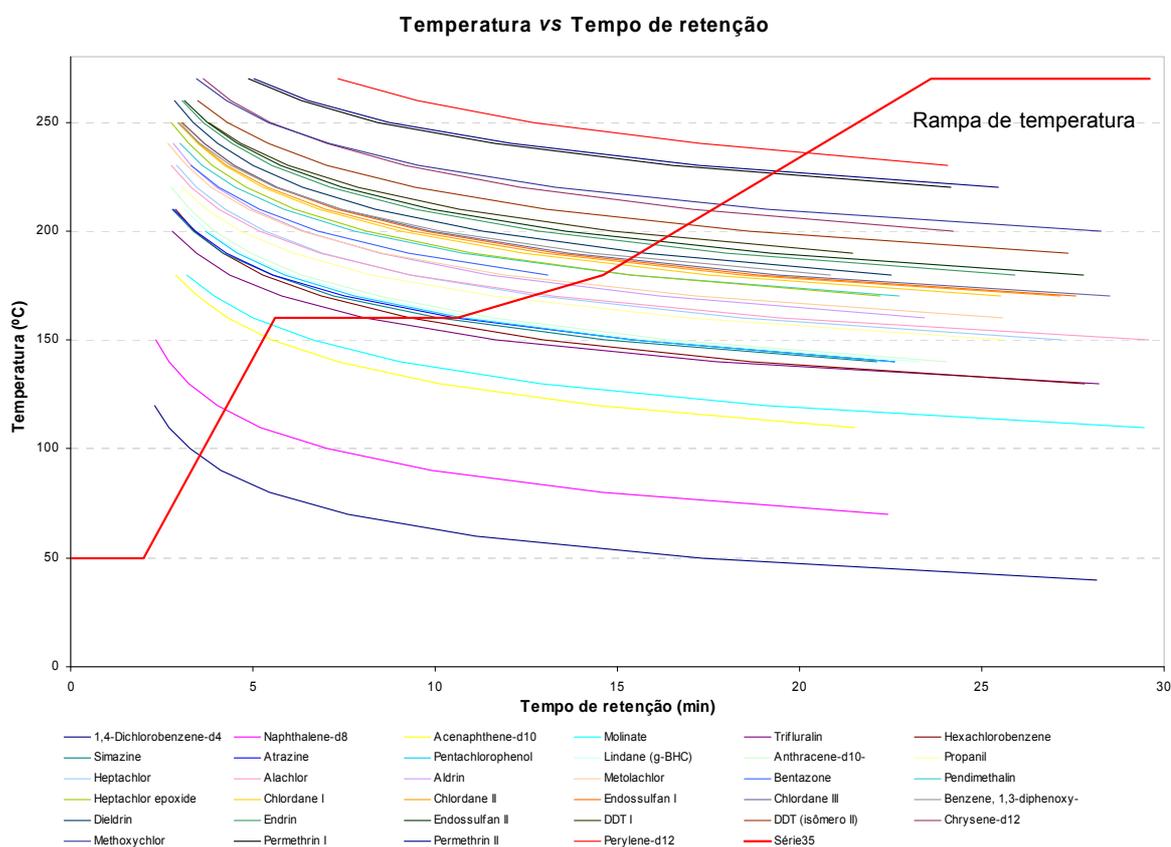


Figura 23 – Gráfico de temperatura do forno da coluna *versus* tempo de retenção

O estudo do gráfico mostra o comportamento do tempo de retenção de cada composto *versus* a temperatura da separação. A programação de temperatura foi escolhida da seguinte forma:

- Primeiro estágio – A programação começa com uma temperatura inicial de 50 °C, pois, é aconselhável que a injeção da amostra ocorra entre 10-30 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente evitando assim dispersão dos analitos na entrada da coluna (neste caso, acetato de etila com ponto de ebulição de 77 °C). Outro aspecto importante é que nesta temperatura os analitos permanecem “congelados”, ou seja, estáticos na parte inicial da coluna por dois minutos, sendo possível trabalhar com otimização de injeção (*pulsed splitless*), sem alteração dos tempos de retenção dos analitos.

- Segundo estágio – Após a etapa de introdução da amostra e eluição lenta do solvente é aplicada uma rampa rápida de $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até a temperatura de $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ com o objetivo de eluir com maior rapidez os compostos mais voláteis (tais como: 1,4-diclorobenzeno-d4, naftaleno-d8, acenafthene-d10 e molinato). A Figura 24 mostra o primeiro e segundo estágio.

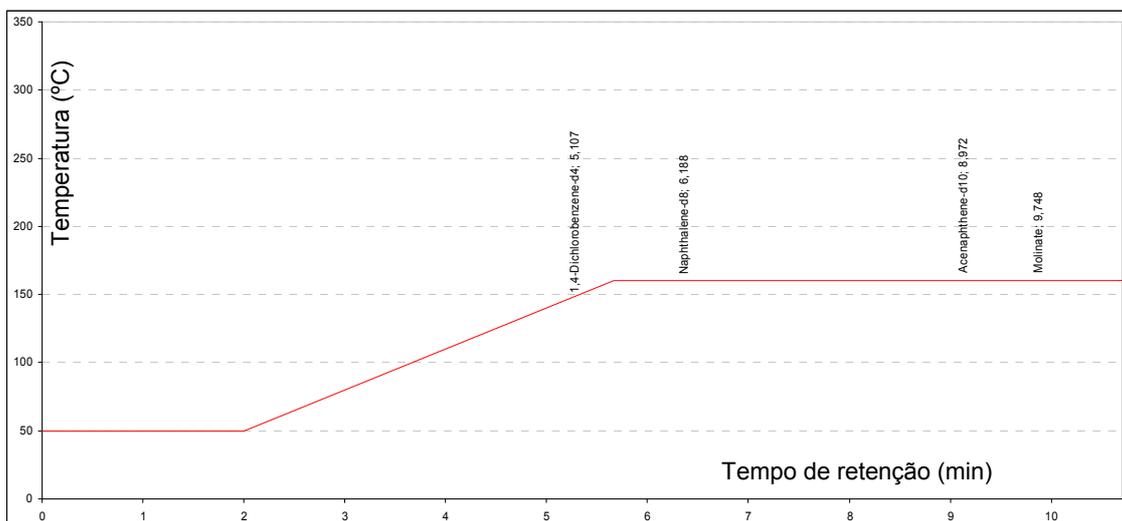


Figura 24 – Primeiro e segundo estágios de temperatura

Em seguida, uma estabilização da temperatura por 5 min favorece uma separação adequada de um grupo de compostos de comportamentos semelhantes (principalmente: simazina, atrazina e lindano) e com volatilidades intermediárias.

- Terceiro estágio – Nesta etapa uma rampa de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ garante maior velocidade dos analitos separados no segundo estágio e permite que um grupo de compostos menos voláteis (por exemplo: heptacloro, alaclor, aldrin e metolacloro) tenha separações adequadas. A Figura 25 mostra o terceiro estágio.

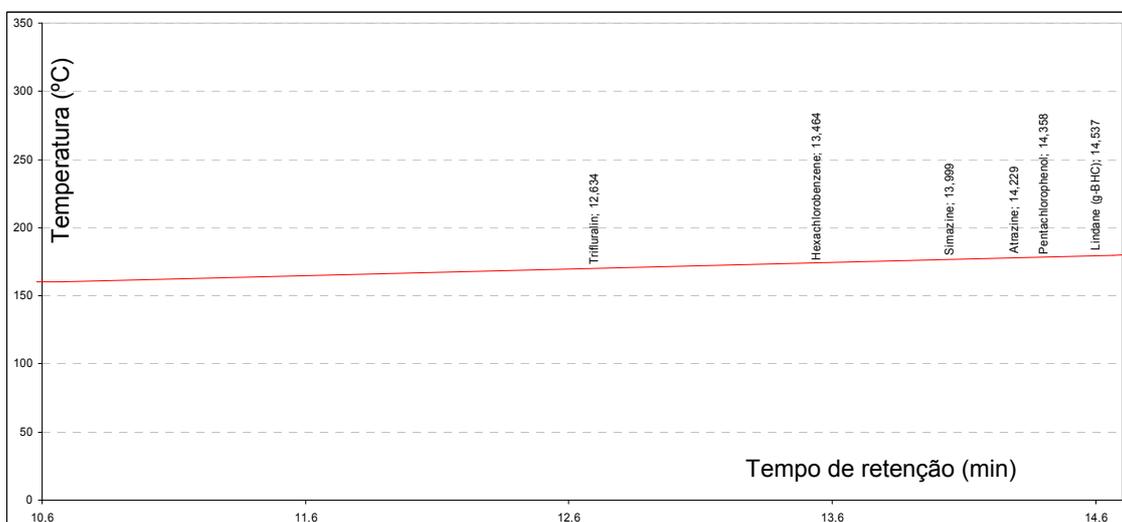


Figura 25 - Terceiro estágio de temperatura

- Quarto estágio – Nesta etapa há uma rampa de temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ de forma a propiciar a eluição de um grande número de compostos com características muito semelhantes (destacando: os clordanos, endossulfan I e 1,3-difenoxibenzeno). A Figura 26 mostra o quarto estágio.

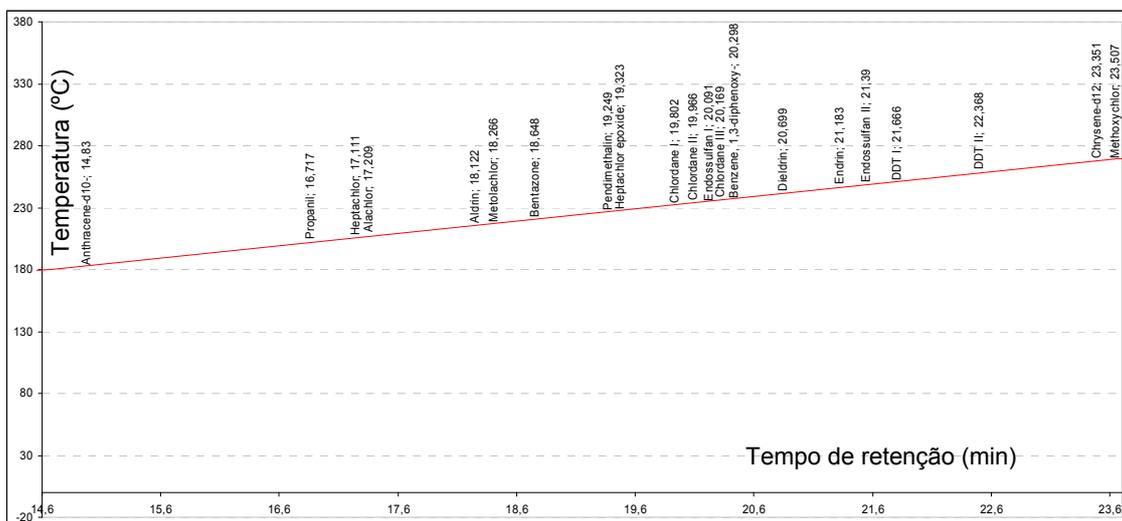


Figura 26 – Quarto estágio de temperatura

- Quinto estágio – Neste último estágio é mantida a temperatura de $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 min de forma a garantir a eluição dos compostos menos voláteis. A Figura 27 mostra os últimos compostos eluídos (as permetrinas e o perileno-d12).

