

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

**VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE
3,3'-DICLOROBENZIDINA EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS QUADRUPOLAR (GC/qMS)**

ALLAN DOS SANTOS POLIDORO

Porto Alegre, julho de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALLAN DOS SANTOS POLIDORO

**VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE
3,3'-DICLOROBENZIDINA EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS QUADRUPOLAR (GC/qMS)**

Monografia apresentada junto à atividade de ensino “Projeto tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof^a. Dra. Leandra Franciscato Campo

Orientadora

Porto Alegre, julho de 2014

AGRADECIMENTOS

À UFRGS, pelo ensino de qualidade.

A Profa. Dra. Leandra Campo pela imensa ajuda, motivação, paciência e orientação durante o período de realização do trabalho.

Às Professoras Dra. Rosângela Assis Jacques e Dra. Elina Bastos Caramão, pela orientação, paciência e amizade, durante a minha Iniciação Científica.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica, pela contribuição com o meu crescimento científico durante a graduação.

Às Mestras Anaí Loreiro e Caroline Saucier, que tão pacientemente me ensinaram os primeiros passos na arte da cromatografia.

Aos líderes Vinícius Praia Carvalho e Alexandre Brandelli, que me proporcionaram a oportunidade de estagiar na NSF Bioensaios e obter experiências inestimáveis na área da cromatografia gasosa e validação de métodos analíticos.

Aos colaboradores da Bioensaios, em especial aos colegas Jaqueline Delazari, Ana Paula Petrecheli, Camila Kauer, Pâmela Zanata, Gracieli Zapello, Dagoberto Alves, Suelen Nunes e Carla Sirtori, por tornarem a minha experiência na empresa ainda mais divertida.

Ao meu grande amigo, Filipe Schwarz, pela amizade, desde a nossa primeira prova de Segurança em Laboratório Químico, até os dias de hoje.

À grande amiga Franciela Arenhart, pelos dois anos de convivência, sempre com paciência suficiente para nunca me defenestrar, mesmo quando eu me esquecia de varrer o apartamento.

Ao vulgo “Bonde da Rafaela”, composto por Bruna Dinarte, Pâmela Barela, Rafaela Rodrigues e José Daniel, por me ensinarem a levar a vida menos a sério.

Aos grandes amigos, Natália Carminatti, Greice Magalhães, Luana Silva, Mayara Closs, Cássia Ribeiro, Mateus Titton, Nathália Galdino, Julia Pazinato, Ícaro Simon, Jenniffer Unfer e Camila Martins pelos inesquecíveis momentos de alegria que passamos juntos.

À Dhébora Sousa, pelo carinho, paciência e incentivo durante a execução deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Luiza e Romildo Polidoro, pela educação e dedicação.

À todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de componentes de incerteza, sua distribuição de probabilidade e seus respectivos divisores.....	34
Tabela 2. Níveis de concentração para a curva analítica.....	43
Tabela 3. Parâmetro de validação <i>versus</i> Critério de aceitação	45
Tabela 4. Linearidade do método de quantificação de 3,3'-diclorobenzidina em água.....	47
Tabela 5. Coeficiente de variação e limites de detecção e quantificação dos extratos de 3,3'-diclorobenzidina.....	48
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da repetitividade do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.....	49
Tabela 7. Resultados obtidos na avaliação da Precisão Intermediária do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.....	50
Tabela 8. Recuperação em três níveis de concentração: 0,030, 0,045 e 0,090 mg L ⁻¹	51
Tabela 9. Fontes de incerteza do Tipo A e do Tipo B.....	54
Tabela 10. Distribuição de probabilidade para cada fonte de incerteza e seu respectivo divisor.....	55
Tabela 11. Coeficientes de sensibilidade para fontes de incerteza provenientes das diluições do padrão em função dos volumes iniciais.....	56
Tabela 12. Coeficientes de sensibilidade para fontes de incerteza provenientes das diluições do padrão em função dos volumes finais.....	56
Tabela 13. Contribuição para a Incerteza da Concentração de 3,3'-diclorobenzidina na Amostra.....	57
Tabela 14. Graus de liberdade referentes às fontes de incerteza.....	58
Tabela 15. Custo de solventes e consumíveis para a análise de 3,3'-diclorobenzidina em uma amostra de água.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da 3,3'-diclorobenzidina.	11
Figura 2. Rota sintética da 3,3'-diclorobenzidina.	11
Figura 3. Esquema simplificado de um cartucho utilizado em SPE.	15
Figura 4. Esquema representativo das etapas de uma SPE.	16
Figura 5. Esquema da estrutura básica de uma câmara de EI ("Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas," [s.d.]).	18
Figura 6. Esquema simplificado do processo de seleção de íons por um sistema Quadrupolar ("Microbial Cell Factories," [s.d.]).	19
Figura 7. Esquema de um espectrômetro de massas operando no modo TIC, com varredura de m/z 50 a 300 (AGILENT, [s.d.]).	19
Figura 8. Esquema de um espectrômetro de massas operando no modo SIM para o íon m/z 285 (AGILENT, [s.d.]).	20
Figura 9. Extração por SPE conduzida em um <i>manifold</i> . Os cartuchos de SPE são colocados em orifícios na parte superior da câmara e, mediante a aplicação de vácuo, o efluente é recolhido por tubos coletores na câmara inferior.	38
Figura 10. Comparação entre os cromatogramas obtidos pela análise do branco e da solução de 3,3'-Diclorobenzidina a $0,12 \text{ mg L}^{-1}$	42
Figura 11. Curva de calibração: variação da área do pico cromatográfico em função da concentração de 3,3'-diclorobenzidina.	43
Figura 12. Cromatogramas obtidos na avaliação da repetitividade do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.	45
Figura 13. Cromatogramas obtidos na avaliação da Precisão Intermediária do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. ESTADO DA ARTE	11
2.1. 3,3'-DICLOROBENZIDINA.....	11
2.1.1. Toxicidade	12
2.2. CORANTES AZÓICOS	13
2.2.1. Tratamento dos Efluentes Industriais.....	13
2.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	14
2.3.1. Extração Líquido-Líquido	14
2.3.2 Extração em fase sólida (SPE)	15
2.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS QUADRUPOLAR	17
2.5. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	20
2.5.1. Parâmetros de Validação.....	21
2.5.1.1. Seletividade	21
2.5.1.2. Linearidade	22
2.5.1.3. Limite de Detecção (LD)	23
2.5.1.4. Limite de Quantificação (LQ)	24
2.5.1.5. Precisão	25
2.5.1.6. Exatidão.....	27
2.5.1.7. Incerteza de Medição (IM) (INMETRO, 2008).....	29
2.5.2. Critérios de Aceitação.....	32
3. SITUAÇÃO ATUAL	33
3.1. PRODUÇÃO MUNDIAL	33
3.2. LEGISLAÇÃO PARA A 3,3'-DICLOROBENZIDINA	33
3.3. LEGISLAÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	33
3.4. DETERMINAÇÃO DE 3,3'-DICLOROBENZIDINA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. OBJETIVO GERAL	35
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5. PROPOSTA TECNOLÓGICA	36
6. METODOLOGIA.....	37

6.1. MATERIAIS E SOLVENTES	37
6.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES	37
6.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	37
6.4. INSTRUMENTAÇÃO	38
6.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	39
6.5.1. Seletividade	39
6.5.2. Linearidade	39
6.5.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	40
6.5.4. Precisão	40
6.5.5. Exatidão	40
6.5.6. Incerteza de Medição (IM)	41
6.5.6. Critérios de Aceitação.....	41
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
7.1. SELETIVIDADE	42
7.2. LINEARIDADE	42
7.3. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	44
7.4. PRECISÃO.....	45
7.4.1. Repetitividade	45
7.4.2. Precisão Intermediária	46
7.5. EXATIDÃO	47
7.6. INCERTEZA DE MEDIÇÃO (IM).....	48
7.6.1. Fontes de Incerteza	48
7.6.2. Incerteza Padrão	50
7.6.3. Coeficientes de Sensibilidade:	51
7.6.4. Contribuição para a Incerteza da Concentração do Analito na Amostra:	53
7.6.5. Incerteza Padrão Combinada:.....	54
7.6.7. Incerteza Expandida:	54
8. CUSTO DA ANÁLISE.....	56
9. CONCLUSÃO.....	57
10. BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DE ABREVIações

CV%	Coeficiente de variação
ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
DPR	Desvio padrão relativo
ECD	Detector por captura de elétrons (do inglês, <i>Electron Capture Detector</i>)
EI	Impacto eletrônico (do inglês, <i>electron impact</i>)
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
FID	Detector por ionização em chama (do inglês, <i>Flame Ionization Detector</i>)
GC/qMS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas Q quadrupolar (do inglês <i>gas chromatography with quadrupole mass spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IM	Incerteza de medição
LQ	Limite de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i>)
LD	Limite de detecção
m/z	Massa/carga
NPD	Detector de nitrogênio e fósforo (do inglês, <i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>)
SIM	Monitoramento de íon selecionado (do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>)
t_R	Tempo de retenção
TIC	Contagem total de íons (do inglês, <i>total ion current</i>)

RESUMO

Este trabalho apresenta a implantação e a validação de uma metodologia analítica para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em amostras de água utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (GC/qMS). O trabalho foi desenvolvido em uma empresa de consultoria ambiental da região metropolitana de Porto Alegre.

A extração do analito foi realizada por Extração em Fase Sólida (SPE), utilizando um cartucho de fase reversa contendo o grupo octadecil, C-18. O extrato obtido foi seco por um fluxo de nitrogênio e ressuspendido em diclorometano, para em seguida ser analisado.

Os parâmetros avaliados no processo de validação foram a linearidade, a seletividade, a exatidão, a precisão, por meio da precisão intermediária e da repetitividade, e os limites de detecção e quantificação do método. Também foi avaliada a incerteza de medição, de forma a verificar a contribuição de diferentes fontes de incerteza.

Na avaliação da seletividade, foi verificado que a matriz não possui substâncias eluindo na região do tempo de retenção da 3,3'-diclorobenzidina, de forma que o método foi considerado seletivo. Na análise da linearidade, foi construída uma curva analítica, utilizando cinco níveis de concentração, variando de 0,03 a 0,12 mg L⁻¹. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9992, demonstrando uma boa linearidade. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,005 e 0,0016 mg L⁻¹, respectivamente, que ficaram de acordo com o limite estipulado pela legislação vigente. Na verificação da precisão intermediária e da repetitividade, foram obtidos coeficientes de variação de 1,8 e 2,36%, respectivamente, ficando de acordo com o critério de aceitação empregado. A recuperação média obtida na análise da exatidão foi de 84,7%, que pode ser considerada satisfatória.

Na estimativa da incerteza de medição, pode-se concluir que a utilização de um padrão de pureza elevada e a utilização de equipamentos volumétricos devidamente calibrados são os pontos críticos de controle durante a execução da metodologia analítica.

1. INTRODUÇÃO

A 3,3'-diclorobenzidina é uma amina aromática sintética, utilizada principalmente como intermediário na preparação de corantes azoicos, utilizados geralmente nas indústrias de couro, papel e têxtil. É considerada potencialmente carcinogênica por diversos órgãos governamentais, estadunidenses e internacionais.

A resolução nº 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005, limita a concentração desse composto em corpos d'água em $0,028 \mu\text{g L}^{-1}$, uma vez que pode ser encontrado em rios nas proximidades de indústrias que utilizam corantes azoicos. Grande parte dessa contaminação é devido às perdas dos corantes dos materiais por falta de fixação.

Diferentes métodos são descritos para analisar a 3,3'-diclorobenzidina e outras aminas aromáticas em água utilizando técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa, empregando geralmente técnicas de extração como a Extração Líquido-Líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*, LLE) e a Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*, SPE). Contudo, para garantir que o método de análise utilizado seja, de fato, adequado para a sua finalidade, realiza-se um processo de validação. Os parâmetros geralmente avaliados são a linearidade, a seletividade, a exatidão, a precisão, por meio da precisão intermediária e da repetitividade, além de serem estipulados os limites de detecção e quantificação do método. Também pode ser avaliada a incerteza de medição, de forma a verificar a contribuição de diferentes fontes de incerteza.

