



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - CAMPUS I
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

SUELLY FERNANDES DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROFENOFOS EM
ÁGUA UTILIZANDO CLAE-EM**

CAMPINA GRANDE – PB

Junho/2018

SUELLY FERNANDES DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROFENOFOS EM
ÁGUA UTILIZANDO CLAE-EM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito indispensável à obtenção do título de
graduado em Bacharel em Química Industrial.

Área de concentração: Química Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes

Coorientador: MSc. Railson de Oliveira
Ramos

CAMPINA GRANDE - PB

Junho/2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586v Silva, Suely Fernandes da.
Validação de método para quantificação de profenofos em água utilizando CLAE-EM [manuscrito] : / Suely Fernandes da Silva. - 2018.
38 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Wilton Silva Lopes, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."

"Coorientação: Prof. Me. Railson de Oliveira Ramos, UFPB - Universidade Federal da Paraíba"

1. Pesticidas. 2. Pesticidas organofosforados. 3. Abastecimento de água. 4. Qualidade da água.

21. ed. CDD 628.161

SUELLY FERNANDES DA SILVA

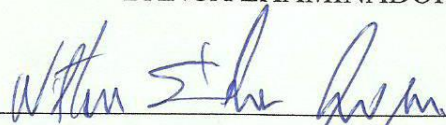
**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROFENOFOS EM
ÁGUA UTILIZANDO CLAE-EM**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito indispensável à obtenção do título de
graduado em Bacharel em Química Industrial.

Área de concentração: Química Ambiental

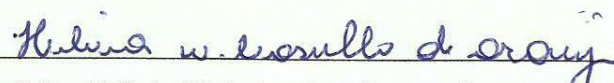
Aprovada em: 15/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



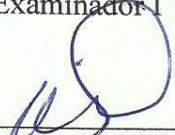
Prof. Dr. Wilton Silva Lopes (UEPB)

Orientador



Prof. Dr. Hélvia Waleska Casullo Araújo (UEPB)

Examinador I



Prof. Dr. Valderi Duarte Leite (UEPB)

Examinador II

Aos meus pais Sebastião e Valdete, e as minhas irmãs
Suênia e Suelma, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por ter me dado força, saúde e sabedoria para superar os momentos difíceis durante a minha longa jornada.

Agradeço também à minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos. Em especial aos meus pais, Sebastião e Valdete por todo amor e incentivo para continuar seguindo em frente. À minha irmã Suelma por ter acompanhado de perto a minha caminhada e por todo o seu apoio, e a minha irmã Suênia e suas filhas, Kemilly Vitória e Maria Sophia, por todo amor e alegria. Aos meus avós, tios, tias, primos, primas e alguns amigos, que sempre me entendiam quando eu não podia ir vê-los.

Ao professor Wilton Silva por seus ensinamentos e por ter aceitado ser meu orientador neste Trabalho de Conclusão de Curso.

Aos professores, Valderi Duarte e Hέλvia Waleska por terem aceitado fazer parte da banca avaliadora deste trabalho e por contribuírem com suas valiosas discussões.

A todos os professores que fizeram parte da minha caminhada, que contribuíram com seus ensinamentos e conselhos, meu MUITO OBRIGADA!

A todos os amigos ao longo da minha graduação pelas valiosas discussões e momentos divertidos, em especial a turma de Licenciatura em Química 2016.2 e a minha turma de Química Industrial 2017.2.

À EXTRABES, e em especial ao Laboratório LAQUISA onde tive a oportunidade de realizar as minhas pesquisas de Iniciação Científica sob a orientação do professor Josivandro.

Aos meus grandes amigos do LAQUISA, Railson, Virgínia, Josivaldo, André, Milena, Vanderlei, Andreza, Ediano, Anna Paula e Amanda pelos vários momentos divertidos e pela ajuda. E aos amigos da EXTRABES, Wilza, Ysa, Raquel, Fernanda, Elaine, Edilma, Renata, Graciele, Luciana e Carol.

Aos meus amigos Adriano, João, Laiani, Amanda, Júnior, Afonso e Luzia pela grande amizade. E a todos aqueles que por motivo de esquecimento não estão citados aqui.

Aos funcionários da UEPB pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

À Welisson de Pontes por todo seu amor, companheirismo, carinho, compreensão e por sempre está me incentivando e me apoiando em todos os momentos.

À UEPB pela oportunidade.

Á todos, meu muito OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
2.1 Pesticidas	9
2.1.1 Pesticidas na Agricultura	9
2.1.2 Classificação dos Pesticidas	9
2.1.3 Efeitos sobre a saúde humana	11
2.2 Validação de Metodologias Analíticas	13
2.2.1 Controle Analítico	13
2.2.1.1 <i>Especificidade/Seletividade</i>	14
2.2.1.2 <i>Linearidade</i>	14
2.2.1.3 <i>Intervalo</i>	15
2.2.1.4 <i>Limite de Detecção</i>	15
2.2.1.5 <i>Limite de Quantificação</i>	16
2.2.1.6 <i>Precisão</i>	16
2.2.1.7 <i>Exatidão</i>	17
2.3 Ferramentas analíticas	18
2.3.1 Espectrometria de Massas	18
2.3.2 CLAE-EM	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Validação de Método	22
3.1.1 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM)	22
3.1.2 Normativa de Referência	23
3.1.3 Determinação da seletividade	23
3.1.4 Determinação da linearidade	24
3.1.5 Determinação do limite de detecção e limite de quantificação	24
3.1.6 Determinação da precisão	24

3.1.7 Determinação da exatidão	24
3.1.8 Determinação do intervalo.....	25
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Análises em CLAE-EM.....	25
4.1.1 Seletividade	25
4.1.2 Linearidade	26
4.1.3 Precisão.....	27
4.1.4 Exatidão	28
4.1.5 Limite de detecção e Limite de quantificação	29
4.1.6 Intervalo.....	30
5 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	33

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROFENOFOS EM ÁGUA UTILIZANDO CLAE-EM

Suelly Fernandes da Silva*

RESUMO

O Brasil é considerado um país agrícola e atualmente é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. Pesticidas são compostos químicos amplamente utilizados para potencializar a produção de culturas, reduzindo diferentes tipos de pragas agrícolas. Além de trazer benefícios, os pesticidas quando empregados de forma incorreta podem causar diversos danos ao meio ambiente e aos seres humanos. O profenofos é um pesticida pertencente à classe dos organofosforados, sendo empregado como defensivo agrícola em diversos países. O princípio ativo deste pesticida é um inibidor irreversível da acetilcolinesterase, uma enzima de efeito sobre o sistema nervoso dos seres vivos. As normativas brasileiras preconizam que águas para abastecimento público devem conter como limite máximo a concentração de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ deste pesticida, contudo, em águas naturais, pesticidas, em geral, são encontrados em traços de concentrações. A aplicação de ferramentas analíticas capazes de identificar e quantificar tais contaminantes em baixas concentrações auxiliam não só no monitoramento da qualidade da água, mas também na identificação de vetores de contaminação nos ambientes naturais. Neste sentido, o presente trabalho objetivou a validação de um método analítico para determinação do profenofos em água, empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM) com método simplificado de preparo de amostra. Foram obtidos como resultado da validação, limite de detecção $0,162 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação de $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$ para o profenofos. O teste de recuperação média indicou 95,24 % de recuperação do analito, sendo o método exato. A precisão obtida foi de 3,51 %, permitindo o monitoramento de profenofos no intervalo de $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. A metodologia desenvolvida atende às preconizações das normativas regulamentadoras, podendo ser empregada, portanto, no monitoramento de profenofos em matrizes de água.