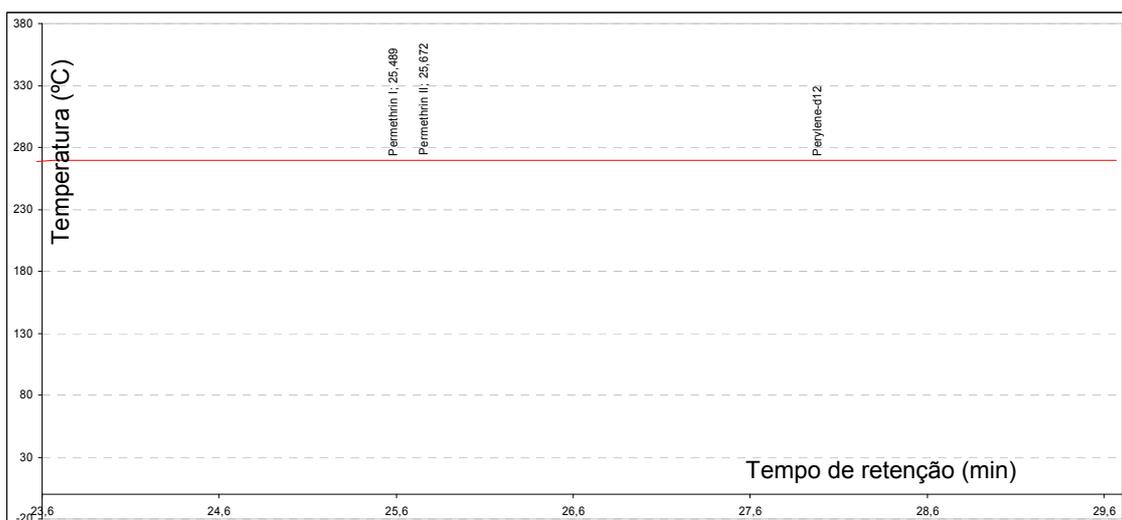


Figura 27 – Quinto estágio de temperatura

É importante ressaltar que as rampas de temperatura foram projetadas para garantir, além de uma boa separação, uma temperatura que forneça alta velocidade

de saída dos compostos no momento da detecção, favorecendo assim, maior altura e menor largura dos picos nos cromatogramas e aumentando a relação sinal/ruído.

Após a otimização do processo de separação, foram determinados os parâmetros cromatográficos como indicadores de desempenho do método. Os resultados estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros cromatográficos

Pesticidas	t_R' (min)	N_{eff}	R_s	H (μ m)
1,4-Diclorobenzeno-d4	3,728	266659	36,4	60
Naftaleno-d8	4,809	395791	55,7	46
Acenafteno-d10	7,593	190178	9,6	113
Molinato	8,369	133187	37,4	166
Trifluralina	11,255	513085	10,8	46
Hexachlorobenzeno	12,085	277720	4,0	87
Simazina	12,62	81650	1,7	299
Atrazina	12,85	291966	3,2	84
Lindano	13,158	306130	2,9	80
Antraceno-d10	13,451	260992	9,8	95
Propanil	15,338	47915	2,3	527
Heptacloro	15,732	1058923	1,5	24
Alaclor	15,83	826601	14,0	31
Aldrin	16,743	1199397	2,0	21
Metolacloro	16,887	632509	14,5	41
Pendimetalina	17,87	1967470	1,4	13
Heptacloro epóxido	17,944	1743573	4,2	15
Clordano I	18,423	1808930	1,5	14
Clordano II	18,587	2128520	2,0	12
Endossulfan I	18,712	1050038	1,3	25
Clordano III	18,79	2327872	2,5	11
1,3-difenoxibenzeno	18,919	1822510	7,5	14
Dieldrin	19,32	2299711	9,5	11
Endrin	19,804	2416378	3,9	11
Endossulfan II	20,011	2168399	5,2	12
DDT I	20,287	2374728	13,8	11
DDT II	20,989	2904618	11,8	9
Criseno-d12	21,972	562267	1,9	47
Metoxicloro	22,128	3724417	31,6	7
Permetrina I	24,11	1459151	2,2	18
Permetrina II	24,293	1362924	14,5	20
Perileno-d12	26,512	223686		21

Tempo da fase móvel: 1,379 min

Os parâmetros de desempenho são considerados adequados, demonstrando alta eficiência e resoluções adequadas.

4.1.2. Parâmetros de injeção e detecção

De acordo com o procedimento de otimização proposto para estudo da sensibilidade do sistema GC-MS, a Tabela 20 mostra os resultados do modelo de Younden:

Tabela 20 – Resultados normalizados dos efeitos em GC-MS

NÍVEL DO FATOR	NÚMERO DE EXPERIMENTOS - MODELO EXPERIMENTAL								Efeito do fator
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Volume injetado (μL)	5	5	5	5	2	2	2	2	18
Temperatura do injetor ($^{\circ}\text{C}$)	280	280	230	230	280	280	230	230	8
Pressão do injetor (psi)	25	7,6	25	7,6	25	7,6	25	7,6	34
Purga (mL)	3	3	0	0	0	0	3	3	21
Tempo (minutos)	5	0,2	5	0,2	0,2	5	0,2	5	8
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	6000	1000	1000	6000	6000	1000	1000	6000	13
Voltagem da multiplicadora (V)	400	0	0	400	0	400	400	0	40
Resultado normalizado	100	5	18	29	13	15	53	1	

Conforme o estudo realizado acima, em resultados opostos, o pior método representa apenas 1% da sensibilidade do melhor desempenho, ou seja, existe uma evidência clara da importância do trabalho de otimização. No entanto, em uma análise mais detalhada, verificam-se alguns problemas que devem ser estudados de forma mais adequada. Nos parâmetros de injeção, baixas pressões e grandes volumes de injeção ocasionam efeitos de *backflush*. No parâmetro de detecção, os resultados, embora mais intensos (com maior voltagem da multiplicadora), não apresentam melhoras nas relações sinal/ruído, já que há também, um aumento no ruído pelo efeito da multiplicadora de elétrons, Figura 28.

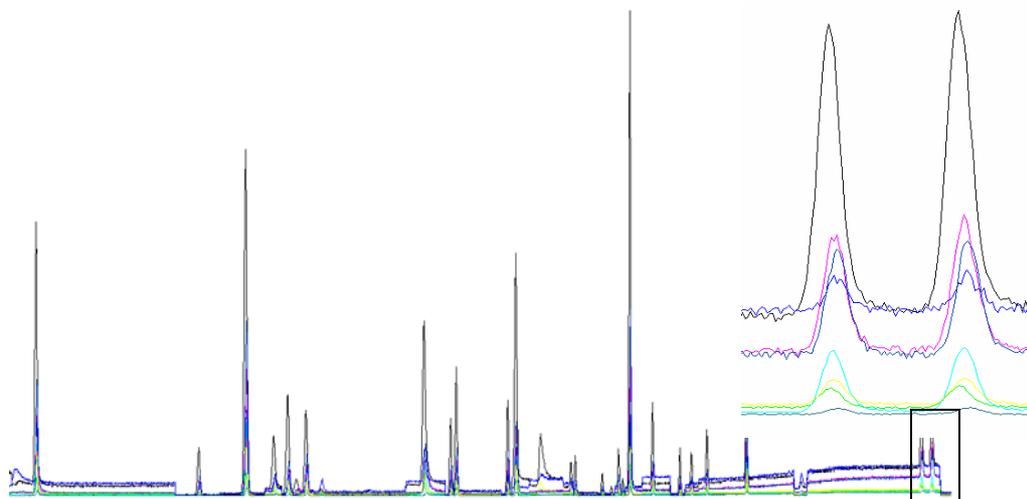


Figura 28 – Efeito da voltagem da multiplicadora de elétrons

Baseado na análise crítica dos cromatogramas do estudo acima, um planejamento experimental da sensibilidade do método foi realizado com um criterioso estudo no sistema de injeção. A Tabela 21 resume os resultados obtidos:

Tabela 21 – Resumo dos resultados de otimização de injeção

Variáveis independentes*			Valores simulados **	Variáveis dependentes***		
Pressão (psi)	Temperatura (°C)	Volume (μL)	Volume de gás (μL)	Retenção baixa $t_R=5,1\text{min}$	Retenção intermediária $t_R=14,9\text{min}$	Retenção alta $t_R=20,3\text{min}$
7.5	240	1	285	14	17	17
7.5	260	1	297	15	25	23
7.5	240	3	856	18	27	26
15	250	1	217	15	23	22
7.5	250	2	582	16	24	21
15	240	2	427	40	68	62
15	250	2	435	72	86	76
25	260	3	497	100	100	95
25	260	2	332	58	87	78
15	260	3	443	56	89	74
25	250	3	488	95	99	100
25	240	1	160	27	46	42

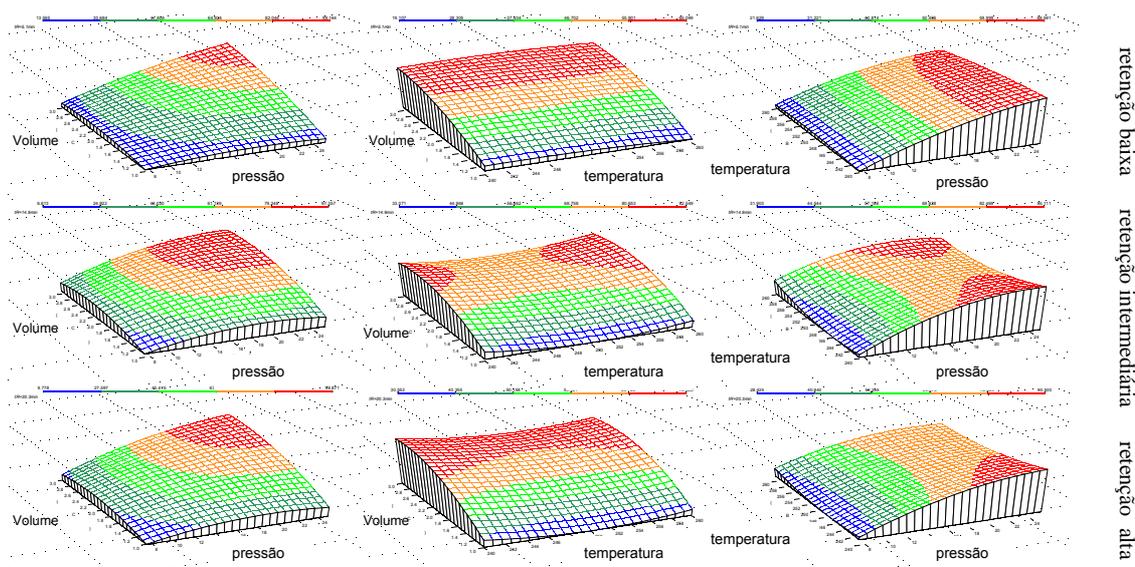


Figura 29 – Modelos quadráticos gerados na otimização do sistema de injeção

De acordo com os resultados da Figura 29 é possível verificar um compromisso da pressão do injetor com o volume de amostra injetada, através da visualização dos gráficos de pressão versus temperatura. A temperatura não é um fator determinante, pois a sensibilidade não varia em função dela, podendo esta ser controlada de acordo com outros interesses, como por exemplo, degradação de analitos termo-instáveis ou melhora na transferência de compostos menos voláteis.

Para verificar as condições ótimas de pressão, temperatura e volume de injeção, a Figura 30 mostra um gráfico da sensibilidade do sinal *versus* o volume de gás gerado em cada condição estudada.

