

AVALIAÇÃO DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUA SUPERFICIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Elaine Arantes Jardim Martins¹, Helio Akira Furusawa², Juliana Ikebe Otomo³, Renata Rodrigues de Souza⁴, Caroline Lima de Oliveira⁵, Marycel Elena Barboza Cotrim⁶, Maria Aparecida Faustino Pires⁷

Abstract — *The uncertainty was estimated for the determination of some endocrines disruptors content in superficial water using gas chromatography with mass spectrometry detection. The endocrine disruptors were extracted from superficial water by solid-phase extraction procedures, derivatisation and quantification by GC/MS. In the estimation of uncertainty, sample processing and chromatographic determination that may significantly influence the uncertainty of analytical data were considered. The results show that the method recovery and matrix-matched calibration are the two main contributors to uncertainty. The method has a relative expanded uncertainty (coverage factor $k = 2,447$ for 6 degrees of freedom at a 95% confidence level) of about 8 to 19% and endocrine disruptors content of approximately 4 ng mL^{-1} to $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, depending on the compound.*

Index Terms — *uncertainty measurement; endocrine disruptors; gas chromatography.*

INTRODUÇÃO

A qualidade de um resultado emitido utilizando uma metodologia analítica está especialmente relacionada à exatidão e precisão (incertezas) das medidas envolvidas no processo. Cada uma das medidas consideradas está associada a uma incerteza, diretamente relacionada à dispersão em cada etapa da análise [1].

O resultado da medição analítica pode se desviar do valor verdadeiro devido a uma grande variedade de fatores. A medição analítica, ou mensurando, é o objeto da medição, isto é, o resultado que se pretende obter. Os fatores que influenciam a incerteza da medição do mensurando são as grandezas de entrada e estas podem ter uma ou mais fonte de incerteza [1,2].

As fontes de incerteza que atuam sobre as grandezas de entrada devem ser identificadas e a elas atribuídas um valor, que permita quantificar a contribuição de cada uma individualmente para, em seguida, serem combinadas obtendo-se um valor global da incerteza sobre o resultado. Na identificação das fontes de incerteza todas as etapas do processo devem ser avaliadas, como por exemplo, amostragem, armazenamento e preparação das amostras, calibração do instrumento, pureza de reagentes, efeito da amostra e do analista, entre outros [1].

Dois tipos de incertezas associadas a uma grandeza de entrada podem ser distinguidos. Para incertezas do Tipo A, sujeitas à análise estatística, baseia-se em uma série de observações ou medições (replicatas). Nesse caso, a incerteza padronizada é o desvio padrão experimental das replicatas. No segundo tipo, incertezas Tipo B, a avaliação da incerteza padronizada é obtida por outros meios que não o estatístico, como por exemplo, certificados emitidos pelo fabricante, materiais de referência certificados, manuais técnicos, entre outros [2,3].

A Incerteza Combinada é resultado da combinação de todas as incertezas padrão. Para se obter um intervalo, com um determinado nível de segurança, onde se acredita que esteja o valor do mensurando, é necessário obter a Incerteza Expandida. Esta é calculada multiplicando-se a incerteza combinada por um fator de abrangência, k . O valor de k está relacionado ao nível de confiança que se deseja atribuir e aos graus de liberdade efetivos, v_{eff} [1].

DIAGRAMA DE CAUSA E EFEITO (ISHIKAWA OU ESPINHA DE PEIXE)

O Diagrama de Causa e Efeito é uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação das fontes de incerteza envolvidas em um método. Constitui um diagrama que possibilita

¹ Elaine Arantes Jardim Martins, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, elaine@ipen.br

² Hélio Akira Furusawa, Pesquisador e Orientador, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, helioaf@ipen.br

³ Juliana Ikebe Otomo, Bolsista de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, julianaikebe@gmail.com

⁴ Renata Rodrigues de Souza, Consumer Testing Services, SGS do Brasil, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, re_rodrigues_souza@yahoo.com.br

⁵ Caroline Lima de Oliveira, Analista Química, Centro de Espectrometria de Massas, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, lollima@gmail.com

⁶ Marycel Elena Barboza Cotrim, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, mecotrim@ipen.br

⁷ Maria Aparecida Faustino Pires, Pesquisadora e Orientadora, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, mapires@ipen.br

identificar, simplificar e agrupar as incertezas identificadas no processo, evitando possíveis duplicações [1].

Na Figura 1 é apresentado o Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia desenvolvida para a análise dos interferentes endócrinos (IEs) em amostras de água bruta e potável. As principais grandezas de entrada identificadas foram as associadas à curva analítica, ao fator de recuperação e ao volume final do extrato. A cada uma dessas grandezas de entrada estão relacionadas fontes de incerteza. As equações envolvidas na estimativa da incerteza são apresentadas mais adiante.