Palavras-Chave: Pesticidas Organofosforados. Validação de Método. CLAE-EM.

* Aluna de Graduação em Química Industrial na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.

Email: susellyfernandes@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a busca pela obtenção de alimentos aumentaram a utilização de pesticidas no meio agrícola, objetivando a ampliação da quantidade de alimentos. Contudo, o manuseio incorreto de tais defensivos agrícolas estão associados a ocorrência de eventos indesejados, como desequilíbrios ambientais, prejuízos direto à saúde do trabalhador rural e à população consumidora de alimentos contaminados, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, como também aos solos agrícolas (YADAV et al., 2015).

Os Pesticidas Organofosforados (PO) são um grupo de compostos químicos e são utilizados mundialmente na agricultura, contra pragas domésticas, higiene pública e controle de vetores de doenças (HARSHIT; CHARMY; NRUPESH, 2017; WEE; ARIS, 2017). Por ser economicamente mais viável, de fácil síntese, biodegradabilidade aumentada e baixo potencial de bioacumulação em organismos vivos (comparadas aos organoclorados), houve uma substituição dos compostos organoclorados para uma ampla utilização dos PO (ALFONSO et al., 2017). No entanto, os PO são também altamente tóxicos, geram efeitos prejudiciais à saúde nos sistemas imunológico, respiratório, endócrino e reprodutivo. São potentes inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE), enzima que tem um efeito sobre o sistema nervoso dos organismos vivos, incluindo o homem (ALFONSO et al., 2017; BLANKSON et al., 2016). Dentre os tipos de pesticidas existentes, destaca-se o profenofos que é muito utilizado para a produção de alimentos (KHALIFA et al., 2017).

O profenofos (PFF) é um pesticida organofosforado que é aplicado na estrutura foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, cebola, ervilha, feijão, feijão verde, girassol, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja, café, tomate e trigo na agricultura brasileira e em outros países (KHALIFA et al., 2017). O profenofos é amplamente utilizado no Brasil, com o objetivo de controlar pragas e insetos nocivos e com isso aumentar a produtividade das culturas. Porém, seu uso incorreto pode contaminar as águas, alimentos e o solo, representa também um risco potencial a saúde humana (MONTAGNER et al., 2014). Os resíduos de PFF são ingeridos através de alimentos e água potável contaminados e são bioacumulados no sangue, leite materno e nos tecidos (KHALIFA et al., 2017). Com isso, vem aumentando as pesquisas no Brasil com objetivo de controle deste contaminante no ambiente (CASSAL et al., 2014).

Considerando estes baixos níveis de concentração de pesticidas em matrizes reais, métodos de detecção e quantificação utilizam-se tecnologias analíticas sensíveis a estas baixas concentrações. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de

Massas (CLAE-EM) está entre os métodos de análises de pesticidas que melhor possibilitam sua identificação e quantificação destes contaminantes em baixas concentrações (KLANCAR et al., 2016; ALFONSO et al., 2017)

Independentemente da metodologia de análise empregada, é importante que ela seja devidamente validada, visto que a validação garante qualidade metrológica dos ensaios e confiabilidade técnica dos resultados obtidos. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia que emprega a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM) para a análise do pesticida profenofos em água.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pesticidas

2.1.1 Pesticidas na Agricultura

A atividade agrícola cresce exponencialmente no Brasil e no mundo. Como consequência, há uma grande necessidade do uso de pesticidas para potencializar a produtividade das culturas. Por outro lado, esses defensivos causam graves problemas ao meio ambiente e à saúde humana. Os pesticidas são substâncias químicas e biológicas utilizadas para controlar ervas daninhas, insetos e outras pragas (MANSOURIIEH; SOHRABI; KHOSRAVI, 2015).

Ao utilizar produtos sintéticos, como os pesticidas, o homem tem contaminado o ecossistema em decorrência da fácil dispersão desses produtos e de sua longa permanência no meio ambiente. Fatores que pode ampliar a extensão da contaminação por pesticida são a ocorrência de fortes chuvas, erosão nos solos, elevadas taxas de evaporação dos pesticidas, além de outros, que potencializam a contaminação indireta, promovendo o transporte de massa de tais poluentes para áreas que não são de sua aplicação (COSCOLLÀ et al., 2013).

2.1.2 Classificação dos Pesticidas

Os pesticidas podem ser classificados como inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de folhas), fumigantes (controle de bactéria do solo), rodenticidas ou raticidas

(controle de roedores/ratos), nematicidas (controle de nematoides) e acaricidas (controle de ácaros). Os pesticidas mais utilizados no Brasil são herbicidas seguido pelos inseticidas e fungicidas (ZHANG; ZEISS; GENG, 2015).

O Ministério da Saúde estabeleceu através do Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, Artigo 6º e Inciso I, a classificação toxicológica dos pesticidas em classes que variam de I a IV: Faixa vermelha, extremamente tóxico, produtos altamente perigosos ao meio ambiente, como exemplo, os organoclorados (Classe I); Faixa amarela, altamente tóxico, produtos muito perigosos ao meio ambiente, como exemplo, o malation (Classe II); Faixa Azul, moderadamente tóxico, produtos perigosos ao meio ambiente, como exemplo, o carbaril e o gliofosato (Classe III); Faixa verde, pouco tóxico, produtos pouco perigosos ao meio ambiente, como exemplo, derivados de óleos minerais (Classe IV), assim sendo, essas classificações ajudam contribuir para os usuários dos mesmos (CHIARELLO et al., 2017).

Dentre os tipos de pesticidas existentes podemos mencionar os organoclorados que são compostos de cadeia acíclica, aromática ou mista, com no mínimo um átomo de cloro ligado covalentemente, são extremamente tóxicos e apresentam alta estabilidade e capacidade de bioacumulação. Os organofosforados possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, por uma ligação dupla (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

Já os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e podem ser ésteres ou sais desse ácido. Os piretróides são ésteres, e podem ser obtidos a partir de compostos de origem natural, como piretro, nicotina e ácido crisantêmico, e mesmo possuindo uma menor toxicidade que a maioria das outras classes de pesticidas, pode mostrar uma longa persistência em ambientes fechados, em virtude de serem empregados como inseticidas domésticos (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Podemos destacar entre os tipos de pesticidas, os organoclorados e os organofosforados.

Os pesticidas organoclorados (OC) têm sido amplamente utilizados na agricultura, assim como nos programas de controle de mosquitos, cupins e moscas. Os OC são caracterizados por sua baixa polaridade, baixa solubilidade aquosa, sendo solúveis em líquidos apolares como éter, clorofórmio, como também em óleos e gorduras, possuindo uma alta lipossolubilidade. Esta classe de compostos apresentam potencial de bioacumulação na cadeia alimentar que representa uma grande ameaça a saúde humana e ao meio ambiente. Eles persistem no meio ambiente por décadas, pois possuem um tempo de degradação muito alto devido à baixa reatividade das ligações químicas presentes (KAFILZADEH, 2015).