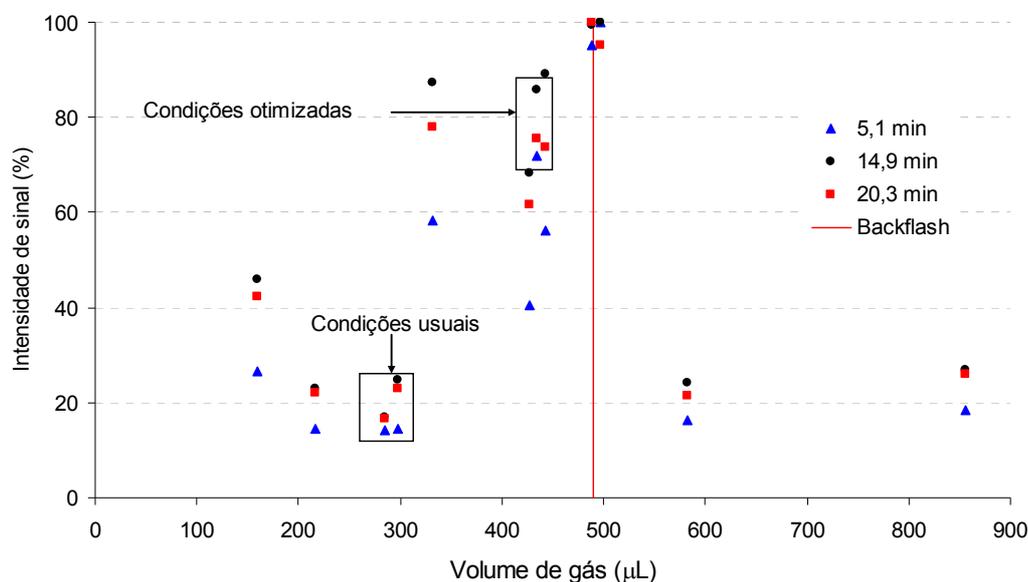


Figura 30 – Gráfico da intensidade de sinal *versus* volume de gás

A Figura 30 mostra que os melhores resultados foram obtidos por métodos que geram volumes de gás comparáveis aos valores limites de *backflush*. Os resultados independem de volatilidade de compostos e de concentração das substâncias em solução. Por precaução foi adotado um método com 80% do limite de *backflush*, pois neste estudo foi observado que volumes de gás pouco acima do volume efetivo do *insersor* perdem fortemente a sensibilidade. Por essa razão, pequenas alterações no volume levariam a perda de precisão na injeção. Com esta etapa de otimização foi possível aumentar em 4 vezes a sensibilidade de um método em condições “padrão” (injeção de 1 µL, 250 °C e modo *splitless* com 7,5 psi).

Devido a otimização do método, foi possível diminuir em 4 vezes o fator de pré-concentração em SPE, o que causa diminuição de tempo de extração e incerteza de medição. CONCHA-GRAÑA et al. (2002), utilizou um planejamento de Plackett-Burman para estudo de uma série de fatores ligados ao sistema de injeção.

4.2 Otimização do procedimento de SPE

Os resultados da avaliação preliminar para o processo de extração, utilizando-se diferentes cartuchos e solventes estão resumidos na Tabela 22.

Tabela 22 – Estudos preliminares de SPE

SPE	C-18 500 mg				Nexus 60 mg				Oasis 30 mg				Strata X 30 mg			
	AcEt		DCM		AcEt		DCM		AcEt		DCM		AcEt		DCM	
Eluição	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV
Pesticidas																
Molinato	73	13	35	16	41	26	8	-	69	11	25	10	21	24	67	38
Trifluralina	90	24	73	12	76	12	47	-	86	12	81	2	72	23	102	4
2,4D																
Hexaclorobenzeno	39	8	46	12	31	12	11	-	45	12	44	0	26	22	55	2
Simazina	162	27	102	6	126	1	117	-	128	0	117	6	134	8	133	19
Atrazina	95	121	113	6	124	1	116	-	129	5	120	8	139	8	134	17
Pentaclorofenol																
Lindano	76	70	95	17	85	16	54	-	81	20	88	1	93	35	141	27
Propanil	168	18	126	13	135	7	129	-	134	1	125	0	140	4	135	19
Heptacloro	206	145	77	11	70	5	45	-	76	7	76	7	69	22	82	2
Alaclor	119	62	121	0	116	2	109	-	115	8	113	4	122	13	125	16
Aldrin	77	0	65	6	54	8	42	-	55	9	64	14	53	16	66	9
Metolaclo	150	42	129	7	124	1	113	-	128	3	115	4	130	4	126	20
Bentazona																
Heptacloro epóxido	123	37	102	6	109	1	94	-	110	7	105	1	110	9	112	16
Pendimetalina	90	17	96	4	81	7	96	-	104	15	108	9	99	11	100	9
Clordano	88	23	93	10	77	3	93	-	82	5	86	10	86	10	91	3
Endossulfan I	119	21	131	13	101	0	113	-	106	11	113	4	107	8	119	4
Clordano	89	28	100	12	80	0	91	-	86	8	89	12	89	12	97	8
Dieldrin	150	33	169	4	132	1	157	-	143	11	148	2	153	2	156	20
Endrin	107	24	107	5	99	3	103	-	102	12	98	1	103	8	106	4
Endossulfan II	114	27	118	9	97	2	116	-	104	9	100	6	108	17	111	3
DDT	83	27	92	0	65	0	79	-	65	3	78	7	70	4	79	6
Metoxicloro	96	10	142	27	63	2	161	-	68	2	132	33	78	4	124	2
Permetrina I	70	24	77	2	52	6	52	-	45	9	57	6	53	4	55	1
Permetrina II	66	22	77	3	48	7	59	-	46	6	56	7	53	3	56	1
Média	107	36	99	9	86	5	87	-	92	8	93	7	92	12	103	11
Coef. de Variação	39		31		31		41		30		30		36		30	
Máximo	206	145	169	27	135	26	161	-	143	20	148	33	153	35	156	38
Mínimo	39	0	35	0	31	0	8	-	45	0	25	0	21	2	55	1
Faixa	167	145	133	27	104	26	153	-	98	20	123	33	133	33	102	37

AcEt = acetato de etila; DCM = diclorometano

Na Tabela 22, os resultados dos estudos preliminares mostram boas condições de recuperação para a maioria dos compostos estudados. A fase mais adequada foi considerada a Strata-X[®] por apresentar resultado global mais próximo do ideal 103%, menor coeficiente de variação global 30% e menor faixa de dispersão total com resultados extremos diferindo em 102% .

4.3 Validação e garantia da qualidade

Após definição das melhores condições para o procedimento de análise via GC-MS o método foi validado de acordo com os conceitos introduzidos na revisão bibliográfica e descritos nos métodos.

4.3.1 Validação do equipamento

O equipamento atendeu a todos os critérios sugeridos para sua qualificação. A Tabela 23 mostra os resultados das qualificações instrumentais realizadas no período de estudos de recuperação.

Tabela 23 – Resultados de qualificação instrumental

Sistema GC-MS	Monitoramento	Critérios
1) Gás e vazamentos	<i>Autotune</i>	m/z: 18 < 5% do pico base; 32 e 28 < 15% do pico base.
2) Background	<i>Autotune</i>	<150 picos;
3) Sensibilidade	<i>Autotune</i>	EM: < 1600 V
4) Resolução de massas	<i>Autotune</i>	0,5 ± 0,15
5) Razão isotópica C ¹² / C ¹³	<i>Autotune</i>	m/z = 70 (1,1 ± 0,1)
6) Energia (EI)	<i>Autotune</i>	70 ± 1 eV
7) Vácuo	Medidor digital	< 4.10 ⁻⁵ Torr

Data	9/7/2007	11/7/2007	12/7/2007	13/7/2007	14/7/2007	17/7/2007	23/7/2007	30/7/2007
1)	1; 12	1; 12	1; 6	1; 12	1; 13	2; 12	1; 11	1; 15
2)	134	134	135	132	135	129	130	137
3)	1529	1529	1435	1529	1576	1529	1529	1529
4)	0,6	0,59	0,59	0,61	0,59	0,62	0,62	0,62
5)	1,11	1,17	1,11	1,15	1,11	1,1	1,12	1,1
6)	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9
7)	3,1. 10 ⁻⁵	3,1.10 ⁻⁵	3,1. 10 ⁻⁵					
<i>Status</i>	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok

4.3.2 Validação do método

4.3.2.1 Função analítica e linearidade

A Tabela 24 mostra um resumo das funções analíticas dos compostos estudados.

Tabela 24 – Funções analíticas

Pesticidas	Regressão linear		Regressão polinomial	
	Equações	R ²	Equações	R ²
Alaclor	$y = 0,2254x - 0,0053$	0,9810	$y = 0,1184x^2 + 0,115x + 0,0004$	0,9999
Aldrin	$y = 0,4386x - 0,0023$	0,9996	$y = 0,0195x^2 + 0,4205x - 0,0014$	0,9998
Dieldrin	$y = 0,4639x - 0,0042$	0,9986	$y = 0,0628x^2 + 0,4053x - 0,0011$	0,9999
Atrazina	$y = 0,5499x - 0,0185$	0,9708	$y = 0,3605x^2 + 0,2137x - 0,0009$	0,9999
Chlordano I	$y = 0,0647x - 0,0002$	0,9998	$y = 0,0032x^2 + 0,0617x - 7E-05$	1,0000
Chlordano II	$y = 0,0229x - 3E-05$	1,0000	$y = 9E-05x^2 + 0,0228x - 2E-05$	1,0000
Chlordano III	$y = 0,0471x - 0,0002$	0,9998	$y = 0,0024x^2 + 0,0449x - 7E-05$	1,0000
DDT I	$y = 0,1078x - 0,0014$	0,9950	$y = 0,0288x^2 + 0,081x - 8E-06$	1,0000
DDT II	$y = 0,4048x - 0,0064$	0,9921	$y = 0,1363x^2 + 0,2776x + 0,0002$	1,0000
Endossulfan α	$y = 0,1319x - 0,0010$	0,9993	$y = 0,0104x^2 + 0,1221x - 0,0005$	0,9997
Endossulfan β	$y = 0,1382x - 0,002$	0,9963	$y = 0,0309x^2 + 0,1094x - 0,0005$	0,9998
Endrin	$y = 0,0801x - 0,0003$	0,9995	$y = 0,0068x^2 + 0,0737x + 2E-05$	1,0000
Heptacloro	$y = 0,1399x - 0,0013$	0,9967	$y = 0,0305x^2 + 0,1115x + 0,0002$	1,0000
Heptacloro epóxido	$y = 0,1970x - 0,0008$	0,9998	$y = 0,0045x^2 + 0,1928x - 0,0006$	0,9998
Hexaclorobenzeno	$y = 1,4671x + 0,0062$	0,9995	$y = 0,0075x^2 + 0,3752x - 0,0008$	0,9999
Lindano (g-BHC)	$y = 0,3822x - 0,0011$	0,9999	$y = 0,0075x^2 + 0,3752x - 0,0008$	0,9999
Metolacloro	$y = 0,4289x - 0,0092$	0,9827	$y = 0,2144x^2 + 0,229x + 0,0012$	0,9999
Metoxicloro	$y = 0,3762x - 0,0021$	0,9987	$y = 0,0508x^2 + 0,3289x + 0,0004$	1,0000
Molinato	$y = 1,3810x - 0,0169$	0,9975	$y = 0,2457x^2 + 1,1519x - 0,0049$	0,9997
Pendimetalina	$y = 0,1383x - 0,0017$	0,9938	$y = 0,0411x^2 + 0,1x + 0,0003$	0,9999
Permetrina I	$y = 0,2672x - 0,0050$	0,9867	$y = 0,1164x^2 + 0,1586x + 0,0007$	0,9998
Permetrina II	$y = 0,3307x - 0,0076$	0,9808	$y = 0,174x^2 + 0,1684x + 0,0009$	0,9998
Propanil	$y = 0,6128x - 0,0182$	0,9745	$y = 0,3748x^2 + 0,2632x + 6E-05$	1,0000
Simazina	$y = 0,3006x - 0,0100$	0,9688	$y = 0,2041x^2 + 0,1103x - 5E-05$	1,0000
Trifluralina	$y = 0,1998x - 0,0029$	0,9922	$y = 0,0668x^2 + 0,1375x + 0,0003$	0,9999

Os pesticidas bentazona, 2,4-D e pentaclorofenol não apresentaram resultados satisfatórios e foram retirados do estudo. Todos os outros compostos apresentaram excelentes coeficientes de determinação, $R^2 > 0,9995$.