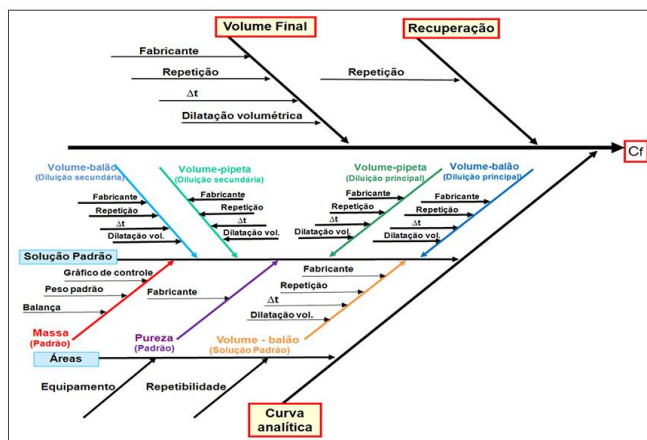


FIGURA 1
DIAGRAMA DE CAUSA E EFEITO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA PARA ANÁLISE DE IES EM ÁGUA.

Estudos recentes em diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil, apontaram a presença de IEs e, em virtude desse cenário, identificou-se a necessidade de investigar determinados compostos representantes da classe dos esteróis, marcadores químicos e produtos industrializados mais utilizados em estudos sobre o aporte de esgotos em matrizes ambientais [4-7].

No grupo dos IEs estão presentes os estrógenos (hormônios femininos sintéticos e naturais), esteroides de animais e plantas, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (produtos farmacêuticos – antibióticos, remédios prescritos e não prescritos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos, metabólitos de detergentes, retardantes de chama, produtos de óleo e combustão) que são amplamente utilizados pela sociedade moderna. Muitas dessas substâncias são classificadas como poluentes emergentes como, por exemplo, os poluentes orgânicos persistentes (POPs) e como micro poluentes, as quais mesmo em concentrações muito baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}) são prejudiciais aos organismos por elas expostos.

O pré-tratamento das amostras é uma etapa crítica que envolve a determinação dos compostos orgânicos em geral. Incluem processos de extração, isolamento e concentração dos analitos. Um dos procedimentos mais empregados é a extração em fase sólida, (*solid phase extraction*, SPE). Metodologias que utilizam a técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas e prévia extração com SPE, são técnicas que obtêm melhor separação, identificação e

quantificação de compostos orgânicos como os interferentes endócrinos [5,8].

EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos

- Água ultrapura de baixa condutância, obtida por meio dos equipamentos de purificação de água: Elix 3, Millipore e Easy Pure PR, Barnstead;
- Metanol (MeOH) e Diclorometano (DCM): grau cromatográfico, de procedência J.T.Baker;
- Padrões com pureza maior que 97% obtidos comercialmente da empresa Sigma: bisfenol-A, pentaclorofenol, estradiol, etinilestradiol, progesterona e estigmasterol;
- Solução derivatizante N,O-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida/trimetilclorosilano, BSTFA/TMCS 99:1: Supelco Analytical;
- Solução Nitro sulfônica (ácido nítrico p.a. e ácido sulfúrico p.a., 1:1, v/v, de procedência Merck): para descontaminação de vidrarias;
- Ácido clorídrico p.a. de procedência Merck;
- Cartuchos SPE C_{18} de polipropileno de 6 mL, preenchidos com 500 mg de octadecil polimericamente ligado, das marcas Supelco e Agilent;
- Balança analítica E. Mettler (H16);
- Compressor/Aspirador - Dia pump (089-CAL), FANEM;
- Microondas – Eletrolux;
- Centrífuga – Solumix;
- Cromatógrafo a gás, Shimadzu – 17A, acoplado ao detector de espectrometria de massas, Shimadzu - QP 5000, microprocessador de dados equipado com o programa GCMS Solution;
- Sistema de filtração a vácuo Sartorius;
- Sistema *manifold* de extração em fase sólida, construído no laboratório do CQMA-IPEN.

Área de Estudo

A represa do Guarapiranga é um dos 8 complexos responsáveis pelo fornecimento de água tratada à Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), sendo a segunda maior produtora desse conjunto. O reservatório é responsável pelo abastecimento de aproximadamente 3,8 milhões de habitantes. Porém, é um dos mananciais mais ameaçados da RMSP, pois vem sofrendo intenso processo de eutrofização e assoreamento. Embora tenha sido construída em 1906, não existe uma série de dados temporais ininterruptos da qualidade da água para este sistema. Os demais reservatórios situados na RMSP apresentam cenários diversos quanto às fontes poluidoras, bem como quanto à qualidade de suas águas e sedimentos [9].

Metodologia

A amostragem foi realizada com garrafa de Van Dorn, 10 cm abaixo da superfície, em 14 estações amostrais na represa da Guarapiranga, armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração até serem analisadas.

As amostras de água coletadas foram inicialmente filtradas em membranas 0,45 µm, acidificadas a pH 3 e percoladas em cartuchos SPE C₁₈.

A metodologia final baseou-se nos métodos propostos por Otomo [4], Souza [5] e Oliveira [6].

