

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE
PESTICIDAS EM LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA, ETA,
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS (LC-MS/MS)

5

*Hélio Akira Furusawa¹, Luiz Fernando Soares Moracci², Elaine Arantes Jardim Martins³,
Marycel Elena Barbosa Cotrim⁵, Maria Aparecida Faustino Pires⁵*

10

¹Hélio Akira Furusawa, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, helioaf@ipen.br, *pesquisador – autor correspondente*

²Luiz Fernando Soares Moracci, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, fernandomoracci@yahoo.com.br, *bolsista de mestrado*

³Elaine Arantes Jardim Martins, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, elaine@ipen.br, *pesquisadora*

15

⁴Marycel Elena Barbosa Cotrim, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, mecotrim@ipen.br, *pesquisadora vice-coordenadora*

⁵Maria Aparecida Faustino Pires, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, mapires@ipen.br, *pesquisadora coordenadora*

20

RESUMO

25

Este trabalho discute os procedimentos de validação de uma metodologia de análise química de determinação de resíduo de pesticidas em lodo de ETA. A utilização da LC-MS/MS provê grandes vantagens à análise, pois apresenta três características essenciais para essa análise: capacidade de discriminação dos compostos de interesse, baixos limites de determinação e rapidez na medição dos compostos. No processo de validação foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e faixa de trabalho da curva analítica, limite de determinação, robustez e precisão. Para a ETA estudada, não foram encontradas quantidades significativas dos compostos determinados (atrazina, azoxistrobina, carbofurano, propoxur e simazina). O estudo dos parâmetros de validação foi importante já que as concentrações de estudo e de determinação estavam próximas aos limites impostos pela técnica. Atualmente, com a constante atualização dos valores máximos estabelecidos pela legislação, somente metodologias consagradas ou validadas agregam qualidade e confiança aos valores reportados.

30

Palavras-chave: Meio-ambiente, qualidade, metrologia, análise química

35

INTRODUÇÃO

Uma das conseqüências negativas do uso de pesticidas é a contaminação do meio ambiente quer por uso abusivo quer pelas características físico-químicas da substância. Assim, os corpos d'água acabam se tornando um grande vertedouro para essas substâncias, pois são, quase sempre, o final de uma cadeia que envolve lançamento, transporte e reservatório das mais diversas substâncias. Comumente, tanto para consumo doméstico como para atividades industriais e agrícolas, corpos d'água são há longa data explorados por consumo direto ou após tratamento. O resultado do tratamento das águas brutas é a água final adequada para o consumo e um lodo que, pelo menos teoricamente, retém substâncias indesejáveis na água distribuída. A redução para um volume menor resulta na concentração das inúmeras substâncias que contaminam ou estão presentes naturalmente na água bruta. A partir dessa premissa e da utilização de técnicas analíticas adequadas, este trabalho apresenta uma metodologia de determinação de atrazina, azoxistrobina, carbofurano, propoxur e simazina em lodo da estação de tratamento de água, ETA, de Registro, São Paulo. A partir da informação sobre as atividades agrícolas da região (predomínio do cultivo de bananas) e dos insumos utilizados, selecionaram-se os compostos mencionados, sempre com vistas a atender a legislação brasileira (BRASIL, 2004), a estadual (SÃO PAULO, 1976) ou alguma internacional de consagrada competência. Para agregar qualidade e confiabilidade nos resultados obtidos, a metodologia foi validada com a avaliação da seletividade, da linearidade e faixa de trabalho da curva analítica, o limite de determinação para cada composto, a precisão e a robustez do procedimento.

Como contribuição deste trabalho, não somente os resultados da análise química foram importantes, mas também o desenvolvimento de uma planilha eletrônica (FURUSAWA, 2008) com os cálculos dos diversos itens de validação baseados principalmente no documento do INMETRO "Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos" de 2003 (INMETRO, 2003). A validação da metodologia foi realizada também como parte dos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 da qual o Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP, já tem ensaio acreditado e está preparando outros ensaios para acreditação.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram coletadas diretamente do tanque de decantação do lodo da
70 ETA quando as operações da estação eram interrompidas para manutenção. Em média,
essa parada programada ocorria em intervalos de um mês. O material apresentava
aspecto lodoso e grande quantidade de água que não podia ser separada durante a
amostragem. Esse material era constituído, em sua maior parte, de uma fração
75 inorgânica decorrente da adição de sulfato de alumínio durante o processo. A fração
orgânica, menos preponderante, era constituída de restos orgânicos (vegetais e animais)
e daqueles compostos oriundos das atividades antrópicas agrícolas.