A linearidade foi aceita na faixa de estudo para todos os compostos. No entanto, para análises de rotina limitou-se à utilização de apenas uma ordem de grandeza em curva de três níveis: 12, 40 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ (correspondente a concentração em água de 0,030, 0,100 e 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$). A razão para esta escolha foi a intenção de priorizar a quantificação da melhor forma possível, dos níveis inferiores de concentração, próximos aos limites de reportagem. Caso seja confirmada a presença de concentrações superiores à faixa de trabalho, deverá ser feita uma diluição do extrato para quantificação na região interpolada pela curva analítica. Assim, em análise de rotina não é necessária, a utilização de equações polinomiais.

4.3.2.2 Seletividade

A seletividade do método mostrou-se adequada para determinação dos pesticidas em seus respectivos VMP de acordo com a Portaria 518. A Tabela 25 mostra a diferença percentual da recuperação obtida empregando-se o íon de quantificação e o íon de qualificação para cada composto. A tolerância máxima é de 20% para os níveis R2 e R3. Para o nível R1 a tolerância é de 30% e deve ser avaliada criticamente, conforme o caso.

Tabela 25 – Diferença percentual da recuperação obtida empregando-se o íon de quantificação e o íon de qualificação

Padrões	R1 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$	R2 0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$	R3 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$
Padrão de substituição 1	0	0	0
Padrão de substituição 2	3	0	-11
Padrão de substituição 3	-4	0	-1
Molinato	44	3	2
Trifluralina	5	0	-2
Hexaclorobenzeno	4	-2	0
Simazina	-8	-2	1
Atrazina	-6	-1	1
Lindano	-324	-79	-24
Padrão de substituição 4	0	0	-1
Propanil	-4	3	3
Heptacloro	-3	0	0
Alaclor	-5	0	0
Aldrin	-1	-1	2
Metolacloro	4	2	-1
Pendimetalina	-13	-5	-4
Heptacloro epóxido	12	-2	1
clordano I	7	-4	1
clordano II	26	-1	-1
clordano III	15	-5	-5
Endossulfan I	4	0	4
Endossulfan II	-3	2	1
Dieldrin	18	4	5
Endrin	2	-2	-1
DDT I	-16	4	1
DDT II	-7	-1	1
Padrão de substituição 5	2	-1	-1
Metoxicloro	0	-2	-1
Permetrina I	-76	-4	1
Permetrina II	-29	-7	-3
Padrão de substituição 6	3	1	1

O lindano apresentou efeito de matriz sistematicamente no íon de qualificação, no entanto, apresenta VMP de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ o que torna os efeitos desprezíveis neste nível. O molinato e a permetrina, também apresentaram efeitos de matriz em seus íons de qualificação, porém apenas em recuperações de $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$, o que não representa problemas para determinação dos VMP de 6 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

4.3.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação instrumental podem ser visualizados na Tabela 26.

Tabela 26 – Limite de detecção e limite de quantificação instrumental

Pesticidas	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Alaclor	3	9
Aldrin	1	4
Dieldrin	3	9
Atrazina	4	14
Clordano (cada isômero)	2	6
DDT (cada isômero)	1	4
Endossulfan α	2	8
Endossulfan β	4	13
Endrin	4	13
Heptacloro	3	9
Heptacloro epóxido	4	13
Hexaclorobenzeno	0	1
Lindano (g-BHC)	1	4
Metolacloro	2	7
Metoxicloro	3	9
Molinato	2	7
Pendimetalina	11	37
Permetrina (cada isômero)	2	7
Propanil	4	14
Simazina	6	21
Trifluralina	3	9

Os limites da Tabela 26 multiplicados pelo fator de concentração de 400 vezes garantem determinações dos VMP da Portaria 518.

A Figura 31 apresenta uma sobreposição dos cromatogramas nos três níveis de concentração: $0,030$, $0,100$ e $0,300 \mu\text{g L}^{-1}$.

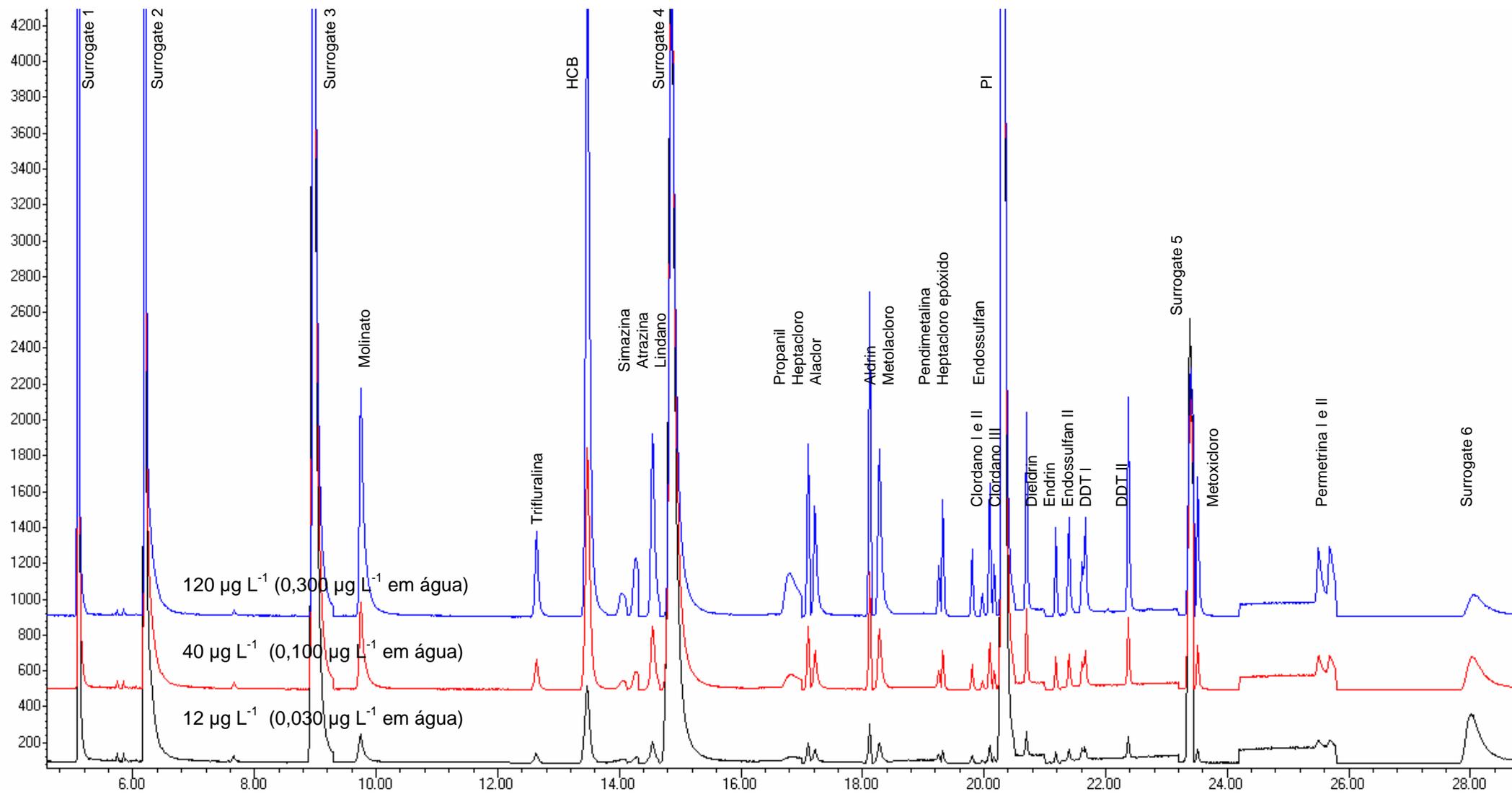


Figura 31 – Sobreposição dos cromatogramas do grupo de pesticidas nos níveis de concentração R1, R2 e R3

4.3.2.4 Precisão instrumental

Os resultados de precisão instrumental estão expressos na Tabela 27.

Tabela 27 – Precisão instrumental

Padrões	Concentrações [$\mu\text{g/L}$]																												
	Curva de Horwitz	Alacloro	Aldrin	Dieldrin	Atrazina	Clordano I	Clordano II	Clordano III	DDT I	DDT II	Endossulfan a	Endossulfan β	Endrin	Heptacloro	Heptacloro epóxido	Hexaclorobenzeno	Lindano (g-BHC)	Metolaclo	Metoxiclo	Molinato	Pendimetalina	Permetrina I	Permetrina II	Propanil	Simazina	Trifluralina			
	Precisão instrumental - desvio padrão relativo																												
P1	1	22	12													7	46	10		8								16	
P2	2,5	20	46	4	10	32	13	35	14		6	4	21	11	44	4	6	16	4	9	5	24							9
P3	5	18	12	1	10	13	5	16	7	17	4	5	6	5	14	8	2	3	2	2	4	14	4	4	7	5	16		
P4	10	16	10	4	9	4	4	8	6	18	6	9	9	2	5	8	5	5	7	8	6	9	12	16	9	9	7		
P5	25	14	7	3	3	3	3	5	4	6	2	4	5	2	5	4	4	5	4	5	5	5	6	6	6	5	4		
P6	50	12	1	3	4	1	3	3	6	5	4	1	2	1	4	3	4	3	2	7	5	2	9	11	4	4	4		
P7	100	11	3	2	2	4	2	6	3	3	1	4	2	2	3	1	3	2	3	3	4	2	6	6	5	4	3		
P8	250	10	3	7	3	3	2	3	3	8	2	1	1	2	3	2	2	2	4	4	1	7	7	5	3	4			
P9	500	9	4	4	1	3	2	3	4	2	3	3	2	1	5	3	6	4	3	5	6	3	9	10	6	5	5		
P10	1000	8	6	3	2	3	2	1	2	5	2	3	1	1	4	2	3	3	5	5	4	4	11	11	4	5	6		

Na Tabela 27, na área sombreada, encontram-se todos os valores de desvio padrão relativo (%) que atendem os critérios da trombeta de Horwitz. É importante notar que o nível mais baixo de precisão aceito é menor que 50% dos VMP na Portaria, o que torna a precisão instrumental adequada.