Inicialmente, faz-se o condicionamento do cartucho com 6 mL de metanol seguida de 6 mL da mistura de metanol e água purificada de baixa condutância na proporção 1:9 em pH 3. Na sequência, percola-se a amostra acidificada a pH 3 pelo cartucho condicionado em fluxo de aproximadamente 5 mL min⁻¹. É feito o *clean up* com 6 mL da mistura de água purificada e metanol (9:1), deixa-se o cartucho secar sob vácuo e centrifuga-se o cartucho por 25 minutos a 2.500 rpm. Procede-se a extração dos compostos retidos no cartucho com 8 mL (2x 4 mL) da mistura de diclorometano e metanol (6:4) a um fluxo de 1 mL min⁻¹.

O volume do eluato é seco em fluxo suave nitrogênio. O eluato totalmente seco é derivatizado com BSTFA a 100°C por 60 minutos e adiciona-se então Diclorometano completando 1000 µL. As análises cromatográficas devem ser realizadas imediatamente.

Análise em GC/MS

Para a caracterização do extrato obtido foi aplicada uma metodologia desenvolvida e validada, baseada em diferentes estudos realizados pela equipe do laboratório. As condições do método cromatográfico foram: temperatura do injetor a 300°C, temperatura da interface a 300°C, rampa de aquecimento da coluna de 80°C a 300°C; fluxo na coluna de 1,6 mL min⁻¹; injeção de 1 µL do extrato, utilizando coluna capilar DB-5 e aquisição de dados no modo de aquisição SIM monitorando cinco fragmentos de massa de cada composto.

Validação

A metodologia foi validada utilizando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, recuperação e robustez, seguindo as orientações do documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO [10]. Porém, neste trabalho será apresentado apenas o estudo da estimativa da incerteza do método, o qual foi realizado com base no proposto pela Eurachem [1].

Estimativa das incertezas

Como apresentado no diagrama de Causa e Efeito da Figura 1, as três principais fontes de incerteza identificadas na análise dos IEs nas amostras de água foram as associadas à curva analítica, ao fator de recuperação e ao volume final do extrato. As incertezas combinadas foram calculadas a partir das incertezas individuais das grandezas de entrada para cada uma das fontes identificadas.

Incerteza associada à curva analítica

Muitas são as fontes de incerteza que influenciam a curva analítica. Neste trabalho, para a estimativa das incertezas associadas à curva analítica foram consideradas as incertezas relacionadas à preparação da solução padrão, às diluições das soluções de trabalho e às áreas obtidas como resposta do equipamento.

Incerteza associada à solução padrão

Como os padrões analíticos são todos sólidos, as incertezas envolvidas no cálculo da incerteza da solução padrão foram as da massa, da pureza do padrão e do volume do balão.

A incerteza da balança, do peso padrão e repetitividade foram vinculadas à incerteza da massa, conforme a equação 01.

$$\mu_{\text{massa padrão}} = \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{peso padrão}})^2 + (\mu_{\text{calib. balança}})^2} \quad (\text{eq.01})$$

A estimativa da incerteza da pureza do padrão analítico foi considerada a pureza declarada pelo fabricante dividida pela raiz de 3 (distribuição retangular).

As incertezas associadas ao volume do balão consideradas foram as vinculadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro, de acordo com a equação 02.

$$\mu_{\text{v. balão}} = \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{fab}})^2 + (\mu_{\Delta T})^2 + (\mu_{\text{coef. dilatação}})^2} \quad (\text{eq.02})$$

A incerteza relacionada à dilatação do vidro normalmente pode ser desprezada no cálculo, visto que seu valor (< 0,04%) é insignificante em relação às demais fontes de incerteza consideradas.

A incerteza combinada da preparação da solução padrão foi calculada conforme a equação 03.

$$\mu_{\text{C (sol. pad)}} = \sqrt{(\mu_{\text{massa pad}})^2 + (\mu_{\text{pureza pad}})^2 + (\mu_{\text{v. balão}})^2} \quad (\text{eq.03})$$

Incerteza associada à preparação das soluções de trabalho

Na estimativa das incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho, as fontes de incertezas envolvidas são as referentes ao volume dos balões utilizados para as diluições e os volumes pipetados. Em fontes de incerteza volumétricas como estas, é necessário considerar as informações dos fabricantes, resultados de repetições, variações de temperatura e coeficiente de dilatação. Para os cálculos utilizou-se a equação 02.