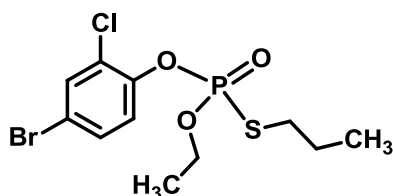
Os pesticidas organofosforados (PO) são amplamente utilizados como inseticidas e acaricidas. Estes compostos são ésteres de ácido fosfórico, ácido tiofosfórico e outros ácidos fosfóricos. Os PO surgiram em virtude da toxicidade dos organoclorados e hoje é a classe mais utilizada de pesticida para o controle de pragas agrícolas devido a sua elevada eficácia (ZHANG; ZEISS; GENG, 2015). O uso extensivo dessa classe é mais frequentemente associado à toxicidade de animais domésticos, animais selvagens e humanos. Este grupo de produtos químicos tais como inseticidas inclui malation, diazinon, azametifós, diclorvos, paration. Eles são lipossolúveis e são capazes de penetrar na pele, na placenta e no feto (MANSOURIIEH; SOHRABI; KHOSRAVI, 2015).

Dentre os pesticidas organofosforados, podemos destacar o profenofos (PFF), que pode atuar como acaricida e inseticida, com classificação toxicológica II. O PFF é usado para o controle de pragas de insetos (MANSOURIIEH; SOHRABI; KHOSRAVI, 2015).

O PFF foi usado na agricultura como inseticida ao longo das últimas duas décadas para controlar pragas de Lepidópteros de algodão, tabaco e culturas de algumas hortícolas. Este uso extensivo de profenofos resultou em uma ampla distribuição em ecossistemas aquáticos e terrestres, contaminando-os. Além disso, devido à pulverização de profenofos em grandes áreas, houve vários casos de mortalidade de peixes, nos Estados Unidos (PAMANJI et al., 2015).

A nomenclatura oficial IUPAC da molécula do profenofos é *O*-4-bromo-2-clorofenil-*O*-etil-*S*-propil, com fórmula química $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ possuindo uma massa molar de $373,63 \text{ g mol}^{-1}$. A Figura 1 apresenta a estrutura química da molécula do profenofos.

Figura 1- Estrutura molecular do pesticida organofosforado profenofos.



Fonte: Adaptado de SHRIVASTAV et al., 2016.

2.1.3 Efeitos sobre a saúde humana

O uso de pesticidas já é considerado indispensável ao modelo extensivo de produção agrícola do Brasil e do mundo, em função das vantagens relacionadas à proteção contra pragas e insetos. Contudo, os impactos negativos de tais defensivos agrícolas à saúde humana

e ao meio ambiente são amplamente discutidos (ZHANG; ZEISS; GENG, 2015). Os efeitos sobre a saúde humana podem ser agudos, quando relacionados a um elevado nível de exposição, mas também podem ser consequência de exposição à concentrações de um ou mais agentes tóxicos, capazes de causar dano efetivo aparentemente dentro de 24 horas, podendo provocar efeitos crônicos. Há ainda aqueles efeitos resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um produto ou mais produtos (CASSAL et al., 2014).

Há evidências sobre os impactos causados à organismos específicos e entre eles os seres humanos são os mais afetados pois, a contaminação do solo e da água, bem como o impacto direto na biodiversidade, está diretamente associada à qualidade de vida humana (LÓPEZ-BLANCO et al., 2018). Estudos têm mostrado a presença de resíduos de pesticidas, com propriedades carcinogênicas, em alimentos de origem animal e vegetal e na água potável (YADAV et al., 2015; CASSAL et al., 2014).

No Brasil, a segunda principal causa de intoxicação em humanos é por pesticidas, depois de medicamentos, entretanto, a morte dos intoxicados ocorre com maior incidência entre os que tiveram contato com pesticidas (CASSAL et al., 2014).

Um dos resultados indesejáveis causado pelos pesticidas é a contaminação de espécies não alvo, ou seja, aquelas espécies que não interferem no desenvolvimento da produção (FU et al., 2017). Esses poluentes tendem a se acumular diretamente nos organismos aquáticos nos ambientes poluídos (água e solo) e indiretamente pela cadeia alimentar, tornando-se uma ameaça possível aos seres humanos. Estudos mostram que a bioacumulação desses poluentes orgânicos ocorre em plantas não alvo e em animais, como peixes e derivados, aves, insetos benéficos (ZHANG; ZEISS; GENG, 2015).

A presença de subprodutos de pesticidas organoclorados no meio ambiente causam problemas como a toxicidade crônica tanto para animais quanto aos humanos via ar, água e ingestão de alimentos (KAFILZADEH, 2015).

Os pesticidas organofosforados foram amplamente utilizados para controlar vários insetos nas culturas de vegetais que constituem uma parte importante da dieta humana e que contribuem para nutrientes necessários, fibras e vitaminas. Estudos comprovam que ao ser exposto aos PO o indivíduo pode adquirir dores de cabeça, alergias e náusea, efeitos fisiológicos adversos e alterações cognitivas caso este pesticida for utilizado em conflito com o rótulo (YU et al., 2016; KAFILZADEH, 2015)

A exposição em longo prazo em águas poluídas com profenofos (PFF) causa diversos prejuízos a saúde humana, em função deste princípio ativo promover inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase além de causar instabilidade na membrana eritrocitária. A inibição

da acetilcolinesterase causa comprometimentos da transmissão respiratória e neuromuscular, que são efeitos toxicológicos agudos de pesticidas organofosforados (MANSOURIIEH; SOHRABI; KHOSRAVI, 2015; KHALIFA et al., 2017). No decorrer dos últimos anos, as preocupações ambientais relacionadas à acumulação de organofosforados em produtos alimentares e no abastecimento de água, têm unido esforços voltados para a ampliação de métodos seguros, acessíveis e economicamente viáveis para a desintoxicação (MANSOURIIEH; SOHRABI; KHOSRAVI, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde, portaria N° 2.914 de 12 de dezembro de 2011, que determina o padrão da água potável e regulamenta o valor máximo permitido dos pesticidas, entre eles, o pesticida profenofos tem seu valor máximo de $60 \mu\text{g L}^{-1}$, um valor muito baixo comparando quando o mesmo é lançado na pulverização das culturas.

2.2 Validação de Metodologias Analíticas

A validação de um método analítico é um processo contínuo que se inicia desde o planejamento da técnica analítica e continua ao longo do seu desenvolvimento. E é através dos ensaios laboratoriais executados que há a garantia do potencial do método analítico de acordo com os padrões globais. É de fundamental importância que os laboratórios possuam meios e critérios objetivos para afirmar, por meio da validação, que a execução das metodologias de ensaio guiem a resultados confiáveis e adequados à característica pretendida. Pois, dados analíticos não confiáveis podem direcionar a prejuízos financeiros como também decisões trágicas (EL-GAWAD, 2016).

Quando se valida um método analítico o mesmo vai oferecer às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e sistemas são adequados para um uso proposto, permitindo assim, uma interpretação clara dos resultados analíticos, visto que leva ao reconhecimento e quantificação de erros e imprecisões específicas ao processo analítico que não conseguem ser eliminados (RATH et al., 2015).

2.2.1 Controle Analítico

Em sua Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003, para validação de um método analítico a ANVISA estabelece requisitos mínimos. Para quantificação de um determinado pesticida em determinada matriz os parâmetros mais consideráveis para a realização de análises são: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e

precisão (VENTURA et al., 2014). Já o INMETRO, em seu documento DOQ-CGCRE-008, de 2006 ainda recomenda como necessária a faixa de trabalho.