4.3.2.5 Repetitividade, precisão intermediária e exatidão (recuperação)

A repetitividade, precisão intermediária e recuperação podem ser visualizadas nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28 – Resultados de precisão e exatidão para fortificação F1 (0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$)

	Repetitividade				Precisão intermediária	
	1º Dia		2º Dia		*R%	RSDpi
	*R%	RSDr	*R%	RSDr		
Molinato	61	21	87	76	74	79
Trifluralina	53	23	61	11	57	25
Hexachlorobenzeno	36	21	36	17	36	27
Simazina	97	13	116	4	107	14
Atrazina	99	10	114	5	107	11
Lindano	72	7	72	4	72	8
Propanil	120	18	114	9	117	20
Heptacloro	46	22	57	4	52	22
Alaclor	97	9	106	6	102	11
Aldrin	32	29	17	14	25	32
Metolacloro	114	8	114	3	114	9
Pendimetalina	75	20	68	12	72	23
Heptacloro epóxido	68	17	70	9	69	19
Clordano (isômeros)	54	33	61	22	58	40
Endossulfan (isômeros)	85	20	79	9	82	22
Dieldrin	87	22	81	12	84	25
Endrin	79	16	80	8	80	18
DDT (isômeros)	46	35	43	27	45	44
Metoxicloro	79	31	85	19	82	36
Permetrina (isômeros)	29	34	35	27	32	43

* R%: Recuperação (%)

De acordo com a trombeta de Horwitz, para o nível de concentração de 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$, o RSD_r - desvio padrão relativo para repetitividade, é 38% e RSD_{pi} - desvio padrão relativo para precisão intermediária, é 76%, as tolerâncias máximas podem ser de até duas vezes estes valores (AOAC, 2002). Os resultados em negrito são referentes aos compostos com VMP no nível de concentração reportado na Tabela 28. Foram considerados excelentes os níveis de precisão alcançados. O aldrin apresentou baixa recuperação.

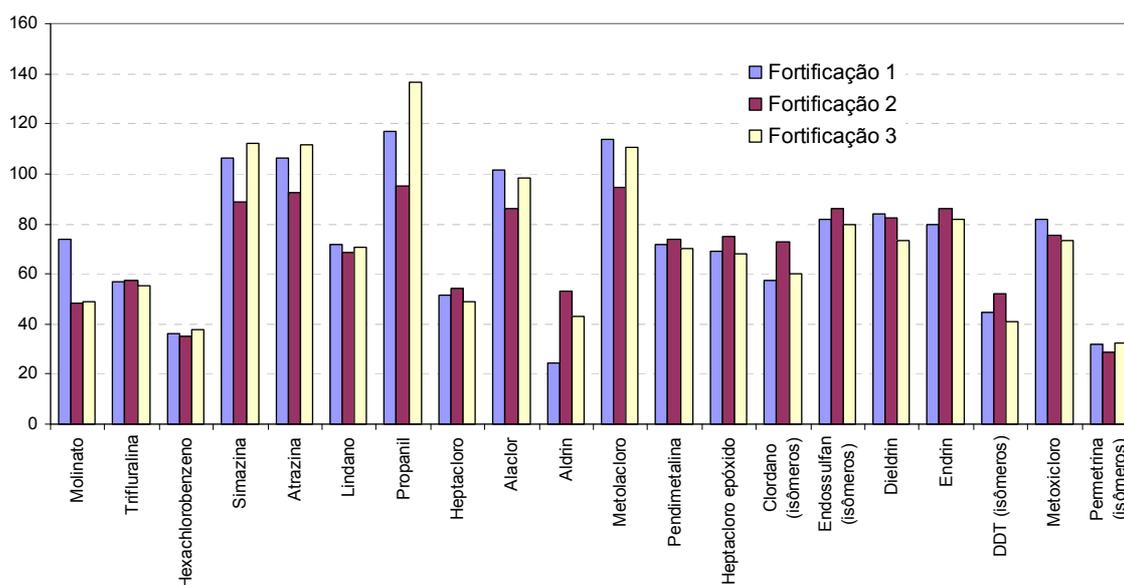
Os demais compostos foram avaliados pela Tabela 29, pois apresentam limites acima de 0,300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 29 – Resultados de precisão e exatidão do método para o nível de fortificação F3 (0,300 µg L⁻¹)

Pesticidas	Repetitividade				Precisão intermediária	
	1º Dia		2º Dia		*R%	RSD _{pi}
	*R%	RSD _r	*R%	RSD _r		
Molinato	66	15	32	46	49	48
Trifluralina	57	11	54	13	56	17
Hexachlorobenzeno	41	18	34	18	38	25
Simazina	117	15	107	15	112	21
Atrazina	113	10	110	14	112	17
Lindano	69	14	72	11	71	18
Propanil	152	20	121	14	137	24
Heptacloro	45	14	53	12	49	18
Alaclor	98	5	99	10	99	11
Aldrin	36	25	50	22	43	33
Metolacloro	109	6	112	9	111	11
Pendimetalina	73	12	67	9	70	15
Heptacloro epóxido	68	7	68	7	68	10
Clordano (isômeros)	62	25	58	13	60	28
Endossulfan (isômeros)	80	5	80	6	80	8
Dieldrin	74	6	73	7	74	9
Endrin	85	4	79	5	82	6
DDT (isômeros)	40	9	42	20	41	22
Metoxicloro	76	6	71	13	74	14
Permetrina (isômeros)	28	12	37	17	33	21

* R%: Recuperação (%)

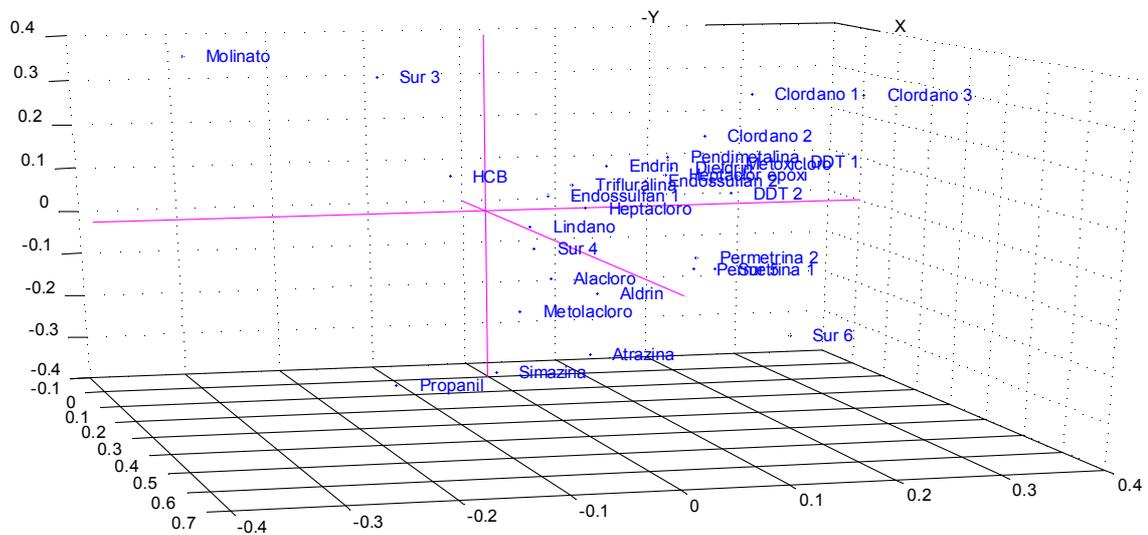
Conforme a curva de Horwitz, para o nível de concentração de 0,300 µg L⁻¹, o RSD_r é 27% e RSD_{pi} é 54%, as tolerâncias máximas podem ser de até duas vezes estes valores. A precisão no processo de recuperação foi considerada excelente. Para demonstrar a consistência do método a Figura 32 mostra as recuperações por nível de concentração.



A Figura 32 – Comparativo de recuperações por nível de fortificação

Devido ao fato de alguns compostos apresentarem baixos níveis de recuperação, foi realizada uma análise exploratória dos dados obtidos, utilizando-se a modelagem por componentes principais. A Figura 33 mostra que as baixas recuperações de molinato e hexaclorobenzeno estão associadas ao padrão de substituição Acenafteno-d10 (Sur3) devido ao efeito de perda por volatilidade. Além disso, é possível notar agrupamentos de compostos quimicamente semelhantes como as triazinas e os isômeros em geral. Na seqüência, estes efeitos serão melhor descritos.

X-loadings



Sur x – Padrão de substituição (*surrogate*), x = ordem de eluição.

Figura 33 – Análise exploratória do conjunto de pesticidas

4.3.2.6 Robustez

O resumo do estudo de robustez revela informações fundamentais para o entendimento do processo de SPE. Os efeitos foram normalizados para que pudessem ser comparados de forma independente da recuperação obtida por cada composto. O teste de Youden encontra-se reportado na Tabela 30.

Tabela 30 – Estudo de robustez da SPE - teste de Youden

Pesticidas e padrões de substituição	Turbidez	pH	Percolação	Estabilidade	Secagem do cartucho	Modificador	Evaporação do eluato
1,4-Diclorobenzeno-d4 (<i>surrogate 1</i>)	26	15	-9	9	-15	-26	-50
Naftaleno-d8 (<i>surrogate 2</i>)	17	16	3	-3	-16	-17	-70
Acenafteno-d10 (<i>surrogate 3</i>)	2	21	21	-21	-21	-2	-60
Molinato	-9	10	16	-14	-12	7	-65
Trifluralina	-13	12	8	-7	-3	1	-49
Hexaclorobenzeno	-11	16	11	-10	-10	4	-56
Simazina	-20	2	0	-13	9	7	-14
Atrazina	-18	0	1	-15	10	4	-15
Lindano	-11	10	10	-8	-3	1	-44
Antraceno-d10 (<i>surrogate 4</i>)	-13	13	12	-13	-5	3	-49
Propanil	-19	-2	-1	-19	13	4	-4
Heptacloro	-12	13	19	-35	-4	3	-30
Alaclor	-17	2	5	-7	3	4	-28
Aldrin	-3	10	12	-11	-10	-4	-34
Metolacloro	-17	-1	3	-9	5	4	-20
Pendimetalina	-16	3	0	-10	3	2	-15
Heptacloro epóxido	-7	7	1	-2	-2	1	-22
Clordano (isômeros)	-9	4	-2	-2	-3	2	-13
Endossulfan (isômeros)	-20	-73	8	-15	-3	9	-15
Dieldrin	-10	3	0	-3	-2	2	-15
Endrin	-9	2	-1	-4	1	2	-11
DDT (isômeros)	-23	2	-8	-4	-4	3	-1
Criseno-d12 (<i>surrogate 5</i>)	-9	10	15	-2	-3	-13	-1
Metoxicloro	-19	0	-7	-12	3	0	2
Permetrina (isômeros)	-33	-7	-9	4	-9	5	8
Perileno-d12 (<i>surrogate 6</i>)	9	28	35	-3	-27	4	-8

Os valores correspondem aos efeitos em % na recuperação dos analitos

De acordo com os resultados obtidos, foi possível identificar os principais fatores que influenciam o processo de extração para cada composto, através da análise dos efeitos.