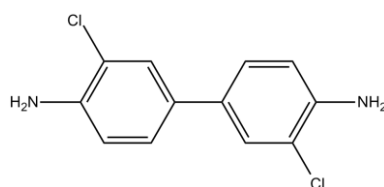
Sendo assim, o objetivo principal desse trabalho foi estudar, implementar e validar uma metodologia analítica para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em amostras de água em uma empresa de consultoria ambiental da região metropolitana de Porto Alegre, uma vez que esta não possui uma metodologia validada de análise de 3,3'-diclorobenzidina em água, visando atender a resolução nº 357 do CONAMA.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. 3,3'-DICLOROBENZIDINA

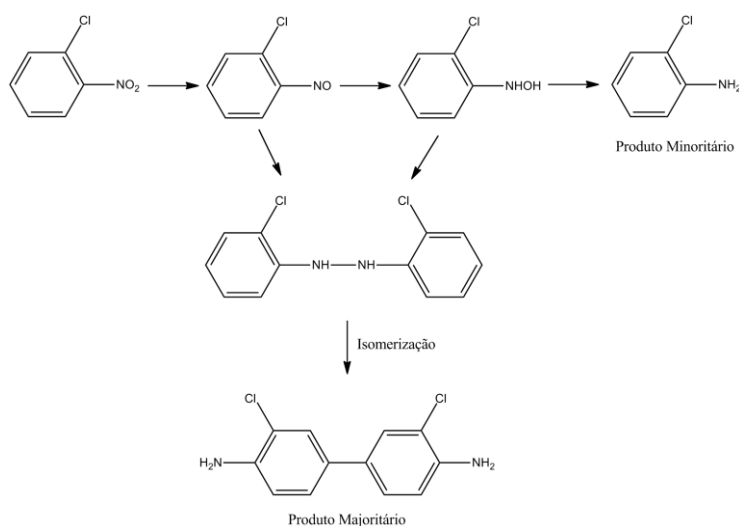
A 3,3'-diclorobenzidina (CAS N^o 91-94-1, **Figura 1**) é uma amina aromática clorada sintética, de fórmula molecular C₁₂H₁₀Cl₂N₂ e peso molecular 253,1 g mol⁻¹, derivada da benzidina. Fisicamente, apresenta-se como um pó cristalino, de coloração roxa acinzentado, de baixa pressão de vapor (4,5 x 10⁻⁹ torr) (ATSDR, 1998).

Figura 1. Fórmula estrutural da 3,3'-diclorobenzidina.



A 3,3'-diclorobenzidina é predominantemente obtida mediante a hidrogenação seletiva do *o*-nitroclorobenzeno, geralmente utilizando paládio como catalisador, que produz a 2,2'-diclorohidrazobenzeno como produto, sendo esta isomerizada na presença de ácidos inorgânicos, formando a 3,3'-diclorobenzidina como produto final (HABIG; BAESSLER; WARNING, 1993; SHEN; LI; CHOI, 2002). As etapas dessa reação podem ser visualizadas na **Figura 2**.

Figura 2. Rota sintética da 3,3'-diclorobenzidina.



Predominantemente, a 3,3'-diclorobenzidina é utilizada na produção de pigmentos amarelos, uma alternativa aos pigmentos a base de cromato de chumbo, empregados na indústria de produção de tinta, papel, borracha, plástico e têxtil (EPA, 1979). A 3,3'-diclorobenzidina também possui aplicações como componente na formulação de plásticos e borrachas, além de poder ser utilizada em testes para verificação de presença de ouro. Outra aplicação é na fabricação da 4-aminobifenila, matéria-prima utilizada na produção de polibenzimidazol (PBI), empregada em vestuários de proteção contra altas temperaturas (ATSDR, 1998).

2.1.1. Toxicidade

A 3,3'-diclorobenzidina é reconhecida por induzir a ocorrência de câncer em animais e é considerada por diversas agências, como a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e o *U.S. Department of Health and Human Services* (DHHS), um composto potencialmente carcinogênico em humanos (ATSDR, 1998). A toxicidade da 3,3'-diclorobenzidina é atribuída a sua desalogenação no sistema digestivo, que resulta na formação da benzidina, composto reconhecido como carcinogênico (NYMAN et al., 1997).

Um estudo preliminar realizado na segunda metade do século passado, na Alemanha, apontou uma grande incidência de câncer na bexiga entre pintores. Na época, havia uma grande produção de corantes à base de aminas aromáticas, como a 3,3'-diclorobenzidina, no país e era uma prática comum entre os pintores alemães prepararem suas próprias tintas, expondo-se ao contato direto com esses compostos (GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). Em outro estudo, trabalhadores expostos à inalação de aminas aromáticas, por um período de 15 anos, foram comparados com homens que nunca foram expostos a esses compostos. O resultado mostrou um aumento significativo de cromossomos que sofreram mutações e, na urina desses homens, foram encontrado 1,8-2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzidina, valor considerado elevado.

O potencial carcinogênico das aminas aromáticas é devido à formação de seus reativos metabólitos eletrófilos, formados no citocromo, onde ocorrem reações com o acetil-CoA, capazes de ligar-se covalentemente ao DNA, gerando o efeito tóxico e possivelmente mutagênico (BENIGNI et al., 2000).

2.2. CORANTES AZÓICOS

A principal aplicação da 3,3'-diclorobenzidina é como intermediário na produção de corantes azoicos. Esses corantes se caracterizam por apresentar um ou mais grupamentos -N=N- ligados no sistema aromático do seu grupo cromóforo (KUNZ et al., 2002).

Aproximadamente, 12% dos corantes se perdem entre os processos de produção e utilização, chegando ao meio ambiente. Os corantes azoicos são degradados na natureza por reações de oxidação, hidrólise, conjugação e redução; sendo a última responsável pela clivagem da ligação azo do corante, produzindo aminas aromáticas, como a 3,3'-diclorobenzidina. (GUARATINI; ZANONI, 2000). Além da toxicidade dos produtos de degradação, os corantes causam alterações em ciclos biológicos que podem afetar principalmente os processos de fotossíntese (KUNZ et al., 2002).

2.2.1. Tratamento dos Efluentes Industriais

As técnicas de tratamento de efluentes das indústrias têxteis baseiam-se em processos de coagulação, seguidas de sedimentação ou flotação. Essas técnicas são eficientes na remoção de material particulado. Contudo a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos mediante esses processos mostram-se deficientes, sendo necessário a sua combinação com o tratamento biológico de lodos ativados, que consiste na agitação do efluente com microrganismos na presença de ar, formando uma grande quantidade de material orgânico. Este processo é relativamente efetivo, conseguindo remover em média 80% das cargas dos corantes. Todavia o processo não é destrutivo, gerando grandes quantidades de lodo cuja disposição permanece sendo um inconveniente (KUNZ et al., 2002).

Uma alternativa a esse processo é o tratamento com ozônio, uma vez que o ozônio é um poderoso agente oxidante. A oxidação dos corantes pode ocorrer por duas vias: direta ou indireta. Na primeira, o ozônio reage com as moléculas orgânicas mediante uma adição eletrofílica. Na via indireta, o agente oxidante é o radical hidroxila, formado da decomposição do ozônio, que reage com as moléculas.

Diversos trabalhos relatam o tratamento desses efluentes por meio da biodegradação dos corantes por clivagem da ligação azo, entretanto poucos sistemas conseguem a eliminação das aminas aromáticas formadas (KUNZ et al., 2002).

2.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Durante a segunda metade do século XX, foi observado um expressivo aumento na demanda por técnicas analíticas mais eficientes, motivado principalmente pela aceleração da industrialização. A preparação dos experimentos, anteriormente realizadas de forma simples, começou a demandar metodologias analíticas mais complexas, necessitando de laboriosos processos de validação, visando à conformidade com as agências de controle da qualidade metrológica. Além disso, a complexidade das amostras a serem analisadas começou a exigir separações preliminares, visando uma diminuição na sua complexidade (LANÇAS, 2003). Sendo assim, o sucesso na detecção, identificação e quantificação dos analitos, é dependente do método de extração e concentração dessas substâncias (BIZIUK; PRZYJAZNY, 1996).

2.3.1. Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido (do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes imiscíveis. Em uma amostra ambiental, geralmente os analitos e os demais compostos (interferentes) encontram-se em uma matriz aquosa (refinato), que é colocada em um funil de separação e, em seguida, é adicionado um solvente orgânico imiscível em água (extrator), formando uma mistura heterogênea. O sistema é agitado, de forma a promover um maior contato entre as fases. Em uma situação ideal, o analito presente na fase aquosa é transferido para a fase orgânica, enquanto que os interferentes permanecem na fase aquosa (LANÇAS, 2004; MILLER, 1975).

Embora a LLE apresente eficientes resultados, trata-se de uma técnica relativamente demorada, uma vez que frequentemente ocorre a formação de emulsões. Além disso, a técnica utiliza uma grande quantidade de solventes orgânicos, expondo o analista ao contato com essas substâncias, além de implicar no

descarte de grandes volumes desses solventes (LANÇAS, 2003; SANTANA et al., 2009).

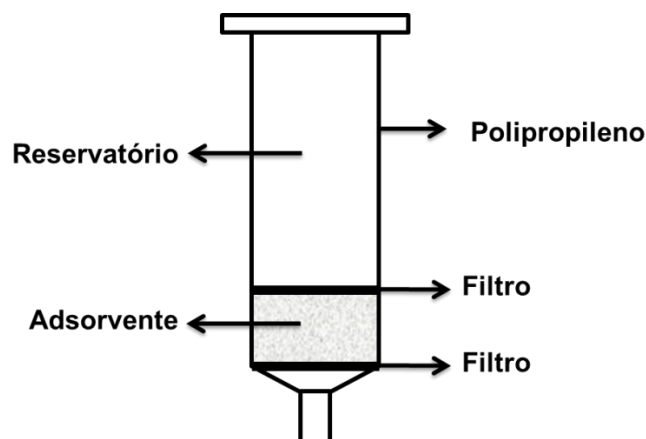
2.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

O método de extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*, SPE) vem se tornando bastante popular em análises de amostras ambientais a nível de traço, uma vez que permite uma pré-concentração dos analitos com alta eficiência (FRITZ; MACKA, 2000). A SPE tem sido utilizada principalmente devido à sua simplicidade, o pequeno volume de solvente utilizado e à facilidade de automação em relação à extração líquido-líquido (JIMÉNEZ et al., 1997).

Este método baseia-se no mecanismo de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica (LANÇAS et al., 1997), onde a interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição. Analitos polares e moderadamente polares são extraídos da amostra por adsorventes polares (fase normal), modificados com grupamentos ciano, diol ou amino, enquanto que analitos apolares ou moderadamente polares são extraídos de soluções polares por adsorventes não polares (fase reversa), modificados com grupos octadecil-, octil-, ciclohexil- ou fenóis (TEKEL; HATRIK, 1996).

Na realização do experimento, utiliza-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, no qual contém a fase sólida (fase estacionária) apropriada (**Figura 3**).

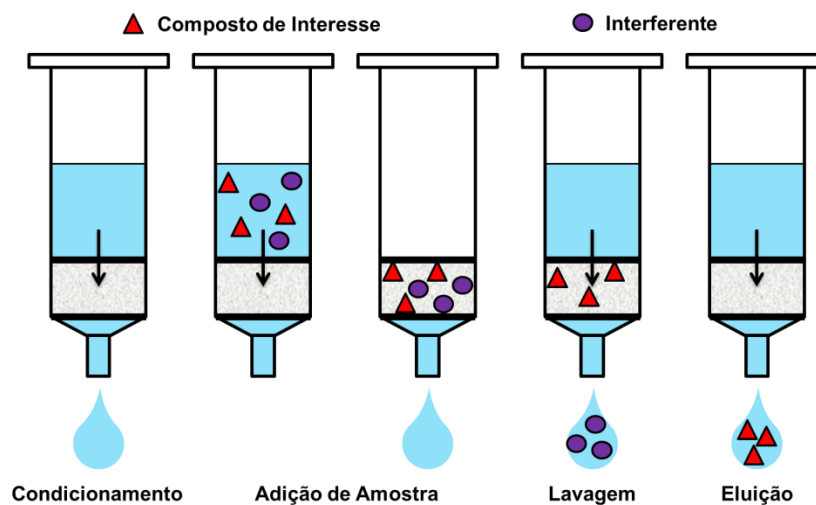
Figura 3. Esquema simplificado de um cartucho utilizado em SPE.