2.2.1.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade é um parâmetro muito importante a ser avaliado, uma vez que corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira evidente na presença de outras substâncias capazes de interferirem na determinação, ou seja, podem interferir no sinal analítico de interesse. A resposta obtida deve corresponder unicamente ao analito (VENTURA et al., 2014).

A resposta que certo método analítico mostra para as variadas substâncias presentes numa amostra é definida como seletividade enquanto, a especificidade consiste principalmente, na habilidade que esse método demonstra para responder a uma única substância de interesse presente numa amostra composta, sendo assim, a seletividade é o termo mais adequado à validação de métodos cromatográficos (KRUIVE et al., 2015).

2.2.1.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma faixa determinada (SILVA-BUZANELLO et al., 2015). A maneira mais simples de descrever a dependência linear é pelo modelo de regressão linear, ou seja, vai relacionar concentração do analito na amostra com uma resposta do método de detecção e pode ser representado por uma equação matemática, a Equação 1 abaixo (VENTURA et al., 2014).

$$y = a x + b \qquad \text{Equação 1}$$

Em que,

y - é a resposta medida (altura ou área do pico), variável dependente;

x - concentração do analito, variável independente;

a - inclinação da curva de calibração (coeficiente angular);

b - intersecção com o eixo y (coeficiente linear).

A linearidade estima-se avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração e é estabelecida em função da reta de calibração, a qual consiste numa representação gráfica de um determinado coeficiente de correlação (R) que permite uma estimativa da qualidade da curva (VENTURA et al., 2014). A ANVISA em Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003 recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve estar acima de 0,990.

2.2.1.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Geralmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

A ANVISA em sua Resolução de N° 899 estabelece que o intervalo de detecção deve conter até 120% do limite máximo especificado por portaria para o contaminante, isto para os ensaios de determinação de impurezas ou contaminantes. Quando determinados compostos apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.

2.2.1.4 Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade ou a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada e identificada com segurança pelo método, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (KRUIVE et al., 2015).

Em relação aos métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a ANVISA em sua resolução de N° 899, diz que a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, como também através da curva de calibração. Pode ser determinado pela Equação 2.

$$LD = \frac{DP}{CA} \times 3 \quad \text{Equação 2}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

2.2.1.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro de ensaios quantitativos para baixos níveis de compostos na amostra. Indica a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ foi determinado pelo coeficiente angular da curva de calibração e o desvio padrão calculado de acordo com a Equação 3 (SILVA-BUZANELLO et al., 2015).

$$LQ = \frac{DP}{CA} \times 10 \quad \text{Equação 3}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003).

2.2.1.6 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a concordância entre uma série de medições de amostragens múltiplas da mesma amostra homogênea. Este parâmetro pode ser avaliado em formas diferente: precisão intermediária (ensaios em dias diferentes),

repetibilidade (precisão intra-corrída) concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação e reprodutibilidade (ensaios envolvendo um analista diferente e um laboratório diferente). A repetitividade expressa fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto intervalo de tempo (SILVA-BUZANELLO et al., 2015).

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003)

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 4.

$$CV\% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 20% (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016). Este é um importante parâmetro porque possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise.

2.2.1.7 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico demonstra um grau de concordância entre o valor (aceito convencionalmente verdadeiro ou um valor de referência aceito) e o valor obtido. A análise de exatidão pode ser realizada em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo a concentração máxima permitível e em uma concentração próxima à média de faixa de uso do método, como também a adição de padrão (SILVA-BUZANELLO et al., 2015).

A recuperação mede a quantidade de substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios, ou seja, pode ser determinada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas, contudo é um parâmetro geralmente dependente da concentração, por isso deve ser avaliado dentro do conjunto de concentrações

esperadas para a amostra (VENTURA et al., 2014). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 5.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

2.3 Ferramentas analíticas

2.3.1 Espectrometria de Massas

Espectrometria de massas (MS, mass spectrometry) é uma técnica analítica extremamente valiosa em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z (SMITH, 2004).

Esta ferramenta analítica é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. A espectrometria de massa é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, já que é capaz de fornecer informação sobre: i) a composição elementar de amostras; ii) a estrutura molecular; iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; iv) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras. Este método analítico difere de outros métodos comuns de análise espectral de compostos orgânicos, pois é uma técnica mais sensível, sendo capaz de detectar baixas quantidades de analito, necessitando-se de menor quantidade de amostra que a espectroscopia no infravermelho e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) para prover informação estrutural da substância em análise (SMITH, 2004).

Espectrômetros de massas são equipamentos que podem ser operados isoladamente ou conectados a um cromatógrafo (líquido ou gasoso). Neste último caso, o cromatógrafo separa a mistura e introduz o analito no espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas ioniza

as moléculas do analito, separando e detectando os íons resultantes (SMITH, 2004; PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004).

O espectro de massa é um gráfico que mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos. O equipamento faz uma medida da razão massa sobre a carga (m/z) e não da massa em si. Desta forma, se uma biomolécula é ionizada pela adição de um ou mais prótons (íons H^+) o instrumento mede o m/z após a adição de um Da (Dalton) para cada próton adicionado. Assim uma molécula com massa de 1000 Da que seja ionizada pela adição de um próton aparecerá no espectro com m/z de 1001 $[(1000+1)/1]$. Por outro lado, se a mesma molécula sofrer adição de dois prótons durante a ionização, essa molécula será detectada com m/z 501 $[(1000+2)/2]$. Moléculas também podem ser ionizadas perdendo um próton, adquirindo carga negativa. Nesta situação o espectrômetro passa a detectar íons de carga negativa. Assim uma molécula com massa de 1000 Da que seja ionizada pela perda de um próton aparecerá no espectro com m/z de 999 $[(1000-1)/1]$. Por outro lado se a mesma molécula sofrer perda de dois prótons durante a ionização, essa molécula será detectada com m/z 499 $[(1000-2)/2]$ (WILSON; WALKER, 2010).

Técnicas de ionização como o electrospray (ESI, electrospray ionization) e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization), tornam possível a determinação precisa de massas de compostos de alto peso molecular bem como de moléculas de baixo peso molecular, que consolidam a aplicabilidade da espectrometria de massas para quase todas as moléculas (WILSON; WALKER, 2010). Os componentes deste equipamento que causam a formação, separação e detecção dos íons são contidos em um ambiente extremamente limpo mantido em vácuo moderado (10^{-3} a 10^{-6} mmHg). Alto vácuo garante que os íons formados na fonte de íons não colidam com outras moléculas durante o seu percurso até o detector (o que poderia causar fragmentação adicional) desviando-se da fragmentação desejada. Alto vácuo ainda protege superfícies metálicas da fonte de íons, do analisador e do detector da corrosão ocasionada pelo ar e vapor de água, o que comprometeria a capacidade do espectrômetro de massas de gerar, separar e detectar íons (SMITH, 2004).

O MS ainda deve ser capaz de detectar tanto íons positivos quanto negativos. Deste modo, quando o analito apresenta grande afinidade por prótons, íons carregados positivamente são produzidos requerendo modo de detecção positiva. Ao contrário, quando espécies negativas são mais estáveis, tais como íons sulfonato, carboxilatos e fenolatos, a detecção em modo negativo é preferida. Em alguns casos, ambos os modos de detecção podem ser plausíveis, contudo, um modo se sobrepõe sobre o outro. Em meio ácido,

moléculas protonadas (em alguns casos com múltiplas protonações) irão predominar (PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004).