Assim, o aumento da turbidez para o limite máximo de potabilidade da Portaria 518, implica diminuição de aproximadamente 15% das recuperações obtidas para os pesticidas em questão. Em pH 9 houve uma grande perda de recuperação de endossulfan, o que não ocorreu com nenhum outro composto. A velocidade de percolação da amostra não significou grandes alterações. A estabilidade das amostras mostrou ser um fator relativamente importante, pois com 24 h a uma temperatura de 35 °C, houve uma diminuição média de 10% nos níveis de recuperação. A presença de modificador orgânico (pequena quantidade de solvente orgânico na amostra) não alterou significativamente a eficiência das extrações. O aumento do tempo de secagem embora, não represente um grande

impacto à SPE, provoca uma diminuição de compostos voláteis e aumento de compostos polares, pois não são transferidas quantidades de água para o extrato final e assim não há partição destes pesticidas entre diclorometano e água. Por fim, 15 minutos extra de evaporação de extrato leva à perdas significativas, podendo representar 50% nos pesticidas mais voláteis com diminuição gradativa até efeitos desprezíveis nos menos voláteis.

As variáveis investigadas servem para limitar características que influenciam negativamente a extração por SPE e otimizar parâmetros que tragam resultados positivos para o procedimento de extração.

Os dados obtidos através do estudo de robustez foram avaliados através de uma matriz de correlação de forma que fosse possível prever recuperações de pesticidas através do conjunto de padrões de substituição (*surrogate*). Assim, é possível criar fatores de correção de compostos com baixa recuperação partindo apenas de informações dos padrões adicionados ao processo de extração. A Tabela 31 mostra a matriz de correlação dos padrões de substituição *versus* pesticidas.

Para melhor visualização dos efeitos, a Figura 34 mostra a influência multivariada dos fatores (em vermelho) sobre os compostos (em azul). Valores negativos da componente principal (PC1) apresentam compostos voláteis. A componente principal 2 (PC2) é influenciada principalmente por pH devido à presença de endossulfan que obteve perda acentuada em pH elevado.

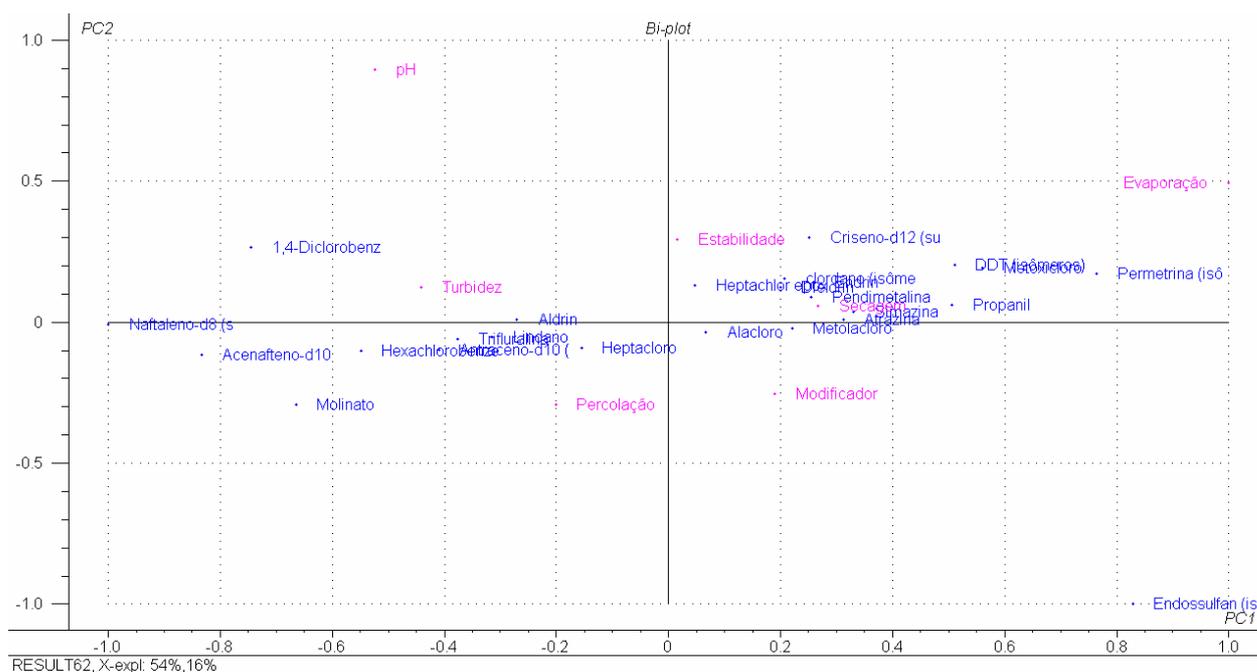


Figura 34 – Representação multivariada do estudo de robustez

Tabela 31 – Matriz de correlação entre os padrões de substituição e pesticidas

Pesticidas e padrões de substituição	1,4-Diclorobenzeno-d4	Naftaleno-d8	Acenafteno-d10	Antraceno-d10	Criseno-d12	Perileno-d12
1,4-Diclorobenzeno-d4 (<i>surrogate 1</i>)		0,93	0,66	0,52	0,11	0,38
Naftaleno-d8 (<i>surrogate 2</i>)	0,93		0,88	0,80	0,21	0,53
Acenafteno-d10 (<i>surrogate 3</i>)	0,66	0,88		0,93	0,40	0,76
Molinato	0,57	0,84	0,95	0,98	0,27	0,57
Trifluralina	0,56	0,81	0,90	0,99	0,34	0,49
Hexachlorobenzeno	0,59	0,84	0,94	0,99	0,33	0,58
Simazina	-0,23	0,09	0,35	0,63	0,17	-0,02
Atrazina	-0,19	0,12	0,38	0,64	0,20	-0,02
Lindano	0,56	0,82	0,92	1,00	0,36	0,53
Antraceno-d10 (<i>surrogate 4</i>)	0,52	0,80	0,93		0,37	0,55
Propanil	-0,52	-0,27	0,02	0,27	0,13	-0,23
Heptacloro	0,18	0,50	0,82	0,83	0,48	0,62
Alaclor	0,24	0,54	0,71	0,92	0,29	0,28
Aldrin	0,64	0,87	0,99	0,95	0,48	0,74
Metolacloro	0,00	0,33	0,55	0,80	0,25	0,13
Pendimetalina	-0,04	0,28	0,53	0,77	0,35	0,19
Heptacloro epóxido	0,56	0,79	0,85	0,97	0,32	0,45
Clordano (isômeros)	0,33	0,58	0,70	0,87	0,26	0,38
Endossulfan (isômeros)	-0,46	-0,32	-0,23	-0,12	-0,32	-0,30
Dieldrin	0,28	0,56	0,71	0,90	0,29	0,35
Endrin	0,16	0,46	0,63	0,86	0,26	0,21
DDT (isômeros)	-0,56	-0,41	-0,17	0,08	0,17	-0,09
Criseno-d12 (<i>surrogate 5</i>)	0,11	0,21	0,40	0,37		0,62
Metoxicloro	-0,71	-0,57	-0,30	-0,06	0,14	-0,28
Permetrina (isômeros)	-0,71	-0,65	-0,48	-0,27	0,04	-0,23
Perileno-d12 (<i>surrogate 6</i>)	0,38	0,53	0,76	0,55	0,62	

A partir dos resultados tabelados acima, é possível observar (em negrito) que um grande número de pesticidas apresenta correlação direta ($r > 0,90$) entre as suas recuperações, e as dos padrões de substituição acenafteno-d10 e antraceno-d10.

4.3.2.7 Estimativa de incerteza

A estimativa de incerteza de medição foi calculada conforme diagrama de causa e efeito sugerido e seguindo as determinações da fundamentação teórica. A planilha de cálculos da Figura 35 mostra como foram obtidos os resultados.

Símbolo	Componentes da incerteza	Unidade	Tipo	Valor (+/-)	Distribuição de Probabilidade	Divisor	Coef. de sensibilidade Ci	Incerteza padrão Ui	Contribuição %	Graus de liberdade
1	Solução estoque - balões (10 mL)	mL	B	0,0	Retangular	1,73	10,00	0,14	0 %	∞
2	Solução estoque - balança (10 mg)	mg	B	0,5	Retangular	1,73	10,00	2,89	1 %	∞
3	Solução estoque - pureza reagentes	%	B	1	Retangular	1,73	1,00	0,58	0 %	∞
4	Solução de calibração SA - pipetador (0,5 mL)	mL	B	0,001	Retangular	1,73	200,00	0,12	0 %	∞
5	Solução de calibração AS+SB+SC - balões (50 mL)	mL	B	0,104	Retangular	1,73	2,00	0,12	0 %	∞
6	Solução de calibração AS+SB+SC - pipeta (5 mL)	mL	B	0,001	Retangular	1,73	20,00	0,01	0 %	∞
7	Solução de calibração AS+SB+SC - balões (25 mL)	mL	B	0,005	Retangular	1,73	4,00	0,01	0 %	∞
8	Solução de calibração AS+SB+SC - pipetador (3 mL+1 mL)	mL	B	0,0031	Retangular	1,73	33,33	0,06	0 %	∞
9	Redissolução	mL	B	0,001	Retangular	1,73	200,00	0,12	0 %	∞
10	Precisão instrumental	%	A	4	Normal	2,65	1,00	1,51	0 %	6
11	Curva de calibração - R2>0,99	%	B	0	Retangular	1,73	100,00	0,58	0 %	∞
12	Turbidez	%	A	11	Normal	2,83	1,00	3,97	1 %	7
13	pH	%	A	13	Normal	2,83	1,00	4,45	1 %	7
14	Percolação	%	A	20	Normal	2,83	1,00	7,22	4 %	7
15	Estabilidade	%	A	19	Normal	2,83	1,00	6,71	3 %	7
16	Secagem	%	A	15	Normal	2,83	1,00	5,35	2 %	7
17	Modificador	%	A	9	Normal	2,83	1,00	3,20	1 %	7
18	Evaporação	%	A	85	Normal	2,83	1,00	30,22	65 %	7
19	Repetitividade do ensaio	%	A	31	Normal	1,73	1,00	17,61	22 %	11
U_c	INCERTEZA COMBINADA							3,75028E+01		veff= 15
U₉₅	INCERTEZA EXPANDIDA (aprx. 95,45%)							79,94		
OBSERVAÇÕES: Molinato (RSD)										k= 2,13

Figura 35 – Planilha de cálculos para incerteza de medição

Para melhor entendimento e avaliação das fontes de incerteza, a Tabela 32 mostra um resumo contendo a incerteza expandida (fator de abrangência K=2, equivalente a 95,45% de confiança) na primeira coluna, e a porcentagem de contribuição de cada uma das fontes de incerteza consideradas para os cálculos. Os Resultados obtidos neste estudo são comparáveis a literatura (STEPÁN et al., 2004). Tabela 32 – Incerteza de medição e contribuição relativa das principais fontes de incerteza