Para a normalização da condição inicial, esse lodo foi centrifugado a 3000 rpm
por 10 minutos para a separação do excesso de água. Em função da complexidade da
matriz lodo, fez-se necessário um procedimento de extração líquido-líquido utilizando
80 uma mistura metanol/água na proporção 80/20 v/v. As curvas analíticas foram criadas a
partir de padrões da Riedel-de-Häen, Seelze, Alemanha. Metanol e acetonitrila, grau
HPLC, e acetato de amônia foram adquiridos da JTBaker, EUA. A água utilizada foi
purificada em um equipamento EasyPure RF System, da Barnstead, Dubuque, EUA.

Para a separação cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo líquido da
85 Agilent, 1100 Series, com uma coluna cromatográfica Varian Metasil ODS – C₁₈ (150
mm x 4,6 mm, 3 µm; MetaChem) e para a quantificação foi utilizado um espectrômetro
de massas da Applied Biosystems, API 5000^{MR} triplo-quadrupolo (Applied
Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá). Sendo que a sigla API indica a ionização à
pressão atmosférica.

90 O tratamento dos dados para a validação da metodologia foi realizado em uma
planilha eletrônica desenvolvida no próprio laboratório sobre a plataforma Excel^{MR} da
Microsoft.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em algumas situações, a medição em química analítica decorrentes de uma
95 condição de baixa sensibilidade pode deixar em dúvida a leitura realizada. Esse era o
caso de alguns dos compostos estudados. Com os resultados de seletividade, precisão,
linearidade e faixa de trabalho, foi possível aplicar a metodologia em baixas
concentrações, justamente em função dos limites impostos pela legislação brasileira.

100 A seletividade da metodologia para a discriminação de cada composto foi avaliada a partir de duas abordagens: a capacidade de separação da cromatografia líquida e a capacidade de monitoração de massas pelo espectrômetro de massas. Na Figura 1 podemos observar que em uma corrida de 5 minutos consegue-se a resolução dos compostos, porém ainda com a sobreposição entre o carbofurano e o propoxur. Essa situação foi resolvida por meio da monitoração das massas (precursor e produto) desses
105 compostos pela espectrometria de massas. Para a validação da metodologia e aplicação em situações reais, essa capacidade analítica é muito interessante, uma vez que permite que se monitore mais de um par de massas (transição) e que se evite a quantificação de um falso positivo.

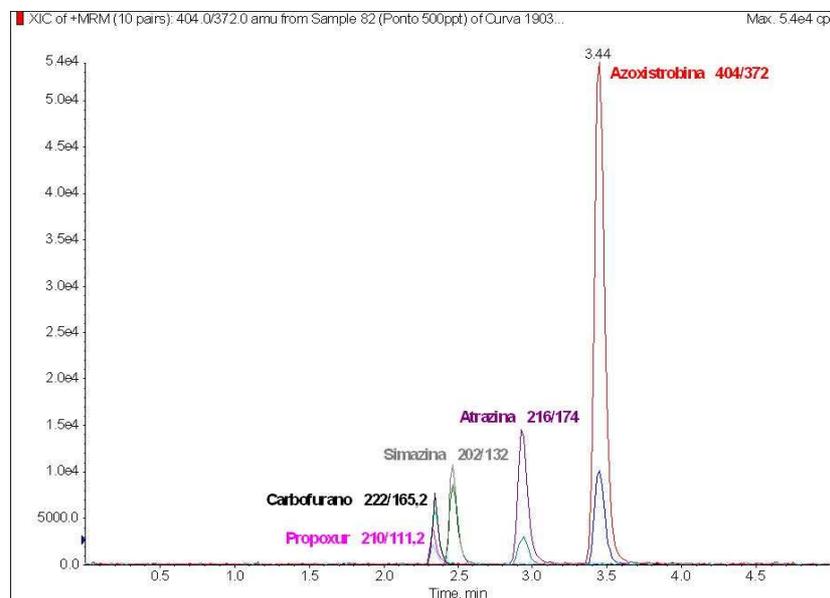


Figura 1. Cromatograma da solução multicomponente (500 ng.L^{-1} de cada composto). Propoxur TR = 2,3; Carbofurano TR = 2,3; Simazina TR = 2,4; Atrazina TR = 2,9; Azoxistrobina TR = 3,4. TR é o tempo de retenção de cada componente, em minutos.

