



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

BEATRIZ DE CAROLI VIZIOLI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS
EM ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO:**

**ESTUDO DE CASO NA REGIÃO METROPOLITANA DE
CAMPINAS**

CAMPINAS

2019

BEATRIZ DE CAROLI VIZIOLI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS
EM ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO:
ESTUDO DE CASO NA REGIÃO METROPOLITANA DE
CAMPINAS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Química da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em Química
na área de Química Analítica**

Orientadora: Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner Raimundo

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Beatriz De Caroli Vizioli e orientada pela Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner Raimundo.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

V839d Vizioli, Beatriz De Caroli, 1993-
Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de nitrosaminas em água de abastecimento público : estudo de caso na Região Metropolitana de Campinas / Beatriz De Caroli Vizioli. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Cassiana Carolina Montagner Raimundo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nitrosaminas. 2. GC-MS. 3. Extração em fase sólida. 4. Validação de métodos. 5. Água tratada. I. Raimundo, Cassiana Carolina Montagner, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation of analytical method for determination of nitrosamines in drinking water: : case study in Campinas Metropolitan Region

Palavras-chave em inglês:

Nitrosamines

GC-MS

Solid-phase extraction

Methods validation

Drinking water

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Cassiana Carolina Montagner Raimundo [Orientador]

Leandro Wang Hantao

Sandro José de Andrade

Data de defesa: 19-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8400-2932>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5075605030106587>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner Raimundo (Orientadora)

Prof. Dr. Leandro Wang Hantao (UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Sandro José de Andrade (UNIFEI - Universidade Federal de Itajubá)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **BEATRIZ DE CAROLI VIZIOLI**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de julho de 2019.

“To have risked so much in our efforts to mold nature to our satisfaction and yet to have failed in achieving our goal would indeed be the final irony. Yet this, it seems, is our situation.”

Rachel Carson. *Silent Spring*, 1962.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos aos meus pais, Marília e Vagner. Nada do que fiz até hoje teria se tornado realidade sem seu apoio incondicional. A vocês que, por vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

Ao Victor. Quando há amor, há tudo.

À minha irmã, Júlia. Minha melhor amiga, desde sempre e para sempre.

Aos meus avós, Adhemar e Yolanda. Pela experiência e sabedoria. Pelo amor infinito.

À Cassiana. Esta jornada talvez tenha sido mais árdua do que o esperado, mas não menos proveitosa. Obrigada por todos estes anos de amizade, ensinamentos e oportunidades.

Ao Leandro e a todos do Laboratório de Cromatografia Gasosa do IQ-UNICAMP. Obrigada pelo acolhimento tão especial.

Aos Professores Isabel Jardim, Marcia Breitzkreitz, Alessandra Sussulini, Sandro de Andrade, Lauro Kubota e Nivea Guedes, membros das minhas bancas de qualificação e defesa.

A todos os meus amigos do LQA-GIA, Alianda, Bianca, Diego, Eduardo, Eliane, Jéssyca, Mariana, Rafael Gaspar e Raphael Acayaba.

Ao Instituto de Química da UNICAMP.

Ao INCTAA (Projeto CNPq Proc. No. 465768/2014-8 e FAPESP Proc. No. 2014/50951-4).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa auxílio concedida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES); Código de Financiamento 001.

RESUMO

As nitrosaminas são uma classe de compostos orgânicos semi-voláteis caracterizadas pela presença de um grupo nitroso ligado ao átomo de nitrogênio de uma amina. Estes compostos são reconhecidos como importantes agentes carcinogênicos, presentes principalmente em alimentos, bebidas e cosméticos.

Contudo, a detecção de nitrosaminas em água tratada como subprodutos de desinfecção (DBPs) tem atraído considerável atenção nos últimos anos devido à sua alta carcinogenicidade, frequência de detecção e possível regulamentação na Europa e nos Estados Unidos.

Este trabalho propôs desenvolver e validar um método analítico sensível e seletivo para determinar 7 nitrosaminas (NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA e NDBA) em água tratada em níveis de nanograma por litro.

O preparo de amostras foi realizado por extração em fase sólida (SPE) e as nitrosaminas foram quantificadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por elétrons (GC-EI-MS). O método foi validado de acordo com as orientações do INMETRO. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental, exatidão e precisão.

A faixa linear de trabalho foi definida de 1 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NDMA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA e NDBA e 5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NMEA. O coeficiente de determinação para todos os compostos foi superior a 0,995 e os limites de detecção e quantificação instrumental variaram de 0,3 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,0 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações médias variaram de 67 a 79% para água ultrapura e 46 a 72% para água tratada. Os coeficientes de variação médio para água ultrapura e água tratada variaram de 3 a 6% e 4 a 7%, respectivamente.

Após o desenvolvimento e validação, o método proposto foi aplicado em um estudo de caso preliminar de ocorrência de nitrosaminas em água tratada na Região Metropolitana de Campinas. A NDMA foi a nitrosamina detectada com maior frequência (87%) e a NMEA foi a nitrosamina detectada com menor frequência (20%).

As concentrações mínima, média e máxima das nitrosaminas encontraram-se nas faixas de <LD a 12 ng L⁻¹, 10 a 22 ng L⁻¹ e 14 a 67 ng L⁻¹, respectivamente.

Embora esta amostragem realizada ainda não possa ser considerada representativa, as concentrações encontradas até o momento apresentam um risco potencial para a população abastecida de acordo com limites não-oficiais recomendados por entidades internacionais regulatórias.

ABSTRACT

Nitrosamines are a class of semi-volatile organic chemical compounds characterized by a nitroso group attached to an amine group. These compounds have been recognized as important carcinogenic agents, mostly present in foods, beverages and cosmetics.

However, detection of nitrosamines as disinfection by-products (DBPs) in drinking water has attracted considerable attention in recent years due to their high carcinogenicity, frequency of detection and their potential regulation in Europe and United States.

This work aimed to develop and validate a selective and sensitive analytical method for 7 nitrosamines (NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA and NDBA) in finished water at nanogram per liter levels.

Sample preparation employed solid phase extraction and nitrosamines were determined using gas chromatography mass spectrometry with electron ionization (GC-EI-MS). The method was validated according to INMETRO guidelines. The figures of merit evaluated were: selectivity, linear range, linearity, instrumental detection limit, instrumental quantification limit, trueness and precision.

Compounds NDMA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA and NDBA showed good linear range between 1 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ and NMEA between 5 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Determination coefficients for all compounds were greater than 0.995 and instrumental limits of detection and quantification ranged from 0.3 to 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1.0 to 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Mean recoveries varied from 67 to 79% for ultrapure water and 46 to 72% for finished water. The relative standard deviation for ultrapure water and finished water ranged from 3 to 6% and from 4 to 7%, respectively.

Following development and validation, the proposed method was employed in a preliminary case study for the occurrence of nitrosamines in drinking water in the Metropolitan Region of Campinas. NDMA was the most detected nitrosamine (87%) and NMEA was the least detected nitrosamine (20%). The minimum, medium and maximum concentrations of nitrosamines ranged from <LOD to 12 ng L^{-1} , 10 to 22 ng L^{-1} and 14 to 67 ng L^{-1} , respectively.

Although this sampling shall not be considered representative, the concentrations found so far present a potential risk for the population supplied according to unofficial limits recommended by international regulatory entities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular geral das nitrosaminas.	26
Figura 2. Regiões Hidrográficas do Brasil. ⁸¹	46
Figura 3. Residências atendidas por abastecimento de água, rede geral de esgoto e coleta de lixo por município para o ano de 2010.	51
Figura 4. Esquema representativo de sistema <i>in line</i> modificado ⁸⁹ utilizado para preparo de amostras por SPE.	62
Figura 5. Esquema representativo das etapas de extração de amostra por extração em fase sólida.	63
Figura 6. Esquema representativo da coluna secativa de vidro.	64
Figura 7. Mapa da Região Metropolitana de Campinas com municípios amostrados para o estudo de caso em destaque.	66
Figura 8. Mapa do sistema de produção e distribuição de água da cidade de Campinas.	67
Figura 9. Cromatograma completo para as sete nitrosaminas para uma solução de 100 µg L ⁻¹ em modo SIM otimizado, com destaque para os tempos de retenção.	74
Figura 10. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NDMA.	78
Figura 11. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NMEA.	78
Figura 12. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NPYR.	79
Figura 13. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NDEA.	79
Figura 14. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NPIP.	80
Figura 15. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NDPA.	80
Figura 16. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em 100 µg L ⁻¹ (preto) para NDBA.	81

Figura 17. Valores de G para Teste de Grubbs obtidos para valores experimentais mínimos (preto) e máximos (vermelho).	83
Figura 18. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDMA.	86
Figura 19. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NMEA.	86
Figura 20. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NPYR.	86
Figura 21. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDEA.	87
Figura 22. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NPIP.	87
Figura 23. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDPA.	87
Figura 24. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDBA.	88
Figura 25. Recuperação para cada nível de fortificação para matrizes de a) água ultrapura e b) água tratada.	95
Figura 26. Concentração de nitrosaminas (ng L^{-1}) para teste de aplicabilidade do método em amostras de água tratada cidade de Campinas-SP.	101
Figura 27. Concentrações totais de nitrosaminas por município amostrado.	103
Figura 28. Concentrações mínima, média e máxima para cada nitrosamina. Valores de 10^{-6} <i>cancer risk level</i> (Estado da Califórnia, EUA) em vermelho. ⁴⁰	105
Figura 29. Concentrações médias para nitrosaminas no presente trabalho (Brasil), em comparação com Estados Unidos e China. ^{46 48}	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de Contaminantes Emergentes mais estudadas atualmente. ^{4 5} ..	22
Tabela 2. Valores Máximos Permitidos para DBPs legislados pela Portaria de Consolidação nº5 de 28 de setembro de 2017. ⁸	25
Tabela 3. Valores de 10^{-6} <i>cancer risk level</i> para nitrosaminas e outros DBPs. ^{39 40} ...	31
Tabela 4. Ocorrência de NDMA em diversos países.....	32
Tabela 5. Valores de ocorrência para nitrosaminas nos Estados Unidos e China. ^{46 48}	34
Tabela 6. Propriedades físico-químicas para nitrosaminas abordadas neste trabalho.	36
Tabela 7. Referências de métodos desenvolvidos para análise de nitrosaminas em água tratada utilizando a técnica de SPE.....	41
Tabela 8. Referências de métodos desenvolvidos para análise de nitrosaminas em água tratada utilizando a técnica de SPME.....	44
Tabela 9. Municípios com algum tipo de abastecimento de água tratada.....	48
Tabela 10. Área territorial (km ²), População, IDH-M e PIB per capita (R\$) para municípios da Região Metropolitana de Campinas. ⁸⁴	50
Tabela 11. Concessionária de água, demanda urbana, manancial de abastecimento, contribuição do manancial no abastecimento, pré-oxidante e desinfetante utilizados no tratamento de água para municípios da Região Metropolitana de Campinas ⁸² ...	52
Tabela 12. Íon molecular (quantificação) e fragmento (confirmação) por Ionização por Elétrons (70 eV) selecionados para cada nitrosamina.	72
Tabela 13. Parâmetros otimizados para método cromatográfico de quantificação de nitrosaminas por GC-MS.	73
Tabela 14. Parâmetros Cromatográficos do método desenvolvido: t_R : tempo de retenção; t'_R : tempo de retenção ajustado; k: fator de retenção; α : fator de separação; TF: fator de alargamento e R_s : resolução.....	75
Tabela 15. Valores obtidos para teste de Cochran (C_0) para verificação de homocedasticidade do modelo, em comparação aos valores de $C_{crítico}$	84
Tabela 16. Parâmetros da regressão linear para modelos construídos pelo método de mínimos quadrados ordinários para cada nitrosamina.	85

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para modelos de regressão linear por mínimos quadrados ordinários (OLS) para cada nitrosamina.	90
Tabela 18. Limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental e faixa linear de trabalho para método de quantificação de nitrosaminas por GC-MS.	91
Tabela 19. Parâmetros de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas. Fortificação em 3 níveis em água ultrapura, n = 3.....	93
Tabela 20. Valores de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas por nível de fortificação. Fortificação em 3 níveis em água tratada, n = 3.	94
Tabela 21. Valores médios de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas.	96
Tabela 22. Valores de recuperação e coeficiente de variação esperados de acordo com nível de concentração do analito, definidos pela AOAC.	98
Tabela 23. Valores de recuperação, concentração média e estimativa do desvio padrão para ensaio de determinação do MDL.	99
Tabela 24. Comparação de valores de MDL obtidos para o método proposto e para o Método USEPA 521.	99
Tabela 25. Concentração de nitrosaminas (ng L^{-1}) para teste de aplicabilidade do método em amostras de água tratada da cidade de Campinas-SP.	100
Tabela 26. Valores de oxigênio dissolvido (OD), pH, potencial redox (ORP), condutividade elétrica (CE) e carbono orgânico total (TOC) para amostragem do estudo de caso realizado em 13 cidades da Região Metropolitana de Campinas. .	102
Tabela 27. Concentração de nitrosaminas (ng L^{-1}) para amostragem do estudo de caso realizado em 13 cidades da Região Metropolitana de Campinas.	103
Tabela 28. Frequência de detecção e concentrações mínima, média e máxima (ng L^{-1}) de nitrosaminas para amostragem do estudo de caso realizado em 13 municípios da Região Metropolitana de Campinas.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANOVA	Analysis of Variance
AOAC	Association Of Analytical Communities
BAP	Benzo[a]pyrene
BRK	BRK Ambiental Participações S/A
CAR	Carboxeno
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Condutividade elétrica
CEC	Contaminants of Emerging Concern
CI	Chemical Ionization
CODEN	Companhia de Desenvolvimento de Nova Odessa
cór	Córrego
CV	Coeficiente de variação
d.d.	Densidade demográfica
DAE	Departamento de Água e Esgoto
DAEV	Departamento de Águas e Esgotos de Valinhos
DBP	Disinfection By-product
DI	Direct Immersion
DVB	Divinilbenzeno
EC	Emerging Contaminant
EI	Electron Ionization
ENU	N-Nitroso-N-etilureia
ETA	Estação de Tratamento de Água
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
HAA	Haloacetic acid
hab	Habitantes
HHPC	Home, Health and Personal Care
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HS	Headspace
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH-M	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC	Liquid Chromatography
LDI	Limite de Detecção Instrumental
LLE	Liquid Liquid Extraction
LOQ	Limit of Quantification

LQI	Limite de Quantificação Instrumental
LVI	Large Volume Injection
Máx	Máxima
MDL	Method Detection Limit
Méd	Média
Mín	Mínima
MLLE	Micro Liquid-Liquid Extraction
MM	Massa Molecular
MNU	N-Nitroso-N-metilureia
MRL	Method Reporting Limit
MS	Mass Spectrometry
MSD	Mass Selective Detector
n.a.	Não analisado
n.i.	Não informado
NA	Nitrosamina
NCD	Nitrogen Chemiluminescence Detector
NDBA	N-Nitroso-di-n-butilamina
NDEA	N-Nitrosodietilamina
NDELA	N-Nitrosodietanolamina
NDMA	N-Nitrosodimetilamina
NDPA	N-Nitroso-di-n-propilamina
NDPhA	N-Nitrosodifenilamina
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMEA	N-Nitrosometiletilamina
NMOR	N-Nitrosomorfolina
NOC	N-Nitroso Compounds
NPD	Nitrogen–phosphorus detector
NPIP	N-Nitrosopiperidina
NPYR	N-Nitrosopirrolidina
OD	Oxigênio dissolvido
OLS	Ordinary Least Squares
ORP	Oxidation-Reduction Potential
PA	Poliacrilato
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PDMS	Polidimetilsiloxano
PIB	Produto Interno Bruto
POP	Persistent Organic Pollutant
PTFE	Politetrafluoretileno
PTV	Programmable Temperature Vaporization
Rec	Recuperação
rep	Represa