As etapas de uma SPE (**Figura 4**) são descritas a seguir:

- 1. Condicionamento:** percola-se uma pequena quantidade de solvente pela coluna, visando assegurar que o adsorvente tenha o máximo de contato possível com a fase líquida. Quando o adsorvente for hidrofóbico, percola-se uma pequena quantidade de solvente orgânico pelo cartucho (solvente de ativação), sendo, em seguida, retirado com água, de forma a obter um meio apropriado para a adição da amostra (MCDOWALL; PEARCE; MURKITT, 1986).
- 2. Adição de amostra:** é aplicado um volume de amostra adequado ao tipo e quantidade da substância adsorvente (NIELEN; BRINKMAN; FREI, 1985).
- 3. Lavagem:** É realizada uma lavagem do cartucho, de forma a remover os interferentes da amostra, podendo ser feita com água ou um solvente orgânico apropriado. A seguir, realiza-se a remoção do solvente, para facilitar a dessorção dos analitos, podendo ser realizada por um fluxo de ar ou de nitrogênio (NOROOZIAN et al., 1987; RICHARD; JUNK, 1986).
- 4. Eluição:** Os analitos de interesse são retirados da fase estacionária por um solvente adequado. Preferencialmente, deve ser usado um solvente que não remova os componentes da matriz. Dessa forma, o eluato é coletado para posterior análise (BERRUETA; GALLO; VICENTE, 1995).

Figura 4. Esquema representativo das etapas de uma SPE.



2.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS QUADRUPOLAR

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de uma mistura, transportados por uma fase móvel, a partir das diferentes interações dos analitos com uma fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG; HOLLE; CROUCH, 2009). Durante a passagem dos analitos através da fase estacionária, ocorrem repetidos processos de sorção e dessorção, havendo a separação em decorrência das diferenças entre os coeficientes de distribuição de cada analito presente na amostra (NIESSEN; GREEF, 1992). Dessa forma, compostos que apresentam uma maior interação com a fase estacionária tem a sua mobilidade diminuída durante o fluxo da fase móvel e, em contrapartida, compostos com menor interação percorrem a fase estacionária mais rapidamente, ocorrendo assim a separação dos compostos em bandas discretas (SKOOG; HOLLE; CROUCH, 2009).

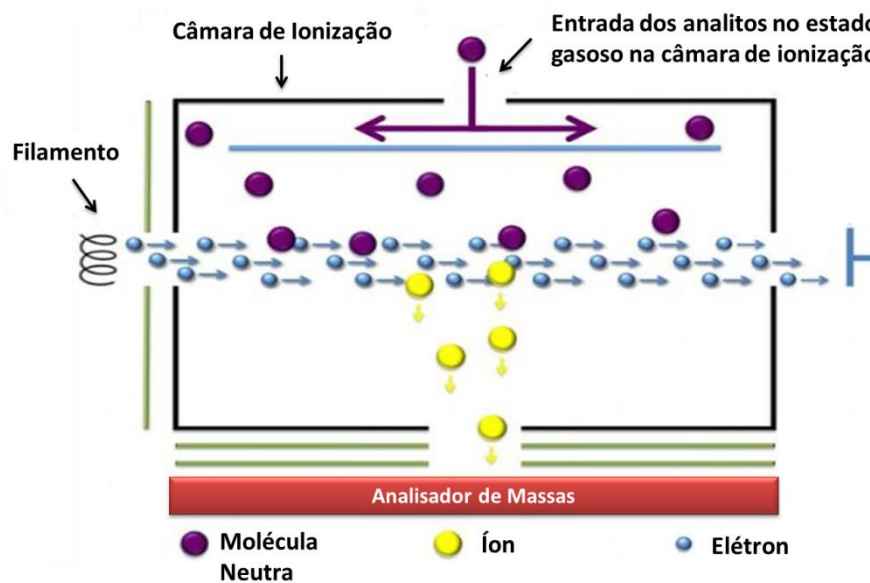
A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography mass spectrometry*, GC/MS) consta de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas adaptado para análise de picos cromatográficos. A GC/MS é atualmente a técnica mais comumente empregada na análise de poluentes orgânicos voláteis e semi-voláteis em amostras ambientais. Esse elevado número de aplicações é devido a sua eficiência na separação cromatográfica, alta sensibilidade e seletividade. Além disso, a técnica possibilita a realização de análises tanto quantitativas, quanto qualitativas, permitindo a identificação de uma série de compostos mediante a comparação dos espectros de massas gerados com uma biblioteca de espectros. (HARRIS, 2005; LANÇAS, 1993; SANTOS; GALCERAN, 2003).

Várias técnicas de ionização são utilizadas na GC/MS, sendo as mais comuns a ionização por impacto eletrônico (do inglês, *electron impact*, EI) e a ionização química. A ionização por EI é a mais utilizada, devido à alta reprodutibilidade dos espectros de massas, que permite a utilização de bibliotecas para a identificação dos analitos (LANÇAS, 1993; SANTOS; GALCERAN, 2003).

Na ionização por EI, os analitos no estado gasoso que eluem da coluna entram em uma câmara de ionização (**Figura 5**), onde sofrerá a colisão com um feixe de elétrons com uma energia geralmente de 70 eV. Em um primeiro momento ocorre a

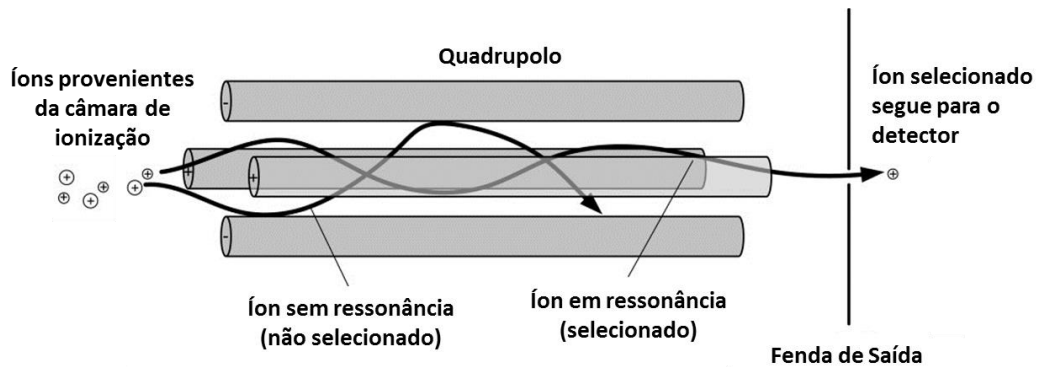
formação de íons moleculares (M^+), muito destes apresentando um excesso de energia, que é dissipada com a quebra de ligações, gerando fragmentos que podem ser cátions, ânions, radicais livres e neutros. Entretanto, apenas os íons positivos são direcionados para o analisador de massas (LANÇAS, 1993; SANTOS; GALCERAN, 2003).

Figura 5. Esquema da estrutura básica de uma câmara de EI (“Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas,” [s.d.]).



O analisador de massas pode ser quadrupolar, *ion trap*, setor magnético ou TOF (do inglês, *time of flight*). A Espectrometria de Massas Quadrupolar (do inglês, *quadrupole mass spectrometry*, qMS) é a mais utilizada, uma vez que o analisador é mais compacto, de menor custo e de fácil operação. O quadrupolo, considerado um filtro de massas, consta de quatro hastes hiperbólicas dispostas paralelamente em uma matriz radial nas quais é aplicado um campo elétrico. De acordo com esse campo, apenas íons com determinada relação massa/carga (m/z) entrarão em ressonância, passando incólumes, sem colidir com o quadrupolo. Por fim, os íons selecionados chegam até o detector, uma eletromultiplicadora, que consiste em um sistema de detecção de íons. Dessa forma, obtêm-se como resultado um espectro de massas típico do composto a ser analisado (SANTOS; GALCERAN, 2003). Uma representação simplificada desse processo pode ser visualizada na **Figura 6**.

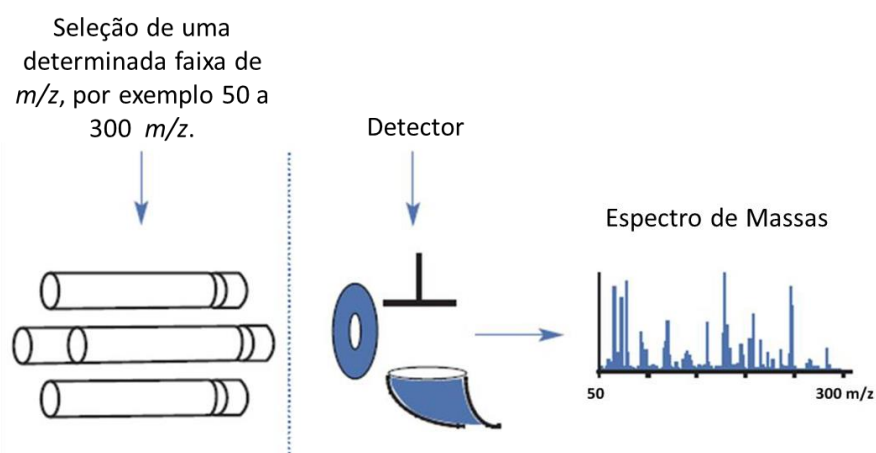
Figura 6. Esquema simplificado do processo de seleção de íons por um sistema Quadrupolar (“Microbial Cell Factories,” [s.d.]).



O modo escolhido para aquisição de dados na GC/qMS está diretamente relacionado à seletividade e sensibilidade do método. Os modo de contagem total de íons (do inglês, *total ion current*, TIC) e monitoramento de íon selecionado (do inglês, *Selected Ion Monitoring*, SIM) são descritos a seguir (ROBINSON; FRAME; FRAME, 2005):

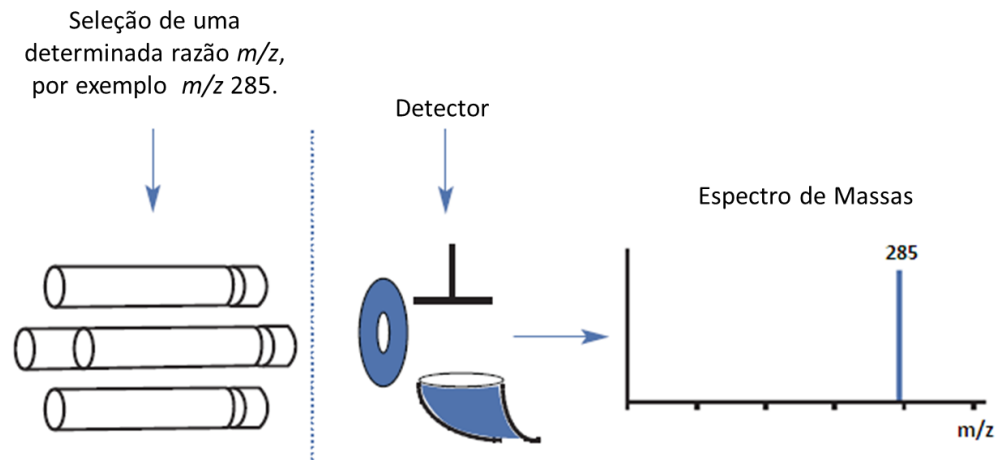
- **TIC:** varredura completa de todos os íons formados na ionização durante todo o tempo de aquisição, dentro da faixa de m/z estipulada (**Figura 7**) (ROBINSON; FRAME; FRAME, 2005).

Figura 7. Esquema de um espectrômetro de massas operando no modo TIC, com varredura de m/z 50 a 300 (AGILENT, [s.d.]).



- **SIM:** são selecionados íons, em determinados tempos de aquisição, coincidentes com os analitos de interesse (**Figura 8**) (ROBINSON; FRAME; FRAME, 2005).