A estimativa da incerteza combinada da preparação das soluções de trabalho considera as incertezas de cada uma das diluições conforme a equação 04.

$$\mu_{\text{C (sol. trab.)}} = C_{\text{sol. trab.}} \sqrt{\left(\frac{\mu(V_{\text{sol. estq}})}{V_{\text{sol. estq}}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{\text{sol. estq}})}{C_{\text{sol. estq}}}\right)^2} \quad (\text{eq.04})$$

onde:

$C_{\text{sol. trab.}}$ = concentração da solução mista de trabalho;

$\mu V_{\text{sol. estq}}$ = incerteza do volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista;

$V_{\text{sol. estq}}$ = volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista;

μV_f = incerteza do volume final da solução mista de trabalho;

V_f = volume final da solução mista de trabalho;

$\mu C_{\text{sol. estq}}$ = incerteza da solução estoque de cada composto;

$C_{\text{sol. estq}}$ = concentração da solução estoque de cada composto.

As concentrações das soluções de trabalho foram calculadas pela equação 05.

$$C_{sol.trab} = C_{sol.estq} \cdot \frac{V_{estq}}{V_f} \quad (\text{eq.05})$$

Incerteza associada à resposta do equipamento (área)

Para a estimativa da incerteza vinculada à área obtida como resposta do equipamento de GC/MS foram consideradas as incertezas da repetitividade das injeções no equipamento e a resolução do GC/MS.

A incerteza para a repetitividade das injeções foi calculada pela equação 06.

$$\mu_{repe} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{eq.06})$$

onde:

s = desvio padrão das medições;
n = número de injeções realizadas.

Obteve-se a incerteza do equipamento pela divisão do valor da resolução do GC/MS a meia altura base do pico cromatográfico por raiz de 3, considerando-se uma distribuição retangular. A resolução do equipamento foi calculada de acordo com a equação 07 e a incerteza do equipamento de acordo com a equação 08.

$$R = \frac{\Delta Tr}{W_{b2} + W_{b1}} \quad (\text{eq.07})$$

onde:

ΔTr = Diferença entre os tempos de retenção de dois picos adjacentes;
 W_{b2} e W_{b1} = Largura da base de cada pico.

$$\mu_{equip} = \frac{R}{\sqrt{3}} \quad (\text{eq.08})$$

onde:

Rec = resolução do equipamento a meia altura base do pico cromatográfico;

A incerteza combinada da resposta do equipamento foi obtida pela equação 09.

$$\mu_{C(\text{área})} = \sqrt{(\mu_{repe})^2 + (\mu_{equip})^2} \quad (\text{eq.09})$$

Incerteza associada à recuperação

A incerteza combinada relacionada à recuperação dos compostos estudados foi obtida a partir da equação 10.

$$\mu_{C(\text{rec})} = R \sqrt{\left(\frac{\mu(C_{real})}{C_{real}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{obtida})}{C_{obtida}}\right)^2} \quad (\text{eq.10})$$

onde:

R = valor da recuperação;
 $\mu(C_{real})$ = incerteza da solução padrão adicionada;
 C_{real} = concentração real adicionada;
 $\mu(C_{obtida})$ = incerteza da concentração obtida;

C_{obtida} = concentração obtida.

A incerteza da solução padrão adicionada foi obtida a partir da equação 04, porém a incerteza da concentração obtida é estimada de acordo com a equação 11.

$$\mu_{C_{obtida}} = \frac{s_{rec}}{\sqrt{n}} \quad (\text{eq. 11})$$

onde:

s_{rec} = desvio padrão dos ensaios de recuperação realizados;

n = número de ensaios de recuperação realizados.

Incerteza associada ao volume final

As incertezas associadas ao volume final das amostras consideradas foram as vinculadas ao *vial* de 1 mL. São elas as referentes às informações do fabricante, à variação de temperatura e ao coeficiente de dilatação térmica, de acordo com a equação 12.

$$\mu_{C(VF)} = \sqrt{(\mu_{fab})^2 + (\mu_{repe})^2 + (\mu_{\Delta t})^2 + (\mu_{coef.dilata\c{a}o})^2} \quad (\text{eq. 12})$$

Incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada de todas as fontes de incertezas parciais envolvidas na determinação da concentração dos IEs nas amostras de água superficial foi obtida de acordo com a equação 13. Foram consideradas as incertezas da curva analítica (μ_{curva}), da recuperação (μ_{rec}), do volume inicial ($\mu_{V_{amostra}}$) e do volume final (μ_{V_f}).

$$\mu_{C(IE)} = C_{IE} \sqrt{\left(\frac{\mu(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_{amostra})}{V_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(rec)}{Rec}\right)^2} \quad (\text{eq. 13})$$

onde:

μ_C = Incerteza associada a curva analítica;

μ_{V_f} = Incerteza associada ao volume final do extrato;

$\mu_{V_{amostra}}$ = Incerteza associada ao volume inicial da amostra;

μ_{rec} = Incerteza associada a recuperação;

A incerteza expandida foi obtida pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência k, de acordo com a equação 14. Neste estudo, seguindo o estabelecido na Tabela t (*student*), considerou-se k = 2,447 considerando 6 graus de liberdade efetivos e nível de confiança de 95%.

$$\mu_{E(IEs)} = \mu_{C(IEs)} \cdot k \quad (\text{eq. 14})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VALIDAÇÃO

Embora as etapas de validação não tenham sido descritas neste trabalho, apresentam-se abaixo os resultados obtidos para cada parâmetro avaliados de acordo com o documento DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011 do INMETRO [10].