RH	Região Hidrográfica
rib	Ribeirão
RMC	Região Metropolitana de Campinas
SAAE	Serviço Autônomo de Água e Esgoto
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SAEAN	Serviço de Água e Esgoto de Artur Nogueira
SAEEC	Serviço de Água e Esgoto de Engenheiro Coelho
SANASA	Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento
SANEBAVI	Saneamento Básico Vinhedo
SDWA	Safe Drinking Water Act
SIM	Selective Ion Monitoring
SNR	Signal-to-Noise Ratio
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
THM	Trihalomethane
TIC	Total Ion Chromatogram
TOC	Total Organic Carbon
TONO	Total Nitrosamines
UCMR	Unregulated Contaminant Monitoring Rule
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
USEPA	United States Environmental Protection Agency
VMP	Valor Máximo Permitido
WHO	World Health Organization
WLS	Weighted Least Squares

SUMÁRIO

1	Introdução	20
1.1	Contaminantes de Preocupação Emergente.....	20
1.1.1	Subprodutos de desinfecção (DBPs)	24
1.2	Nitrosaminas	25
1.2.1	Primeiras preocupações, toxicidade e exposição	27
1.3	Nitrosaminas como DBPs	29
1.3.1	Formação e ocorrência de nitrosaminas em água tratada	31
1.3.2	Métodos analíticos para determinação de nitrosaminas em matrizes aquáticas ambientais	35
1.4	Qualidade da água tratada para abastecimento público no Brasil	46
1.4.1	A Região Metropolitana de Campinas e sua importância para o Estado de São Paulo	49
2	Objetivos	55
2.1	Objetivos Gerais.....	55
2.2	Objetivos Específicos	55
3	Procedimento Experimental	56
3.1	Padrões analíticos, solventes, reagentes e materiais	56
3.2	Equipamentos e utensílios	56
3.3	Instrumentação e acessórios	57
3.4	Cuidados com contaminação	57
3.5	Preparo de soluções	58
3.5.1	Solução estoque	58
3.5.2	Soluções Intermediárias.....	58
3.5.3	Soluções de trabalho	58
3.6	Método cromatográfico.....	59
3.6.1	Instrumentação analítica	59
3.6.2	Coluna cromatográfica	59
3.6.3	Desenvolvimento e otimização	59

3.6.4 Desempenho cromatográfico	60
3.7 Procedimento de análise de amostras	60
3.7.1 Coleta de amostras	60
3.7.2 Análise de parâmetros de qualidade da água	61
3.7.3 Preparo de amostras	61
3.7.4 Análise e quantificação de amostras	65
3.8 Definição da região de amostragem	65
3.9 Validação do método analítico	67
3.9.1 Seletividade	68
3.9.2 Linearidade	68
3.9.3 Faixa Linear de Trabalho	69
3.9.4 Limites de Detecção e Quantificação Instrumentais	69
3.9.5 Exatidão e Precisão	69
3.9.6 Limite de Detecção do Método (MDL)	70
4 Resultados e Discussão	71
4.1 Método cromatográfico	71
4.1.1 Instrumentação analítica	71
4.1.2 Coluna cromatográfica	71
4.1.3 Desenvolvimento e otimização	72
4.1.4 Desempenho cromatográfico	74
4.2 Validação do método analítico	77
4.2.1 Seletividade	77
4.2.2 Linearidade	81
4.2.3 Faixa Linear de Trabalho	91
4.2.4 Limites de Detecção e Quantificação Instrumentais	91
4.2.5 Exatidão e Precisão	92
4.2.6 Limite de Detecção do Método	98
4.2.7 Aplicabilidade do método desenvolvido	100
4.3 Estudo de caso: ocorrência de nitrosaminas em águas de abastecimento público na RMC	101
5 Conclusões	108
6 Referências Bibliográficas	109

1 Introdução

1.1 Contaminantes de Preocupação Emergente

A preocupação ambiental é um dos temas mais recorrentes que a humanidade deverá enfrentar durante o século XXI. Nosso planeta vem enfrentando fortes transições, naturais e antropogênicas. A necessidade de conscientização da humanidade está gerando novos paradigmas, determinando novos comportamentos e exigindo novas providências na gestão de recursos do meio ambiente.

Dentre todas as problemáticas ambientais, talvez a de recursos hídricos chame mais a atenção. Problemas como a escassez, qualidade e o uso indiscriminado da água estão sendo considerados como as questões mais graves da atualidade.

A pesquisa e o desenvolvimento das práticas de detecção, prevenção, controle e estratégias de eliminação da poluição ambiental estão em expansão. No entanto, dado o grande número de contaminantes que ocorrem no ambiente devido tanto aos efeitos de processos naturais como às atividades antrópicas, é aparente que a gama de compostos atualmente regulados representa apenas uma minúscula fração da composição química total. Além disso, a detecção gradual e identificação de novos compostos aumenta ainda mais a longa lista de contaminantes ambientais.

Neste âmbito, os contaminantes de preocupação emergente (CECs), ou simplesmente contaminantes emergentes (*Emerging Contaminants*, ECs), representam uma classe relativamente nova de substâncias químicas não reguladas presentes em diversas matrizes ambientais. Embora estes compostos venham sendo detectados apenas nas últimas décadas, eles não são necessariamente novos. Alguns ECs de fato foram recentemente introduzidos no meio ambiente dada sua contemporaneidade. Porém, outros compostos podem ter estado presentes no meio ambiente por muitos anos antes de serem identificados, porém a discussão sobre seu impacto negativo no meio ambiente é recente e inicial.¹

O principal obstáculo dos estudos de ECs é que os dados disponíveis para a maioria desses contaminantes são escassos e relativamente limitados, pois seus efeitos potenciais ainda não são bem compreendidos. Isso é especialmente verdade

para os efeitos da exposição em baixas doses durante um longo período. Desse modo, a análise da (eco)toxicidade crônica do composto é essencial para obter uma avaliação realista do risco ambiental que ele pode apresentar.

Além disso, os níveis de concentração em que os ECs costumam ser detectados é da ordem de micrograma ou até nanograma por litro e, portanto, a instrumentação necessária para a detecção e quantificação destes compostos deve ser altamente precisa e sofisticada. É por isso que apenas com o progresso da instrumentação analítica e das técnicas de preparo de amostra que foi possível a gradual detecção destes compostos no ambiente.²

Estudos feitos nas últimas décadas detectaram milhares de ECs distribuídos em diferentes classes, incluindo fármacos e produtos de cuidado pessoal, hormônios, surfactantes, pesticidas, retardantes de chama, nanomateriais, subprodutos do processo de desinfecção, microplásticos, entre outros. Contudo, o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos implica que existe um grande universo químico ainda não identificado. Portanto, o termo “contaminantes emergentes” é bastante amplo e inclui uma grande variedade de compostos, naturais ou sintéticos, com um risco potencial atribuído, embora ainda não haja conhecimento suficiente sobre eles.³

Grande parte dessas substâncias são poluentes orgânicos persistentes (POPs), como por exemplo fármacos e compostos perfluorados. Outros contaminantes podem degradar-se rapidamente e formar compostos que apresentem efeitos tóxicos ainda maiores do que os compostos originais, como os produtos de transformação de alguns pesticidas.² Há ainda os compostos pseudo-persistentes que, embora não sejam persistentes no meio ambiente e possam ser transformados ou até removidos, possuem uma introdução contínua no meio ambiente, prolongando sua presença na água, como é o caso dos subprodutos de desinfecção (*Disinfection By-products*, DBPs). A Tabela 1 apresenta algumas das classes mais relevantes de ECs estudados atualmente.^{4 5}

Tabela 1. Classes de Contaminantes Emergentes mais estudadas atualmente.^{4 5}

Classe	Categoria	Compostos Representativos
Fármacos	Anti-inflamatórios não esteroidais	Ibuprofeno, Cetoprofeno, Naproxeno, Diclofenaco, Ácido acetilsalicílico, Acetaminofeno, Piroxicam
	Anti-inflamatórios esteroidais	Prednisolona, Cortisona, Hidrocortisona, Dexametasona, Betametasona
	Antibióticos	Sulfametoxazol, Ofloxacina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Trimetoprima, Eritromicina, Azitromicina, Claritromicina, Amoxicilina, Ampicilina, Penicilina, Levofloxacina, Tetraciclina, Cefazolina
	Beta-bloqueadores	Atenolol, Metoprolol, Sotalol, Propanolol
	Antilipidêmicos	Gemfibrozil, Bezafibrat, Simvastatina
	Antipsicóticos e antidepressivos	Diazepam, Citalopram, Paroxetina, Fluoxetina, Bupropiona, Clonazepam, Nortriptilina, Carbamazepina, Amitriptilina, Sertralina, Trazadona, Alprazolam
	Protetores gástricos	Ranitidina, Omeprazol, Simetidina
	Diuréticos	Hidroclorotiazida, Furosemida
	Antidiabéticos	Metformina, Glibenclamida, Dapaglifloxacina
	Anti-histamínicos	Fexofenadina, Desloratadina, Dexclorfeniramina
	Estimulantes	Cafeína
	Edulcorantes	Sucralose, Sacarina, Acessulfame K, Ciclamato, Neotame, Aspartame, Esteviosídeo
Hormônios	Naturais	Estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), Estriol (E3), Progesterona, Testosterona
	Sintéticos	17 α -etinilestradiol (EE2), Dietilestilbestrol, Mestranol, Noretindrona, Norgestrel, Levonorgestrel, Drospirenona
HHPC	Fragrâncias	Almíscares sintéticos: nitros, policíclicos, macrocíclicos, alicíclicos
	Filtros UV	BP-1, BP-3, BP4, PBSA, 4-MBC, EHMC, IAMC, OC, OD-PABA
	Antimicrobianos e preservativos	Triclosan, Triclocarban, (benzil, butil, etil, isobutil, isoropil, metil, propil) parabenos
PFCs	-	PFOA, PFOS, PFNA, PFBS, POSF, PFOSA
Plastificantes	-	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP, BPA
Anticorrosivos	-	Benzotriazol, Toliltriazol
Surfactantes	-	Não iônicos, catiônicos, aniônicos, anfóteros
Nanomateriais	Orgânicos	Fulerenos, Grafenos, Nanotubos de carbono
	Inorgânicos	Prata, Dióxido de titânio, Óxido de zinco
Pesticidas	Fungicidas	Carbendazim, Tebuconazol, Azoxistrobina, Mancozeb, Propiconazol
	Herbicidas	Diuron, 2,4-D, Atrazina, Glifosato, Simazina, Hexazinona, Ametrina, Clomazona, Tebutiuron
	Inseticidas	Clorpirifós, Terbufós, Malation, Imidacloprida, Fipronil, Carbofurano

Classe	Categoria	Compostos Representativos
DBPs	Halometanos	Clorofórmio, Bromodiclorometano, Clorodibromometano, Bromofórmio, Iodofórmio, Diclorometano, Dibromometano, Tetracloreto de carbono, Dicloriodometano, Iododiclorometano, Dibromiodometano, Bromodiodometano
	Halofuranonas	MX, Red-MX, Ox-MX, EMX, BMX-1, BMX-2, BMX-3, BEMX-1, BEMX-2, BEMX-3, Ácido mucoclórico
	Ácidos haloacéticos	Cloroacético, Bromoacético, Dicloroacético, Dibromoacético, Tricloroacético, Iodoacético, Bromiodoacético, Bromocloroacético, Bromodicloroacético, Clorodibromoacético, Tribromoacético
	Haloaldeídos	Cloroacetaldeído, Dicloroacetaldeído, Bromocloroacetaldeído, Tricloroacetaldeído, Tribromoacetaldeído
	Haloacetatos	Acetato de bromoclorometila
	Haloamidas	Monocloroacetamida, Monobromoacetamida, Dicloroacetamida, Dibromoacetamida, Tricloroacetamida
	Halonitrometanos	Bromonitrometano, Cloronitrometano, Dibromonitrometano, Dicloronitrometano, Bromocloronitrometano, Bromodicloronitrometano, Dibromocloronitrometano, Tribromonitrometano
	Halocetonas	Cloropropanona, Dicloropropanona, Tricloropropanona, Tetracloropropanona, Bromopropanona, Dibromopropanona, Tribromopropanona, Tetracloropropanona
	Haloacetonnitrilas	Bromoacetonnitrila, Cloroacetonnitrila, Tribromoacetonnitrila, Bromodicloroacetonnitrila, Dibromocloroacetonnitrila
	Haloquinonas	2,6-dicloro-1,4-benzoquinona, 2,6-dicloro-3-metil-1,4-benzoquinona, 2,3,6-tricloro-1,4-benzoquinona, 2,6-dibromo-1,4-benzoquinona
	Aldeídos	Formaldeído, Acetaldeído, Cianoformaldeído, Glioxal, Metilglioxal, Propanal, Butanal, Pentanal, Hexenal
	Cetonas	2-butanona, 2,3-butanediona, 6-hidroxi-2-hexanona
	Nitrosaminas	NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA, NDBA, NDPhA, NMOR, NNN, NAT, NAB, NNK, NNAL
	Inorgânicos	Bromato, Clorito, Clorato, Perclorato
Microplásticos	-	Plásticos de tamanho < 5 mm
Retardantes de chama	-	PBDEs, HBCDs
Produtos de transformação	-	Processos físicos, químicos ou biológicos aplicados a moléculas precursoras
Biotoxinas	-	Saxitoxinas, Anatoxinas, Microcistinas, Nodularinas, Cilindrospermopsinas

1.1.1 Subprodutos de desinfecção (DBPs)

Os DBPs são consequência não intencional da aplicação de desinfetantes químicos visando a eliminação de patógenos nocivos durante o tratamento de água. Eles são formados pela reação dos desinfetantes com precursores inorgânicos (como brometo ou iodeto) e precursores orgânicos (como a matéria orgânica natural ou compostos antropogênicos), presentes na água. Existem dezenas de diferentes classes de DBPs que podem ser formadas durante o tratamento da água. O tipo e quantidade dependem tanto da qualidade da água do manancial, quanto do desinfetante e da operação do sistema de tratamento e distribuição.⁴

Os primeiros DBPs identificados em água tratada foram os trihalometanos (THMs), em 1974.⁶ Os THMs são compostos halogenados tri-substituídos com fórmula geral CHX_3 , em que X representa um halogênio. Os THMs mais comuns encontrados em água tratada são o clorofórmio, bromofórmio, bromodiclorometano e clorodibromometano. Como esses quatro compostos geralmente ocorrem juntos, tem sido prática em diversos países legislar o total de THMs como um todo.

Em 1976, o *National Cancer Institute* publicou um relatório da carcinogenicidade do clorofórmio em animais experimentais. Três anos mais tarde, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) emitiu a primeira regulamentação de DBPs para THMs totais.⁷

Desde a regulamentação de THMs, apenas 7 outros DBPs foram legislados nos EUA até hoje: 5 ácidos haloacéticos (HAA) e dois íons inorgânicos; bromato e clorito. Outros países, assim como o Brasil, tomaram como base os critérios de valores máximos permitidos definidos pela USEPA e também passaram a regulamentar estes DBPs na água destinada ao consumo humano.

Atualmente, o Brasil possui 16 DBPs legislados na Portaria de Consolidação nº5 de 28 de setembro de 2017, sendo eles: THMs totais (bromodiclorometano, tribromometano, triclorometano e dibromoclorometano), HAAs totais (ácidos monocloroacético, monobromoacético dicloroacético, tricloroacético, bromocloroacético, dibromoacético e bromodicloroacético), 2,4,6-triclorofenol, bromato e clorito, cujos valores máximos permitidos em água tratada para abastecimento público estão apresentados na Tabela 2.⁸

Tabela 2. Valores Máximos Permitidos para DBPs legislados pela Portaria de Consolidação nº5 de 28 de setembro de 2017.⁸

DBP	VMP mg L ⁻¹
THMs totais	0,1
HAAs totais	0,08
2,4,6-triclorofenol	0,2
Bromato	0,01
Clorito	1

A regulamentação destes compostos veio inicialmente por duas principais razões: sua formação é mais favorecida com a utilização de cloro, o desinfetante mais utilizado atualmente, e as concentrações de THMs e HAAs são substancialmente maiores do que outros DBPs em água tratada. Além disso, o controle da formação de THMs e HAAs geralmente resulta na redução da concentração de outros DBPs halogenados.⁹

Embora atualmente haja quase 700 DBPs relatados na literatura, ainda não há dados de (eco)toxicidade suficientes para a maioria deles, dificultando a priorização de pesquisas. O grupo das nitrosaminas, no entanto, configura uma exceção. Estes compostos vêm sendo extensivamente estudados em diversas matrizes desde seu primeiro relato de hepatotoxicidade e carcinogenicidade no início do século XX.⁴

1.2 Nitrosaminas

As N-nitrosoaminas, ou simplesmente nitrosaminas, são compostos pertencentes à classe de Compostos N-Nitroso (NOC), juntamente com as nitrosoamidinas e as nitrosamidas. A característica essencial dos NOCs é a presença de um grupo N=N=O em sua estrutura molecular. Nas nitrosaminas, os compostos apresentam em suas estruturas um grupo NO ligado a um átomo de nitrogênio de uma amina secundária (Figura 1).