Figura 8. Esquema de um espectrômetro de massas operando no modo SIM para o íon m/z 285 (AGILENT, [s.d.]).



O modo SIM eleva a sensibilidade da análise, quando comparado ao modo TIC, uma vez que aumenta o número de íons de interesse selecionados pelo quadrupolo, devido ao conseqüente aumento na velocidade de aquisição de dados, permitindo que o pico cromatográfico seja definido e integrado utilizando mais pontos. Dessa forma, o modo SIM apresenta limites de detecção (referentes à injeção de 1 μL de amostra) que variam de 0,01 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que o modo TIC apresenta valores entre 0,1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ROBINSON; FRAME; FRAME, 2005).

2.5. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Para garantir que uma determinada metodologia analítica forneça informações confiáveis e válidas sobre as amostras analisadas, ela deve sofrer uma avaliação denominada validação (NBR ISO/IEC 17025, 2005).

Segundo a NBR ISO/IEC 17025, a validação é a comprovação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos para um determinado uso são atendidos, ou seja, consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (NBR ISO/IEC 17025, 2005). Para a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003). A *Eurachem Working Group* traz que a validação de uma metodologia é o processo de definir uma exigência analítica, e confirmar que a metodologia em consideração apresenta capacidade de desempenho consistente

com a aplicação pretendida (EURACHEM WORKING GROUP, 1998). Por sua vez, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define que validação analítica é a garantia de que o procedimento analítico em questão dará resultados reprodutíveis e confiáveis para a proposta pretendida (WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS, 1992).

2.5.1. Parâmetros de Validação

Os parâmetros geralmente verificados na validação de métodos cromatográficos são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e incerteza de medição. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho, ou ainda como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004).

2.5.1.1. Seletividade

A seletividade de um método cromatográfico é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, os analitos de interesse na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra. Um método seletivo garante que o pico cromatográfico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 1999; VESSMAN et al., 2001). A avaliação da seletividade é a primeira etapa na validação de um método cromatográfico, uma vez que, se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas.

Uma forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz fortificada com esta substância (padrão). Para um método ser considerado seletivo, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito, que deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING, 1995; ICH, 1995; SHABIR, 2003).

2.5.1.2. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de uma metodologia analítica fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, sendo obtida por padronização interna ou externa (ICH, 1995; UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 1999).

A correlação entre a área do pico e a concentração da espécie a ser quantificada raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva de calibração*. Para a construção de uma curva de calibração, sugere-se a utilização de, no mínimo, cinco níveis de concentração que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A fórmula matemática que relaciona as duas variáveis, concentração versus resposta é a equação da reta:

$$y = a \cdot x + b \quad [1]$$

Onde:

y : concentração do parâmetro no extrato

a : coeficiente angular da reta, obtido pela curva de calibração

x : área obtida pelo cromatógrafo

b : coeficiente linear da reta, obtido pela curva de calibração

A estimativa dos coeficientes de uma curva de calibração a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO; DE ANDRADE; AUGUSTO, 1997). Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r) (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de

correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (GREEN, 1996; JENKE, 1998; SHABIR, 2003). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

2.5.1.3. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1995; INMETRO, 2011).

O LD pode ser determinado por diferentes maneiras. Algumas metodologias aceitas e descritas em guias de validação internacionais e nacionais são o método visual, o método da razão sinal-ruído e o método baseado no menor nível da curva de calibração (ICH, 2005; INMETRO, 2011; US-FDA, 1994, 1995).

Método Visual

Utilizado para determinar o LD mediante a adição de concentrações conhecidas do analito na matriz, de forma que se possa estabelecer o menor nível de concentração em que se possa distinguir entre o ruído e o sinal analítico (ICH, 2005; US-FDA, 1994, 1995).

Método da razão sinal-ruído

Esse método é aplicado somente para procedimentos analíticos que exibem ruído da linha de base. Para a determinação da razão sinal-ruído, é realizada a comparação entre a medição dos sinais de amostras contendo baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse). Dessa forma, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada. Razões sinal-ruído de 3:1 ou 2:1 são geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (GARP, 1999; ICH, 2005; US-FDA, 1994, 1995).

Método baseado no menor nível da curva de calibração

O LD pode ser calculado por meio dos desvios padrão obtidos na análise de replicatas da amostra fortificada com a concentração do nível mais baixo da curva de calibração. O LD pode ser expresso como:

$$LD = t_{(n-1)} \cdot S \quad [2]$$

onde S é o desvio padrão amostral das replicatas das amostras fortificadas e $t_{(n-1)}$ é o valor da distribuição de Student para n replicatas e $(n - 1)$ graus de liberdade.

O INMETRO recomenda um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD. Neste caso, ao se analisar 7 alíquotas, têm-se $7-1 = 6$ graus de liberdade. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99% de confiança é 3,143. Logo o LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral (INMETRO, 2011).

2.5.1.4. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1995; INMETRO, 2011).

Assim como o LD, o LQ pode ser determinado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou o método baseado no menor nível da curva de calibração.

Método Visual

Utilizado para determinar o LQ mediante a adição de concentrações conhecidas do analito na matriz, de forma que se possa estabelecer o menor nível de concentração em que se possa quantificá-lo com precisão e exatidão aceitáveis. (ICH, 2005; US-FDA, 1994, 1995).

Método da razão sinal-ruído

A razão sinal-ruído é obtida a partir da comparação das medidas de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz com

medidas de amostras do branco, até que se encontre a concentração mínima que ofereça uma razão sinal-ruído de 10:1. (GARP, 1999; ICH, 2005; US-FDA, 1994, 1995).

Método baseado no menor nível da curva de calibração

O LQ pode ser calculado por meio do desvio padrão obtido na análise de replicatas da amostra fortificada com a concentração do nível mais baixo da curva de calibração. O LQ pode ser expresso como:

$$LQ = 10 \cdot S \quad [3]$$

Onde S é o desvio padrão amostral das replicatas das amostras fortificadas (INMETRO, 2011).

2.5.1.5. Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é geralmente expressa pela estimativa do desvio padrão (S) ou pelo Desvio Padrão Relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%) (INMETRO, 2011).

$$\text{Desvio padrão: } s(x_k) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad [4]$$

$$\text{Coeficiente de variação: } CV\% = \frac{(S \times 100)}{\bar{X}} \quad [5]$$

Onde:

S : desvio padrão

X_i : valor individual de uma medição

\bar{X} : média aritmética de um pequeno número de determinações

n : número de medições

Geralmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV% de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV% de até 20% (HUBER, 1999).

A precisão é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade ou repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária.

Repetitividade

Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento; mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2011).

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa mediante a estimativa do CV%. O INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo do CV% (INMETRO, 2011).

Precisão intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Logo, o objetivo da avaliação da precisão intermediária é verificar se, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação para o cálculo de repetitividade (ICH, 1995; INMETRO, 2011).

Reprodutibilidade

É a concordância entre os resultados nas análises de uma mesma amostra, efetuadas em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos (ANVISA, 2003). Esse parâmetro não é avaliado quando o método é utilizado em um único laboratório (INMETRO, 2011).

2.5.1.6. Exatidão

Representa o grau de proximidade entre os resultados encontrados em um determinado ensaio e o valor verdadeiro (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). Contudo, o valor verdadeiro é uma medida obtida em uma análise perfeita, sendo este valor impossível de se obter. Logo, o valor verdadeiro é aquele estimado e convencionalmente aceito como verdadeiro (INMETRO, 2011).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

Materiais de referência certificados

Os materiais de referência certificados são padrões acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada.

Para verificar a exatidão do método, são comparados os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão) na análise de uma série de replicatas da amostra fortificada com os valores certificados do material de referência.

Comparação de métodos

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método a ser validado e os resultados encontrados mediante um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida.

As análises são realizadas em replicatas, utilizando os dois métodos separadamente (o método em validação e o método de referência), sobre as mesmas amostras, na faixa de concentrações nas quais se pretende validar o método (RIBANI et al., 2004).

Ensaio de recuperação

A recuperação (Rec) é definida como a proporção da quantidade de analito, presente ou adicionada na matriz do material de teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A recuperação pode ser estimada de materiais de referência certificados, quando disponíveis, ou de um composto substituto (“*surrogate*”), que é definido como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste, cujo comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2001). Os compostos substitutos, adicionados nas amostras, podem ser de vários tipos:

- Padrão da substância adicionado à matriz isenta da substância ou à amostra (fortificação, incorporação, dopagem, enriquecimento, termos provenientes do inglês “*spiking*”);
- Uma versão da substância modificada isotopicamente;
- Composto quimicamente diferente do analito, mas representativo de seu comportamento. Algumas vezes este composto é denominado padrão interno (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2001; LEITE, 2002).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Geralmente, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir consideravelmente a altas e baixas concentrações. Sendo assim, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser realizado adicionando a substância em pelo menos três diferentes níveis de concentração, por exemplo, próximo ao LQ, próximo à concentração máxima permitida pelo método em validação e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

As medições de recuperação são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios (BURNS; DANZER; TOWNSHEND, 2002). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999).

Adição padrão

Este método é aplicado quando em casos em que é difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. No método de adição padrão, quantidades conhecidas do analito são adicionadas em diferentes níveis na matriz da amostra, antes do preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância (DE ANDRADE, 1987). Geralmente, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, [s.d.]). A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada.

2.5.1.7. Incerteza de Medição (IM) (INMETRO, 2008)

A incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. Mesmo quando todas as componentes de erro conhecidas ou suspeitas foram avaliadas e as devidas correções forem tomadas, ainda assim permanece uma incerteza acerca da correção do resultado declarado, ou seja, uma dúvida acerca de quão bem o resultado de uma medição representa o valor da grandeza que foi medida. Logo é necessário, caracterizar a qualidade do resultado de medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza.

A primeira etapa para o cálculo da IM é definir as Fontes de Incertezas. Para tanto, é necessário realizar uma análise crítica, a fim de identificar todas as componentes de incerteza, tais como os erros atrelados à diluição e concentração da amostra e os desvios obtidos na avaliação da precisão.

O próximo passo é estabelecer o modelo matemático que descreve a variável associada a cada componente de incerteza, ou seja, descrever a função $y = f(x_i)$.

Em seguida, deve-se realizar a determinação da incerteza padrão, $u(x_i)$ (incerteza do resultado de uma medição expressa como um desvio padrão), associada aos componentes de incerteza, que é avaliada de acordo com os métodos de avaliação do **Tipo A** ou do **Tipo B**.

A **avaliação do Tipo A da incerteza padrão** é o método de avaliação pela análise estatística de uma série de observações. Nesse caso, a incerteza padrão é o desvio padrão experimental da média, $s(\bar{x})$, que se obtém de um procedimento de cálculo da média aritmética ou de uma análise de regressão adequada.

$$s(\bar{x}) = \frac{s(x_k)}{\sqrt{n}} \quad [6]$$

A **avaliação do Tipo B da incerteza padrão** é o método de avaliação por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações. Nesse caso, a avaliação da incerteza padrão é baseada em algum outro conhecimento científico, tais como dados de medições prévias, experiência ou conhecimento geral do comportamento e das propriedades de materiais e instrumentos relevantes, especificações do fabricante, dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados, além de incertezas atribuídas a dados de referência extraídos de manuais.

A incerteza padrão é obtida dividindo-se os componentes de incerteza por um número associado com a distribuição de probabilidade assumida. Os divisores para as distribuições comumente encontrados podem ser visualizados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Tipos de componentes de incerteza, sua distribuição de probabilidade e seus respectivos divisores (INMETRO, 2008).