2.3.2 CLAE-EM

Quando se utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas (NAGY, K. et al., 2005). As vazões utilizadas em CLAE são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}^2$. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em CLAE-EM é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (FM) (KITSON; LARSEN; MCEWEN, 1996)

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema CLAE com EM foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis. Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são ionização por eletronebulização ("electrospray ionization") - IEN, ionização química à pressão atmosférica ("atmospheric pressure chemical ionization") - IQPA e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica ("atmospheric pressure photoionization") - FIPA (SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002; BOS; VAN; KARST, 2006).

Apesar das limitações quanto ao desenvolvimento estrutural, esta já é uma técnica consolidada e é empregada como análise de referência em relação a várias metodologias analíticas (SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002).

Nunes e colaboradores (2002) validou método para identificação de pesticidas em HPLC/FLUORESCÊNCIA, e utilizou como método de referência a análise por HPLC-MS abordando que a vantagem adicional, que se constitui no grande trunfo da técnica analítica HPLC-APCI/MS, é que se pode, a um só tempo, determinar os resíduos dos pesticidas e confirmar a presença desses resíduos e de outros que porventura apareçam no cromatograma.

Rosen (2007) descreve que cromatógrafos líquidos associados a espectrômetros de massas podem ser equipados com diferentes tipos de analisadores de massa, cada qual com

características únicas capazes de identificar, quantificar, e resolver ambiguidades a partir da seleção adequada de parâmetros de ionização e aquisição.

Sevilla-Morán (et al., 2008) estudaram a fotodegradação do herbicida aloxidim (80 mg/L) sob radiação solar simulada. Foram utilizadas lâmpadas de xenônio de diferentes intensidades. A cinética de fotodegradação foi obtida por meio de metodologia CLAE em coluna de fase reversa C18 (diâmetro de partículas de 4 μm , dimensões de 150 mm x 3,9 mm). A fase móvel foi constituída por água acidificada com ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila, sendo utilizado método gradiente atingindo concentração máxima de 70% de acetonitrila. Os produtos de transformação foram identificados com utilização de espectrômetro de massas híbrido QTOF com ionização ESI em modo positivo. Espectrometria de massas sequencial foi realizada com energia de colisão de 22 eV.

Vidal (et al., 2009) ressalta que, em geral, os produtos de degradação são mais polares e menos voláteis que o precursor, além de serem termolábeis. Neste sentido, a cromatografia líquida é adequada para a determinação e identificação de produtos de transformação polares, já que a cromatografia gasosa pode requerer uma etapa adicional de derivatização o que acarretaria e maior gasto e tempo de análise.

Um método para determinação de praguicidas das classes organofosforados, carbamatos, triazinas e ureias por CLAE-EM/EM (Cromatografia Líquida e Alta Eficiência acoplada e Espectrometria de Massas Sequencial) em urina de pessoas expostas em decorrência de atividades agrícolas foi desenvolvido por Anaia (2014), que obteve respostas lineares no intervalo de 0,25 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os praguicidas com coeficiente de determinação maiores que 0,999. O LD do método variou de 0,192 a 3,19 $\mu\text{g L}^{-1}$. O LQ do método variou entre 0,582 e 13,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de variação inferior a 20% CV. As recuperações em amostras fortificadas em 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 55,7 e 72,6% e a precisão em termos de %CV entre 1,94 e 19,1%. As recuperações em amostras fortificadas em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 99,1 a 105% e a precisão entre 0,751 e 8,98% CV. As recuperações em amostras fortificadas em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 99,5 a 101% e a precisão entre 0,877 e 5,94% CV.

Tette (et al., 2015) desenvolveu validação de método em CLAE-EM para análise do pesticida triclorfon em méis, com um tempo de corrida cromatográfica de 13 minutos. O controle positivo foi demonstrado por meio de ensaios de recuperação de extratos fortificados em dois níveis de concentração para cada analito na faixa de 70 a 120 %. Os limite de detecção (LD) do analito foi determinado em 0,005 mg Kg^{-1} e os limites de quantificação (LQ) foi de 0,01 mg Kg^{-1} .

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades desta pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Química Sanitária e Ambiental (LAQUISA), que está situado nas dependências da Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES) da Universidade Estadual da Paraíba, localizada na cidade de Campina Grande-PB.

3.1 Validação de Método

3.1.1 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM)

Para a preparação da solução estoque, foi utilizado o principio ativo do profenofos da marca Sigma Aldrich, com pureza 99,999 %, que foi diluído em acetonitrila grau HPLC e água Tipo 1, na proporção de 50 % água/acetonitrila obtendo uma solução estoque com concentração de 2,5 g L⁻¹ de PFF. Foi desenvolvido um método simplificado de preparo de amostra por protonação, no qual, os padrões para construção da curva de calibração foram acidificados com adição de HCl 0,06 mol L⁻¹ para pH 3. O mesmo procedimento de acidificação foi realizado para as amostras analisadas por este método.

Para validação do método de análise de profenofos em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi utilizado um cromatógrafo da marca Thermo Scientific, UHPLC 3000, acoplado com Espectrômetro de Massas LCQ Fleet.

Foram otimizados os parâmetros de operação do espectrômetro de massas e, em seguida, procedeu-se com a otimização dos parâmetros de operação do cromatógrafo. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de operação do cromatógrafo e do espectrômetro de massas que foram ajustados para análise do profenofos.

Tabela 1 - Parâmetros de operação do CL e do EM para análise do profenofos.

Parâmetros do espectrômetro de massas	
Polarização	ESI +
Voltagem do spray	5000 V
Temperatura do vaporizador	378° C
Temperatura do capilar de transferência de íons	200° C
Parâmetros do cromatógrafo	
Tipo de coluna	Fase reversa C18, 150 x 2.1 mm, 3 µm
Fase móvel	Metanol/Acetonitrila
Modo de eluição	Isocrático 50%
Vazão do eluente	0,3 mL/min
Temperatura da coluna	40° C
Temperatura do Auto-amostrador	25° C
Volume de injeção	10µL

3.1.2 Normativa de Referência

A validação do método de análise do profenofos foi realizada por meio dos seguintes parâmetros, conforme padrões da Resolução ANVISA Nº 899, de 29 de maio de 2003 e documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2016: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, seletividade e intervalo.

3.1.3 Determinação da seletividade

Considerando que a molécula do profenofos possui uma razão m/z específica, e que o espectrômetro de massas permite selecionar a detecção de razões m/z desejadas, a análise da seletividade é desconsiderada. No caso da presença interferentes com mesma m/z, estes ainda não causariam interferência na seletividade do método, considerando que uma molécula de mesma massa molecular, mas de estrutura molecular diferente da molécula de profenofos teria

afinidade distinta aos solventes e a composição da coluna na etapa de separação cromatográfica.