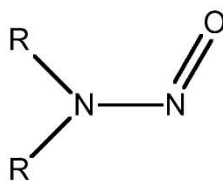


Figura 1. Estrutura molecular geral das nitrosaminas.

As nitrosaminas foram sintetizadas pela primeira vez em meados do século XIX por A. Geuther, em 1863.¹⁰ Contudo, foi apenas quase um século depois que estes compostos ganharam destaque quando cientistas começaram a descobrir seus efeitos tóxicos.

Extensas investigações ao longo do século XX estabeleceram muitas nitrosaminas e outros compostos N-Nitroso como notáveis agentes citotóxicos com ações biológicas poderosas, incluindo mutagenicidade, teratogenicidade, e, principalmente, carcinogenicidade.¹¹

Até a década de 1970, as nitrosaminas possuíam diversas aplicações comerciais. Nitrosaminas como a NDMA e a NDEA eram comumente utilizadas como solventes industriais, principalmente nas indústrias de plástico e têxtil.

As nitrosaminas também eram muito empregadas como precursores em sínteses orgânicas. Alquilnitrosaminas como NDMA, NDEA, NDPA e NDBA eram utilizadas na síntese de dialquilhidrazinas e nitrosaminas como MNU e ENU eram utilizadas na síntese de diazoalcanos.

Outras aplicações das nitrosaminas incluíam seu uso como inibidores de ferrugem e aditivos de biocidas, devido às propriedades fungistáticas e nematostáticas, além de serem empregadas como aditivos de gasolina, óleos lubrificantes e detergentes. Elas também eram muito utilizadas como plastificantes e estabilizantes de polímeros, borrachas e outros produtos derivados de petróleo.

Com tantas aplicações industriais, atribuíam-se às nitrosaminas principalmente o risco ocupacional. Conforme os estudos toxicológicos demonstraram cada vez mais sua associação com a incidência de câncer, estes compostos foram gradativamente proibidos de serem produzidos industrialmente em larga escala, e seu uso foi limitado apenas para propósitos de pesquisa científica.^{12 13}

1.2.1 Primeiras preocupações, toxicidade e exposição

O interesse na toxicidade das nitrosaminas surgiu em 1937 quando H. Freund relatou a incidência de danos hepáticos associados à exposição ocupacional em dois pesquisadores que trabalhavam na produção de NDMA para aplicação como inibidor de corrosão. Freund ainda realizou testes iniciais de exposição aguda com camundongos e cachorros e concluiu que a NDMA era um agente tóxico potente para o fígado e que seu uso deveria representar um risco ocupacional.¹⁴

Já em 1949, A. Hamilton e H. Hardy, duas famosas médicas pesquisadoras pioneiras no estudo de saúde ocupacional, alertavam brevemente sobre as propriedades toxicológicas da NDMA no renomado livro *Industrial Toxicology*.¹⁵

Contudo, a exposição ocupacional às nitrosaminas passou a ser um fator alarmante apenas alguns anos depois, quando novos casos de danos hepáticos foram associados à exposição aguda em uma grande indústria que utilizava NDMA como solvente. Os casos incentivaram J. Barnes e P. Magee a publicar em 1954 os primeiros estudos de propriedades toxicológicas do composto em diversos mamíferos como ratos, camundongos, cachorros, porquinhos-da Índia e coelhos. Os pesquisadores realizaram ensaios de administração aguda e crônica, via injeção direta, ingestão oral e absorção percutânea. As observações experimentais levaram à conclusão de que a NDMA pôde causar lesões hepáticas muito severas na variedade de animais testada e que havia uma provável conexão causal entre a exposição ocupacional humana e o desenvolvimento de doenças no fígado.^{16 17}

A preocupação em relação às nitrosaminas se intensificou devido à descoberta de sua presença em alimentos. A primeira ocorrência relatada de NDMA em alimentos ocorreu no fim da década de 1950. Entre 1957 e 1962, Koppang e Sakshaug observaram a incidência de doenças hepáticas e tumores em ovelhas que haviam sido alimentadas com farinha de peixe excessivamente processada com nitrito de sódio.¹⁸ Em 1964, Ender e colaboradores reportaram altos níveis de contaminação de NDMA na farinha de peixe, confirmando suspeitas de que nitrosaminas pudessem ser formadas em alimentos a partir de reações de nitrosação de aminas.¹⁹

A descoberta foi de grande relevância, pois induziu cientistas da época a produzirem extensas investigações sobre o potencial de formação de nitrosaminas

carcinogênicas em alimentos com adição dos conservantes nitrito e nitrato (carnes curadas e queijos), alimentos defumados (carnes e peixes), alimentos secos por combustão (cereais, malte para produzir bebidas alcoólicas, leite em pó e temperos), alimentos em conserva (enlatados e embutidos), entre outros.^{20 21 22}

As nitrosaminas ganharam destaque novamente em 1977, quando foi reportada a primeira contaminação de produtos de higiene e cosméticos pela NDELA.²³ Desde então, muitos estudos foram conduzidos, comprovando a ocorrência de nitrosaminas como NDMA, NDELA e NMOR pela reação de nitrosação de componentes de matéria prima em produtos de *Home, Health and Personal Care* (HHPC), como maquiagens e demaquilantes, loções e espumas de barbear, géis, shampoos e condicionadores, entre outros.^{24 25 26 27}

Foi apenas no fim da década de 1980 que as preocupações acerca da presença de nitrosaminas passou a ser na água. Em 1989, em Ohsweken, Canadá, a descoberta de altos níveis de NDMA em água tratada promoveu uma série de estudos de ocorrência e formação deste composto. Desde então, a formação de NDMA foi associada à etapa de desinfecção da água, classificando-a como DBP.²⁸

Na literatura há mais de 300 compostos N-Nitroso estudados devido à sua toxicidade. Destes compostos, 199 de 232 nitrosaminas apresentaram algum tipo de atividade tóxica. As nitrosaminas já foram administradas em mais de 40 espécies de animais como macacos, cachorros, gatos, porcos, roedores, peixes, anfíbios e répteis. Todas as espécies testadas mostraram-se suscetíveis à ação carcinogênica de uma ou mais nitrosaminas, sugerindo que os seres humanos tampouco apresentem resistência aos efeitos destes compostos.^{29 30 31 32}

Até o presente momento, 32 destas 199 nitrosaminas já estão descritas nas Monografias da *International Agency of Research on Cancer* (IARC), revisões científicas e avaliações sobre a carcinogenicidade de agentes em seres humanos, baseadas em inúmeros estudos toxicológicos. As Monografias da IARC avaliam as evidências disponíveis de que um agente seja um perigo de câncer para humanos, com base em três categorias: evidências de câncer em humanos, evidências de câncer em animais experimentais e evidências mecanicistas. Desse modo, cada agente avaliado é classificado em um de quatro grupos: 1 (carcinogênico para humanos), 2A (provavelmente carcinogênico para humanos), 2B (possivelmente carcinogênico para humanos) e 3 (não classificável quanto a sua carcinogenicidade a

humanos). Das 32 nitrosaminas descritas, 3 são classificadas no grupo 1, 7 no grupo 2A, 11 no grupo 2B e 11 no grupo 3.¹³

Há 4 rotas principais e mais prováveis de exposição do ser humano às nitrosaminas; inalação, ingestão de água e alimentos, absorção cutânea e formação endógena.¹²

A via de inalação ocorre principalmente pela contaminação industrial ou por fumaça do tabaco. A ingestão de nitrosaminas pode ocorrer tanto pelo consumo de alimentos processados, quanto pelo consumo de água tratada. A absorção cutânea decorre principalmente dos riscos ocupacionais em indústrias, mas também do uso de cosméticos e outros produtos de cuidados pessoais contaminados. Por fim, a formação *in vivo* ao longo do trato gastro-intestinal compõe majoritariamente a exposição de nitrosaminas ao ser humano.¹²

Um estudo feito em 2007 pela USEPA produziu uma estimativa da ingestão oral diária média de NDMA de 2300 nanogramas por dia, para um adulto acima de 18 anos. O estudo concluiu que a contribuição devido aos alimentos (carnes, bebidas alcoólicas, laticínios, vegetais, cereais e etc), era em média de 0,58% e a contribuição da água era de apenas 0,01%, enquanto que a formação endógena correspondia a 99,41% da ingestão diária.³³

Contudo, a maioria dos toxicologistas acredita que as nitrosaminas são perigosamente eficazes até quando administradas em pequenas doses. Desse modo, a exposição até mesmo em pequenas quantidades, se frequentes, poderia contribuir para o desenvolvimento de câncer.

1.3 Nitrosaminas como DBPs

Nas últimas duas décadas, inúmeros órgãos governamentais têm procurado regular ou definir metas de saúde pública para nitrosaminas na água tratada destinada ao consumo humano. No entanto, ainda há muita discussão acerca de valores máximos permitidos de nitrosaminas em água tratada, uma vez que a avaliação do risco da saúde humana em relação a uma substância química é resultado de revisões abrangentes de inúmeros dados de toxicidade.

Estabelecer valores máximos permitidos em água tratada para compostos não legislados demanda um processo longo e complexo, pois envolve ter o conhecimento do potencial tóxico dos compostos e seus possíveis efeitos, conhecer suas fontes e/ou rotas de formação, desenvolver métodos analíticos sensíveis e seletivos o suficiente para detectar estes compostos em concentrações baixas e realizar vários estudos de ocorrência.

Embora nenhuma nitrosamina seja oficialmente regulamentada atualmente, as resoluções regulatórias para água tratada variam muito de acordo com a jurisdição em questão. O Estado da Califórnia nos Estados Unidos definiu um nível de notificação de 10 ng L^{-1} para a NDMA, NDEA e NDPA.³⁴ O Canadá possui uma diretriz para a NDMA de 40 ng L^{-1} ,³⁵ enquanto que na Austrália este valor é de 100 ng L^{-1} ,³⁶ de acordo com a recomendação da *World Health Organization* (WHO) para gestão de riscos e fontes de exposição que possam comprometer a segurança da água tratada.³⁷

Compostos com potencial carcinogênico são comumente avaliados quanto ao risco de câncer que apresentam devido à exposição prolongada. Este risco é expresso em termos da probabilidade de se desenvolver câncer durante o tempo de vida de uma pessoa. Os riscos calculados para compostos carcinogênicos servem apenas como diretrizes, fornecendo uma orientação aos pesquisadores, portanto não estabelecem nenhuma regra substantiva, embora representem uma abordagem sólida e atualizada para a avaliação de risco de câncer.

Uma das definições de “risco aceitável” amplamente difundida na regulamentação ambiental é conhecida como 10^{-6} *cancer risk level*, que avalia se a exposição a um composto ao longo da vida aumenta a chance de um indivíduo desenvolver câncer por uma chance de um em milhão. Esse nível, que passou a ser considerado como 'essencialmente zero', significa que o risco é não preocupante e pode ser negligenciado, e que, dada a exposição ao composto, a incidência de câncer em um indivíduo em uma população de um milhão de pessoas é aceitável. Estabelecendo-se este risco, infere-se que o nível de exposição é pequeno o suficiente para que, apesar de real, possa ser considerado como flutuação estatística.³⁸

Os riscos de câncer calculados para nitrosaminas em água tratada de acordo com a USEPA³⁹ e o Estado da Califórnia nos Estados Unidos⁴⁰ (Tabela 3), chegam a ser ordens de grandeza menores do que riscos de câncer associados a DBPs já

legislados atualmente, evidenciando a potência do risco que as nitrosaminas apresentam e apontando a necessidade de se estabelecer novos padrões de potabilidade da água.

Tabela 3. Valores de 10^{-6} *cancer risk level* para nitrosaminas e outros DBPs.^{39 40}

Nitrosamina	USEPA	Califórnia
	ng L ⁻¹	ng L ⁻¹
NDMA	0,7	3,0
NMEA	2,0	1,5
NPYR	20,0	15,0
NDEA	0,2	1,0
NPIP	-	3,5
NDPA	5,0	5,0
NDBA	6,0	3,0
NDELA	10,0	-
NDPhA	7000	-
Bromodiclorometano*	600	-
Tribromometano*	4000	-
Ácido dicloroacético*	700	-
Bromato*	50	-

*compostos legislados na portaria de potabilidade brasileira

1.3.1 Formação e ocorrência de nitrosaminas em água tratada

As nitrosaminas podem adentrar o sistema de água tratada principalmente através da reação não intencional com desinfetantes. Inicialmente, sua formação era associada estritamente ao uso de cloraminas como desinfetantes. Estudos subsequentes comprovaram sua formação com outros desinfetantes como cloro, dióxido de cloro e ozônio, muito embora a cloramina ainda seja o principal contribuinte para a formação destes compostos.^{41 42}

Além do tipo de desinfetante utilizado durante o tratamento de água, outro fator de grande importância são os precursores orgânicos presentes na água. Inúmeros estudos reportaram que os grandes precursores orgânicos procedem de mananciais impactados com aporte de esgoto (tratado ou não), fármacos e produtos de HHP, C,

polímeros catiônicos amino funcionais utilizados como coagulantes primários como alternativas aos coagulantes inorgânicos convencionais (sais de ferro) e resinas de troca iônica utilizadas para retirar cátions como cálcio (II), magnésio (II) e ferro (II/III).⁴²

A presença de nitrosaminas nos processos de tratamento de água tem sido relatada em níveis médios tipicamente inferiores a 10 ng L⁻¹, em que a NDMA é a principal nitrosamina de interesse. Diversos estudos feitos ao redor do mundo já demonstraram que a NDMA é detectada em concentração e frequência superiores em comparação às outras nitrosaminas e que, portanto, este composto poderia servir como um marcador para a avaliação de risco de exposição às nitrosaminas no geral, semelhante à maneira como o benzo[a]pireno (BAP) tem sido usado para avaliação da exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH).^{43 44} A Tabela 4 resume alguns trabalhos de ocorrência de NDMA em diversos países.

Tabela 4. Ocorrência de NDMA em diversos países.

Referência	País	Faixa de concentração de NDMA (ng L ⁻¹)
LIEW, 2005 ⁴⁵	Austrália	3 – 75
BEI, 2016 ⁴⁶	China	1 – 189
ASAMI, 2009 ⁴⁷	Japão	1 – 6
USEPA, 2012 ⁴⁸	Estados Unidos	2 – 630
DILLON, 2008 ⁴⁹	Reino Unido	1 – 6

Nos Estados Unidos, a lei de nome *Safe Drinking Water Act* (SDWA) exige que uma vez a cada cinco anos a USEPA emita uma nova lista de não mais de 30 contaminantes não regulamentados a serem monitorados nacionalmente em sistemas públicos de água, chamada de *Unregulated Contaminant Monitoring Rule* (UCMR). A UCMR é uma ferramenta utilizada para identificar os contaminantes não regulamentados de preocupação, seu risco potencial à saúde e sua frequência de ocorrência em água tratada para abastecimento público. Esse monitoramento fornece uma base para decidir quais contaminantes precisam de futuras ações regulatórias. Desse modo, em 2007 a USEPA lançou a UCMR2, que incluiu 6 nitrosaminas (NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA) a serem monitoradas no país entre 2008 e 2010.⁴⁸

Os dados da UCMR2, publicados em 2012, compreendem atualmente o conjunto mais abrangente de informações relativas à ocorrência de nitrosaminas nos Estados Unidos, em que quase 1200 sistemas públicos de água foram monitorados em mais de 18100 amostras de água coletadas.