110 As curvas analíticas para os compostos estudados são apresentados na Figura 2. Somente para a azoxistrobina o coeficiente de correlação (r^2) apresentou 2 noves (0,997). Para os demais, os r^2 foram obtidos com 3 noves (0,999). Isso significa que a linearidade da curva analítica nos intervalos escolhidos é muito boa. Mais adiante essa informação será retomada com mais detalhes quando se discutir a tabela ANOVA.

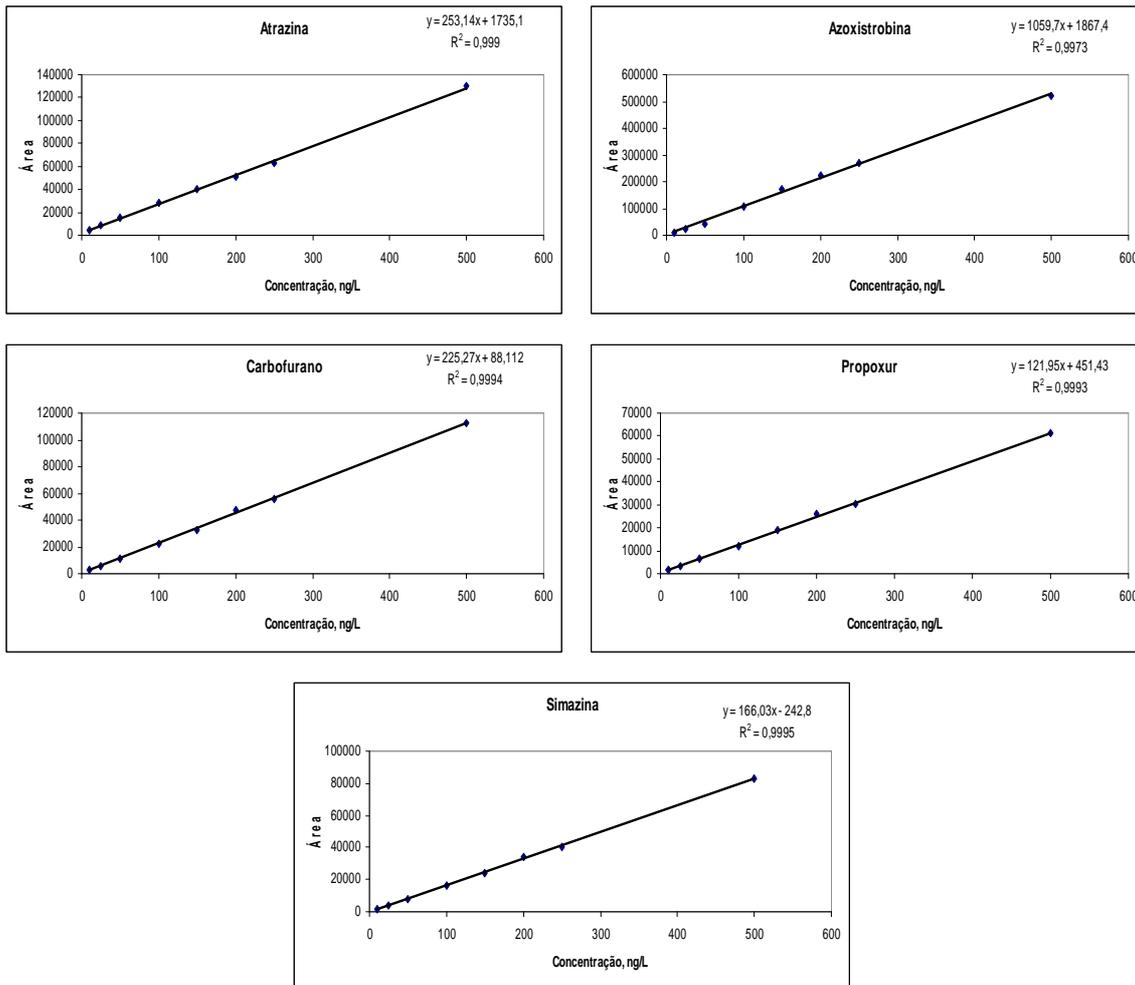


Figura 2. Curva analítica dos compostos atrazina, azoxistrobina, carbofurano, propoxur e simazina.