3.1.4 Determinação da linearidade

Para a determinação da linearidade foi elaborada uma curva analítica com concentrações padrões de 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da solução estoque de 2,5 g L^{-1} . Foram utilizados balões volumétricos com capacidade de 50 mL para a construção dos pontos da curva de calibração a partir da diluição da solução estoque em água Tipo 1. As concentrações foram preparadas em 6 replicatas. Em seguida, no procedimento de protonação, 30 mL de cada padrão receberam 40 μL de HCl 0,06 mol L^{-1} . Depois de acidificados, 2 mL de cada solução padrão foram transferidos para o frascos vials e submetidos a análises em CLAE-EM para a construção da curva analítica, concentração *versus* área do pico. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R) foram calculados.

3.1.5 Determinação do limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas 3 curvas de calibração com concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação dos limites de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente) que foram calculados pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das 3 curvas de calibração pelo coeficiente angular da curva de calibração da Figura 2, multiplicados por 3 (LD) e 10 (LQ), respectivamente.

3.1.6 Determinação da precisão

A avaliação da precisão do método foi com base na repetitividade. Foram preparadas soluções concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e injetadas 6 replicatas para cada concentração. A média e o desvio padrão de cada concentração foram obtidos com vista a se determinar a precisão a partir do coeficiente de variação (CV), conforme a Equação 4.

3.1.7 Determinação da exatidão

A exatidão foi determinada em função da recuperação do analito pela sua quantificação na matriz (água mineral). Amostras foram fortificadas com concentrações de profenofos com três níveis: $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (a baixa), outra com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a média) e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (a alta). As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata. Para obter o valor da porcentagem do analito recuperado calculou-se a relação entre a concentração média determinada previamente e a concentração teórica correspondente, após a adição do analito. Os resultados expressos em valores percentuais.

3.1.8 Determinação do intervalo

Após os cálculos dos demais parâmetros foi calculado o intervalo de concentrações do método. Ele deve enquadrar-se em 120% do valor máximo permitido do profenofos em águas de abastecimento público. Logo, foi calculado o equivalente a 120 % de $60 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o valor máximo permitido pelo Ministério da Saúde, e observado se este equivalente está dentro dos limites contidos na curva analítica de quantificação inferior e superior.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises em CLAE-EM

O procedimento de acidificação realizado nos padrões utilizados na curva de calibração permitiu a obtenção de um pico com razão m/z de 375. Este foi o pico com maior abundância relativa. Os outros picos detectados, em função da baixa abundância, não se distinguiram do ruído na linha de base. A razão m/z obtida indica que a molécula de profenofos, com massa inicial de 374, recebeu um hidrogênio durante a acidificação, sendo protonado positivamente para o íon 375.

4.1.1 Seletividade

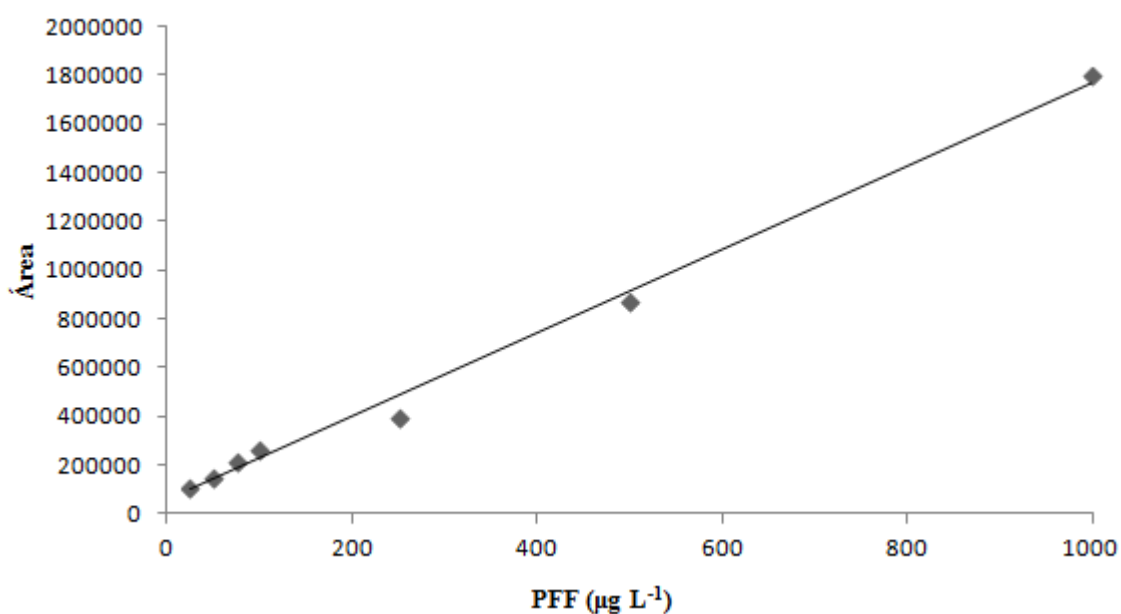
O principal modo de varredura utilizado neste trabalho foi o Select Ion Monitoring (SIM). Quando se utiliza o modo de monitoramento do íon selecionado, os íons são previamente selecionados pelo operador conforme seu tempo de retenção, a fim de analisar apenas o que lhe interessa, tornando o método altamente seletivo.

Neste sentido, a determinação do parâmetro seletividade em sistemas analíticos com espectrômetro de massas é desnecessária, uma vez que, cada analito possui uma razão massa/carga característica. Desta forma, componentes diferentes, mesmo que parecidos, não são detectados como um mesmo componente por um espectrômetro de massas. O processo de separação cromatográfica também contribui, como já discutido anteriormente, para a seletividade do método.

4.1.2 Linearidade

Nesta curva de calibração, cada padrão de concentração foi submetido a leituras em CLAE-EM, e os pontos da curva representam a média das seis injeções. A Figura 2 apresenta a curva obtida para profenofos em CLAE-EM.

Figura 2 - Curva de calibração para profenofos em CLAE-EM.



Foi obtido um coeficiente de correlação linear 0,994 para a Equação 1.

$$y = 1709,4x + 57555$$

Equação 1

De acordo com a Resolução N° 899, 29 de maio 2003 da ANVISA, o valor mínimo requerido para uma linearidade confiável é de 0,99. Desta forma, a curva de calibração obtida está em conformidade com as exigências da ANVISA.

4.1.3 Precisão

Para obtenção deste parâmetro procedeu-se com o método da repetitividade (precisão intra-corrída). Foram realizadas seis injeções para cada concentração. O coeficiente de variação é a razão entre o desvio padrão e a média. Os valores de cada injeção, a média das injeções, o desvio padrão para cada concentração e o coeficiente de variação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de concentração, área, média das injeções, desvio padrão e coeficiente de variação utilizados na análise da precisão em CLA-EM.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área						Média	Desvio padrão	CV%
	1°	2°	3°	4°	5°	6°			
25	112826	112098	109254	110449	106865	96886	108063	5873	5,43
50	136076	157036	149131	157304	159376	158579	152917	9033	5,91
75	219228	215092	220508	226569	219383	221581	220394	3743	1,70
100	268037	266882	266894	276827	267055	267313	268835	3939	1,47
250	402844	395991	397512	395430	390039	402277	397349	4764	1,20
500	833355	835066	900179	918537	891173	859258	872928	35615	4,08
1000	1714901	1832354	1937347	1834695	1775845	1711839	1801164	85679	4,76

Observa-se que o valor de CV em cada ponto da reta, obedeceu ao limite máximo de 20% recomendado pela Resolução N° 899, de maio de 2003 da ANVISA. O valor médio de CV é de 3,51 %. Ghani e Hanafi (2016) obtiveram um coeficiente de variação de 10,7 % utilizando CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas) e Li (et al., 2015) conseguiram 10,25 % para o profenofos utilizando CL-EM/EM (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial), mesmo os resultados da literatura dentro do limite permitido, a técnica utilizada na validação deste trabalho apresentou uma precisão maior.