A principal tendência foi a prevalência da NDMA, detectada em 10% dos sistemas públicos de água analisados, enquanto que as outras nitrosaminas foram detectadas em menos de 1% das amostras. A concentração de NDMA variou de 2 a 630 ng L⁻¹, porém a concentração média foi de 9 ng L⁻¹. As outras nitrosaminas tiveram uma concentração média entre 4 e 15 ng L⁻¹ (Tabela 5).

Um grande estudo feito na China entre 2012 e 2016 avaliou a ocorrência de 9 nitrosaminas em águas provenientes de 44 cidades representativas do país. Tanto a frequência de detecção quanto a concentração média das nitrosaminas foi superior aos dados da UCMR2. A NDMA foi encontrada em 35% dos sistemas públicos de água e sua concentração média foi de 32 ng L⁻¹. Os autores atribuem esses dados ao uso mais elevado de cloraminas nas estações de tratamento da China, contrariamente aos Estados Unidos, que fazem uso majoritário de cloro.⁴⁶

Tabela 5. Valores de ocorrência para nitrosaminas nos Estados Unidos e China.^{46 48}

Nitrosamina	MRL (ng L ⁻¹)	Análises	Análises com detecção (%)	Sistemas públicos avaliados	Sistemas públicos com detecção (%)	Mín (ng L ⁻¹)	Méd (ng L ⁻¹)	Máx (ng L ⁻¹)
Estados Unidos								
NDMA	2	18098	10,28	1198	27,05	2	9	630
NMEA	3	18101	0,02	1198	0,25	4	4	5
NPYR	2	18107	0,23	1198	1,75	2	5	24
NDEA	5	18096	0,25	1198	2,17	5	15	100
NDPA	7	18107	0,00	1198	0,00			
NDBA	4	18101	0,05	1198	0,42	4	8	21
China								
NDMA	0,5	117	35,04	62	40,32	1,0	32,0	189,0
NMEA	1,0	117	17,09	62	25,81	1,1	3,1	9,0
NPYR	0,5	117	41,03	62	51,61	0,5	2,4	16,0
NDEA	0,5	117	16,24	62	22,58	0,7	3,3	11,0
NPIP	0,5	117	40,17	62	59,68	0,5	2,9	23,0
NDPA	0,5	117	27,35	62	35,48	0,5	9,5	79,0
NDBA	0,5	117	67,52	62	82,26	0,5	2,7	11,0
NMOR	0,5	117	76,92	62	90,32	0,6	7,8	40,0
NDPhA	0,5	117	5,13	62	8,06	0,7	2,5	6,0

1.3.2 Métodos analíticos para determinação de nitrosaminas em matrizes aquáticas ambientais

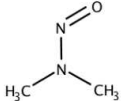
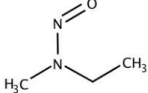
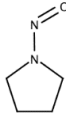
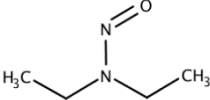
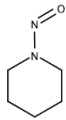
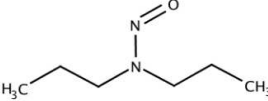
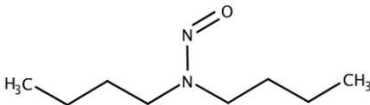
No geral, o método analítico envolve processos como amostragem, preparo de amostra, separação, detecção e análise dos dados. As análises de amostras ambientais geralmente exigem o emprego de técnicas limpas em todas as etapas do processo para reduzir possíveis contaminações e preservar a integridade das amostras.

A análise de nitrosaminas em matrizes aquáticas provou ser um grande desafio para a comunidade científica. Vários estudos de ocorrência em água tratada, rio ou efluente indicam que estes compostos estão geralmente presentes em concentrações de ng L^{-1} , exigindo métodos sensíveis e seletivos o suficiente para viabilizar sua detecção e quantificação.⁵⁰

As nitrosaminas são tipicamente analisadas usando cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas, pois oferece detectabilidade suficiente para baixos níveis de concentração. A técnica de extração em fase sólida é a mais adotada no preparo de amostra para nitrosaminas, frequentemente utilizando fases sólidas de carvão ativado, devido à sua alta capacidade de retenção de compostos polares.⁵⁰

Em 2004, a USEPA desenvolveu um método oficial para quantificar sete nitrosaminas específicas de baixa massa molecular consideradas de maior potencial tóxico e maior potencial de formação, sendo elas: N-Nitrosodimetilamina (NDMA), N-Nitrosometiletilamina (NMEA), N-Nitrosopirrolidina (NPYR), N-Nitrosodietilamina (NDEA), N-Nitrosopiperidina (NPIP), N-Nitroso-di-n-propilamina (NDPA) e N-Nitroso-di-n-butilamina (NDBA). O método emprega extração em fase sólida para o preparo de amostra e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para quantificação destes compostos em água tratada.⁵¹ A Tabela 6 apresenta as sete nitrosaminas contempladas no método oficial da USEPA, que foram objeto de estudo neste trabalho.

Tabela 6. Propriedades físico-químicas para nitrosaminas abordadas neste trabalho.

Acrônimo	Fórmula	Estrutura molecular	CAS	MM (g mol ⁻¹) ⁵²	Temperatura de ebulição (°C) ⁵²	Pressão de vapor (mm Hg-20°C) ⁵²	log K _{ow} ⁵²	Solubilidade em água (mg L ⁻¹) ⁵³
NDMA	C ₂ H ₆ N ₂ O		62-75-9	74,048	153	2,70	-0,57	1 000 000
NMEA	C ₃ H ₈ N ₂ O		10595-95-6	88,064	154	1,10	0,04	300 000
NPYR	C ₄ H ₈ N ₂ O		930-55-2	100,064	214	0,06	-0,19	1 000 000
NDEA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O		55-18-5	102,079	174	0,86	0,48	106 000
NIPI	C ₅ H ₁₀ N ₂ O		100-75-4	114,079	219	0,06	0,36	76 480
NDPA	C ₆ H ₁₄ N ₂ O		621-64-7	130,111	206	0,09	1,36	13 000
NDBA	C ₈ H ₁₈ N ₂ O		924-16-3	158,142	116	0,05	2,63	1 270

1.3.2.1 Técnicas analíticas de separação e análise

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para a determinação de nitrosaminas, porém as mais comuns são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC).

A cromatografia gasosa normalmente é a técnica mais adotada, pois geralmente apresenta menores limites de detecção e pode ser facilmente combinada com uma gama de detectores sensíveis e seletivos, como detector por ionização de chama (FID),⁵⁴ detector de nitrogênio e fósforo (NPD),⁵⁵ detector por quimiluminescência de nitrogênio (NCD)⁵⁵ e principalmente o detector seletivo de massas (MSD).

A popularidade do GC-MS deve-se principalmente à robustez do equipamento, necessária para detectar nitrosaminas em baixas concentrações, e à alta detectabilidade e seletividade proporcionadas pelo monitoramento seletivo de íons (SIM).

A análise por GC-MS é um excelente método para a detecção de nitrosaminas semi-voláteis e termicamente estáveis, principalmente as descritas pelo método oficial da USEPA. Contudo, o uso de GC impede a análise de nitrosaminas maiores, termicamente instáveis ou não voláteis, como por exemplo a NDPhA.⁵⁶ Desse modo, são necessárias outras técnicas para obter-se uma compreensão mais global da composição de nitrosaminas na água tratada. Nesse sentido, o desenvolvimento de trabalhos com cromatografia líquida vem em ganhando mais destaque. Contudo, a técnica de LC-MS/MS acaba tornando-se uma técnica mais cara quando em comparação à de GC-MS, e também mais suscetível ao efeito matriz.

1.3.2.2 Preparo de amostra

Tipicamente, o preparo de amostras em uma análise química chega a consumir 61% do tempo total de análise.⁵⁷ Isso ocorre porque, na maioria dos casos, os instrumentos analíticos não podem manipular as amostras diretamente. Todo o processo analítico pode ser desperdiçado se o método de preparo de amostra for inadequado. Um preparo de amostra preciso é, portanto, um componente essencial

para uma análise bem sucedida, pois assegura a integridade da amostra e remove possíveis interferentes que podem ocasionar efeitos de supressão da detecção do analito e redução de sensibilidade do método.

Devido aos baixos níveis de concentração de nitrosaminas em amostras ambientais (ng L^{-1}), a pré-concentração torna-se parte essencial do método para detectar estes compostos. A técnica de extração em fase sólida é atualmente a mais adotada no preparo de amostra, como uma alternativa à técnica de extração líquido-líquido (LLE).

Longos preparos de amostra são obviamente desvantajosos e procedimentos em várias etapas são propensos à perda de analitos. Desse modo, a técnica de microextração em fase sólida (SPME) recentemente vem se mostrando como uma alternativa bastante viável, porém ainda pouco explorada.

(i) LLE

A técnica de extração líquido-líquido é um método clássico para isolamento e concentração de compostos orgânicos a partir de matrizes aquosas, pois sua grande vantagem é a possibilidade de adequação para uma ampla gama de compostos. Esta técnica baseia-se na separação dos compostos por sua diferença de distribuição entre as fases imiscíveis.

O solvente de extração mais empregado para nitrosaminas é o diclorometano, pois elas são bastante solúveis neste solvente e a pressão de vapor do diclorometano é suficientemente baixa para que não haja degradação ou volatilização das nitrosaminas na etapa de concentração.

Antes do interesse na ocorrência de nitrosaminas em concentrações traço, o preparo de amostras usualmente era realizado por extração líquido-líquido, principalmente para análise de nitrosaminas em alimentos e bebidas. Porém, a alta solubilidade das nitrosaminas em água acaba por limitar a eficiência da extração em concentrações muito baixas.^{58 59}

Atualmente, esta técnica é raramente utilizada por ter inúmeras desvantagens: os limites de detecção nem sempre são suficientes para analisar estes compostos nas concentrações esperadas para matrizes ambientais, a recuperação é geralmente

baixa e varia muito conforme a matriz, a técnica consome uma grande quantidade de tempo, solvente e amostra e, portanto, possui um baixo custo-benefício.

A USEPA possui o Método 607 para análise de três nitrosaminas (NDMA, NDPA e NDPhA) utilizando a técnica de LLE no preparo de amostras. Os valores de limite de detecção do método (MDL) estão na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$.⁶⁰ Outro método utilizando LLE como preparo de amostra para análise de NDMA atingiu um MDL de 2 ng L^{-1} , porém o preparo leva 18 horas de extração contínua.⁶¹

W. Mitch e D. Sedlak também desenvolveram um método de análise de NDMA utilizando a técnica de LLE. O preparo de amostra levou 2 horas, mas as recuperações foram de 21 e 17% para água ultrapura e esgoto tratado, respectivamente.⁶²

Para superar as desvantagens da LLE, um método promissor de microextração líquido-líquido (MLLE) foi desenvolvido para análise de 8 nitrosaminas em água. Os limites de detecção do método chegaram em ng L^{-1} , com recuperações em torno de 90%.⁶³ Ainda assim, a técnica é custosa e pouco difundida para análise de nitrosaminas atualmente.

(ii) SPE

A extração em fase sólida é uma técnica de preparo de amostras usada rotineiramente em laboratórios analíticos para a extração de analitos de matrizes complexas e vem sendo extensivamente usada para a análise de nitrosaminas em matrizes aquáticas. Esta técnica é baseada na distribuição sólido-líquido do composto, e a diferença de afinidade do composto entre as fases permite sua separação.

A extração em fase sólida previne a maioria dos problemas encontrados na extração líquido-líquido, principalmente na melhora da recuperação quantitativa dos compostos, o menor consumo de solvente orgânico, facilidade de automação e uma grande disponibilidade comercial de fases sorventes. Contudo, a técnica tem como principais desvantagens o tempo elevado de preparo e o alto custo dos cartuchos.

Um grande obstáculo na escolha de uma fase sólida de SPE é a capacidade de adsorver compostos pequenos e polares, devido à sua hidrofiliabilidade. Várias fases sólidas já foram avaliadas quanto à extração e concentração de nitrosaminas, porém as fases sólidas ricas em carbono vêm se mostrando a melhor escolha para

nitrosaminas de baixa massa molecular e alta polaridade. Um exemplo é a fase carbonácea Ambersorb 572, de partículas esféricas com alta área superficial. O cartucho próprio para o Método 521 da USEPA feito de carvão ativado de fibra de coco também é comumente empregado no preparo de amostras. Mais recentemente, algumas pesquisas associaram fases de carvão com fases reversas como a LiChrolut EN, um fase de etilvinilbenzeno – divinilbenzeno, a fim de promover a limpeza de possíveis interferentes e melhorar a recuperação de nitrosaminas de menor polaridade.⁵⁰

A Tabela 7 apresenta um resumo dos principais trabalhos utilizando SPE como preparo de amostras. No geral as recuperações são adequadas e os valores de MDL são suficientes para analisar nitrosaminas em matrizes de água em níveis de ng L^{-1} .

Tabela 7. Referências de métodos desenvolvidos para análise de nitrosaminas em água tratada utilizando a técnica de SPE.

Referência	Técnica de análise	Fase sólida	MDL (ng L ⁻¹)						
			NDMA	NMEA	NPYR	NDEA	NPIP	NDPA	NDBA
CHARROIS 2004 ⁶⁴	GC-MS	LiChrolut EN Ambersorb 572	0,7	0,4	1,2	0,6	1,3	1,0	1,3
MUNCH 2004 ⁵¹	GC-MS/MS	Resprep EPA521	0,28	0,28	0,35	0,26	0,66	0,32	0,36
ZHAO 2006 ⁶⁵	LC-MS/MS	LiChrolut EN Ambersorb 572	3,1	2,4	2,1	10,6	0,9	0,2	3,1
PLANAS 2008 ⁶⁶	GC-HRMS	Resprep EPA521	0,8	0,6	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
KRAUSS 2008 ⁶⁷	LC-HRMS	Oasis HLB Bakerbond Carbon	0,4	0,9	1,0	0,7	0,1	0,8	3,3
WANG 2011 ⁶⁸	UHPLC-MS/MS	Resprep EPA521	0,5	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,02
RIPOLLES 2011 ⁶⁹	UHPLC-MS/MS	Resprep EPA521	2	5	2	1	2	1	8
POZZI 2011 ⁷⁰	GC-MS/MS	Resprep EPA521	1,0	1,9	1,5	1,4	1,1	1,4	2,7
MCDONALD 2012 ⁷¹	GC-MS	Supelclean	0,45	0,55	1,16	0,94	0,91	0,83	1,66
QIAN 2015 ⁵⁶	LC-MS/MS	LiChrolut EN Ambersorb 572	0,45	0,25	0,33	2,67	0,45	0,31	0,92
NGONGANG 2015 ⁷²	UHPLC-HRMS	Resprep EPA521	4,2	9,1	1,5	7,4	7,0	7,2	5,3
BEI 2016 ⁴⁶	UHPLC-MS/MS	Resprep EPA521	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Referência	Matriz	Fortificação (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)						
			NDMA	NMEA	NPYR	NDEA	NPIP	NDPA	NDBA
CHARROIS 2004 ⁶⁴	Água ultrapura	10; 200	87; 124	80; 99	67; 91	76; 101	66; 82	76; 101	78; 105
MUNCH 2004 ⁵¹	Água ultrapura	2; 20	94,7; 89,5	81,8; 90,9	92,6; 101	84,6; 95,6	98,3; 93,6	81,7; 87,1	82,2; 104
	Água tratada	20	85,0	81,9	85,2	88,4	91,6	77,1	79,7
ZHAO 2006 ⁶⁵	Água ultrapura	10; 40	42; 78	77; 75	41; 82	ND; 93	81; 105	65; 82	96; 76
PLANAS 2008 ⁶⁶	Água mineral	500	88	91	93	88	91	87	73
KRAUSS 2008 ⁶⁷	Água tratada	10	108	58	110	78	108	70	48
WANG 2011 ⁶⁸	Água ultrapura	2	92,0	90,0	75,0	77,0	86,0	89,0	58,0
	Água tratada	2	101,4	89,0	70,1	76,0	85,0	90,0	66,0
RIPOLLES 2011 ⁶⁹	Água tratada	10; 100	86; 63* 114; 111	88; 64* 116; 107	89; 81* 106; 151	82; 63* 107; 91	85; 75* 120; 120	87; 52* 116; 111	66; 38* 118; 90
POZZI 2011 ⁷⁰	Água ultrapura	3; 50	96; 97	92; 99	84; 93	73; 74	81; 98	76; 90	82; 92
MCDONALD 2012 ⁷¹	Água ultrapura	10; 100	43; 51* 100; 96	55; 71* 92; 98	52; 63* 68; 71	66; 82* 88; 92	72; 78* 72; 76	83; 93* 84; 93	90; 92* 94; 91
	Água tratada	10; 100	79; 52* 90; 100	62; 72* 94; 102	63; 69* 82; 87	73; 85* 93; 100	76; 83* 86; 93	87; 93* 90; 100	93; 94* 104; 98
QIAN 2015 ⁵⁶	Água ultrapura	20	69	70	90	75	77	65	76
NGONGANG 2015 ⁷²	Água tratada	100	82	82	83	75	83	81	78
BEI 2016 ⁴⁶	Água ultrapura	100	81,7	64,2	97,0	69,1	115,6	92,0	88,2

*sem correção por padronização interna.