115

Como consequência, observa-se que a linearidade das curvas analíticas é abrangente o suficiente para determinações de concentrações muito baixas, próprias para o atendimento da legislação ambiental brasileira. Tanto a exatidão quanto a precisão em 7 replicatas de cada ponto da curva analítica foram avaliadas a partir das probabilidades normais padronizadas, estando todos os pontos para todos os compostos de interesse entre -3 e +3, sendo que quase a totalidade entre -2 e +2, indicando boa dispersão nas replicatas. O comportamento, em gráfico, é linear sem a ocorrência de tendência ou pontos espúrios. Em termos práticos, nesses casos, esses resultados indicam que mesmo as curvas analíticas tendo sido criadas com um intervalo de concentração grande (10 a 500 ng.L⁻¹, por exemplo), pode-se utilizá-las para comparação em concentrações baixas, mais próximas dos valores limites da legislação, sem que haja comprometimento dos resultados. Numa eventualidade, em casos de

125

contaminação elevada, por exemplo, a linearidade mesmo em altas concentrações permite que se quantifique o composto sem grandes diluições o que poderia contribuir para o aumento da incerteza no valor final.

A análise de amostras ambientais quase sempre está condicionada a determinação de substâncias em concentrações muito baixas em função dos valores de referência da legislação ou valores estabelecidos por estudos toxicológicos. Assim, o conhecimento do limite de determinação é uma condição que muitas vezes irá definir se uma determinada metodologia poderá ser aplicada ou não, ou então, se um determinado resultado poderia ter sido produzido pela tal metodologia. Segundo o documento do INMETRO utilizado como referência neste trabalho, o limite de determinação é calculado a partir do desvio padrão de uma série de medidas em replicata. Aplicando-se esse conceito nos compostos deste trabalho, obtiveram-se valores muito baixos para as concentrações em função da sensibilidade da técnica de medição aos compostos. Por razões práticas, adotou-se como limite de determinação, a menor concentração da curva analítica (10 ng.L^{-1}). Essa concentração está abaixo dos valores estabelecidos pela legislação, o que garante que o intervalo de concentrações da curva abrange o valor estabelecido como referência legal.

A análise de variância (Tabela ANOVA) para o intervalo de concentrações da curva analítica fornece mais informações sobre o comportamento desta. Para a atrazina, Tabela 1, o melhor modelo linear ajustado para os dados é representado pela equação $y = 253,14x + 1735,1$. A qualidade dos dados permite uma explicação máxima de 99,95% da variação, ou seja, considerando-se a influência (dispersão) dos resíduos sobre uma situação ideal. A resposta do modelo ajustado indica que 99,86% da variação pode ser explicada a partir desse modelo. Essa diferença está associada ao erro puro decorrente dos erros aleatórios do processo de medição. A avaliação do Teste $F_{95\%}$ para os resíduos permite-nos dizer que o modelo ajustado (linear) é significativo, ou seja, é adequado para os dados da curva analítica (concentração e sinal). Porém, o Teste $F_{95\%}$ para o ajuste indica que os pontos de uma forma geral ou um determinado ponto estão prejudicando o comportamento do modelo. Apesar de não constituir situação extrema, cabe ao analista decidir a significância do modelo. Nesse caso, a partir da experiência do laboratório, avaliou-se que o ajuste pode ser aplicado para as análises deste estudo.

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para a atrazina na transição 216/174,1 (massa precursor/massa produto, na forma m/z). Modelo linear ajustado $y = 253,14x + 1735,1$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	23305023422	1	23305023422	
Resíduos	33116285	14	2365449	9852
Falta de Ajuste	22123718	6	3687286	
Erro Puro	10992567	8	1374071	2,68
Total	23338139707	15		
% de variação explicada	99,86		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,95		$F_{6,8,95\%}$	3,58

160

Na Tabela 2 os dados estão resumidos para os demais compostos. O comportamento da azoxistrobina é semelhante ao da atrazina. Já para o carbofurano, propoxur e simazina os modelos ajustados permitem uma porcentagem de explicação muito próxima ao máximo explicável. Possíveis explicações podem estar associadas ao sinal de fundo nas regiões das massas (maior nos casos da atrazina e da azoxistrobina) influenciando a qualidade dos sinais, à sensibilidade para os compostos (atrazina um pouco maior e azoxistrobina muito maior que para os demais) resultado dum maior susceptibilidade aos efeitos de nebulização, desolvatação e ionização, por exemplo.