Seletividade

A detecção por espectrometria de massas é altamente seletiva sem identificação falsa dos compostos estudados, tendo sido avaliada tanto a partir dos cromatogramas obtidos, os quais apresentaram separação/resolução de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método, além da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção específicos dos analitos de estudo, quanto pelos testes estatísticos *F(Snedecor)* de homogeneidade das variâncias e teste *t (Student)* de significância das diferenças. Tendo sido obtidos resultados de *F* e *t* calculados maiores que os tabelados, e evidenciando assim uma influência da matriz para os compostos estudados, para minimizar as possíveis interferências foram utilizadas as curvas analíticas com a matriz e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. As determinações por GC/MS no modo *Select Ion Monitoring*, SIM, permite obter uma maior sensibilidade com relação ao modo SCAN. Neste estudo as áreas foram obtidas no modo SIM de aquisição, monitorando-se 5 fragmentos.

Linearidade

A linearidade inicialmente foi avaliada a partir dos coeficientes de determinação (r^2) relativos a cada curva analítica preparadas na matriz dos compostos estudados em 7 replicatas. Os valores de r^2 obtidos nos 5 pontos de cada curva foram todos acima de 0,99, demonstrando que a resposta do método é linear na faixa de trabalho apresentada [10]. A linearidade foi avaliada por aplicação da análise da variância (*Analysis of Variance*, ANOVA), e também por meio da análise de resíduos relacionando a distribuição espacial dos resíduos absolutos em função das concentrações e a distribuição dos resíduos em função da probabilidade normalizada nos ensaios com matriz. Foram observadas dispersões muito pequenas com pontos distribuídos no intervalo de probabilidade dentro de ± 2 desvios padrão, com 95% de confiança, sem tendências que depreciem o comportamento linear.

Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites foram determinados pelo desvio padrão de 7 replicatas da menor concentração dos analitos adicionados na matriz. Os valores do limite alcançados em ambas as matrizes, os valores de LD e LQ foram próximos entre si corroborando com o parâmetro seletividade discutido anteriormente. Os valores de limite de quantificação obtidos para os compostos foram os seguintes: $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ para pentaclorofenol, $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ para bisfenol-A, $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ para progesterona e $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para estradiol, etinilestradiol e estigmasterol.

Precisão

A precisão foi avaliada através da reprodutibilidade (R), repetitividade (r) e pelo coeficiente de variação (CV), em 3 níveis de concentração da curva analítica dos analitos, com matriz. O CV ou desvio padrão relativo (DPR) das replicatas em todas as análises foram inferiores a 20%, porcentagem de referência para análise de traços ou impurezas [11].

Para os 3 níveis de concentração avaliados, as diferenças absolutas entre os resultados das replicatas dos ensaios obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade foram

inferiores aos valores de *r* e *R*, demonstrando a precisão do método [12].

Exatidão

Foi aplicado o *z Score* e os valores de $|z|$ para todos os compostos foram inferiores a 2, evidenciando que os resultados são satisfatórios para o intervalo de confiança (2s) e o método tem exatidão na faixa de concentração considerada.

Recuperação

O estudo da recuperação consistiu na fortificação com a solução padrão dos compostos estudados em três níveis de concentrações. A amostra fortificada foi submetida à determinação da concentração pelo método em todas as etapas de análise e a concentração determinada foi confrontada com o valor esperado. Valores de recuperação de 70 a 120% para análise de resíduos, ou de 50 a 120% para amostras complexas são considerados aceitáveis [13]. No nível de recuperação que se espera encontrar nas amostras, os compostos tiveram as seguintes porcentagens de recuperação: 111% para pentaclorofenol, 95% para bisfenol-A, 94% para estradiol, 105% para etinilestradiol, 70% para progesterona e 119% para estigmasterol, valores estes aceitáveis para análises de resíduos.

Robustez

A robustez foi avaliada por meio do teste de *Youden*, com seleção de 7 variáveis de influência significativa sobre o método, onde foram ordenados em 8 experimentos diferentes seguindo o planejamento fatorial saturado com o intuito de verificar a sensibilidade do método frente a pequenas variações. Foram avaliados os resultados dos efeitos por meio de gráficos de *Rankit* e gráficos de probabilidade normal para os compostos estudados na matriz avaliada. Observou-se que os efeitos das variações aplicadas não apresentaram significância sobre os resultados, pois os valores obtidos nos gráficos de *Rankit* encontram-se abaixo do limite mais crítico (*Margin of Error*, ME). Em relação aos gráficos de probabilidade normal, a distribuição dos valores entre -2 e +2 demonstram que os mesmos estão bem distribuídos, e que as alterações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados [14].

ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Para a estimativa das incertezas dos compostos estudados seguiu-se os cálculos descritos anteriormente, utilizando-se as equações de 1 a 14.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das incertezas padronizadas individuais que contribuiram para a incerteza combinada dos mensurandos associadas às curvas analíticas e às recuperações.

TABELA 1
CONTRIBUIÇÃO DE CADA GRANDEZA DE ENTRADA DO MENSURANDO PARA ÁGUA SUPERFICIAL, CONSIDERANDO O PONTO MÉDIO DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS ESTUDADOS.

COMPOSTO	Valor calculado $\mu\text{g mL}^{-1}$	CONTRIBUIÇÕES INDIVIDUAIS DE CADA INCERTEZA			
		U _{curva}	U _{vol. inicial}	U _{vol final}	U _{rec combinada}

Pentaclorofenol	0,00091	0,0172	0,0004	0,006	0,0192	0,000024
Bisfenol A	0,00077	0,0561	0,0004	0,006	0,0328	0,000050
Estradiol	0,00073	0,0200	0,0004	0,006	0,0150	0,000019
Etinilestradiol	0,00067	0,0320	0,0004	0,006	0,0880	0,000063
Progesterona	0,00075	0,0200	0,0004	0,006	0,0170	0,000020
Estigmaterol	0,00015	0,0283	0,0004	0,006	0,0353	0,000007

Para obtenção desses valores, inicialmente foram calculados os valores individuais de cada uma das grandezas de entrada.

Apresenta-se a seguir um exemplo detalhado das etapas da estimativa das incertezas para o composto pentaclorofenol, utilizando todas as etapas apresentadas neste trabalho por meio das equações. Os demais compostos seguem o mesmo procedimento.

EXEMPLO DETALHADO DAS ETAPAS DO CÁLCULO DE INCERTEZAS

ESTIMATIVA DAS INCERTEZAS PARA O PENTAFLOROFENOL (PCP)

1. Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

$$u(m) = 0,0353701 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(P) = 0,0023094 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V) = 0,0120944 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada

$$uc(PCP_{sol,padr\tilde{a}o}) = 0,00375 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da preparação da solução de trabalho 1.

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$u(C_{sol, estoque}) = 0,003745194 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{i, estoque}) = 0,004007343 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,003464102	0,002	0,000242487

$$u(V_{final}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,011547005	0,003162278	0,001212436

Incerteza combinada

$$uc(PCP_{sol,intermedi\tilde{a}ria}) = 0,046564027 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incerteza da preparação da solução de trabalho 2

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução de trabalho 1 para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$u(C_{sol, estoque}) = 0,046564027 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V_{i, estoque}) = 0,001001836 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,000866025	0,0005	6,06218E-05

$$u(V_{final}) = 0,008824256 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,008660254	0,001581139	0,000606218

Incerteza combinada

$$uc(PCP_{sol,trabalho2}) = 0,007069088 \mu\text{g mL}^{-1}$$

4. Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução de trabalho, volume pipetado da solução de trabalho e volume dos balões usados para diluição das soluções.

Incerteza volume pipetado para cada solução da curva

$$u(V_{1,sol,trabalho}) = 0,000867489 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,000866025	0,00005	6,06218E-06

$$u(V_{2,sol,trabalho}) = 0,001734978 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,001732051	0,0001	1,21244E-05

$$u(V_{3,sol,trabalho}) = 0,000234429 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,00023094	0,00004	4,84974E-06

$$u(V_{4,sol,trabalho}) = 0,000644679 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,000635085	0,00011	1,33368E-05

$$u(V_{5,sol,trabalho}) = 0,001172144 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,001154701	0,0002	2,42487E-05

Incerteza balão volumétrico 1 mL

$$u(V_{1\text{mL}}) = 0,005774776 \mu\text{g mL}^{-1}$$

calibração	repe	Δt
0,005773503	0	0,000121244

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

$$uc(PCP_{C1,sol,curva}) = 0,001836066 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$uc(PCP_{C2,sol,curva}) = 0,003672131 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 0,20 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$uc(PCP_{C3,sol,curva}) = 0,006815329 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 0,80 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$uc(PCP_{C4,sol,curva}) = 0,018742154 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 2,20 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$uc(PCP_{C5,sol,curva}) = 0,034076644 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 4,00 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

Os cálculos até aqui apresentados podem ser aplicados qualquer matriz, uma vez que as grandezas de entrada não envolvem as respostas das amostras. A seguir, são descritas individualmente as incertezas estimadas para as curvas analíticas e a recuperação de cada matriz.

MATRIZ Água Superficial

5. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica

$$uc(PCP_{curva,analitica}) = 0,0145 \mu\text{g mL}^{-1}$$

6. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação

$$uc(PCP_{recupera\tilde{c}o}) = 0,0177 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{real}) = 0,002337523 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{encontrada}) = 0,019075052 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Assim como na Tabela 1, nos gráficos da Figura 2 podem ser observados os resultados das incertezas padronizadas individuais que contribuíram para a incerteza combinada dos mensurandos. As maiores incertezas foram as associadas às curvas analíticas e às recuperações. Esses resultados são coerentes, uma vez que ambas estão relacionadas às concentrações e a resposta do equipamento.