(iii) SPME

Uma abordagem relativamente recente e bem-sucedida em preparo de amostras ambientais é a técnica de microextração em fase sólida. Esta técnica foi desenvolvida por Pawliszyn em 1989, em uma tentativa de corrigir as limitações inerentes às técnicas de SPE e LLE. A técnica de SPME é economicamente atrativa, pois além de ser um método simples, rápido e gerar uma quantidade pequena de resíduos, ela consome um volume reduzido de amostra, não requer a utilização de solventes orgânicos e pode ser totalmente automatizada. A técnica de SPME produz extratos relativamente limpos e concentrados, sendo muito compatível com análises por cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas.⁷³

A técnica consiste em expor uma fibra de sílica fundida revestida com uma fina camada de material polimérico à amostra, cujos analitos sofrerão processos de sorção. A exposição pode ser por imersão direta (DI) ou na região confinada acima da amostra, ou *headspace* (HS). A extração é considerada completa quando os compostos de interesse atingem o equilíbrio de partição entre a amostra e a fibra (partição gás-líquido ou gás-sólido). Em seguida, a fibra é transferida para o instrumento analítico onde ocorrerá a dessorção dos analitos, seguida da análise cromatográfica.⁷³ Embora a técnica seja muito promissora, a viabilidade da análise de nitrosaminas em matrizes ambientais usando a técnica de SPME ainda não foi amplamente explorada como a técnica de SPE. O desafio da técnica atualmente é chegar em limites de detecção suficientes para análise destes compostos.

Alguns trabalhos na literatura já demonstraram que a técnica de SPME é adequada e tem o potencial para ser uma ferramenta útil para análises rotineiras de nitrosaminas. A alta seletividade do SPME em comparação a métodos mais comuns como SPE ou LLE indica que há pouca ou nenhuma necessidade de processos de *clean-up* de amostra. No entanto, dificuldades em atingir detectabilidade suficiente precisam ser superadas; os valores de MDL reportados, embora ainda na faixa de ng L⁻¹, são ligeiramente superiores aos limites de detecção de métodos utilizando SPE e das concentrações esperadas em água tratada. A Tabela 8 apresenta algumas referências em aplicações de SPME na análise de nitrosaminas em água tratada.

Tabela 8. Referências de métodos desenvolvidos para análise de nitrosaminas em água tratada utilizando a técnica de SPME.

Referência	Técnica de análise	Modo	Fibra	NDMA		NMEA		NPYR		NDEA		NPIP		NDPA		NDBA	
				MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)	MDL (ng L ⁻¹)	CV (%)
GREBEL 2006 ⁷⁴	GC-MS	HS	CAR/PDMS	30	n.i.	90	n.i.	n.a.	-	64	n.i.	59	n.i.	59	n.i.	79	n.i.
HUNG 2010 ⁷⁵	GC-MS	HS	CAR/PDMS	3,2	9,3	n.a.	-	n.a.	-	3,4	3,3	n.a.	-	3,6	15,9	n.a.	-
LLOP 2010 ⁷⁶	GC-MS/MS	HS	DVB/CAR/PDMS	5	3	4	12	1	13	3	3	5	6	2	7	1	3
AMAYREH 2018 ⁷⁷	GC-MS/MS	HS	PA	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	11,92	3,8	5,4	3,5	9,6	5,7	0,78	1,8

*n.i.: não informado; *n.a.: não analisado

1.3.2.3 Métodos alternativos

Em decorrência da priorização das 7 nitrosaminas pela USEPA, alguns pesquisadores passaram a se questionar se estes compostos de fato constituíam a composição majoritária de nitrosaminas formadas nos processos de desinfecção da água. Mais ainda, se o intuito era buscar maneiras para limitar a exposição às nitrosaminas como um grupo, a quantidade total de nitrosaminas configurava uma importante questão, porém a identidade das nitrosaminas restantes permanecia desconhecida.

Nesse sentido, ensaios de Nitrosaminas Totais (TONO) passaram a ser mais recorrentes na literatura. O ensaio de TONO consiste basicamente em analisar a quantidade total de nitrosaminas apenas pela quantificação de óxido nítrico liberado no processo de desnitração destes compostos. Quando associado a análises cromatográficas quantitativas, este ensaio pode fornecer informações sobre a fração representativa de cada composto. Alguns trabalhos publicados recentemente com a aplicação de ensaios de TONO chegaram a conclusões semelhantes;^{78 79 80} a fração correspondentes às 7 nitrosaminas prioritárias não é majoritária. Além disso, a fração de uma nitrosamina específico em relação à concentração total pode variar muito de acordo com os compostos precursores presentes na matriz.

A grande vantagem deste ensaio é capacidade de trazer perspectivas sobre a quantidade total de nitrosaminas presentes em água tratada. Contudo, o ensaio apresenta grandes limitações: os limites de detecção geralmente encontram-se na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, ordens de grandeza maior do que o comumente encontrado em água tratada (ng L^{-1}). A eficiência de conversão de nitrosaminas em óxido nítrico também é um fator limitante e pode variar bastante de acordo com o agente desnitrosante utilizado. Por fim, a complexidade de matrizes aquáticas somada à diversidade de compostos presentes em solução acrescentam a possibilidade da presença de compostos interferentes capazes de liberar óxido nítrico e mascarar resultados experimentais.

1.4 Qualidade da água tratada para abastecimento público no Brasil

No Brasil, a água é utilizada principalmente para irrigação, abastecimento humano e industrial. Segundo dados do Relatório de Conjuntura dos Recursos Hídricos de 2018, a água destinada às práticas agrícolas chega a ser de quase 70% do total consumido. Os abastecimentos humano e industrial contam com quase 10% cada. A demanda por uso de água no Brasil é crescente, com aumento estimado de aproximadamente 80% no total retirado de água nas últimas duas décadas. A previsão é de que, até 2030, a retirada ainda aumente em 24%.⁸¹

As águas do território brasileiro percorrem diversas bacias, atendendo aos diferentes usos. A hidrografia do país é dividida em 12 regiões hidrográficas (RHs) (Figura 2): bacias, grupo de bacias ou sub-bacias hidrográficas que possuem características naturais, sociais e econômicas semelhantes. Este critério de divisão é útil quando há a necessidade de planejamento e gerenciamento dos recursos hídricos em todo o país.



Figura 2. Regiões Hidrográficas do Brasil.⁸¹

Estima-se que o Brasil possua cerca de 12% da disponibilidade de água doce do planeta, porém sua distribuição não é equilibrada ao longo do território brasileiro. A RH Amazônica, por exemplo, em que 85% da área total permanece com cobertura vegetal nativa, concentra aproximadamente 81% da quantidade de água doce disponível em 45% do território nacional, mas representa apenas 5% da população brasileira. Desse modo, os principais temas para a gestão das águas na RH Amazônica giram em torno do desmatamento, hidroeletricidade e navegação.⁸¹ Já as regiões próximas ao Oceano Atlântico possuem mais de 45% da população e menos de 3% dos recursos hídricos do país. A RH Atlântico Nordeste Oriental, por outro lado, ocupa apenas 3,4% do território brasileiro, mas sua gestão de demanda hídrica está muito relacionada com a baixa oferta de água, secas, desertificação e degradação ambiental. A RH do Paraná ocupa 10% do território brasileiro, sendo a região mais populosa e de maior desenvolvimento econômico do país. Por isso, possui as maiores demandas por recursos hídricos, tendo como destaque o uso industrial, agrícola e abastecimento urbano. Assim, a qualidade das águas de abastecimento público da RH do Paraná é muito afetada pela escassez de água e pelo estresse provocado pela poluição e/ou contaminação dos corpos hídricos.⁸¹

A crise hídrica instaurada no país é crescente e preocupante. Muito se associa a crise hídrica aos padrões de distribuição das chuvas e eventos extremos decorrentes do seu excesso ou da escassez, como estiagens, secas, enxurradas e inundações. Contudo, a crise é muito mais profunda e complexa. O crescimento da demanda hídrica contribui para uma situação em que a demanda é maior do que disponibilidade e capacidade de renovação dos mananciais. Este crescimento é consequência direta do crescimento populacional e da ampliação dos níveis de consumo, e tais fatores aumentam a pressão sobre os mananciais de abastecimento público. Estes fatores e seus efeitos não ocorrem de forma isolada, havendo uma relação dos fatores urbanos, industriais e rurais na degradação dos mananciais e consequentemente na qualidade da água.

A dimensão da crise hídrica pode ser estimada quando se analisam a precariedade do sistema de água e de esgotos sanitários e industriais, o uso inadequado de defensivos agrícolas, a inadequação das soluções utilizadas para o destino do lixo erosão, a desproteção dos mananciais e os níveis de poluição

ambiental. A manutenção desse quadro resulta na baixa qualidade da água distribuída, principalmente na qualidade da água para abastecimento público.⁸²

A legislação brasileira atual que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade é a Portaria de Consolidação nº5 de 28 de setembro de 2017. Segundo o Anexo XX, Capítulo V, Art. 24, “Toda água para consumo humano, fornecida coletivamente, deverá passar por processo de desinfecção ou cloração”.⁸ Não obstante, a porcentagem de municípios com algum tipo de abastecimento de água tratada era de 82,0% em 2000 e 93,4% em 2008 (Tabela 9), o que corresponde a apenas 83,5% da população. De acordo com o IBGE, os tratamentos podem ser classificados em convencional (tratamento da água bruta pelos processos de floculação, decantação, filtração, correção de pH, desinfecção e fluoretação), não-convencional (tratamento da água bruta por clarificador de contato, estações de tratamento de água compactas, filtragem rápida, etc) e simples desinfecção (tratamento da água bruta que recebe apenas desinfecção antes de sua distribuição à população).⁸³

Tabela 9. Municípios com algum tipo de abastecimento de água tratada.

População	Municípios com abastecimento geral (%)		Municípios com algum tipo de tratamento (%)		Municípios sem nenhum tipo de tratamento (%)	
	2000	2008	2000	2008	2000	2008
Brasil	97,9	99,4	82,0	93,4	18,0	6,6
Até 50 000 hab d.d. < 80 hab/km ²	97,6	99,4	78,9	92,1	21,1	7,9
Até 50 000 hab d.d. > 80 hab/km ²	98,7	99,2	94,5	97,7	5,5	2,3
50 000 a 100 000 hab d.d. < 80 hab/km ²	100,0	100,0	92,4	99,3	7,6	0,7
50 000 a 100 000 hab d.d. > 80 hab/km ²	100,0	100,0	99,4	100,0	0,6	0,0
100 000 a 300 000 hab d.d. < 80 hab/km ²	100,0	100,0	97,1	100,0	2,9	0,0
100 000 a 300 000 hab d.d. > 80 hab/km ²	100,0	100,0	97,6	100,0	2,4	0,0
300 000 a 500 000 hab	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
500 000 a 1 000 000 hab	100,0	100,0	94,4	100,0	5,6	0,0
Mais de 1 000 000 hab	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0

*d.d.: densidade demográfica; hab: habitantes

1.4.1 A Região Metropolitana de Campinas e sua importância para o Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo é o mais populoso e o de maior dinamismo econômico do país, reunindo 45,5 milhões de habitantes em 645 municípios espalhados em mais de 248 mil km². Pouco mais da metade dos municípios paulistas possuem captações exclusivamente subterrâneas. Próximo à capital e a leste do estado encontra-se um maior número de captações superficiais (29% dos municípios), enquanto os 20% restantes das sedes urbanas são abastecidas de forma mista.⁸⁴

Grande parte dos mananciais que abastecem o Estado de São Paulo apresenta problemas de qualidade de água, particularmente agravados nos períodos de estiagem. Em função das limitações da disponibilidade hídrica dos mananciais atualmente explorados, o estado necessita de grandes investimentos em tratamento de água, e coleta e tratamento de esgoto.⁸²

A Região Metropolitana de Campinas (RMC) foi criada pela Lei Complementar do Estado de São Paulo nº 870/00 de 19 de junho de 2000 e atualmente é integrada por 20 municípios: Americana, Artur Nogueira, Campinas, Cosmópolis, Engenheiro Coelho, Holambra, Hortolândia, Indaiatuba, Itatiba, Jaguariúna, Monte Mor, Morungaba, Nova Odessa, Paulínia, Pedreira, Santa Bárbara d'Oeste, Santo Antônio de Posse, Sumaré, Valinhos e Vinhedo.⁸⁵

Segundo dados do IBGE, a RMC é a décima maior região metropolitana do Brasil e a segunda maior do Estado de São Paulo, possuindo o terceiro melhor IDH-M do país (0,792, alto), atrás apenas das regiões metropolitanas de São Paulo (0,794, alto) e de Florianópolis (0,815, muito alto).⁸⁶ A RMC possui uma área territorial de aproximadamente 3,8 mil km², uma população que já ultrapassa 3,2 milhões de habitantes e um PIB *per capita* médio de R\$ 48 mil por ano, configurando quase 9% do PIB estadual em 2016.⁸⁴ A Tabela 10 reúne a área territorial (e classificação), população (e classificação), IDH-M e PIB *per capita* para os municípios compreendidos na Região Metropolitana de Campinas.⁸²

Tabela 10. Área territorial (km²), População, IDH-M e PIB per capita (R\$) para municípios da Região Metropolitana de Campinas.⁸⁴

Município	Área (km ²)		População (nº hab)		IDH-M	PIB <i>per capita</i> (R\$)
Ano de referência	2018		2018		2010	2016
Americana	133,912	(14º)	237.112	(4º)	0,811	44.417,02
Artur Nogueira	178,026	(6º)	53.450	(15º)	0,749	19.388,74
Campinas	794,571	(1º)	1.194.094	(1º)	0,805	49.876,62
Cosmópolis	154,665	(7º)	70.998	(11º)	0,769	19.396,97
Engenheiro Coelho	109,941	(15º)	20.284	(18º)	0,732	23.074,63
Holambra	65,577	(19º)	14.579	(19º)	0,793	66.380,04
Hortolândia	62,416	(20º)	227.353	(5º)	0,756	52.570,87
Indaiatuba	311,545	(3º)	246.908	(3º)	0,788	49.861,28
Itatiba	322,276	(2º)	119.090	(8º)	0,778	44.580,54
Jaguariúna	141,391	(12º)	56.221	(14º)	0,784	158.703,96
Monte Mor	240,566	(5º)	58.765	(13º)	0,733	40.134,15
Morungaba	146,752	(11º)	13.458	(20º)	0,715	30.316,36
Nova Odessa	73,788	(18º)	59.381	(12º)	0,791	48.867,19
Paulínia	138,777	(13º)	106.776	(9º)	0,795	314.637,69
Pedreira	108,817	(16º)	47.361	(16º)	0,769	24.386,64
Santa Bárbara D'Oeste	271,030	(4º)	192.536	(6º)	0,781	26.590,27
Santo Antonio de Posse	154,133	(8º)	23.085	(17º)	0,702	39.295,21
Sumaré	153,465	(9º)	278.571	(2º)	0,762	44.750,01
Valinhos	148,538	(10º)	127.123	(7º)	0,819	41.711,77
Vinhedo	81,604	(17º)	77.308	(10º)	0,817	106.027,00
RMC	3791,79		3.224.453		0,792	48.332,79