165

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para a azoxistrobina na transição 404/372 (massa precursor/massa produto, na forma m/z).

	Transição ¹	% de variação explicada	% de variação explicável	$F_{1,14,95\%}$	$F_{6,8,95\%}$	Equação
Azoxistrobina	404/372	99,70	99,97	4578	11,78	$y = 1058x + 2121$
Carbofurano	222,1/165,2	99,90	99,96	14058	1,93	$y = 225,27x + 88,11$
Propoxur	210/111,2	99,91	99,97	14978	2,80	$y = 121,95x + 451,43$
Simazina	202/132,1	99,90	99,94	13722	1,11	$y = 166,03x + 242,8$

170

¹ - Massa precursor/massa produto, na forma m/z .

A robustez da metodologia foi avaliada a partir dos seguintes fatores: massa de lodo, tempo de agitação, razão metanol/água, volume da mistura extratora, tempo de centrifugação, velocidade de centrifugação e temperatura do forno (câmara de

175 nebulização do sistema API). A metodologia aplicada seguiu o planejamento fracionário saturado de 7 variáveis e 8 experimentos ou planejamento de Plakett-Burman (VANDER HEYDEN e col., 2001). Os contrastes ou efeitos obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Testes dos efeitos de Robustez. Solução multicomponente em concentração de 50 ng.L⁻¹ para cada composto.

Fator	Nominal	Variação	Contraste ou Efeito				
			Azoxistrobina	Simazina	Propoxur	Atrazina	Carbofurano
Massa, g	5	5,2	1425	980	-50	200	-55
Tempo agitação, s	60	70	1925	320	150	50	285
MeOH/H ₂ O, v/v	80/20	75/25	25	45	450	0	-405
Volume da mistura extratora, mL	10	11	-475	230	950	1200	-70
Tempo Centrifugação, min	10	9	1125	-145	-50	-50	350
Velocidade Centrifugação, rpm	3000	2900	625	595	1250	-200	430
Temperatura Forno, °C	20	25	925	55	50	2150	415

180

Para uma melhor avaliação desse resultado, foram criados gráficos de meia-normal com dois limites de referência. Esses gráficos são apresentados nas Figuras 3, 4 e 5. Os limites de referência identificados pelas siglas ME (*Margin of Error*) e SME (*Simultaneous Margin of Error*), (VANDER HEYDEN e col., 2001) indicam se o fator é significativo para a metodologia no intervalo estudado. O limite ME, sendo mais baixo, pode, em alguma situação, indicar um falso positivo, assim, pode-se utilizar o limite SME para avaliar se o fator é significativo ou não. Para os compostos estudados os fatores associados às etapas de extração (massa do lodo, razão metanol/água e volume da mistura extratora) foram os mais significativos para a metodologia. Atrazina, propoxur e simazina são mais susceptíveis às variações desses fatores.

185

190

A metodologia validada foi aplicada a diversas amostras de lodo da ETA de Registro, SP, não encontrando quantidades significativas desses compostos em nenhuma situação. Algumas amostras apresentaram algum sinal cromatográfico para a azoxistrobina, porém, com área muito reduzida e abaixo do limite de determinação estabelecido neste trabalho. Associa-se essa situação à decomposição/degradação desses compostos por processos químicos tanto na ETA como no meio ambiente por reações

195

fotoquímicas. Além disso, não se pode deixar de considerar que a aplicação agrícola está sendo realizada de modo a reduzir o impacto no meio ambiente.