Pesticidas	Incerteza expandida - RSD, (K=2)	Solução estoque - volumetria	Solução estoque – gravimetria	Solução estoque - pureza de reagentes	Solução de calibração - volumetria	Redissolução	Precisão instrumental	Curva de calibração	Turbidez	pH	Percolação	Estabilidade	Secagem	Modificador	Evaporação	Repetitividade do ensaio
Molinato	94	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	2	1	1	45	46
Trifluralina	45	0	2	0	0	0	0	0	4	4	2	1	0	0	56	31
Hexachlorobenzeno	50	0	1	0	0	0	0	0	1	3	1	1	1	0	35	55
Simazina	44	0	2	0	0	0	0	0	22	0	0	9	5	3	11	48
Atrazina	40	0	2	0	0	0	1	0	23	0	0	15	6	1	16	36
Lindano	43	0	2	0	0	0	0	0	3	3	3	2	0	0	50	37
Propanil	51	0	1	0	0	0	1	0	21	0	0	20	9	1	1	45
Heptacloro	38	0	2	0	0	0	0	0	2	3	6	22	0	0	16	47
Alaclor	37	0	3	0	0	0	0	0	20	0	1	3	1	1	53	18
Aldrin	54	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	7	89
Metolacoloro	34	0	3	0	0	0	0	0	27	0	1	8	3	2	36	20
Pendimetalina	29	0	4	0	0	0	0	0	18	1	0	7	0	0	14	55
Heptacloro epóxido	21	0	8	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	35	48
Clordano (isômeros)	43	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	91
Endossulfan (isômeros)	43	0	2	0	0	0	0	0	11	65	2	6	0	1	6	6
Dieldrin	19	0	10	0	0	0	1	0	12	1	0	1	0	1	24	49
Endrin	15	0	15	1	0	0	1	1	15	1	0	3	0	1	25	37
DDT (isômeros)	38	0	2	0	0	0	0	0	32	0	3	1	0	0	0	60
Metoxicloro	35	0	3	0	0	0	0	0	43	0	6	18	1	0	1	28
Permetrina (isômeros)	50	0	1	0	0	0	1	0	50	2	4	1	3	1	3	34
Média	41	0	3	0	0	0	0	0	16	4	2	6	2	1	22	44

Estes resultados permitem uma série de observações extremamente relevantes para ensaios de rotina, pois é possível observar a real influência de uma série de etapas do processo analítico. Inicialmente, é possível observar que todas as

questões relacionadas às medidas volumétricas no preparo de amostras e transferências não contribui significativamente para a incerteza de ensaios desta natureza. Neste sentido, medidas como a utilização de vidrarias não calibradas, poderiam ser adotadas sem prejuízos metrológicos nas determinações, reduzindo-se assim, custos com serviços da rede de calibração.

Na pesagem de padrões surgem algumas medidas de melhoria como a pesagem de maiores quantidades de padrões, diminuindo esta incerteza relativamente grande em massas reduzidas. Vale lembrar que 10 mg é o limite mínimo para pesagem de acordo com a Portaria 236. A utilização de padrões de massas certificados é conveniente nesta etapa.

Fontes normalmente importantes de incerteza como curva de calibração e precisão instrumental foram desprezíveis no método proposto, em grande parte pela utilização do padrão interno e desenvolvimento dos parâmetros de injeção.

De forma geral, três fatores somaram mais de 80% de contribuição para a incerteza global. O mais importante está associado ao processo de SPE em condições de repetitividade. Em segundo lugar, está o processo de evaporação do extrato, que afeta de forma significativa os compostos mais voláteis, sendo fundamental que se tenha um controle rigoroso deste parâmetro. Em terceiro lugar, podemos destacar a quantidade de matriz da amostra, que de modo geral tem contribuído com perdas de recuperação.

Outros fatores importantes e pontuais podem ser explorados como o grande efeito do pH alcalino para a extração do endossulfan e a baixa estabilidade de alguns compostos como o propanil, heptacloro, metoxiloro e atrazina.

O estudo de incerteza de medição tem um fator intrínseco relacionado com o método, com a natureza da amostra e um fator de precisão que pode ser reduzido com o aumento do número de determinações. No entanto, as incertezas calculadas com uma única determinação em rotina (incertezas reportadas neste estudo) garantem resultados muito semelhantes das análises replicadas ($n=2$, apresentam melhoras de apenas 10% para compostos cuja influência da repetitividade esteja em torno de 40%).

4.3.2.8 Limite prático de reportagem e faixa de aplicação

Todos os pesticidas apresentaram sinais maiores que seus limites de quantificação nos ensaios de recuperação em concentração de $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 33 mostra os limites práticos de reportagem comparados com os VMP da Portaria 518. Os limites superiores de determinação não foram estabelecidos devido a possibilidade de diluição do extrato para determinação abaixo de $0,300 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 33 – Limite prático de reportagem

Pesticidas	Limite inferior	VMP Portaria 518
Alaclor	0,023	20,0
Aldrin	0,010	0,03
Dieldrin	0,023	0,03
Atrazina	0,035	2
Clordano (cada isômero)	0,015	0,2
DDT (cada isômero)	0,010	2
Endossulfan α	0,020	20
Endossulfan β	0,033	20
Endrin	0,033	0,6
Heptacloro	0,023	0,03
Heptacloro epóxido	0,033	0,03
Hexaclorobenzeno	0,003	1
Lindano (g-BHC)	0,010	2
Metolacloro	0,018	10
Metoxicloro	0,023	20
Molinato	0,018	6
Pendimetalina	0,093	20
Permetrina (cada isômero)	0,018	20
Propanil	0,035	20
Simazina	0,053	2
Trifluralina	0,023	20

4.4 Aplicação do método em amostras reais e adequação do sistema

A aplicação do método em amostras reais apresentou ótimo desempenho estando de acordo com os critérios de adequação do sistema. A Figura 36 mostra a sobreposição dos cromatogramas das 5 amostras reais e do padrão de $0,300 \mu\text{g L}^{-1}$. Nenhum pesticida foi detectado nas amostras reais submetidas ao estudo. Em estudos de monitoramento em água potável apenas uma pequena fração das amostras apresentam, de fato, contaminação em níveis críticos. A CORSAN até o primeiro semestre de 2006, não havia registrado nenhum caso de contaminação.

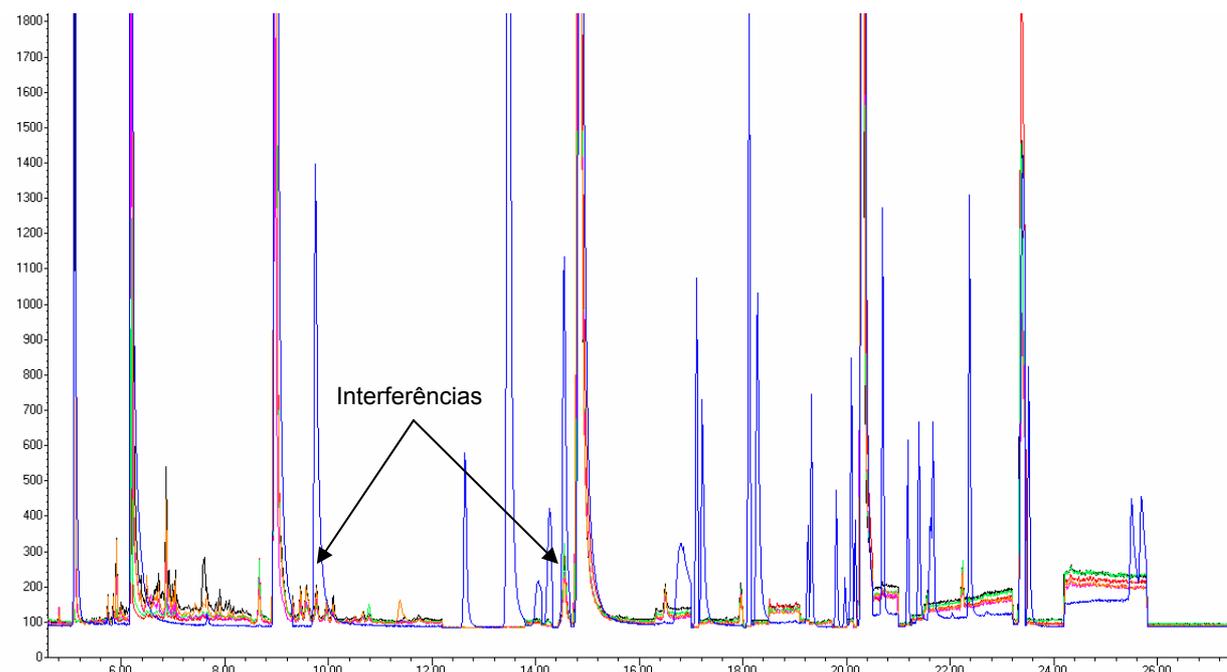


Figura 36 – Sobreposição de cromatogramas de amostras reais e padrão (em azul)

Observando-se a figura 36, pode-se notar que não há interferências importantes, salvo aquelas já reportadas no estudo de seletividade provenientes do processo de extração (indicadas na sobreposição). A causa mais provável, destas interferências, tem origem nos subprodutos dos cartuchos de SPE, e não nas amostras. Isto ocorre, porque os cartuchos de SPE são condicionados com metanol (solvente polar), mas eluídos com diclorometano (solvente apolar). Assim, o caráter apolar do diclorometano, extrai compostos residuais do processo de fabricação dos cartuchos, que não foram eluídos pelo metanol na etapa inicial da SPE.

Na faixa de calibração compreendida entre $0,030$ e $0,300 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se equação de regressão linear para todos os compostos, o pior resultado entre os coeficientes de determinação foi $R^2 = 0,995$. Estes resultados mostraram-se adequados, para utilização do método em rotinas, de qualquer tipo de água que atenda aos parâmetros físicos de potabilidade.

SOBOLEVA et al. (2004) traz uma boa discussão sobre estudos de adequação do sistema, combinando parâmetros de injeção e detecção. As conclusões que a autora chega são condizentes com as apresentadas neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

O presente método foi considerado adequado para a determinação de pesticidas da Portaria 518. O grupo de pesticidas, que constam no escopo deste método, apresenta características físico-químicas muito diferenciadas o que dificulta a elaboração de um procedimento único de extração e análise, fato este que reforça a importância do trabalho desenvolvido.

Apenas 4 compostos da Portaria 518 não puderam ser determinados adequadamente pelo método desenvolvido. O glifosato e o 2,4-D são compostos inadequados para cromatografia gasosa. Enquanto bentazona e pentaclorofenol apresentam sensibilidade, mas não foram recuperados de forma adequada na extração multirresíduo por SPE.

A técnica de GC-MS demonstrou ser fundamental para determinações que exigem extrema sensibilidade e seletividade, atendendo requisitos na faixa de nanogramas por litro para todos os compostos e apresentando seletividade para possibilitar determinações de resíduos de pesticidas em amostras de várias procedências e com alta turbidez, sem interferências significativas.

Os parâmetros cromatográficos foram considerados excelentes em termos de eficiência, resolução e tempo total de análise. O método foi mantido por um período maior que um ano sem apresentar modificações importantes nos tempos de retenção.

Na pré-concentração, a técnica de SPE foi essencial para garantir todos os VMP da Portaria 518, onde foi necessário um fator de concentração de 400 vezes. O procedimento de extração não apresentou influências significativas para velocidade de percolação da amostra o que agiliza o trabalho de rotina.

No desenvolvimento do método foi levado em consideração um grande número de fatores que possibilitaram aumento significativo de sensibilidade e robustez em GC-MS e SPE. Otimizações por modelos fatoriais mostraram ser de grande valia para selecionar variáveis de maior efeito e tomar ações adequadas de controle.

Para variáveis pré-selecionadas por modelos fatoriais, a utilização de planejamento experimental e construção de modelos quadráticos ajudaram no aumento de sensibilidade em pelo menos 4 vezes no sistema de injeção. A

utilização da teoria dos gases ideais para otimização do sistema de injeção pode ser aplicada para qualquer método que utilize este sistema de injeção.

Na validação do método foram investigados todos os parâmetros necessários para o credenciamento da norma ISO 17025, incluindo qualificação de equipamentos e adequação do sistema.