Nos últimos anos, a RMC vem ocupando e consolidando uma importante posição econômica, pois comporta um parque industrial moderno e diversificado e possui uma estrutura agrícola e industrial bastante significativa. Dados de 2010 mostram que a RMC possui um bom sistema de saneamento básico no geral, com uma média de 98,04% de domicílios atendidos para sistema de abastecimento de água, 86,96% para rede geral de esgoto sanitário ou pluvial e 99,75% para serviço regular de coleta de lixo (Figura 3).⁸⁷

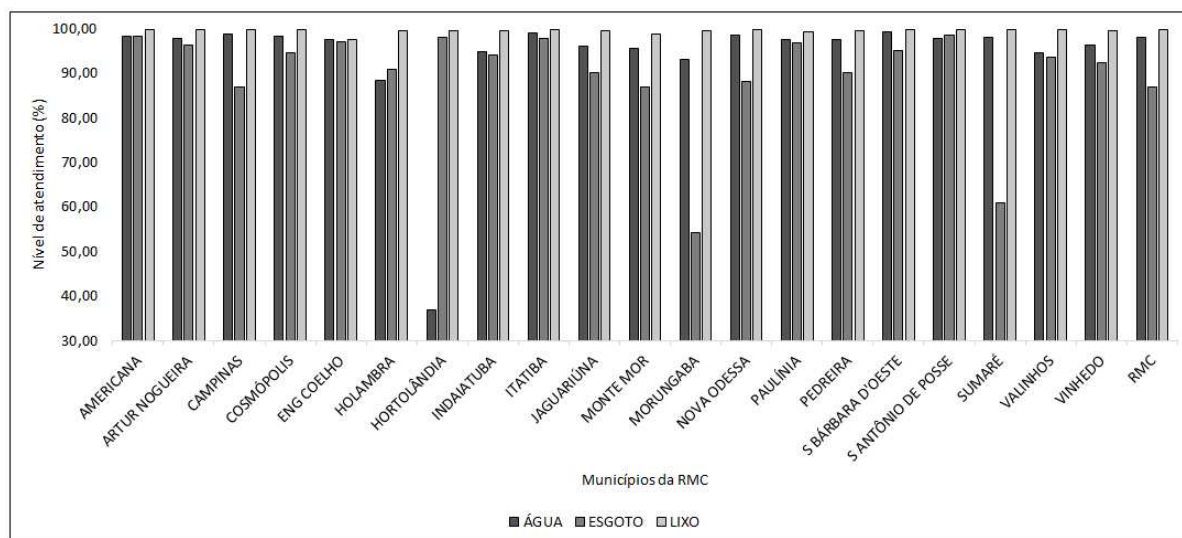


Figura 3. Residências atendidas por abastecimento de água, rede geral de esgoto e coleta de lixo por município para o ano de 2010.

A RMC tem como principais corpos hídricos para abastecimento os rios Atibaia, Jaguari, Camanducaia, Pirapitingui, Capivari e Piracicaba, além de contar com reforço de fontes hídricas subterrâneas (poços) e represas. Municípios predominantemente urbanizados e populosos como Americana, Campinas, Cosmópolis, Hortolândia, Itatiba, Jaguariúna, Paulínia, Pedreira e Sumaré chegam a ter quase 100% de contribuição no abastecimento por estes grandes rios. A Tabela 11 apresenta as concessionárias de água, demanda urbana, manancial de abastecimento, participação do manancial no abastecimento do município, pré-oxidante e desinfetante utilizados no tratamento de água para municípios da Região Metropolitana de Campinas.

Tabela 11. Concessionária de água, demanda urbana, manancial de abastecimento, contribuição do manancial no abastecimento, pré-oxidante e desinfetante utilizados no tratamento de água para municípios da Região Metropolitana de Campinas ⁸².

Município	Concessionária de água	Demanda urbana (L s⁻¹)	Manancial	Contribuição abastecimento (%)	Pré-oxidante	Desinfetante
Americana	Prefeitura (DAE)	622	Rio Piracicaba	100	ClO ₂	Cl ₂
Artur Nogueira	SAEAN	119	Lagoa Cotrins Rib. Boa Vista Poços	28 61 11	NaClO	NaClO
Campinas	SANASA	3528	Rio Atibaia Rio Capivari Poços	94 5 <1	Cl ₂	NH ₂ Cl
Cosmópolis	Prefeitura (DAE)	160	Rio Pirapitingui Rep. Barreiro Amarelo	99 1	Cl ₂	NaClO
Engenheiro Coelho	SAEEC	30	Rep. Pinhalzinho	100	Cl ₂	Cl ₂
Holambra	Águas de Holambra	21	Cór. Borda da Mata Poços	98 2	Nenhum	NaClO
Hortolândia	SABESP	351	Rio Jaguari Poços	~100 <1	Cl ₂	Cl ₂
Indaiatuba	SAAE Indaiatuba	727	Rio Capivari Mirim Cór. Da Barrinha Cór. Barnabé Poços	54 36 8 2	Cl ₂	Cl ₂
Itatiba	SABESP	213	Rio Atibaia Poços	~100 <1	Cl ₂	Cl ₂
Jaguariúna	Prefeitura (DAE)	102	Rio Jaguari Rio Camanducaia Mirim Poços	94 3 3	Nenhum	NaClO

Município	Concessionária de água	Demanda urbana (L s⁻¹)	Manancial	Contribuição abastecimento (%)	Pré-oxidante	Desinfetante
Monte Mor	SABESP	95	Rio Capivari Mirim Rio Jaguari Poços	67 10 23	Cl ₂	Cl ₂
Morungaba	SABESP	31	Cór. Barra Mansa	100	Cl ₂	Cl ₂
Nova Odessa	CODEN	138	Cór. Recanto/Lopes	100	ClO ₂	ClO ₂
Paulínia	SABESP	174	Rio Jaguari	100	Cl ₂	Cl ₂
Pedreira	SAAE Pedreira	118	Rio Jaguari	100	Cl ₂	Cl ₂
S. Bárbara D'Oeste	Prefeitura (DAE)	570	Rep. Santa Alice Cór. Araçariguama Rib Toledos	92 4 4	Cl ₂	NaClO
S. Antonio de Posse	Prefeitura (DAE)	44	Córrego Benfica Poços	94 6	NaClO	NaClO
Sumaré	BRK	772	Rio Atibaia Cór. Bassos	57 43	Nenhum	Cl ₂
Valinhos	DAEV	295	Rio Atibaia Rep. J. A. dos Santos Poços	68 30 2	Cl ₂	Cl ₂
Vinhedo	SANEBAVI	190	Rio Capivari Poços	67 33	Nenhum	Cl ₂

*rib: ribeirão; rep: represa; cór: córrego

Nesse sentido, a região possui uma grande demanda hídrica dividida entre os setores de produção agrícola, produção industrial e abastecimento urbano. Assim, a região torna-se um cenário representativo de muitas outras regiões economicamente desenvolvidas no Estado de São Paulo e configura-se como uma boa localidade para realizar o estudo de caso de ocorrência de nitrosaminas em águas de abastecimento público proposto neste trabalho.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar um método analítico para análise multirresíduo das nitrosaminas N-Nitrosodimetilamina (NDMA), N-Nitrosometiletilamina (NMEA), N-Nitrosopirrolidina (NPYR), N-Nitrosodietilamina (NDEA), N-Nitrosopiperidina (NPIP), N-Nitroso-di-n-propilamina (NDPA) e N-Nitroso-di-n-butilamina (NDBA) em água tratada destinada ao abastecimento público.

2.2 Objetivos Específicos

(i) Desenvolver e validar um método analítico cromatográfico sensível e seletivo para determinação de nitrosaminas, utilizando Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.

(ii) Aplicar e validar o preparo de amostra por extração em fase sólida, estabelecido como método oficial USEPA 521.⁵¹

(iii) Validar o método de acordo com as especificações exigidas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).⁸⁸

(iv) Avaliar a presença de nitrosaminas e fornecer um estudo preliminar em amostras de água tratada para abastecimento público da Região Metropolitana de Campinas, no Estado de São Paulo.

3 Procedimento Experimental

3.1 Padrões analíticos, solventes, reagentes e materiais

- Padrão analítico EPA 521 Nitrosamine Mix contendo 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada nitrosamina em diclorometano, Sigma-Aldrich (San Luis, EUA).
- Metanol grau HPLC, J. T. Baker (Xalostoc, México).
- Diclorometano grau HPLC, Honeywell (Charlotte, EUA).
- Etanol grau PA, LS Chemicals (Mumbai, Índia).
- Propanona grau PA, Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Extran MA 01, Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Pré-filtro de fibra de vidro grau 13400, Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha).
- Sulfato de sódio anidro PA, Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Lã de vidro Shimadzu (Kyoto, Japão).
- Cartuchos para SPE Method Specific USEPA 521, 2,0 g de fase sólida de carvão ativado feito de fibra de coco, Restek (Bellefonte, EUA).

3.2 Equipamentos e utensílios

- Manifold a vácuo de 12 portas PrepSep, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA).
- Bomba de vácuo, Primatec (São Paulo, Brasil).
- Vortex IKA Genius 3, Merse (São Paulo, Brasil).
- Bomba peristáltica 4 canais IPC e CA Cassettes, Ismatec (Wertheim, Alemanha).
- Analisador TOC-5000A, Shimadzu (Tokyo, Japão).

- pHmetro modelo 370 com eletrodo combinado de Ag/AgCl, Orion (Waltham, EUA).
- Medidor de O₂ dissolvido modelo 810A+, Orion (Waltham, EUA).
- Condutivímetro modelo 115A+, caminho de 1 cm, Orion (Waltham, EUA).
- Medidor de potencial redox modelo 250A, Orion (Waltham, EUA).
- Pipetadores automáticos Research Plus de 20, 100, 200, 1000 e 5000 µL, Eppendorf (Hamburg, Alemanha).
- Balança semianalítica UX82005, Shimadzu (Kyoto, Japão).
- Sistema de purificação de água modelo Synergy, Millipore (Burlington, EUA).
- Sistema de fluxo de N₂ desenvolvido em laboratório.
- Sistema de filtração a vácuo.
- Sistema de extração *in line* desenvolvido em laboratório.
- Frascos âmbar de 1000 mL para coleta de amostras.
- Ampolas âmbar de 5 mL para armazenamento das soluções.

3.3 Instrumentação e acessórios

- Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC Trace 1300 ISQ QD Single Quadrupole MS com ionização por Impacto de Elétrons, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA).
- Coluna analítica capilar de sílica fundida para GC J&W DB-624 PN 122-1334, 30 m, 0,25 mm, 1,40 µm, 6% cianopropilfenil e 94% polidimetilsiloxano, Agilent Technologies (Santa Clara, EUA).

3.4 Cuidados com contaminação

A análise de compostos em amostras ambientais cujas concentrações encontram-se em níveis traço requer procedimentos especiais para evitar possíveis

contaminações. Todos os cuidados foram providenciados para evitar contaminações, desde o desenvolvimento do método até a etapa de análise de amostras.

Os materiais e vidrarias utilizados neste trabalho sempre foram mantidos em banho de Extran até seu uso. Vidrarias volumétricas foram limpas com água deionizada, etanol e propanona. Vidrarias não volumétricas foram adicionalmente submetidas a tratamento térmico em mufla a uma temperatura de 400 °C por um período de 4 horas.

3.5 Preparo de soluções

3.5.1 Solução estoque

A solução estoque foi preparada a partir da diluição do padrão analítico de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluído em metanol em balão de 25 mL, resultando em uma concentração de 80 mg L^{-1} . A solução resultante foi posteriormente armazenada em ampolas âmbar mantidas sob refrigeração em geladeira entre 2 e 8 °C.

3.5.2 Soluções Intermediárias

As soluções intermediárias foram preparadas pela diluição da solução estoque de 80 mg L^{-1} em diclorometano, resultando em uma concentração de 10 mg L^{-1} . As soluções foram mantidas sob refrigeração em geladeira entre 2 e 8 °C.

3.5.3 Soluções de trabalho

As soluções de trabalho utilizadas foram preparadas diariamente em diclorometano a partir das soluções intermediárias de 10 mg L^{-1} .

3.6 Método cromatográfico

3.6.1 Instrumentação analítica

A instrumentação analítica empregada para o desenvolvimento do método de análise de nitrosaminas em água tratada foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por elétrons (GC-EI-MS).

3.6.2 Coluna cromatográfica

Para atingir a separação física dos compostos, utilizou-se uma coluna de fase estacionária de 6% cianopropilfenil e 94% polidimetilsiloxano, uma fase bastante inerte e de polaridade mediana.

3.6.3 Desenvolvimento e otimização

Iniciou-se o desenvolvimento do método com a análise de uma solução de trabalho de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em diclorometano. A análise foi realizada em modo de varredura completa (*Full Scan*) no intervalo de 40 a 160 m/z e forneceu um quadro qualitativo dos padrões de fragmentação dos compostos de interesse.

A energia de ionização de elétrons é de grande importância quando se utiliza bibliotecas espectrais para fins comparativos, portanto este parâmetro foi mantido em 70 eV de acordo com as bibliotecas espectrais, possibilitando a identificação de cada nitrosamina mediante comparação com espectros provenientes da base de dados do NIST.

Em seguida programou-se o modo de aquisição do analisador para o monitoramento seletivo de íons (SIM). O modo SIM permite a detecção de compostos específicos com maior sensibilidade em relação ao modo *Full Scan*. Neste modo, o instrumento é configurado para reunir dados de massas específicas de interesse, portanto ele responderá apenas àqueles compostos que possuem os fragmentos de

massa selecionados. Este recurso ajuda a eliminar interferências decorrentes de matrizes de amostras complexas, contribuindo para o potencial da técnica analítica.

Normalmente, dois a quatro íons são monitorados por composto e as proporções desses íons serão exclusivas para o composto de interesse. O íon de maior intensidade, normalmente o íon molecular, é utilizado para a quantificação, e os fragmentos são utilizados para confirmação do composto.

Devido às baixas massas moleculares das nitrosaminas e, conseqüentemente, de seus fragmentos, selecionou-se o íon molecular para a quantificação e apenas o fragmento de maior intensidade para a confirmação de cada composto.

Os parâmetros cromatográficos foram otimizados utilizando-se soluções diariamente preparadas na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Os parâmetros otimizados foram volume de injeção, vazão do gás de arraste, temperatura do injetor, temperatura de interface, temperatura da fonte de ionização e rampa de temperatura.

3.6.4 Desempenho cromatográfico

A precisão e confiabilidade de um método cromatográfico partem de um sistema bem comportado. O desempenho cromatográfico do método desenvolvido foi avaliado a partir dos cálculos dos parâmetros cromatográficos.

Os parâmetros estudados foram fator de retenção (k), fator de separação (α), fator de alargamento (TF) e resolução (R_s).

3.7 Procedimento de análise de amostras

3.7.1 Coleta de amostras

As amostras de água tratada para abastecimento público foram coletadas em frascos âmbar de 1000 mL, preenchendo-os completamente.

As amostras foram coletadas em domicílios diretamente da tubulação de entrada sem que houvesse contato com caixas d'água residenciais e mantidas sob

refrigeração em geladeira entre 2 e 8 °C até a realização dos procedimentos de extração e análise.

Devido à volatilidade e possibilidade de degradação dos compostos de interesse, as amostras foram analisadas em até 24 horas após sua coleta.

3.7.2 Análise de parâmetros de qualidade da água

As amostras coletadas para o estudo de caso foram analisadas para a determinação da qualidade da água. Os parâmetros físico-químicos analisados foram pH, oxigênio dissolvido (OD), potencial redox (ORP), condutividade elétrica (CE) e teor de carbono orgânico total (TOC).