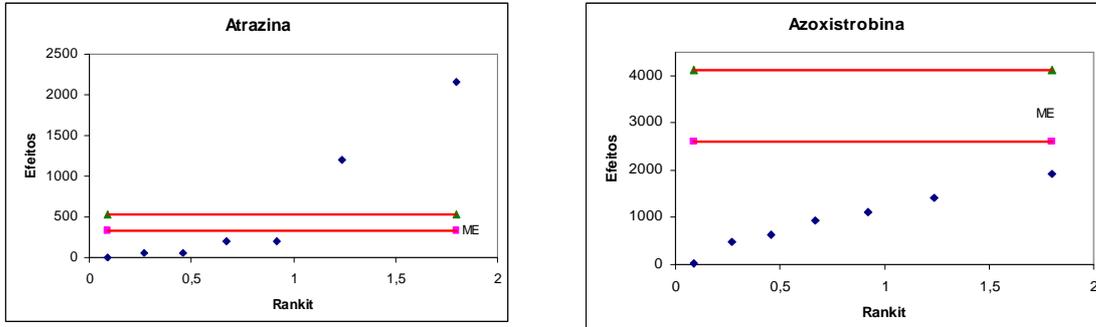


Figura 3. Gráfico de meia-normal para a atrazina e azoxistrobina.

200

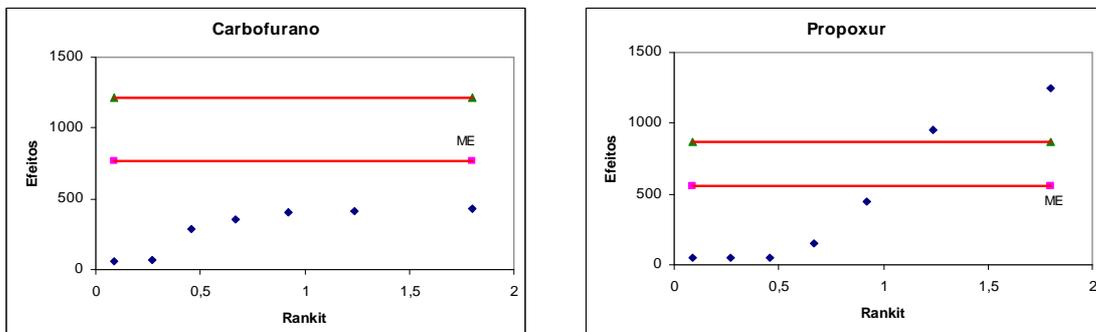


Figura 4. Gráfico de meia-normal para o carbofurano e propoxur.

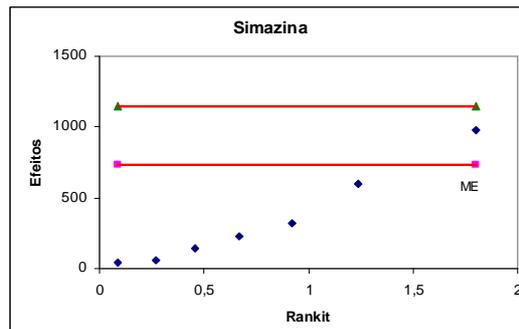


Figura 5. Gráfico de meia-normal para a simazina.

CONCLUSÃO

1. A metodologia desenvolvida é simples e permite a determinação dos compostos na ordem de grandeza dos valores limites estabelecidos pela legislação brasileira.

205

2. A validação da metodologia agrega qualidade aos resultados principalmente em situações limites como é o caso de concentrações muito baixas.
3. No caso deste trabalho, a seletividade e o limite de determinação são os parâmetros mais importantes, pois determinam se a metodologia poderá ou não ser aplicada para o atendimento à legislação brasileira.
4. Para assegurar a robustez da metodologia, deve-se ter mais atenção aos fatores associados à extração dos compostos de interesse durante o desenvolvimento da análise.
5. A concentração dos compostos determinados no lodo da ETA no período estudado, não é significativa, indicando a ocorrência de processos de degradação/decomposição associados ao uso correto.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPQ, SABESP, Applied Biosystems do Brasil

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria n. 518, 2004*. Ministério da Saúde do Brasil, D.O.U., de 25 de março de 2004, Brasília.
2. FURUSAWA, H.A. *Validação de Ensaio Químicos*. São Paulo, IPEN/CNEN-SP, 2008. (Adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).
3. INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.
4. SÃO PAULO (Estado). Decreto n. 8468, de 8 de setembro de 1976. Aprova o Regulamento da Lei n. 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a Prevenção e Controle da Poluição do Meio Ambiente.
5. VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L.; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, p.723-753, 2001.