Distribuição	Tipo de Componente de Incerteza	Divisor	Graus de Liberdade
	-Incertezas herdadas	k	v_{eff}
<i>t-Student</i>	- Desvio padrão experimental da média	\sqrt{n}	$n - 1$
	- Desvio padrão de R&R	1	$n - 1$
Retangular	- Erros e resolução	$\sqrt{3}$	Infinitos
Triangular	-Erros de posicionamento	$\sqrt{6}$	Infinitos
Forma de U	-Variações extremas	$\sqrt{2}$	Infinitos

A próxima etapa é o cálculo dos coeficientes de sensibilidade (c_i), que servirão como fatores de conversão de unidades de medida, convertendo a incerteza padrão

de cada variável, $u(x_i)$, para a mesma unidade de medida de $f(x_i)$. Os coeficientes de sensibilidade são calculados mediante as derivadas parciais de $f(x_i)$ em relação a cada variável x :

$$c_i = \frac{\partial f(x_i)}{\partial x_i} \quad [7]$$

O produto entre a incerteza padrão, $u(x_i)$, e seu respectivo coeficiente de sensibilidade, dá origem a chamada contribuição de incerteza, $u_i(y)$, que corresponde a uma medida de dispersão equivalente a um desvio padrão, com a mesma unidade de medida do mensurando y .

$$u_i = c_i \cdot u(x_i) \quad [8]$$

Em seguida, as contribuições de incerteza devem ser combinadas para produzir um valor total de incerteza denominado incerteza padrão combinada, representada por $u_c(y)$. A incerteza padrão combinada é expressa pela raiz quadrada positiva da soma quadrática das contribuições de incerteza:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N u_i^2(y)} \quad [9]$$

A última etapa no cálculo da incerteza é determinação da incerteza expandida, U , que é definida como um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. Contudo, é necessário primeiramente identificar os graus de liberdade (ν_i) para cada um dos componentes da incerteza.

Na estatística, em geral, o grau de liberdade é $(n-1)$, ou seja, o número total de medições menos um. Entretanto, em cálculos de incerteza, existem componentes que não são avaliados por meio de uma análise estatística, tornando-se necessário utilizar um conceito mais genérico para o grau de liberdade. Sendo assim, considera-se que o grau de liberdade em IM quantifica a credibilidade sobre cada componente da incerteza. Logo, um alto grau de credibilidade implica em um alto grau de liberdade. Dessa forma, para distribuições de probabilidade retangulares e triangulares, o grau de liberdade é sempre infinito, pois se sabe com 100% de confiança que o valor da

variável estará contido nos valores máximos e mínimos de variação ($\pm a$). O grau de liberdade associado ao mensurando y , chamado de grau de liberdade efetivo, v_{eff} , pode ser estimado por meio da fórmula de *Welch-Satterthwaite*:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad [10]$$

Em seguida, podemos obter o fator de abrangência, k_p , sendo p um dado nível de confiança (geralmente 95,45 %), considerando a distribuição- t e tomando $k_p = t_p(v_{eff})$.

Por fim, para calcular a incerteza expandida, deve-se multiplicar o valor da incerteza combinada pelo fator k :

$$U = k \cdot u_c(y) \quad [11]$$

O resultado de uma medição deve ser reportado na forma $y \pm U$.

O INMETRO recomenda que a incerteza expandida seja arredondada para, no máximo, dois algarismos significativos (INMETRO, 2008).

2.5.2. Critérios de Aceitação

Os critérios de aceitação são definidos a partir da legislação vigente dentro do território nacional. Caso não haja nenhuma que tenha abrangência na quantificação do analito em estudo, podem-se usar organizações internacionais como guia, podendo ser estipulados dentro da empresa que usará o método em seu controle de qualidade. Podem-se escolher ainda alguns testes estatísticos para ajudar na avaliação.

3. SITUAÇÃO ATUAL

3.1. PRODUÇÃO MUNDIAL

Em uma análise realizada em 2009, foi demonstrado que havia somente um fabricante de 3,3'-diclorobenzidina na Europa, contudo empresas que produzem o seu sal totalizaram 10 fabricantes, sendo uma na Europa, uma na China, duas na Ásia, e seis na Índia, contando com um total de 14 fornecedores internacionais (REPORT ON CARCINOGENS, 2011).

3.2. LEGISLAÇÃO PARA A 3,3'-DICLOROBENZIDINA

O Conselho Nacional do Meio-Ambiente (CONAMA), por meio da resolução nº 357, de 17 de março de 2005, determina os limites para a quantidade de 3,3'-diclorobenzidina em água. Para tanto, o CONAMA utiliza a seguinte classificação para os corpos de água:

- Águas doces: águas com salinidade igual ou inferior a 0,5 %;
- Águas salobras: águas com salinidade superior a 0,5 % e inferior a 30 %;
- Águas salinas: águas com salinidade igual ou superior a 30 %.

Dessa forma, o limite estabelecido para a 3,3'-diclorobenzidina é de 0,028 µg/L em águas doces, salobras e salinas, onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo.

3.3. LEGISLAÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Ainda que não exista uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional de validação de metodologias analíticas para técnicas cromatográficas, existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a sua realização. Dessa forma, para demonstrar sua competência técnica, os laboratórios de análise devem submeter-se a um credenciamento de um órgão vigente.

No Brasil, há duas agências credenciadoras, que verificam a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO. Estes órgãos disponibilizam guias

para o procedimento de validação: a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho/2011 (INMETRO, 2011). No âmbito internacional, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) redigiu um guia para validação de métodos analíticos, atualmente utilizado pela ISO (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Sendo assim, órgãos como ANVISA e INMETRO exigem a validação como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica.

3.4. DETERMINAÇÃO DE 3,3'-DICLOROBENZIDINA

Atualmente, diversos trabalhos obtiveram baixos limites de detecção na análise de aminas aromáticas. As técnicas mais utilizadas nesses trabalhos são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e a cromatografia gasosa.

Em um trabalho recente, Lizier, T. M. e Zanoni, M. V. B., utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico (do inglês, *Electrochemical Detector*, ED) na determinação de aminas aromáticas, obtiveram um LOD de 21 ng L⁻¹ (LIZIER; ZANONI, 2012). Ainda empregando HPLC-ED, Vera-Avila *et al.*, utilizando SPE na extração da 3,3'-diclorobenzidina, obteve um LOD de 50 ng L⁻¹, com uma recuperação na ordem de 90% (VERA-AVILA; GARCÍA-AC; COVARRUBIAS-HERRERA, 2001). Já Bacaloni *et al.*, utilizando HPLC acoplada a um espectrômetro de massas e SPE como método de extração, obteve um LOQ de 4 ng L⁻¹, com uma recuperação de 83% para a 3,3'-diclorobenzidina (BACALONI *et al.*, 2007).

Utilizando GC/qMS na determinação de 3,3'-diclorobenzidina e LLE como método de extração, Shin, H. e Ahn, H. obtiveram um LOD de 0,02 ng mL⁻¹, com uma recuperação de 103% (SHIN; AHN, 2006). Lee, H. B. *et al.*, empregando GC/qMS na análise de efluentes industriais e SPE na extração, obtiveram um LOD de 0,01 ng L⁻¹ e recuperações acima de 90% para a 3,3'-diclorobenzidina (LEE *et al.*, 2004).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivo geral a validação de uma metodologia para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em água doce, salina e salobra, previstos na resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio-Ambiente (CONAMA), de 17 de março de 2005 por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em uma empresa de consultoria ambiental da região metropolitana de Porto Alegre.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Adicionalmente, os seguintes objetivos específicos podem ser citados:

- Estudar e implementar um método cromatográfico para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina
- Utilizar um método de SPE na etapa de pré-concentração da amostra;
- Definir parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- Definir experimentos de validação;
- Realizar os experimentos de validação.

5. PROPOSTA TECNOLÓGICA

A proposta tecnológica desse trabalho é implantar e validar uma metodologia de análise para a 3,3'-diclorobenzidina em água em uma empresa de consultoria ambiental da região metropolitana de Porto Alegre, visando à conformidade com a ISO/IEC 17025:2005. Uma vez que a empresa não possui uma metodologia validada de análise de 3,3'-diclorobenzidina em água, este trabalho visa auxiliar a empresa a ampliar seu escopo de análises. Além disso, esse trabalho é uma ação corretiva para eliminar uma inconformidade observada na empresa na última auditoria realizada pelo INMETRO.

Embora um método de extração líquido-líquido seja eficiente na extração de 3,3'-diclorobenzidina em água e atenda as necessidades da empresa, a escolha da SPE como método de extração do analito é justificada pela sua simplicidade e o pequeno volume de solvente necessário para a sua execução, minimizando os custos da análise e seu impacto ambiental. Além disso, a SPE já é utilizada como método de extração de organoclorados na empresa.

A decisão por um método de análise envolvendo GC/qMS, operando no modo SIM, é justificada pela sua alta seletividade e sensibilidade, imprescindíveis para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina a uma concentração que atenda a resolução nº 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005.

6. METODOLOGIA

6.1. MATERIAIS E SOLVENTES

Os solventes empregados nas extrações e análises cromatográficas foram acetonitrila, diclorometano e metanol, grau HPLC ou equivalente da Tedia. A água utilizada foi tratada pelo sistema Milli-Q da Millipore.

O cartucho utilizado na SPE foi adquirido da Chromabond, de fase RP-18 (fase reversa contendo o grupo octadecil, C-18, quimicamente ligado à sílica).

O gás hélio empregado nas análises cromatográficas (pureza superior a 99,999%) e o gás nitrogênio (pureza entre 97 e 99,999%) utilizado no processo de evaporação dos solventes das amostras foram adquiridos da Air Liquide.

O padrão de 3,3'-diclorobenzidina, com grau de pureza acima de 99,5%, foi adquirido da SPEX CertiPrep.

6.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES

Foi preparada uma solução estoque de 3,3'-diclorobenzidina em metanol, na concentração de 10 mg L⁻¹. A validade dessa solução é de aproximadamente 6 meses. Em seguida, a partir dessa solução estoque, foi preparada uma solução na concentração de 1 mg L⁻¹ em diclorometano, da qual foram preparadas as soluções usadas para a construção da curva de calibração e para a fortificação da matriz. As concentrações e os solventes foram estabelecidos com base na experiência do próprio laboratório.

6.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Inicialmente, os cartuchos foram acondicionados com 10 mL de acetonitrila, seguido da adição de 10 mL de água. Logo após o acondicionamento, foram adicionados 1000 mL da solução aquosa de 3,3'-diclorobenzidina e, em seguida, foi realizada a lavagem com 2 mL de água ultrapura. O cartucho foi seco por um período de 30 minutos e então foi feita a eluição passando duas alíquotas de 5 mL de

acetonitrila. Por fim, o extrato obtido foi seco sob um fluxo de N_2 e ressuspenso com 1 mL de diclorometano (ARRUDA, 2008). O processo de extração pode ser visualizado na **Figura 9**. Os extratos obtidos foram filtrados e transferidos com uma seringa para vials posteriormente analisadas por GC/qMS.

Figura 9. Extração por SPE conduzida em um *manifold*. Os cartuchos de SPE são colocados em orifícios na parte superior da câmara e, mediante a aplicação de vácuo, o efluente é recolhido por tubos coletores na câmara inferior.



6.4. INSTRUMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC 2010, acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar, marca Shimadzu, modelo QP2010-Plus. Foi utilizada uma coluna capilar ZB-5 (fase estacionária contendo 95% de dimetil polisiloxano e 5% de grupamentos fenila), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com um fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram mantidas a 310 $^{\circ}\text{C}$. O tipo de ionização empregado foi por Impacto Eletrônico (EI), operando a uma energia de 70 eV. O modo de análise adotado foi o de monitoramento de íon selecionado (SIM), selecionando os íons de m/z de 252 e 254 Daltons. O volume de injeção foi de 1 μL no modo *splitless*. A temperatura inicial do forno foi de 150 $^{\circ}\text{C}$ com taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 260 $^{\circ}\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 1,5 min. Em seguida, a temperatura foi elevada a 280 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,

onde permaneceu por 1 min. Para o tratamento dos dados, foi utilizado o *software* GCMS Solutions 2.6.

6.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia de validação utilizada foi baseada no documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho/2011, e os parâmetros e a estratégia utilizada estão descritos logo a seguir:

6.5.1. Seletividade

Para a verificação da seletividade, foram comparados o cromatograma obtido pela análise do branco, preparado a partir da extração da matriz sem a adição do padrão, com o obtido pela análise da matriz fortificada com o padrão de referência de 3,3'-diclorobenzidina.