4.1.4 Exatidão

A exatidão é a relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica. As concentrações adotadas para cálculo de exatidão foram 50, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras para esta análise foram preparadas através do método de fortificação, em que os padrões foram preparados pela adição de profenofos em água mineral.

A Tabela 3 apresenta os valores de área, concentração e os valores de exatidão.

Tabela 3 - Valores de área, concentração e exatidão.

Conc. Adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. Calculada	Exatidão (Recuperação)
500	520,68	104,13
500	500,41	100,08
500	491,95	98,39
	Média	<u>100,87</u>
100	102,78	102,78
100	92,53	92,53
100	85,51	85,51
	Média	<u>93,61</u>
50	46,79	93,59
50	44,35	88,70
50	45,73	91,47
	Média	<u>91,25</u>

De acordo com a Resolução n° 899, de maio de 2003 da ANVISA, o valor da exatidão deve acompanhar os resultados determinados através do método. A exatidão calculada como recuperação não deve ser inferior a 85% nem superior a 120 %. Os valores obtidos atende as exigências da resolução, apresentando exatidão média de 95,24 %. Ghani e Hanafi (2016) conseguiram em sua validação uma recuperação de 95,1 % para o pesticida profenofos em água utilizando CG-EM e Luzardo (et al., 2015) uma recuperação de 93,0 % em sangue humano utilizando CL-EM/EM.

4.1.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

O método empregado recomenda a construção de, no mínimo, três curvas de calibração com concentrações próximas ao possível limite de detecção do método.

Tabela 4 - Valores de concentração área para cálculo de limite de quantificação.

Con. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10	25	50	75	100	Coef. Linear
Áreas 1	112098	157036	215092	266882	112098	2089,6
Áreas 2	109254	149131	220508	266894	109254	2177,2
Áreas 3	110449	157304	226569	276827	110449	2273,6

O limite de detecção é três vezes a razão entre o desvio padrão (DP) dos coeficientes lineares e o coeficiente angular da curva de calibração (CA). O desvio padrão entre os coeficientes lineares da Tabela 4 é 92,03. O Coeficiente angular obtido pela curva de calibração da Figura 2 é 1709,4.

$$LD = \frac{DP}{CA} \times 3 \quad \text{Equação 2}$$

$$LD = \frac{92,03}{1709,4} \times 3$$

$$LD = 0,162 \mu\text{g L}^{-1}$$

Desta forma, $0,162 \mu\text{g L}^{-1}$ é a menor quantidade detectável de profenofos para este método.

Os dados empregados para determinação do limite de quantificação são os mesmos utilizados para limite de detecção, que equivale a dez vezes a razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares e o coeficiente angular da curva de calibração.

$$LQ = \frac{DP}{CA} \times 10 \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{92,03}{1709,4} \times 10$$

$$LQ = 0,538 \mu\text{g L}^{-1}$$

Observa-se então, que $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$ correspondem à quantidade mínima de profenofos que pode ser quantificado por este método.

Muitos métodos analíticos validados são descritos para análises de pesticidas, como o profenofos, em água como também em outras matrizes. Ghani e Hanafi (2016) alcançaram um LD de $2,29 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $7,64 \mu\text{g L}^{-1}$ para o profenofos usando a técnica de CG-EM, entretanto, o método utilizando CLAE-EM neste trabalho demonstrou uma maior sensibilidade. Donato (et al., 2017) desenvolveram um método usando a técnica de extração por sorção em disco rotativo para a extração de vários pesticidas. Entre eles o profenofos com LD e LQ de $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, utilizando técnica de UHPLC-MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial) demonstrando uma alta sensibilidade do seu método utilizado. Albero (et al., 2005) conseguiram um LD e LQ de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, na análise do profenofos em sucos de frutas e vegetais utilizando CG-EM. Luzardo (et al., 2015) obtiveram um LQ de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ na quantificação do profenofos em sangue humano utilizando CL-EM/EM. Li (et al., 2015) usando CL-EM/EM validaram um método utilizando metanol como modificador em soluções de amostra para eliminar os efeitos de adsorção e aumentar o sinal de detecção do profenofos em águas, e conseguiram um LD e LQ de $0,027 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,090 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, um método com alta sensibilidade para análise do profenofos.

4.1.6 Intervalo

Para este parâmetro, a Resolução N° 899, de 29 de maio 2003 da ANVISA recomenda que o intervalo de concentrações do método enquadre 120% do valor máximo permitido da concentração do contaminante preconizado por portarias. A Portaria N° 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, estabelece que a concentração máxima permitida de profenofos em água de abastecimento público é de $60 \mu\text{g L}^{-1}$.

Desta forma, os limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para este método é de no mínimo $60 \mu\text{g L}^{-1}$ a $72 \mu\text{g L}^{-1}$ (120% de $60 \mu\text{g L}^{-1}$). Estes limites estão contidos na curva que possui limite de quantificação $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$, e se estende até $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (R) de 0,994. Este intervalo de detecção possibilita também o estudo das cinéticas de degradação, uma vez que, permite a análise de águas contaminadas por profenofos em concentrações acima da portaria, e o monitoramento da degradação até níveis permitidos do contaminante, sendo possível detectar traços do pesticida em concentrações próximas de $0,162 \mu\text{g L}^{-1}$.

5 CONCLUSÃO

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM) proposto para a análise do pesticida profenofos em águas foi devidamente validado segundo os parâmetros de limite de detecção, limite de quantificação, precisão, seletividade, linearidade, exatidão e o intervalo. Os parâmetros validados atenderam às recomendações estabelecidas pela ANVISA garantindo a confiabilidade dos resultados.

O LD calculado foi $0,162 \mu\text{g L}^{-1}$ e o LQ $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a linearidade, o coeficiente de correlação foi superior a 0,99 na faixa de 25 a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e está dentro dos padrões estabelecidos que determina ser maior que 0,99. O método apresentou uma boa precisão para o profenofos, com coeficiente de variação de 3,51%. A exatidão do método também foi comprovada e apresentou uma recuperação média de 95,24 %, estando conforme as exigências estabelecidas pelas portarias de referência. Além disso, o método apresentou um intervalo adequado, possibilitando o monitoramento de profenofos no intervalo de $0,538 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$.

As condições operacionais adotadas para a análise cromatográfica foram adequadas e válidas para a determinação quantitativa de profenofos em água. Este método apresenta vantagens em relação a outros descritos para a determinação do profenofos em água, no que se refere ao procedimento de preparação de amostras, que compreendeu uma única etapa de acidificação para a realização das análises.