Na avaliação da precisão foram considerados excelentes todos os níveis de concentração estudados quando comparados com a Trombeta de Horwitz. A precisão intermediária foi considerada excelente mostrando não haver comportamentos diferenciados entre dias diferentes.

As recuperações foram consistentes, independente do dia e do nível de concentração do analito, o que mostra a robustez na execução da SPE. Alguns analitos apresentaram baixas recuperações, porém devido à consistência dos resultados em torno de um valor médio de recuperação é possível estabelecer com segurança um fator de correção dos resultados em amostras reais.

A avaliação da robustez foi essencial para o conhecimento de fatores provenientes da execução da SPE e da natureza das amostras. Com os resultados obtidos pelo estudo de robustez foi possível identificar fatores importantes, com extrema coerência quando confrontados com a teoria. A análise de efeitos, somados à visualização gráfica através de PCA, mostra informações relevantes para o entendimento dos fenômenos estudados e auxiliam na tomada de ações de melhoria contínua. Através do estudo de robustez foi possível construir uma matriz de correlação entre os padrões de substituição e os pesticidas analisados. Isto possibilita a previsão de recuperações a partir de padrões adicionados ao sistema de SPE e assim a correção dos resultados em amostras reais. Com isso, os componentes de incerteza ligados à robustez da extração podem ser reduzidos a praticamente zero, diminuindo em torno de 40% a incerteza expandida global do ensaio.

A determinação de incerteza provou trazer informações essenciais que complementam os demais parâmetros de validação estudados. Com um levantamento completo de fontes de incerteza envolvendo todas as etapas analíticas, foi possível avaliar a contribuição efetiva de cada etapa, possibilitando a redução de custos em variáveis irrelevantes e aumentando os controles em etapas críticas do ensaio. O levantamento completo de incertezas auxilia no gerenciamento de garantia da qualidade e na redução de custos de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM, **Associação Brasileira de Indústria Química**. Disponível em <<http://www.abiquim.org.br>. Acesso em: 16/04/2007.

AGILENT. Course number H4063A. **Interpretation of mass spectra**. Barueri, 2000, 253p.

AGILENT. Curso: M5C. **Diagnóstico e Solução em Problemas de GC-MS**. Barueri, 2002.

AGUILAR, C et al. Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY. A.** 771 (1997) 221-231 p.

ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. 2003

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16/04/2007.

AOAC. **Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods**. 2002

AZEVEDO, D. et al. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hidrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. **JOURNAL BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY**. 15,2 (2004) 292-299.

BARROS, C. et al. **Validação de Métodos Analíticos**. Apostila da REMESP, 2005.

BASHEER, C. et al. Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 968 (2002) 191-199.

BECEIRO-GONZÁLES, E. et al. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in Water by gas chromatography-mass spectrometry. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 1141 (2007) 165-173.

CAC/GL 50 – 2004. **General Guidelines on Sampling**. Disponível em: www.codexalimentarius.net/download/standards/10141/CXG_050e.pdf. Acesso em: 04/2007.

CHÁFER-PERICÁS, C. et al. In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples. **JOURNAL**

CHROMATOGRAPHY A. 1141 (2007) 10-21.

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>>. Acesso em: 04/2007.

COLLINS, C. H et al. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 6^a ed., 1995, 279 p.

COLLINS, C. H. Some thoughts on the 100 years of chromatography. 10^o Congresso Latino- Americano de Cromatografia e Técnicas Afins. **BOOK OF ABSTRACTS**. 2004. p. 42.

COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES. Disponível em <<http://www.alanwood.net/pesticides/>>. Acesso em: 10/04/2007.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 02/2006.

CONCHA-GRAÑA, E et al. Optimisation of a programmed split–splitless injector in the gas chromatographic–mass spectrometric determination of organochlorine pesticides. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 958 (2002) 17-24.

CURRIE, L.A. Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions. **CHEMOMETRICS AND INTELLIGENT LABORATORY SYSTEMS.** 37 (1997) 151-181.

CRQ-V. Câmara de Agrotóxico. **Informativo CRQ-V.** Ano X, nº 97, Junho/Agosto, 2006.

DOHERTY, L. Enhancing pesticide analysis with a highly sensitive GC/MSD system. **APPLICATION NOTE AGILENT.** 5966-0370E. 23 (1999), p. 1-8.

DOHERTY, L. Optimizing the Agilent Technologies 6890 Series GC for High Performance MS Analysis. **TECHNICAL OVERVIEW.** 5988-9944EN. (14-11-2003), p. 1-10.

EEC. **European Environmental Comission.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc21_en.pdf>. Acesso em: 07/2006.

EURACHEM. **Determinando a incerteza na Medição Analítica.** Segunda edição, 2002.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: a laboratory guide to method validation and related topics.** 1998.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic - mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residue.** Almeria, Spain. Elsevier: 2005, 487p.

FILHO, R. et al. **Introdução aos Cálculos da Química**. São Paulo: Makron, 1992. 275p.

FOOTPRINT. **Pesticide Properties Database**. Disponível em: <<http://www.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>>. Acesso em: 04/2007

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **QUÍMICA NOVA**, v.29, no.1, p.105-112, 2006.

HARRIS, D. et al. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.

HATRIK, S et al. Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 733 (1996) 217-233.

HENNION, M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 856 (1999) 3-54.

HUCK, C. W. et al. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 885 (2000) 51-72.

HORWITZ, W. **Validation: an invisible Component of Measurement**. [2003-09-04].

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008**. Revisão: 01 – MARÇO/2003.

ISO 8402. **Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade – Terminologia**. 1994.

ISO IEC 17025:2005. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. 2005.

ISO DIN 1042. **Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks**. 1999-08.

IUPAC. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Calibration of Methods of Analysis**. Vol. 74, nº 5, p. 835-855, 2002.

JIMMENEZ, J. L. Apresentação Lecture Chromo-3: Gas Chromatography. Referência original (GRANT. Capillary Gas Chromatography: QD79.C45G73. Wiley, 1995). 2003.

KOK, A. et al. Stability of pesticides standards and solutions. 1st Workshop Latino Americano sobre Resíduos de Pesticidas. **BOOK OF ABSTRACTS**. 2007. 143 p.

KURZ, M. H. S. **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a determinação de resíduos de pesticidas em água e da degradação a campo**. Tese de Doutorado, UFSM,

Santa Maria, RS, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993, 239 p.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Ensaio**. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

LAPRW. 1ST WORKSHOP LATINO AMERICANO SOBRE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **BOOK OF ABSTRACTS**. 2007. 162 p.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. 230 p.

LEBLANC, G. A Review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples. **LC-GC EUROPE**, vol.19, n^o. 11, p.1120-1130. (2001).

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas - SP, 4^a ed. Editora Átomo, 2002.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 885 (2000) 3-16.

LOUTER, A. J. H. et al. Analysis of microcontaminants in aqueous samples by fully automated on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass selective detection. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 725 (1996) p. 67-83.

MAJORS, R. E. New Designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. **LC-GC EUROPE**, p. 2-6 (2001).

MAJORS, R. E. Trends in sample preparation. **LC-GC EUROPE**, p. 2-8 (2003).

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2004, 123 p.

MASTOVSKÁ, K. et al. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 1040 (2004) 259-272.

MITRA, S. et al. **Sample Preparation: An Analytical Perspective**. John Wiley and Sons, Inc., 2003, 36 p.

MS. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004**. Disponível em: <<http://www.uniagua.org.br/website/images/destaque/portaria518.pdf>>. Acesso em: 02/2006.

MÜHLEN, C., et al. Cromatografia unificada. **QUÍMICA NOVA**, 2004, vol.27, n^o. 5, p.747-753.

NIST. **National Institute of Standards and Technology**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 05/2007.

OSU. **Extension Pesticide Properties Database**. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/ppdmove.htm>>. Acesso em: 04/2007.

PAN. **Pesticide Action Network**. Disponível em: <<http://www.panna.org/>>. Acesso em: 04/2007.

PEPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. et al. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. **SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT**. 321 (2004) 127-146 p.

PÉREZ-TRUJILLO, J. P. et al. Comparison of different coatings in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ground water. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 963 (2002) 95-105 p.

PESTICIDE Manual. **The Pesticide Manual**. Hampshire, UK. BCPC. 2000-2001.

PICHON, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 885 (2000) 195-215 p.

POOLE, C. New trends in solid-phase extraction. **TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY**. Vol. 22, N^o 6. 2003.

PLANAS, C. et al. Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction Estimation of the uncertainty of the analytical result. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 1131 (2006) 242-252 p.

QMC. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Disponível em: <http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/nobel-prize/nobel-quimica.html>. Acesso em: 04/2007.

QUINTANA, J. et al. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A**. 938 (2001) 3-13 p.

RESTEK. **Calculator Pressure**. Disponível em: <http://www.restek.com/calcs/calc_pressure.asp>. Acesso em: 03/2007.

RESTEK. **Operating hints for using split/splitless injectors**. Technical Guide. Disponível em: <<http://www.restek.com>>. Acesso em: 03/2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **QUÍMICA NOVA**. 2004, vol.27, no.5, p.771-780.

RIOS DO BRASIL. Disponível em <<http://www.riosoBrasil.com.br>>. Acesso em: 10/2002.

SABIK, H. et al. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 885 (2000) 217-236 p.

SILVERSTEIN, R. et al. **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 6^a ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1998.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Informações do Setor, 2003.** Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 16/04/2007.

SKOOG, D. et al. **Princípios de análise instrumental.** 5^a ed. São Paulo: Bookman, 2002, 836 p.

SLIWKA-KASZYNSKA, M. et al. **Preservation and Storage of Water Samples.** Chapter 1. Critical Reviews in environmental Science and Technology. 33(1): p.31-44, 2003.

SOBOLEVA, E. et al. Aplicability test for quality assurance and performance optimization of a chromatographic system for pesticide residue analysis. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 1027 (2004) 55-65.

STEPÁN, R. et al. Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors. **ANALYTICA CHIMIA ACTA.** Accepted 10 May 2004.

TAHBOUB, Y. et al. Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 1098 (2005) 150-155 p.

US EPA. **About EPA.** Disponível em:<<http://www.epa.gov/epahome/aboutepa.htm>>. Acesso em: 07/2006.

US EPA. Statistical Protocol for the Determination of the Single-Laboratory Lowest Concentration Minimum Reporting Level (LCMRL) and Validation of Laboratory Performance at or Below the Minimum Reporting Level (MRL). **EPA Document # 815-R-05-006.** 2004.

US EPA, **Environmental Protection Agency.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticidas/food/>>. Acesso em: 04/2007.

USP. Universidade de São Paulo. Espectrometria de massas por reflexão magnética para determinação de razão isotópica de elementos leves. Disponível em: <http://web.cena.usp.br/apostilas/Bertinho/MIECCen5706/01EspectMass.doc>. Acesso em: 06/2007.

VEGA, A. B., et al. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

ANALYTICA CHIMICA ACTA. 538 (2005) 117-127 p.

VIDAL, J. L. et al. Pesticide trace analysis using solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and tandem mass spectrometric detection in water samples. **JOURNAL CHROMATOGRAPHY A.** 867 (2000) 235-245.

VIM. **Vocabulário Internacional de Metrologia.** 1995.

WELLS, M. J. M. **Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids.** Chapter 1. John Wiley and Sons, Inc., p. 37-129, 2003.