6.5.2. Linearidade

Para comprovar a linearidade do método, foi construída uma curva de calibração. As soluções utilizadas na construção da curva foram preparadas em diclorometano, em cinco níveis de concentração, variando entre 0,03 a 0,12 mg L⁻¹ (**Tabela 2**). Cada ponto da curva analítica foi analisado em duplicata e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear.

Tabela 2. Níveis de concentração para a curva analítica.

Nível	Concentração (mg L ⁻¹)
1	0,030
2	0,045
3	0,060
4	0,090
5	0,120

6.5.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Para a determinação do LD e do LQ, foram analisadas 7 réplicas da amostra fortificada com a concentração do nível mais baixo da curva de calibração (0,03 mg L⁻¹). Dessa forma, o LD e o LQ podem ser expressos por meio das equações [2] e [3].

$$LD = t_{(n-1)} \cdot S \quad [2]$$

$$LQ = 10 \cdot S \quad [3]$$

onde S é o desvio padrão amostral das replicatas das amostras fortificadas e $t_{(n-1)}$ é o valor da distribuição de Student para n replicatas e (n-1) graus de liberdade.

6.5.4. Precisão

A precisão foi avaliada de duas formas: repetitividade e precisão intermediária. Para a avaliação da repetitividade foram preparadas sete amostras fortificadas com o padrão de referência na concentração do segundo nível da curva de calibração (0,045 mg L⁻¹), sendo essas analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de sete amostras fortificadas com o padrão de referência na concentração do segundo nível da curva de calibração (0,045 mg L⁻¹), sendo essas preparadas e analisadas no dia seguinte à preparação e análise das replicatas referentes a avaliação da repetitividade.

A partir destes resultados, foram calculados o desvio padrão entre as replicatas, o coeficiente de variação (CV%) e as recuperações.

6.5.5. Exatidão

Para a verificação da exatidão foram analisadas 6 amostras fortificadas, sendo duas de concentração baixa (0,03 mg L⁻¹), duas de concentração média (0,045 mg L⁻¹) e duas de concentração alta (0,09 mg L⁻¹). A partir desses resultados, foi possível determinar a recuperação média do método.

6.5.6. Incerteza de Medição (IM)

Para o cálculo da incerteza de medição, foi realizada uma análise crítica das etapas do método analítico a fim de identificar todas as componentes de incerteza. Para tanto, foram consideradas as incertezas dos certificados de calibração do material utilizado, a incerteza do certificado do padrão e os desvios padrão obtidos nas análises de precisão.

6.5.6. Critérios de Aceitação

Os critérios de aceitação utilizados para a validação do método utilizado estão apresentados na **Tabela 3**. Esses critérios são utilizados para definir se o método validado pode ser usado para a finalidade a qual se destina.

Tabela 3. Parâmetro de validação *versus* Critério de aceitação.

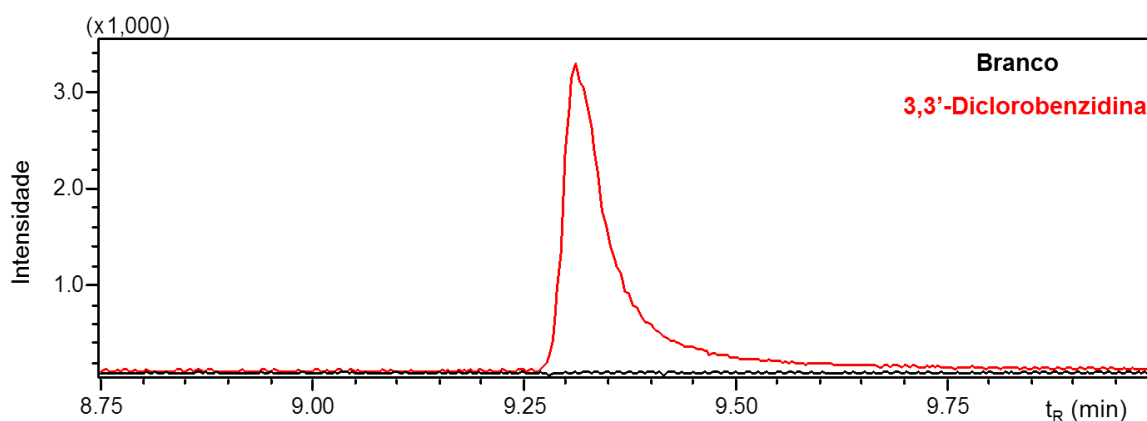
Parâmetro de Validação	Critérios de Aceitação
Seletividade	O branco não deve apresentar pico no tempo de retenção da 3,3'-diclorobenzidina
Linearidade	Coeficiente de correlação linear (r) maior ou igual a 0,9
Limite de Quantificação	Abaixo de 0,028 µg L ⁻¹ (limite estabelecido pela resolução nº 357 do CONAMA)
Exatidão	Recuperação de 80 a 100% da concentração alvo
Precisão	Repetibilidade Recuperação de 80 a 100% da concentração alvo Coeficiente de variação menor que 20%
	Intermediária Recuperação de 80 a 100% da concentração alvo Coeficiente de variação menor que 20%

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. SELETIVIDADE

A partir da visualização do cromatograma obtido da análise da amostra de água que não continha o analito (branco), foi observado que a matriz não possui substâncias eluindo na região do tempo de retenção da 3,3'-diclorobenzidina (9,31 min) (**Figura 10**). Logo, não é verificada a presença de interferentes na matriz que possam proporcionar um resultado “falso-positivo”, portanto o método pode ser considerado seletivo.

Figura 10. Comparação entre os cromatogramas obtidos pela análise do branco e da solução de 3,3'-Diclorobenzidina a 0,12 mg L⁻¹.



7.2. LINEARIDADE

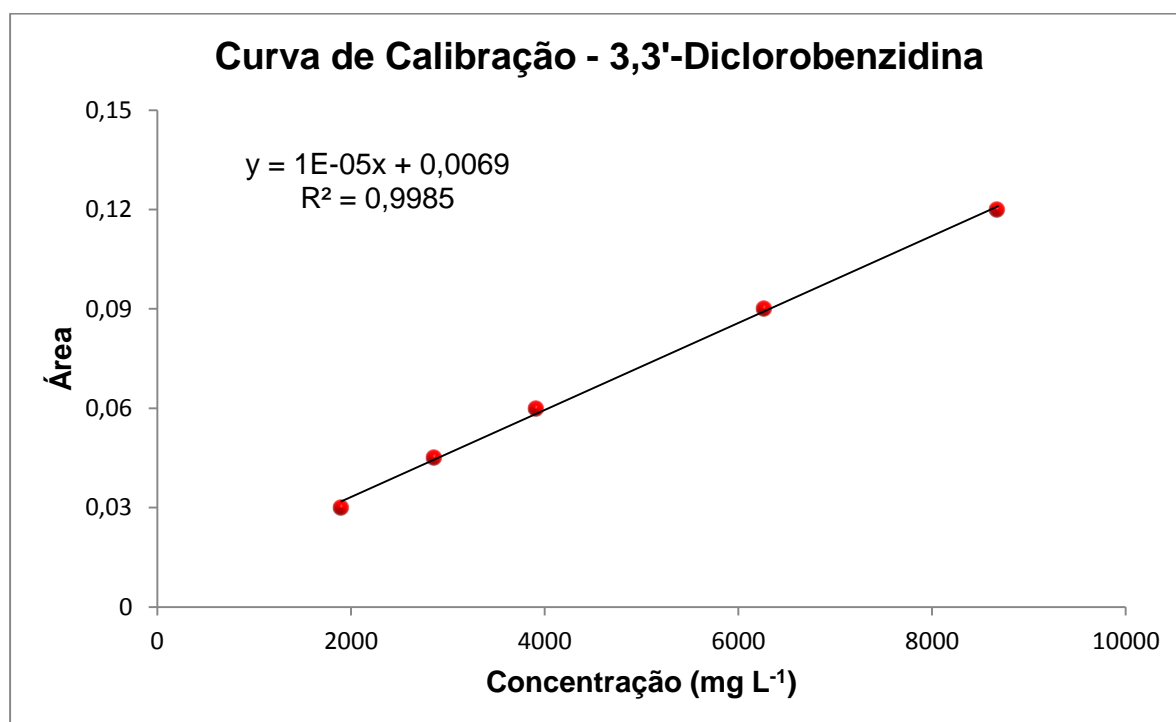
A **Tabela 4** apresenta os resultados das áreas dos picos cromatográficos para a cada duplicata dos cinco níveis de concentração de 3,3'-Diclorobenzidina avaliados. A **Figura 11** mostra a curva de calibração construída.

Tabela 4. Linearidade do método de quantificação de 3,3'-diclorobenzidina em água.

Nível de Concentração	Concentração (mg L ⁻¹)	Área 1	Área 2	DPR (%)
1	0,030	1904	1894	0,37
2	0,045	2849	2871	0,54
3	0,060	3990	3840	2,71
4	0,090	6266	6278	0,14
5	0,120	8633	8729	0,78

Área 1: Área do pico cromatográfico da primeira replicata; Área 2: Área do pico cromatográfico da segunda replicata; DPR: Desvio Padrão Relativo das áreas das duas replicatas.

Figura 11. Curva de calibração: variação da área do pico cromatográfico em função da concentração de 3,3'-diclorobenzidina.



A partir do método dos mínimos quadrados, com o auxílio do software Excel, foi possível estimar a equação da reta que define a relação entre a área do pico cromatográfico e a concentração de 3,3'-diclorobenzidina e o coeficiente de correlação linear (r).

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9992, que ficou acima de 0,9, estando dentro do critério de aceitação proposto pelo INMETRO. Além disso, o

coeficiente de correlação foi maior que 0,999, que é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, de acordo com autores como Green, Jenke e Shabir (GREEN, 1996; JENKE, 1998; SHABIR, 2003).

7.3. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O LD foi determinado por meio da equação [2], utilizando um “t” de Student relativo ao nível de confiança de 99%.

$$LD = t_{(n-1)} \cdot S \quad [2]$$

O LQ foi calculado mediante a equação [3], como 10 vezes o desvio padrão.

$$LQ = 10 \cdot S \quad [3]$$

A **Tabela 5** apresenta os resultados do LD e do LQ para a metodologia implantada:

Tabela 5. Coeficiente de variação e limites de detecção e quantificação dos extratos de 3,3'-diclorobenzidina.

CV%	6,5
LD (mg L⁻¹)	0,005
LQ (mg L⁻¹)	0,016

Uma vez que a amostra foi concentrada em um fator de 1000 vezes, o LD de 0,005 e o LQ de 0,0016 mg L⁻¹ são adequados para a determinação 3,3'-diclorobenzidina em amostras de água, pois estão abaixo do que é estabelecido pela resolução nº 357 do CONAMA, de 0,028 µg L⁻¹ (0,028 mg L⁻¹, nos extratos). Além disso, esses valores estão coerentes com os resultados obtidos por Lee et al., que obtiveram um LD de 0,01 ng L⁻¹ para os extratos (LEE et al., 2004).

7.4. PRECISÃO

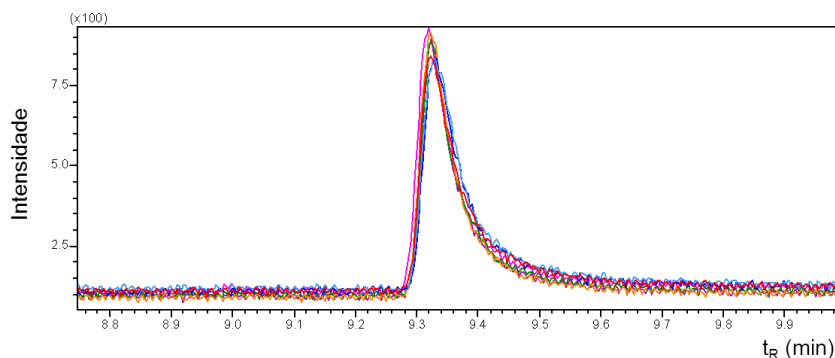
7.4.1. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%), obtido mediante os resultados da análise de sete amostras fortificadas analisadas no mesmo dia, com mesmo equipamento, mesmo analista e mesmas condições ambientais. Os resultados obtidos podem ser visualizados na **Tabela 6** e os cromatogramas obtidos na **Figura 12**.

Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da repetitividade do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.

Replicata	Concentração Medida (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	0,0381	84,7
2	0,0385	85,4
3	0,0381	84,6
4	0,0395	87,8
5	0,0379	84,2
6	0,0373	82,8
7	0,0380	84,5
Média	0,0382	84,6
CV%		1,8

Figura 12. Cromatogramas obtidos na avaliação da repetitividade do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.



Em métodos de análises a nível de traço, são aceites valores de coeficiente de variação de até 20 %, enquanto que o valor de CV% obtido foi de 1,8%. Além disso, as recuperações foram superiores a 80%, demonstrando que a repetitividade do método proposto está de acordo com o critério de aceitação adotado.

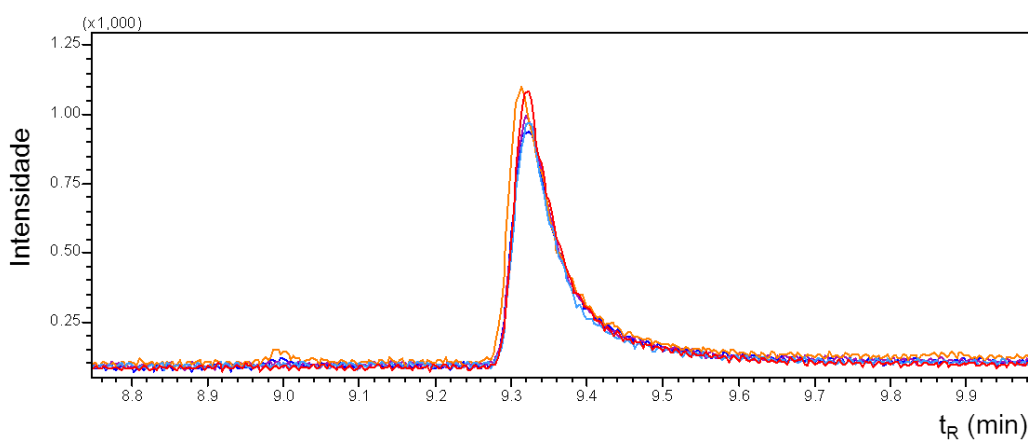
7.4.2. Precisão Intermediária

Os resultados obtidos para a análise das replicatas das amostras fortificadas na avaliação da precisão intermediária podem ser visualizados na **Tabela 7** e os cromatogramas na **Figura 13**. Para avaliação desse parâmetro, foi utilizado o coeficiente de variação entre os dias e a recuperação.

Tabela 7. Resultados obtidos na avaliação da Precisão Intermediária do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.

Replicata	Concentração Medida (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	0,0395	87,9
2	0,0387	86,0
3	0,0396	88,1
4	0,0390	86,6
5	0,0407	90,4
6	0,0392	87,2
7	0,0395	87,8
Média	0,0395	87,8
CV Inter-dia (%)		2,36

Figura 13. Cromatogramas obtidos na avaliação da Precisão Intermediária do método de determinação de 3,3'-diclorobenzidina água.



O coeficiente de variação entre os dias foi de 2,36% e as recuperações obtidas foram superiores a 80%. Logo, de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos, o método possui uma precisão intermediária adequada.

7.5. EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada a partir da recuperação obtida na análise em duplicata de amostras fortificadas em três níveis de concentração: 0,03 mg L⁻¹; 0,045 mg L⁻¹ e 0,09 mg L⁻¹. Mediante os resultados apresentados na **Tabela 8**, foi possível demonstrar que o método possui uma exatidão adequada, uma vez que a média das recuperações obtidas foi de 84,7%, acima do critério de aceitação adotado de 80% de recuperação mínima.

Tabela 8. Recuperação em três níveis de concentração: 0,030, 0,045 e 0,090 mg L⁻¹.

Concentração de Fortificação (mg L ⁻¹)	Rec 1 (%)	Rec 2 (%)
0,030	85,7	81,1
0,045	84,7	86,0
0,090	82,0	80,2
Média	84,7	

Rec 1: Percentual de recuperação do analito na primeira replicata; Rec 2: Percentual de recuperação do analito na segunda replicata.

7.6. INCERTEZA DE MEDIÇÃO (IM)

7.6.1. Fontes de Incerteza

Para o cálculo da incerteza da medição, foram consideradas as contribuições do Tipo A (Desvio padrão proveniente da avaliação da repetitividade e precisão intermediária) e do Tipo B, proveniente das incertezas dos certificados de calibração dos balões volumétricos, micropipetas e proveta utilizados, além da incerteza da concentração do padrão e o desvio padrão dos resíduos da curva de calibração (**Tabela 9**).

Em seguida, foi estabelecido um modelo matemático que descreve a variável associada a cada componente de incerteza, a função $y = f(x_i)$. Para tanto, foram consideradas as equações que definem as etapas de diluição e concentração das amostras e a equação da curva de calibração:

Concentração da amostra:

$$y = C \cdot 1000 \cdot \frac{V_f}{V_i} \quad [12]$$

Onde:

y : concentração do analito no extrato

C : concentração do analito na amostra

V_f : volume do extrato

V_i : volume inicial da amostra

1000: fator de conversão para $\mu\text{g L}^{-1}$

Diluições do padrão:

$$n_1 \cdot V_1 = n_2 \cdot V_2 \quad [13]$$

$$n_2 \cdot V'_2 = n_3 \cdot V_3 \quad [14]$$

$$n_3 \cdot V'_3 = n_4 \cdot V_4 \quad [15]$$

Onde:

V_1 : volume do padrão de referência

V_2 : volume da solução mãe - Primeira diluição do padrão de referência

V'_2 : volume da sol. mãe utilizada na primeira diluição da sol. mãe

V_3 : volume da primeira diluição da sol. mãe

V'_3 volume de solução, proveniente da primeira diluição da sol. mãe, utilizada na segunda diluição da sol. mãe

V_4 : volume segunda diluição da sol. mãe

n_1 : concentração do padrão de referência

n_2 : concentração da solução mãe

n_3 : concentração da primeira diluição da sol. mãe

n_4 : concentração da segunda diluição da sol. mãe

Curva de Calibração:

$$y = a \cdot x + b$$

[16]

Onde:

y : concentração do parâmetro no extrato

a : coeficiente angular da reta, obtido pela curva de calibração

x : área obtida pelo cromatógrafo

b : coeficiente linear da reta, obtido pela curva de calibração

Tabela 9. Fontes de incerteza do Tipo A e do Tipo B.

Fonte	Incerteza	Unidade
Incerteza da concentração n_1	10	mg L ⁻¹
Erro no volume v_1 (micropipeta)	0,0002	mL
Erro no volume v_2 (balão volumétrico)	0,025	mL
Erro no volume v_2' (Micropipeta)	0,0008	mL
Erro no volume v_3 (balão volumétrico)	0,02	mL
Erro no volume v_3' (micropipeta)	0,0003	mL
Erro no volume v_4 (balão volumétrico)	0,02	mL
Erro na medição de V_i (proveta)	10	mL
Erro na medição de V_f (balão volumétrico)	0,02	mL
Desvio padrão dos resíduos da curva de calibração	0,002	mg L ⁻¹
Desvio Padrão da repetitividade e precisão intermediária	0,001	mg L ⁻¹

7.6.2. Incerteza Padrão

A incerteza padrão foi obtida dividindo-se os componentes de incerteza por um número associado com a distribuição de probabilidade assumida (**Tabela 10**).

Tabela 10. Distribuição de probabilidade para cada fonte de incerteza e seu respectivo divisor.

Fonte	Distribuição	Divisor	Incerteza Padrão - $u(x_i)$
Incerteza da concentração n_1	ret	1,73	5,77
Erro no volume v_1 (micropipeta)	t	2,31	0,0001
Erro no volume v_2 (balão volumétrico)	t	2,00	0,0125
Erro no volume v_2' (Micropipeta)	t	2,31	0,0003
Erro no volume v_3 (balão volumétrico)	t	2,00	0,01
Erro no volume v_3' (micropipeta)	t	2,31	0,0001
Erro no volume v_4 (balão volumétrico)	t	2,00	0,01
Erro na medição de V_i (proveta)	ret	1,73	5,77
Erro na medição de V_f (balão volumétrico)	t	2,00	0,01
Desvio padrão dos resíduos da curva de calibração	t	1,00	0,002
Desvio Padrão da repetitividade e precisão intermediária	t	1,00	0,0009

ret: distribuição retangular; t : distribuição t -student.

7.6.3. Coeficientes de Sensibilidade:

Os coeficientes de sensibilidade (c_i), que servirão como fatores de conversão da a incerteza padrão de cada variável, $u(x_i)$, foram calculados mediante as derivadas parciais de $f(x_i)$ em relação a cada variável x .

Concentração da amostra:

Os coeficientes de sensibilidade foram obtidos mediante a derivada parcial da equação [12].

Para fontes de incerteza em função de V_f :

$$\frac{\delta y}{\delta V_f} = 1000 \cdot \frac{c}{V_i} \quad [17]$$

Para fontes de incerteza em função de V_i :

$$\frac{\delta y}{\delta V_i} = -1000 \cdot \frac{V_f \cdot C}{V_i^2} \quad [18]$$

Diluições do padrão:

Os coeficientes de sensibilidade foram obtidos mediante a derivada parcial das equações [13], [14], [15].

Para fontes de incerteza em função do volume inicial das diluições:

Tabela 11. Coeficientes de sensibilidade para fontes de incerteza provenientes das diluições do padrão em função dos volumes iniciais.

Diluição do Padrão	1ª Diluição da Sol. Mãe	2ª Diluição da Sol. Mãe
$\frac{\delta n_2}{\delta V_1} = \frac{n_1}{V_2}$ [19]	$\frac{\delta n_3}{\delta V'_{12}} = \frac{n_2}{V_3}$ [20]	$\frac{\delta n_4}{\delta V'_{13}} = \frac{n_3}{V_4}$ [21]

Para fontes de incerteza em função do volume final das diluições:

Tabela 12. Coeficientes de sensibilidade para fontes de incerteza provenientes das diluições do padrão em função dos volumes finais.

Diluição do Padrão	1ª Diluição da Sol. Mãe	2ª Diluição da Sol. Mãe
$\frac{\delta n_2}{\delta V_2} = -\frac{n_1 \cdot V_1}{V_2^2}$ [22]	$\frac{\delta n_3}{\delta V_3} = -\frac{n_2 \cdot V'_{12}}{V_3^2}$ [23]	$\frac{\delta n_4}{\delta V_4} = -\frac{n_3 \cdot V'_{13}}{V_4^2}$ [24]

Por fim, para a incerteza da concentração do padrão:

$$\frac{\delta n_2}{\delta n_1} = \frac{V_1}{V_2} \quad [25]$$

Curva de Calibração:

O coeficiente de sensibilidade referente ao desvio padrão dos resíduos da curva de calibração foi obtido mediante a derivada parcial da equação da reta [16]:

$$\frac{\delta y}{\delta x} = a \quad [26]$$

7.6.4. Contribuição para a Incerteza da Concentração do Analito na Amostra:

Mediante o produto entre a incerteza padrão, $u(x_i)$, e seu respectivo coeficiente de sensibilidade, foi obtida a contribuição de incerteza, $u_i(y)$, conforme pode ser visualizado na **Tabela 13**:

Tabela 13. Contribuição para a Incerteza da Concentração de 3,3'-diclorobenzidina na Amostra

Fonte	Contribuição para a Incerteza ($\mu\text{g L}^{-1}$) - $u_i(y)$
Incerteza da concentração n_1	0,029
Erro no volume v_1 (micropipeta)	0,017
Erro no volume v_2 (balão volumétrico)	-0,013
Erro no volume v_2' (Micropipeta)	0,0003
Erro no volume v_3 (balão volumétrico)	-0,001
Erro no volume v_3' (micropipeta)	0,0001
Erro no volume v_4 (balão volumétrico)	-0,0005
Erro na medição de V_i (proveta)	-0,000173
Erro na medição de V_f (balão volumétrico)	0,0003
Desvio padrão dos resíduos da curva de calibração	0,00002
Desvio Padrão da repetitividade e precisão intermediária	0,0009

7.6.5. Incerteza Padrão Combinada:

Em seguida, foi calculada a raiz quadrada positiva da soma quadrática das contribuições de incerteza (equação [9]), de forma a definir a incerteza padrão combinada, representada por $u_c(y)$. O valor de $u_c(y)$ encontrado foi de $0,0011 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.6.7. Incerteza Expandida:

Para o cálculo da incerteza expandida (U) primeiramente foi necessário identificar os graus de liberdade (ν_i) para cada uma das fontes de incerteza. Os graus de liberdade encontrados são expressos na **Tabela 14**.