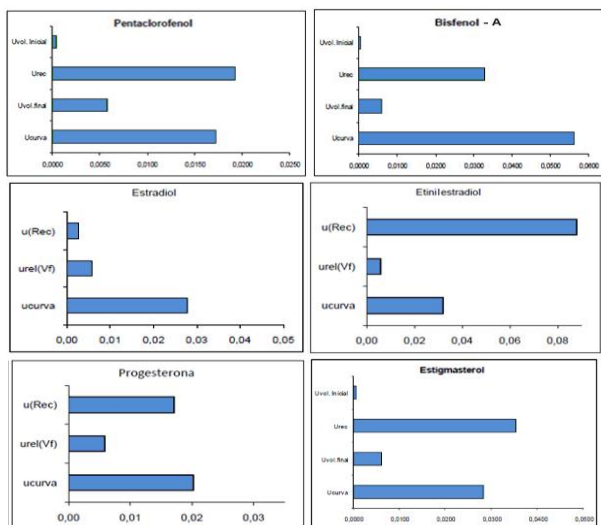


FIGURA 2

REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS INCERTEZAS INDIVIDUAIS ENVOLVIDAS NA ANÁLISE DOS IES NA MATRIZ DE ÁGUA SUPERFICIAL.

Os resultados das incertezas expandidas, considerando-se o ponto médio do intervalo de concentração das curvas analíticas são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2

INCERTEZAS EXPANDIDAS PARA OS COMPOSTOS ESTUDADOS REFERENTES AO PONTO INTERMEDIÁRIO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM ÁGUA SUPERFICIAL, CONSIDERANDO $K = 2,447$ PARA 6 GRAUS DE LIBERDADE E 95% DE CONFIANÇA.

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Incerteza Expandida ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pentaclorofenol	0,908	$\pm 0,047$
Bisfenol A	0,772	$\pm 0,099$
Estradiol	0,733	$\pm 0,037$
Etinilestradiol	0,667	$\pm 0,123$
Progesterona	0,747	$\pm 0,040$
Estigmasterol	0,061	$\pm 0,011$

Aplicação da Metodologia

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados, com suas respectivas incertezas expandidas, obtidos pela aplicação da metodologia em amostras coletadas em setembro de 2012 e abril de 2013 na área de estudo nos 14 pontos avaliados no projeto.

TABELA 3

CONCENTRAÇÃO MÉDIA E INCERTEZA EXPANDIDA NAS AMOSTRAS COLETADAS EM SETEMBRO DE 2012.

Ponto de coleta	Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$					
	Pentaclorofenol	Bisfenol-A	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona	Estigmasterol
G000-01	<LQ	0,08 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	1,0 $\pm 0,1$
G000-02	<LQ	0,04 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	2,1 $\pm 0,3$
G000-03	<LQ	0,027 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	1,1 $\pm 0,1$

G106-04	<LQ	0,025 $\pm 0,004$	<LQ	<LQ	<LQ	0,22 $\pm 0,02$
G000-05	<LQ	0,035 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	0,20 $\pm 0,02$
G107-06	0,0061 $\pm 0,0004$	0,027 $\pm 0,002$	<LQ	<LQ	<LQ	0,31 $\pm 0,03$
G108-07	<LQ	0,045 $\pm 0,004$	<LQ	<LQ	<LQ	1,0 $\pm 0,1$
G000-08	<LQ	0,046 $\pm 0,004$	<LQ	<LQ	<LQ	2,1 $\pm 0,2$
G109-09	<LQ	0,023 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	0,19 $\pm 0,02$
G105-10	<LQ	0,025 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	0,15 $\pm 0,02$
G104-11	<LQ	0,029 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	0,22 $\pm 0,03$
G103-12	<LQ	0,11 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	0,6 $\pm 0,1$
G102-13	<LQ	0,028 $\pm 0,002$	<LQ	<LQ	<LQ	0,19 $\pm 0,02$
G000-14	<LQ	0,036 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	0,15 $\pm 0,02$

LQ = limite de quantificação do método

TABELA 4

CONCENTRAÇÃO MÉDIA E INCERTEZA EXPANDIDA NAS AMOSTRAS COLETADAS EM ABRIL DE 2013.

Ponto de coleta	Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$					
	Pentaclorofenol	Bisfenol-A	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona	Estigmasterol
G000-01	0,06 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G000-02	0,024 $\pm 0,003$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G000-03	0,027 $\pm 0,004$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G106-04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G000-05	0,037 $\pm 0,004$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G107-06	0,07 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G108-07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G000-08	0,03 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G109-09	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G105-10	0,029 $\pm 0,005$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G104-11	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G103-12	0,05 $\pm 0,03$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G102-13	0,037 $\pm 0,005$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G000-14	0,05 $\pm 0,01$	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

LQ = limite de quantificação do método

O bisfenol-A e o estigmasterol foram detectados em 100% das amostras coletadas ($n=14$), em setembro de 2012, período mais seco em concentrações ligeiramente acima do limite de quantificação, todas as demais resultaram em valores abaixo do LQ, embora esses compostos não sejam contemplados pela legislação atual.