METHOD VALIDATION FOR QUANTIFICATION OF PROFENOFOS IN WATER USING HPLC-MS

ABSTRACT

Brazil is considered an agricultural country and is currently one of the largest consumers of pesticides in the world. Pesticides are chemical compounds widely used to potentiate crop production reducing different types of agricultural pests. In addition to getting benefits, when used improperly can cause several damages to the environment and humans. Profenofos is a pesticide belonging the class of organophosphates, being used as an agricultural defense in various countries. The active principle of this pesticide is an irreversible inhibitor of acetylcholinesterase, an enzyme that effects the nervous system of living beings. Brazilian regulations recommend that public water supply should contain $60 \mu\text{g L}^{-1}$ of this pesticide as a maximum, however, in natural waters, pesticides are generally found in trace amounts of concentrations. The application of analytical tools capable of identifying and quantifying contaminants at low concentrations helps not only the monitoring of water quality but also the identification of vectors contamination in natural environments. In this respect, the present work aimed at the validation of an analytical method for the determination of profenofos in water, using High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS) with a simplified method of sample preparation. As a result of the validation, detection limit $0.162 \mu\text{g L}^{-1}$ and limit of quantification of $0.538 \mu\text{g L}^{-1}$ for profenofos. The mean recovery test indicated 95.24% of analyte recovery, the exact method being. The precision obtained was 3.51%, allowing the monitoring of profenofos in the rate of $0.538 \mu\text{g L}^{-1}$ to $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. The methodology developed complies with the recommendations of the regulatory normative, and can therefore be used to monitor profenofos in water matrices.

Keywords: Organophosphate Pesticides. Method Validation. HPLC-MS.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003, Brasília (DF), 2003.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, v. 66, p. 917-924, 2005.

ALFONSO, L. et al. Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils : The case of karst landscape of northwestern Yucatan. *Chemosphere*, v. 166, p. 292-299, 2017.

ANAIA, G. C. Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC no contexto de exposição ocupacional, Digital Library of Theses and Dissertations of USP, 2014.

BLANKSON, G. K. et al. Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra , Ghana. *Food Control*, v. 68, p. 174-180, 2016.

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto Nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html/, acessada em abril de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, p. 1-38, 2011.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos : uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital*, p. 437-445, 2014.

CHIARELLO, M. et al. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPL-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo. *Química Nova*, v. 40, n. 2, p. 158-165, 2017.

COSCOLLÀ, C. et al. LC-MS characterization of contemporary pesticides in PM10 of Valencia Region, Spain. *Atmospheric Environment*, v. 77, p. 394-403, 2013.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, n. July 2015, 2014.

DONATO, F. F. et al. Evaluation of the rotating disk sorptive extraction (RDSE) technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2017.

EL-GAWAD, H. A. Validation method of organochlorine pesticides residues in water using gas chromatography–quadruple mass. *Water Science*, 2016.

FU, L. et al. Multiresidue determination and potential risks of emerging pesticides in aquatic products from Northeast China by LC-MS/MS. *Journal of Environmental Sciences*, p. 1-10, 2017.

GHANI, S. B. A.; HANAFI, A. H. QuEChERS Method Combined with GC–MS for Pesticide Residues Determination in Water. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 71, n. 5, p. 508-512, 2016.

HARSHIT, D.; CHARMY, K.; NRUPESH, P. Organophosphorus Pesticides Determination by Novel HPLC and Spectrophotometric Method. *Food Chemistry*, 2017.

Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 2006.

Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, Revisão: agosto de 2016.

KAFILZADEH, F. Assessment of Organochlorine Pesticide Residues in Water, Sediments and Fish from Lake Tashk, Iran. *Achievements in Life Sciences*, v. 9, n. 2, p. 107-111, 2015.

KHALIFA, M. E. et al. Extractive separation of Profenofos as an organophosphorous insecticide from wastewater and plant samples using molecular imprinted cellulose. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide, Academic: London, 1996.

KLANCAR, A. et al. An advanced oxidation process for wastewater treatment to reduce the ecological burden from pharmacotherapy and the agricultural use of pesticides. *Ecological Engineering*, v. 97, p. 186-195, 2016.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods : Part I. *Analytica Chimica Acta*, 2015.

LI, W. et al. The role of methanol addition to water samples in reducing analyte adsorption and matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1389, p. 76-84, 2015.

LÓPEZ-BLANCO, R. et al. Experimental and theoretical determination of pesticide processing factors to model their behavior during virgin olive oil production. *Food Chemistry*, v. 239, p. 9-16, 2018.

LUZARDO, O. P. et al. Science and Justice Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS /MS and its application in two poisoning cases. *Science & Justice*, 2015.

MANSOURIIEH, N.; SOHRABI, M. R.; KHOSRAVI, M. Optimization of profenofos organophosphorus pesticide degradation by zero-valent bimetallic nanoparticles using response surface methodology. *Arabian Journal of Chemistry*, abr. 2015.

MONTAGNER, C. C. et al. Analytical Methods their occurrence in surface and drinking waters from the State of S a. *Analytical Methods*, v. 6, p. 6668-6677, 2014.

NAGY, K. et al. High performance liquid chromatography–mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils. *Journal of Chromatography A*, v. 1078, p. 90-97, 2005.

NUNES, G. S. et al. Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de barata, com determinação por HPLC/Fluorescência e confirmação por HPLC/Espectrometria de Massas. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 214-220, 2002.

PACHECO, J. R.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Integration of Physical Chemistry And Advanced Oxidative Processes for Remediation of Landfill Leachate. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 9, p. 306-311, 2004

PAMANJI, R. et al. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 39, n. 2, p. 887-97, mar. 2015.

RATH, S. et al. Considerações e Implicações Práticas do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica de Fármacos em Produtos para a Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. *Química Nova*, v. 38, n. 5, p. 697-708, 2015.

ROSEN, R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 246-251, 2007.

SEVILLA-MORÁN, B. et al. Study of alloxymid photodegradation in the presence of natural substances : Elucidation of transformation products. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, v. 198, p. 162-168, 2008.

SHRIVASTAV, A. M.; USHA, S. P.; GUPTA, B. D. Fiber optic profenofos sensor based on surface plasmon resonance technique and molecular imprinting. *Biosensors & bioelectronics*, v. 79, p. 150-7, 15 maio 2016.

SILVA-BUZANELLO, R. A. et al. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (L-lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry*, v. 172, p. 99-104, 2015.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix Effects and Selectivity Issues in LC-MS-MS. *Chromatographia Supplement*, v. 55, p. 95-99, 2002.

SMITH, R. M. *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 372 p., 2004.

TETTE, P. A. S.; OLIVEIRA, F. A. S.; SILVA, G, PAULA, B. M.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M. B. A. Monitoramento da contaminação do mel por pesticidas nos estados de Minas Gerais e São Paulo por meio de método multirresíduo, 5º simpósio de segurança alimentar, alimento e saúde, Bento gonçalves, RS, 2015.

VENTURA, L. M. B. et al. Validation Method to Determine Metals in Atmospheric Particulate Matter by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 25, n. 9, p. 1571-1582, 2014.

VIDAL, J. L. M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 6767-6788, 2009.

WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Chemosphere Ecological risk estimation of organophosphorus pesticides in riverine ecosystems. *Chemosphere*, v. 188, p. 575-581, 2017.

WILSON & WALKER. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7ed. Página 352, 2010.

YADAV, I. C. et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *The Science of the total environment*, v. 511, p. 123-37, 1 abr. 2015.

YU, R. et al. Concentrations of organophosphorus pesticides in fresh vegetables and related human health risk assessment in Changchun, Northeast China. *Food Control*, v. 60, p. 353-360, fev. 2016.

ZHANG, M.; ZEISS, M. R.; GENG, S. Agricultural pesticide use and food safety: California's model. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 14, n. 11, p. 2340-2357, nov. 2015.