As análises de pH, oxigênio dissolvido, potencial redox e condutividade elétrica foram realizadas em amostras ambientadas em uma temperatura de 25 °C. Uma alíquota de 100 mL foi transferida para um béquer limpo e realizou-se medições diretas com os respectivos equipamentos previamente calibrados a 25 °C.

O teor de carbono orgânico total foi medido com o método de combustão catalítica em elevada temperatura empregando um catalisador de alumina suportado em platina. A temperatura do forno foi mantida em 690 °C e o volume de injeção foi de 53 µL. Os teores foram determinados por curva analítica com os pontos de 1, 2,5, 5 e 10 mg L⁻¹, cujo coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,999$.

3.7.3 Preparo de amostras

As nitrosaminas foram extraídas por extração em fase sólida, cujo procedimento foi realizado de acordo com o Método USEPA 521,⁵¹ utilizando cartucho propriamente desenvolvido para o método. Optou-se por utilizá-lo, pois é um método bem descrito, de simples reprodução e é frequentemente utilizado em outros trabalhos da literatura, proporcionando possíveis comparações.

Previamente à extração, as amostras foram filtradas com pré-filtro de fibra de vidro com o auxílio do aparato de filtração à vácuo, prosseguindo para a etapa de extração em fase sólida.

O procedimento foi realizado com o auxílio de um sistema de extração *in line* adaptado de projetos anteriores, desenvolvido em laboratório para processar amostras de maneira rápida, contínua e sem riscos de contaminação.⁸⁹ O sistema consiste no acoplamento do frasco âmbar contendo a amostra a um conjunto de peças adaptadas de PTFE que suportam o cartucho de SPE. A amostra é aplicada no cartucho por aspiração empregando-se uma bomba peristáltica. O esquema representativo do sistema *in line* é apresentado na Figura 4.

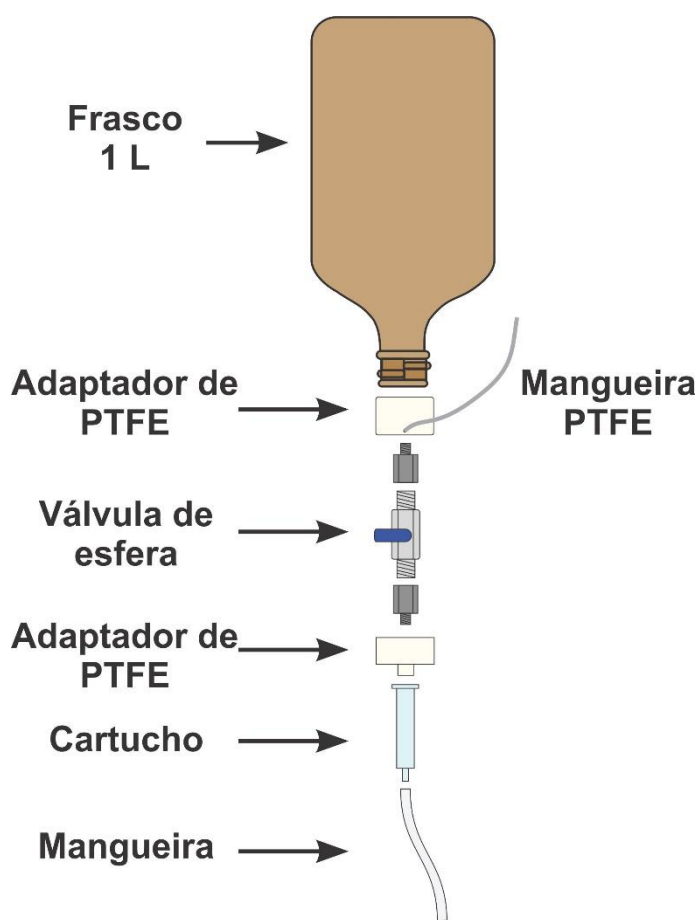


Figura 4. Esquema representativo de sistema *in line* modificado⁸⁹ utilizado para preparo de amostras por SPE.

A extração é constituída pelas etapas de (i) limpeza e condicionamento do cartucho, (ii) carregamento da amostra, (iii) eluição da amostra, (iv) remoção de água residual e (v) concentração do extrato (Figura 5).

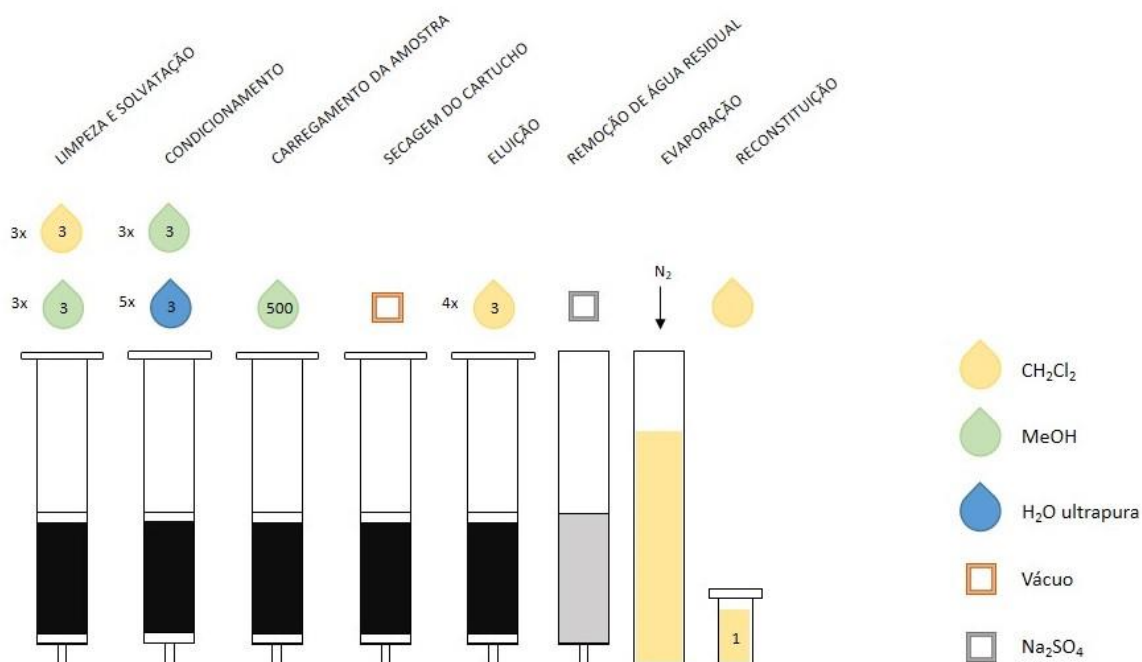


Figura 5. Esquema representativo das etapas de extração de amostra por extração em fase sólida.

(i) Limpeza e condicionamento do cartucho

Ajustou-se a bomba peristáltica de vácuo a uma vazão de 3 mL min^{-1} para a limpeza e condicionamento. A limpeza seguiu a ordem: adicionou-se duas alíquotas de 3 mL de diclorometano, aspirando completamente. Em seguida, adicionou-se duas alíquotas de 3 mL de metanol, aspirando completamente. Prosseguiu-se com o condicionamento do cartucho com duas alíquotas de 3 mL de metanol e cinco alíquotas de 3 mL de água deionizada, sem que o cartucho secasse. Após o condicionamento, prosseguiu-se com o carregamento da amostra.

(ii) Carregamento da amostra

Ajustou-se a bomba peristáltica a uma vazão de 10 mL min^{-1} e aplicou-se 500 mL de amostra.

(iii) Eluição da amostra

Em um *manifold*, secou-se o cartucho a vácuo por 10 minutos, prosseguindo para a eluição dos analitos. Com o vácuo desligado, preencheu-se o cartucho com 3 mL de diclorometano, permitindo a ambientação do solvente por 1 minuto. Aplicou-se vácuo com fluxo gota a gota, adicionando aos poucos mais 9 mL de diclorometano sem permitir que o cartucho secasse em nenhum momento, totalizando 12 mL.

(iv) Remoção de água residual

Transferiu-se a alíquota de 12 mL para uma pequena coluna de vidro, previamente empacotada com lã de vidro e 7 gramas de sulfato de sódio anidro, e ambientada com 2 mL de diclorometano. Após a adição da alíquota, lavou-se a coluna com 3 mL de diclorometano. O extrato final foi coletado em tubo de ensaio com tampa. O esquema representativo da coluna de vidro é apresentado na Figura 6.

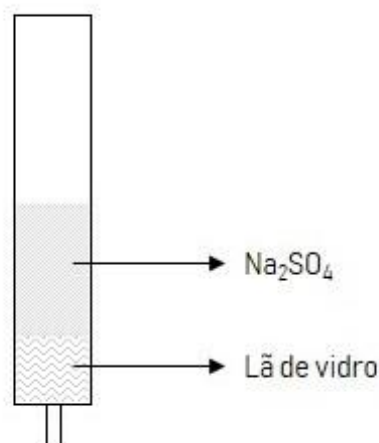


Figura 6. Esquema representativo da coluna secativa de vidro.

(v) Concentração do extrato

O volume total extraído foi reduzido sob fluxo brando de gás nitrogênio até aproximadamente 0,6 a 0,9 mL e não menos do que 0,5 mL, a fim de evitar perdas significativas dos analitos. Ajustou-se o volume final do extrato em um balão volumétrico de 1,0 mL, fornecendo um fator de concentração de 500 vezes.

3.7.4 Análise e quantificação de amostras

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os compostos de interesse foram quantificados por calibração, conjunto de operações que estabelece a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição de um material de referência e os valores correspondentes da grandeza associada. A técnica utilizada para quantificação dos compostos foi a calibração por padrão externo, que consiste em analisar a amostra externamente ao padrão.⁹⁰ A curva analítica foi obtida pelo plote do sinal de resposta (área) do analito em função de sua concentração.

3.8 Definição da região de amostragem

As amostras de água tratada para abastecimento público foram coletadas em 13 das cidades mais representativas e populosas da Região Metropolitana de Campinas. As cidades escolhidas foram Americana, Campinas (3 pontos de coleta), Cosmópolis, Hortolândia, Indaiatuba, Itatiba, Jaguariúna, Monte Mor, Paulínia, Santa Bárbara D'Oeste, Sumaré, Valinhos e Vinhedo, demarcadas na Figura 7.



Figura 7. Mapa da Região Metropolitana de Campinas com municípios amostrados para o estudo de caso em destaque.

Na cidade de Campinas coletou-se em três pontos diferentes para abranger as 3 estações de tratamento de água que abastecem a população. O mapa do sistema de produção e distribuição da cidade de Campinas com as regiões de abastecimento de cada ETA é exibido na Figura 8.

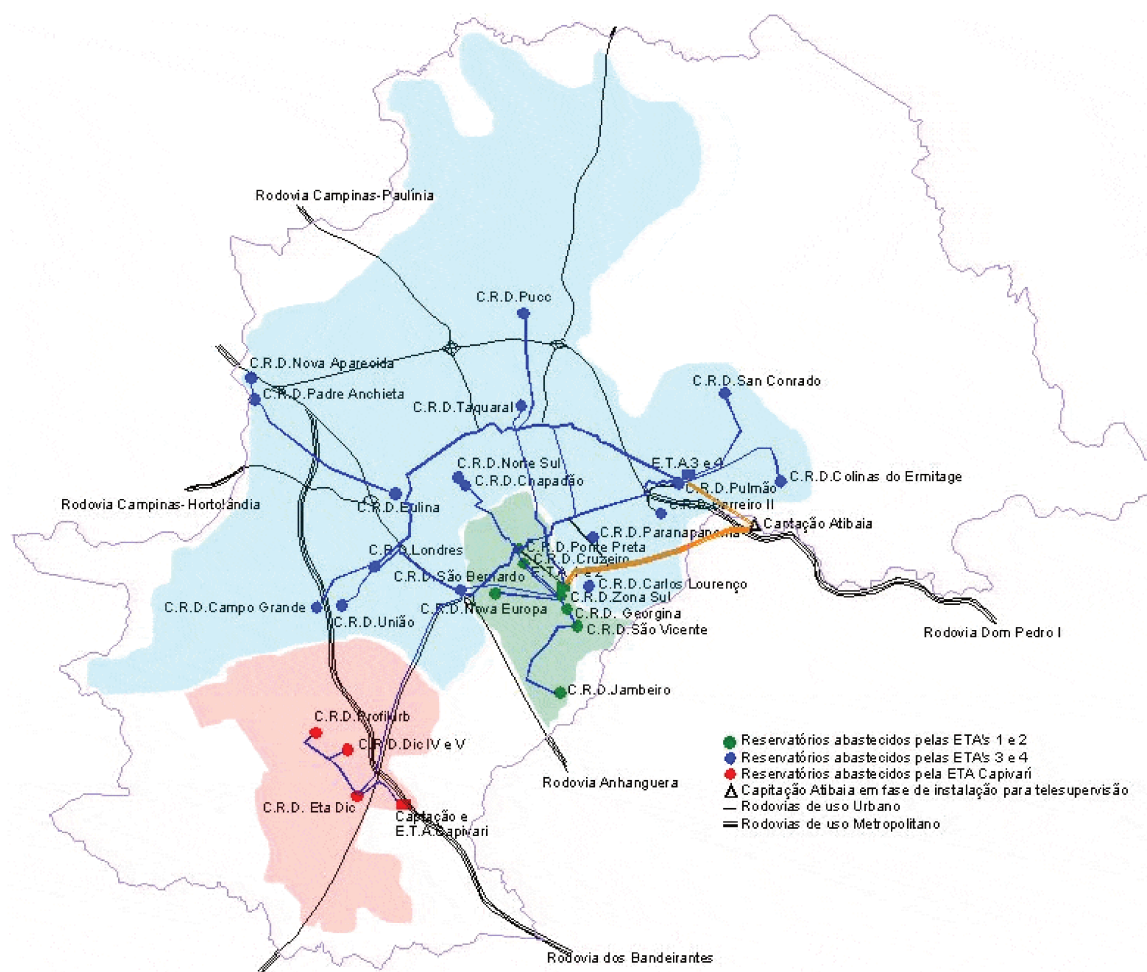


Figura 8. Mapa do sistema de produção e distribuição de água da cidade de Campinas.

3.9 Validação do método analítico

O método desenvolvido para a determinação de nitrosaminas em água para abastecimento público foi validado de acordo com as orientações normativas do INMETRO.⁸⁸ As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental, exatidão e precisão.

O Limite de Detecção do Método foi determinado de acordo com as orientações da USEPA.⁵¹

O método desenvolvido e validado foi empregado inicialmente em três amostras de água coletadas na cidade de Campinas durante o mês de fevereiro de 2019 para testar sua aplicabilidade.

3.9.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade de quantificar os analitos de interesse na presença de possíveis interferentes.⁸⁸

Para a avaliação da seletividade, primeiramente extraiu-se uma amostra de água tratada para abastecimento público isenta dos compostos de interesse (matriz branca) e analisou-se o extrato. Em seguida, fortificou-se o extrato obtido da matriz branca com as nitrosaminas em uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e analisou-se seu extrato. Verificou-se a seletividade do método a partir da comparação dos cromatogramas obtidos do extrato branco e do extrato fortificado.

3.9.2 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a relação diretamente proporcional de uma resposta analítica (variável dependente) a uma variável conhecida (variável independente). A linearidade para métodos cromatográficos geralmente é estabelecida através da relação entre a área do pico cromatográfico obtida para o composto em função de sua concentração analítica.⁸⁸

Inicialmente, estimou-se uma faixa desejável de trabalho que abrangesse as concentrações esperadas dos analitos em água tratada para abastecimento público. Selecionou-se diversos níveis de concentração entre 0,1 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e verificou-se a relação entre área e concentração para cada composto. Em seguida, definiu-se seis níveis de diferentes concentrações (1, 5, 10, 50, 100 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$) para a construção da curva analítica. Avaliou-se a linearidade pela análise de soluções dos seis níveis em triplicatas verdadeiras, preparadas de modo independente. Os testes estatísticos aplicados foram: Teste de Grubbs para avaliar a presença de valores extremos, Teste de Cochran para avaliar a homogeneidade da variância (homocedasticidade),

construção do modelo linear por método de mínimos quadrados ordinários (OLS) e análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância da regressão.