O pentaclorofenol foi detectado em concentração ligeiramente acima do LQ apenas no ponto G107-06 na coleta de setembro de 2012. Já na coleta de abril de 2013, foi detectado em 10 dos 14 pontos avaliados em concentrações que variaram de 0,024 a 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O valor máximo permissível desse composto para águas superficiais estabelecido pela legislação brasileira é de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na União Europeia, o valor de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ é aceito como a concentração máxima individual de PCP. Este estudo

demonstrou que a contaminação das águas avaliadas não ultrapassou essa concentração nos períodos das coletas das amostras.

CONCLUSÃO

No presente estudo, foram estimadas as incertezas da determinação do teor de compostos orgânicos selecionados, os quais são considerados interferentes endócrinos, em amostras de água superficial. As contribuições das incertezas das diferentes grandezas de entrada foram estimadas a partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados e foram combinadas de acordo com o proposto em literatura gerando incertezas padrão relativas.

O detalhamento da estimativa das incertezas é um exemplo muito útil que visa auxiliar futuros interessados neste tipo de avaliação em seus estudos.

Para todos os compostos estudados, os dois maiores contribuintes para a incerteza combinada do método são provenientes da incerteza da recuperação e da incerteza da curva analítica. Esse resultado é coerente, visto que ambas as grandezas estão relacionadas às concentrações e a resposta do equipamento e compreendem todas as fases do processo de análise, incluindo a extração de fase sólida (SPE), a qual não foi avaliada separadamente.

A metodologia aqui proposta mostrou ser adequada para a determinação de IEs em amostras de água na ordem de grandeza de $\mu\text{g L}^{-1}$. Ressalta-se que isso só foi possível pela preparação das amostras pela técnica de extração em fase sólida (SPE) e pelo uso do equipamento de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS), que apresenta elevada seletividade e sensibilidade adequada.

O processo de validação forneceu confiabilidade estatística aos dados, confirmando a sensibilidade e a seletividade do método, além da boa linearidade nas faixas de trabalho consideradas. O método apresentou boa precisão e exatidão para todos os compostos na matriz avaliada. Os limites de detecção e quantificação alcançados, após a concentração de 1L de amostra, são coerentes com os limites necessários para a análise de amostras ambientais em níveis traço. Além disso, o método é robusto frente a pequenas variações nos parâmetros estabelecidos.

Os resultados obtidos confirmaram que o método proposto para determinação dos IEs estudados é adequado e sensível na determinação de compostos orgânicos considerados interferentes endócrinos em água superficial, podendo ser aplicado no monitoramento da região estudada. A estimativa da incerteza pode ser aplicável a outras matrizes de água.

As análises das amostras de água coletadas na Represa Guarapiranga permitiram uma avaliação da ocorrência e distribuição de alguns dos compostos, mesmo que em baixas concentrações, principalmente no período seco. Estes resultados já demonstram influência antrópica na região podendo afetar não só a qualidade da água superficial como a qualidade da água de distribuição, embora o processo de tratamento de água colabore para a diminuição destes contaminantes na água distribuída.

AGRADECIMENTO

Os autores desse trabalho agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro por meio do Projeto 2009/53898-9, ao CNPq pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- [1] EURACHEM. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3rd Edition. 2012
- [2] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. NIT-DICLA-021. **Expressão da incerteza de medição**. Rev. 04 de fev. 2010.
- [3] LEITE, F. Validação em análise química. 5.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008. Cap. 17, Fator de recuperação. p. 135-137.
- [4] OTOMO, J.I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP. 2010. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo
- [5] SOUZA, R.R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2011.
- [6] OLIVEIRA, C.L. Estudo de esteróis como marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2012
- [7] GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas, São Paulo
- [8] MANSILHA, C.; REBELO, M.H.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; PINHO, O.; DOMINGOS, V.; PINHO, C.; GAMEIRO, P. *Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6681-6691, 2010.
- [9] BICUDO, E. C. M. Reconstrução paleolimnológica da Represa Guarapiranga e diagnóstico da qualidade atual da água e dos sedimentos de mananciais da RMSP com vistas ao gerenciamento do abastecimento. Projeto temático, 2010-2015.
- [10] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011.
- [11] HORWITZ, W.; ALBERT, R. *The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision*. Journal of AOAC International, 89:4, 2006
- [12] CHUI, Q.S.H.; BARROS, C.B.; SILVA, T.D. *Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial – como usá-los. Química Nova*, v. 32, n. 8, 2009.
- [13] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, 27: 5, 2004, 771-780.
- [14] FURUSAWA, H. A. **Validação de Ensaios Químicos**. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 2007 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).