Tabela 14. Graus de liberdade referentes às fontes de incerteza.

Fonte	Graus de Liberdade (ν_i)
Incerteza da concentração n_1	infinitos
Erro no volume v_1 (micropipeta)	9
Erro no volume v_2 (balão volumétrico)	infinitos
Erro no volume v_2' (micropipeta)	10
Erro no volume v_3 (balão volumétrico)	infinitos
Erro no volume v_3' (micropipeta)	infinitos
Erro no volume v_4 (balão volumétrico)	infinitos
Erro na medição de V_i (proveta)	infinitos
Erro na medição de V_f (balão volumétrico)	infinitos
Desvio padrão dos resíduos da curva de calibração	9
Desvio Padrão da repetitividade e precisão intermediária	13

Mediante os graus de liberdade de cada fonte de incerteza, foi realizado o cálculo do grau de liberdade efetivo, ν_{eff} , por meio da fórmula de *Welch-Satterthwaite* (equação [10]). O valor obtido foi de 20059225, que pode ser aproximado para infinitos graus de liberdade.

Para um grau de liberdade infinito, a um nível de confiança de 95,45%, o fator de abrangência (k) é igual a 2,00.

Por fim, para calcular a incerteza expandida, foi multiplicado a incerteza combinada pelo fator k (equação [11]), obtendo-se um valor igual a $0,0022 \mu\text{g L}^{-1}$. Desta forma, foi possível verificar que a utilização de um padrão de pureza elevada, além da utilização de equipamentos volumétricos devidamente calibrados são os pontos críticos de controle durante a execução da metodologia analítica quando se deseja reduzir os valores de U .

8. CUSTO DA ANÁLISE

Os custos relacionados a solventes e consumíveis para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em uma amostra de água são apresentados na **Tabela 15**. O custo com o gás hélio foi baseado em uma duração do cilindro de 20 dias, sendo calculado o valor aproximado para 10 minutos de análise. O custo da coluna foi avaliado, partindo de uma vida-útil média de 6 meses, calculando o custo equivalente a 10 minutos de análise.

Tabela 15. Custo de solventes e consumíveis para a análise de 3,3'-diclorobenzidina em uma amostra de água.

Material	Quantidade Utilizada	Valor (R\$)
Hélio Air Liquide 5.0	-	0,16
Ponteira brand	2 un	0,08
Filtro Chromafil 0,45 µm	1 un	2,90
Seringa descartável	1 un	0,20
Acetonitrila Grau HPLC Tedia	20 mL	0,12
Diclorometano Grau HPLC Tedia	1 mL	0,006
Cartucho SPE C18 Chromabond	1 un	8,60
Zebron ZB-5MS (30 m x 0,25 mm 0,25 µm)	-	0,05
Total		12,116

A média de amostras a serem analisadas por mês é de aproximadamente 40 amostras. O valor a ser cobrado por cada amostra é de aproximadamente R\$ 200,00. Logo, o lucro mensal da empresa utilizando esta metodologia de análise é de R\$ 7515,36, desconsiderando os custos relacionados a serviços administrativos e a remuneração do técnico responsável pela execução da análise.

9. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o método estudado para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em água apresentou uma boa linearidade, além de se mostrar seletivo para o analito em estudo. O método em validação ainda mostrou um limite de detecção e quantificação adequados, obtendo-se valores abaixo do limite de concentração estipulado pela resolução nº 357. Além disso, os critérios de aceitação estipulados no início do estudo para os parâmetros de precisão e exatidão foram atendidos. O cálculo da incerteza da medição associada à essa metodologia analítica, se mostrou uma ferramenta útil para avaliar a contribuição de cada fonte na incerteza total.

No que diz respeito à viabilidade econômica, o método mostrou-se adequado, uma vez que é estimado um lucro mensal de aproximadamente R\$ 7515,36, desconsiderando os custos relacionados a serviços administrativos e a remuneração do técnico responsável pela execução da análise. Além disso, o tempo de análise e sua complexidade foram compatíveis com os interesses da empresa, uma vez que ela já utiliza metodologias semelhantes na determinação de outros parâmetros.

Enfim, o método estudado para a determinação de 3,3'-diclorobenzidina em amostras de água pode ser considerado validado na empresa, ou seja, o método é adequado à finalidade à qual se propõem.

10. BIBLIOGRAFIA

AGILENT. Disponível em: <www.bercaniaga.com/agilent7000.php>. Acesso em: 19 maio. 2014.

ANVISA. Resolução RE nº 899. Brasil, 2003.

ARRUDA, F. R. Determinação de benzidina nos rios que recebem a carga de efluentes das indústrias têxteis da cidade de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2008.

ATSDR. Toxicological Profile for 3,3'-Dichlorobenzidine, 1998.

BACALONI, A. et al. Evaluation of the atmospheric pressure photoionization source for the determination of benzidines and chloroanilines in water and industrial effluents by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 72, n. 2, p. 419–26, 30 abr. 2007.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim. Nova*, v. 25, n. 5, p. 856–865, 2002.

BENIGNI, R. et al. Quantitative Structure–Activity Relationships of Mutagenic and Carcinogenic Aromatic Amines. *Chemical Reviews*, v. 100, n. 10, p. 3697–3714, 2000.

BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia*, v. 40, n. 7-8, p. 474–483, 1995.

BIZIUK, M.; PRZYJAZNY, A. Methods of isolation and determination of volatile organohalogen compounds in natural and treated water. *Journal of Chromatography A*, v. 733, n. 1-2, p. 417–448, 1996.

BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the term “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 11, p. 2201–2205, 2002.

CAZES, J. EWING'S Analytical instrumentation handbook. 3 ed. ed. Boca Raton: Marcel Dekker, 2005. p. 1037

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Quim. Nova*, v. 24, n. 3, p. 374–380, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING. *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes*, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. p. 456

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *Trends Anal. Chem.*, v. 20, n. 11, p. 620–636, 2001.

CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Quim. Nova*, v. 20, n. 2, p. 219–225, 1997.

DE ANDRADE, J. C. O papel dos erros determinados em análises químicas. *Quim. Nova*, v. 10, n. 3, p. 159–165, 1987.

EPA. *Survey of the manufacture, import, and uses for benzidine related substances, and related dyes and pigments*, 1979.

EURACHEM WORKING GROUP. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1998.

FRITZ, J. S.; MACKA, M. Review: Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 902, n. 1, p. 137–166, 2000.

GARP. *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*, 1999.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicology Letters*, v. 151, n. 1, p. 203–210, 2004.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation v. 68. In: *Analytical Chemistry*. p. 305 – 309.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. *Quim. Nova*, v. 23, n. 2, p. 71–78, 2000.

HABIG, K.; BAESSLER, K.; WARNING, K. Process for the Continuous Preparation of 3,3'-Dichloro-benzidinedihydrochloride United States Patent, 1993.

HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 876

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy *LC/GC Magazine*, 1999.

ICH. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1995.

ICH. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 2005.

INMETRO. *Guia para a expressão de incerteza de medição*, 2008.

INMETRO. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQCGCRE-008*. Brasil, 2011.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Instrument. Sci. Technol.*, v. 26, n. 1, p. 1–18, 1998.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 778, n. 1, p. 289–300, 1997.

KUNZ, A. et al. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Quim. Nova*, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia em fase gasosa*. São Carlos: Acta, 1993. p. 240

LANÇAS, F. M. et al. Novas aplicações de sistemas SFE “home –made” IV: Qualidade dos alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n. 4, p. 432–436, 1997.

LANÇAS, F. M. The hole of the separation sciences in the 21th century. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 2, p. 183– 197, 2003.

LANÇAS, F. M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. RiMa, 2004.

LEE, H. B. et al. Determination of 3,3'-dichlorobenzidine in industrial wastewaters. *Water Quality Research Journal of Canada*, v. 39, n. 1, p. 29–34, 2004.

LEITE, F. *Validação em Análise Química*. 4. ed. Campinas, SP: Átomo, 2002.

LIZIER, T. M.; ZANONI, M. V. B. Effect of Ionic Liquid on the Determination of Aromatic Amines as Contaminants in Hair Dyes by Liquid Chromatography Coupled to Electrochemical Detection. *Molecules*, v. 17, p. 7961–7979, 2012.

LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. London: Blackie, 1996. p. 275

MCDOWALL, R. D.; PEARCE, J. C.; MURKITT, J. Liquid solid sample preparation in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 4, n. 1, p. 3–21, 1986.

Microbial Cell Factories. Disponível em: <www.microbialcellfactories.com>. Acesso em: 19 maio. 2014.

MILLER, J. M. *Separation methods in chemical analysis*. New York: Wiley, 1975. p. 309

NBR ISO/IEC 17025. *Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios*. Brasil ABNT, 2005.

NIELEN, N. W. F.; BRINKMAN, U. A. T.; FREI, R. W. Industrial waste-water analysis by liquid-chromatography with precolumn technology and diode-array detection. *Analytical Chemistry*, v. 57, p. 806–810, 1985.

NIESSEN, W. M. A.; GREEF, J. VAN DER. *Liquid chromatography: mass spectrometry*. New york: Marcel Dekker, 1992. p. 479

NOROOZIAN, E. et al. Liquid-chromatography trace enrichment with online capillary gas chromatography for the determination of organic pollutants in aqueous samples. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 10, p. 17–24, 1987.

NYMAN, M. C. et al. 3,3'-Dichlorobenzidine Transformation Processes in Natural Sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v. 31, p. 1068–1073, 1997.

REPORT ON CARCINOGENS. 3,3'-Dichlorobenzidine and its Dihydrochloride, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICHARD, J. J.; JUNK, G. A. Solid-phase versus solvent-extraction of pesticides from water. *Microchimica Acta*, v. 88, n. 5-6, p. 387–394, 1986.

ROBINSON, J. W.; FRAME, E. M. S.; FRAME, G. M. *Undergraduate Instrumental Analysis*. 6 ed. ed. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 1079

SANTANA, C. M. et al. Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. *Molecules*, v. 14, n. 1, p. 298–320, 2009.

SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, n. 1-2, p. 125–151, 2003.

SCOTT, R. P. W. *Principles and Practice of Chromatography*. p. 100

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J. Chromatogr. A*, v. 987, n. 1-2, p. 57–66, 2003.

SHEN, K.; LI, S.; CHOI, D. H. Catalytic Hydrogenation of o-Nitrochlorobenzene. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 23, n. 12, p. 1785–1789, 2002.

SHIN, H.; AHN, H. Analysis of Benzidine and Dichlorobenzidine at Trace Levels in Water by Silylation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Chromatographia*, v. 63, n. 1-2, p. 77–84, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLE, F. J.; CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. Bookman, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. In: *Practical HPLC Method Development*. 2. ed. New York: Wiley.

Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas. Disponível em: <www.espectrometriademassas.com.br>. Acesso em: 18 maio. 2014.

TEKEL, J.; HATRIK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *Journal of Chromatography A*, v. 754, n. 1, p. 397–410, 1996.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 857–867, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. *US Pharmacopeia 24: Validation of Compendial Methods* Rockville, 1999.

US-FDA. *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, 1994.

US-FDA. *Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds*, 1995.

VERA-AVILA, L. E.; GARCÍA-AC, A.; COVARRUBIAS-HERRERA, R. Trace-Level Determination of Benzidine and 3,3'-Dichlorobenzidine in Aqueous Environmental Samples by Online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatographic Science*, v. 39, p. 301–307, 2001.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, v. 73, n. 8, p. 1381, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS
FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. Thirty-second report. Geneva.