3.9.3 Faixa Linear de Trabalho

A faixa linear de trabalho é definida como o intervalo entre a menor e a maior concentração do composto de interesse que apresenta precisão, exatidão e linearidade suficientemente aceitáveis.⁸⁸

O limite superior da faixa linear de trabalho foi definido como a maior concentração em que a linearidade fosse mantida com um coeficiente de determinação superior a 0,990. O limite inferior foi definido como o Limite de Quantificação Instrumental.

3.9.4 Limites de Detecção e Quantificação Instrumentais

O limite de detecção instrumental (LDI) pode ser definido como a menor quantidade detectável do analito de forma confiável e distinta de zero ou de ruídos do sistema, mas não necessariamente quantificável, dada a incerteza associada à medida. O limite de quantificação instrumental (LQI) é definido como a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.⁸⁸ Os valores de LDI e LQI foram determinados a partir da relação sinal-ruído do cromatograma obtido.

3.9.5 Exatidão e Precisão

A exatidão de um método analítico é a medida do grau de concordância entre resultados experimentais em relação a um valor de referência ou valor verdadeiro. Já a precisão é a medida da concordância interna para um conjunto de réplicas.⁸⁸

A exatidão e precisão do método foram avaliadas simultaneamente através de ensaios de recuperação dos analitos. A exatidão foi expressa em termos de recuperação e a precisão foi expressa em termos de repetibilidade pelo coeficiente de

variação. Os testes de recuperação foram conduzidos de modo em que as amostras fossem avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e dentro de um curto intervalo de tempo.

Os ensaios consistiram em fortificar dois tipos de matriz; água ultrapura e água tratada para abastecimento público isenta de analitos (matriz branca). As matrizes foram fortificadas em três níveis de concentração, denominados baixo, médio e alto, contemplados no intervalo linear do método. Cada nível de concentração foi avaliado com 3 réplicas individualmente preparadas a partir de diferentes soluções intermediárias de 1 mg L^{-1} , totalizando 9 determinações independentes para cada matriz. As fortificações foram feitas nas concentrações de 20, 100 e 200 ng L^{-1} .

3.9.6 Limite de Detecção do Método (MDL)

O limite de detecção do método é definido pela USEPA como a concentração mínima do analito que pode ser detectada e reportada como diferente de zero ou diferente do sinal de uma matriz branca, com um nível de confiança de 99%. A determinação do MDL é um procedimento estatístico e, portanto, é projetado para ser uma técnica direta para estimar o limite de detecção para uma ampla variedade de métodos, levando em consideração diversos fatores como as propriedades do analito, eficiência de extração, tipo de matriz, concentração de fortificação e desempenho instrumental.⁹¹

O procedimento de determinação do MDL consiste em selecionar um nível de fortificação entre 2 e 10 vezes o valor do MDL estimado e processar um mínimo de 7 amostras de água ultrapura fortificadas, passando por todas as etapas do método. As amostras devem ser preparadas e analisadas em pelo menos três lotes, em três dias diferentes.⁹¹

4 Resultados e Discussão

4.1 Método cromatográfico

4.1.1 Instrumentação analítica

A instrumentação analítica empregada foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por elétrons (GC-EI-MS) para o desenvolvimento do método de análise de nitrosaminas em água tratada.

O Método USEPA 521⁵¹ utiliza cromatografia gasosa com ionização química por metanol ou acetonitrila, juntamente com espectrometria de massas sequencial (GC-CI-MS/MS) e injeção de grandes volumes (LVI) com injeção por vaporização em temperaturas programadas (PTV).

Geralmente, a ionização por CI apresenta vantagens em relação à ionização por EI, pois é uma ionização mais branda que preserva melhor o íon molecular. Em matrizes mais complexas e com muitos interferentes, o uso de EI leva a uma queda de seletividade de detectabilidade porque é uma ionização mais forte e produz fragmentos não distintos. Além disso, a injeção de grandes volumes em GC-MS configura uma grande vantagem na análise de contaminantes em níveis traço em matrizes limpas, resultando em uma melhor detectabilidade.

No entanto, estas técnicas são compatíveis com uma instrumentação muito mais específica. Desse modo, a escolha de GC-EI-MS torna-se interessante, pois é um método relativamente simples e vantajoso em análises de contaminantes em concentrações traço em matrizes de água mais limpas, como a água tratada.

4.1.2 Coluna cromatográfica

A escolha da coluna é fundamental para uma boa análise cromatográfica. Visto que os compostos de interesse são relativamente voláteis e polares, escolheu-se uma coluna de fase estacionária de 6% cianopropilfenil e 94% polidimetilsiloxano. Esta fase

foi escolhida, pois foi especificamente projetada para análises rápidas de compostos orgânicos voláteis, especialmente poluentes prioritários e solventes residuais.

A separação em colunas de fases estacionárias de natureza não-polar como o polidimetilsiloxano baseia-se em interações dispersivas, portanto a separação depende principalmente da pressão de vapor dos compostos. A introdução de uma fase mais polar como a cianopropilfenil faz com que haja interações polares entre a fase e os compostos. Portanto, aumentar a polaridade da coluna aumenta a retenção dos compostos.⁹²

A escolha de um filme de maior espessura (1,4 µm) baseou-se no princípio de que filmes mais espessos são preferidos na análise de compostos voláteis, uma vez que promovem um aumento em sua retenção e, conseqüentemente, em sua resolução.

4.1.3 Desenvolvimento e otimização

A análise em modo *Full Scan* resultou na seleção do íon molecular e do fragmento de maior intensidade para realizar a quantificação e a confirmação de cada composto, respectivamente. Os íons moleculares e fragmentos para cada nitrosamina são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Íon molecular (quantificação) e fragmento (confirmação) por Ionização por Elétrons (70 eV) selecionados para cada nitrosamina.

Nitrosamina	Íon Molecular (m/z)	Fragmento (m/z)
NDMA	74	42
NMEA	88	42
NPYR	100	41
NDEA	102	42
NPIP	114	42
NDPA	130	43
NDBA	158	84

No modo SIM otimizou-se os parâmetros de volume de injeção, vazão do gás de arraste, temperatura do injetor, temperatura de interface, temperatura da fonte de ionização e rampa de temperatura, resumidos na Tabela 13.

O modo de injeção escolhido foi o *splitless*, comumente adotado para análise de traços. Já o volume de injeção foi o máximo volume de acordo com a capacidade do *liner*. Estes dois parâmetros foram determinados de tal forma a maximizar a detectabilidade, uma vez que a concentração esperada das nitrosaminas em amostras de água tratada é muito baixa.

A vazão do gás de arraste foi ajustada a $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para coincidir com a faixa de velocidade linear ótima do hélio, entre 30 e 45 cm s^{-1} . A temperatura do injetor foi programada em 200°C para garantir a máxima transferência dos compostos e evitar possíveis perdas por volatilização ou degradação. A temperatura de interface foi programada em 250°C de acordo com a temperatura final da corrida e a temperatura da fonte de ionização foi programada na temperatura padrão determinada pelo fabricante de 275°C .

Tabela 13. Parâmetros otimizados para método cromatográfico de quantificação de nitrosaminas por GC-MS.

Modo de ionização	Ionização por Elétrons (EI)	
Modo de injeção	Splitless	
Volume de injeção	4 µL	
Corte do solvente	7 min	
Vazão do gás de arraste (hélio)	1,2 mL min ⁻¹	
Temperatura do injetor	200 °C	
Temperatura de interface	250 °C	
Temperatura da fonte de ionização	275 °C	
Rampa de Temperatura		
Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	40	2
15	250	10

4.1.4 Desempenho cromatográfico

A análise de uma solução de nitrosaminas no modo SIM otimizado em uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em diclorometano produz um cromatograma total (TIC) típico apresentado na Figura 9.

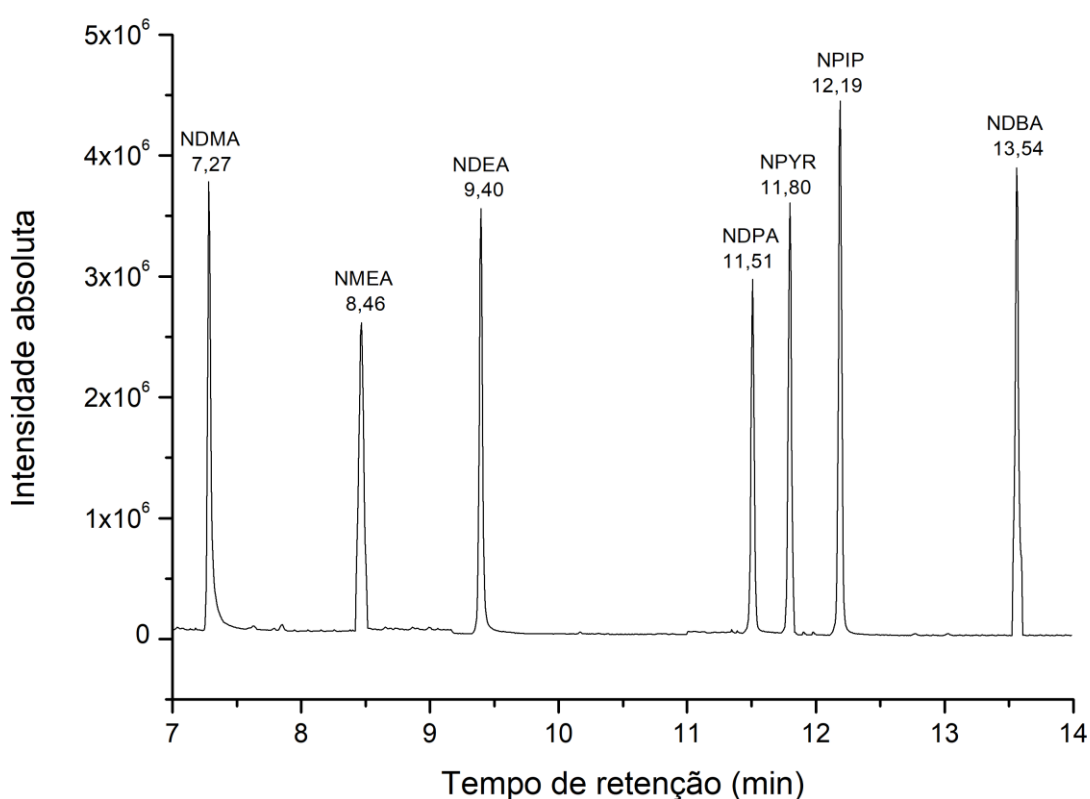


Figura 9. Cromatograma completo para as sete nitrosaminas para uma solução de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em modo SIM otimizado, com destaque para os tempos de retenção.

A avaliação visual da Figura 9 mostra que há qualidade de separação para o método desenvolvido e os picos respectivos a cada nitrosamina estão bem resolvidos entre si.

O desempenho cromatográfico do método desenvolvido foi avaliado a partir seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), fator de separação (α), fator de alargamento (TF) e resolução (R_s) (Tabela 14).

Tabela 14. Parâmetros Cromatográficos do método desenvolvido: t_R : tempo de retenção; t'_R : tempo de retenção ajustado; k : fator de retenção; α : fator de separação; TF: fator de alargamento e R_S : resolução.

Nitrosamina	t'_R (min)	k	α	TF	R_S
NDMA	6,04	4,91	-	1,271	
NMEA	7,23	5,88	1,20	1,042	
NPYR	8,17	6,64	1,13	1,106	
NDEA	10,28	8,36	1,26	0,992	3,55
NPIP	10,57	8,59	1,03	1,056	
NDPA	10,96	8,91	1,04	1,006	
NDBA	12,31	10,01	1,12	1,025	

(i) Fator de retenção, k

O fator de retenção (k) é característico de um dado composto e mede a capacidade de um sistema cromatográfico de retê-lo. Este parâmetro expressa a medida do tempo em que o composto reside na fase estacionária em relação ao tempo em que reside na fase móvel e pode ser calculado como a razão entre o tempo de retenção ajustado do composto e o tempo de eluição de um composto não retido, conforme a Equação 1.⁹²

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

O tempo de retenção ajustado (t'_R) foi calculado pela diferença entre o tempo de retenção obtido para cada composto (t_R) e o tempo de eluição de um composto não retido (t_M),⁹² conforme a Equação 2. O composto não retido utilizado foi o butano, cujo tempo de eluição (t_M) foi de 1,23 minutos.

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Equação 2}$$

As condições cromatográficas devem ser ajustadas de modo que haja uma diferença suficiente nos valores de k dos vários compostos na mistura, de modo a proporcionar uma boa separação entre eles. Também é necessário selecionar condições para que a faixa de valores de k para cada composto seja tal que a separação possa ser concluída dentro de um tempo razoável de análise. Um valor de $k = 0$ significa que o composto não é retido pela coluna. Quando $k = 1$, o composto é

igualmente retido na fase estacionária e na fase móvel e, portanto, seu tempo de retenção será o dobro do tempo de eluição de um composto não retido (t_M). Geralmente, os valores sugeridos de k são de $1 \leq k \leq 10$.^{93 94 95}

Os valores de k obtidos para as nitrosaminas variaram de 4,91 a 10,01 e estão de acordo com os valores sugeridos pela literatura.

(ii) Fator de separação, α

O fator de separação (α) estima a capacidade do sistema em promover a separação entre dois picos adjacentes e foi calculado para cada par como a razão entre os fatores de retenção do pico mais retido (k_{n+1}) e do menos retido (k_n), de acordo com a Equação 3.⁹²

$$\alpha = \frac{k_{n+1}}{k_n} \quad \text{Equação 3}$$

Por definição, $\alpha \geq 1,0$. Quando $\alpha = 1,0$ o valor de k para dois compostos é o mesmo e o sistema não consegue separá-los. Um valor de $\alpha \geq 1,05$ sugere que os compostos estão bem separados entre si.^{93 94 95} Embora os valores de α para o par NPIP/NDEA e NDPA/NPIP sejam inferiores a 1,05, os compostos encontram-se suficientemente separados.

(iii) Fator de alargamento, TF

A simetria dos picos cromatográficos é uma propriedade importante, visto que distorções frontais ou posteriores induzem a superposição de picos, comprometendo a quantificação dos compostos de interesse. A simetria foi analisada através do fator de alargamento, TF, calculado como a razão entre a largura do pico medida a 5% de altura ($w_{0,05}$) e a largura da metade da frente do pico ($a_{0,05}$), conforme a Equação 4.⁹²

$$TF = \frac{w_{0,05}}{2a_{0,05}} \quad \text{Equação 4}$$

Picos simétricos possuem um fator de alargamento de aproximadamente 1,0. Valores de $TF \geq 2,0$ são comumente aceitos, porém o ideal é que este valor esteja entre $0,9 \leq TF \leq 1,2$.^{93 94 95} Os picos obtidos são bastante simétricos e possuem um

fator de alargamento entre 1,006 e 1,271, demonstrando a qualidade do método cromatográfico.

(iv) Resolução, R_s

Tendo em vista que a finalidade mais importante de uma separação cromatográfica é resolver os compostos de interesse, calculou-se a resolução para cada par de picos adjacentes de acordo com a Equação 5, em que t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos compostos mais retido e menos retido, respectivamente, e w_{b2} e w_{b1} são as larguras dos picos medida na base para os compostos mais retido e menos retido, respectivamente.⁹²

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} \quad \text{Equação 5}$$

No geral, uma $R_s \geq 1,0$ é aceitável para análises qualitativas. Para análises quantitativas, uma $R_s \geq 1,5$ é suficiente para separar os picos, pois geralmente indica a ausência de sobreposição.^{93 94 95}

A resolução reportada foi a resolução crítica, correspondente ao par NPIP/NDEA. A resolução crítica do método é o menor valor de resolução calculado para todos os pares de picos e expressa que, se o par crítico possui uma boa resolução, ou seja, se este par de picos está bem separado, conseqüentemente todos os outros pares também estarão. Desse modo, o método é capaz de fornecer uma quantificação confiável dos compostos em baixas concentrações.

4.2 Validação do método analítico

4.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas obtidos para a matriz branca (destacado em vermelho) e para a matriz branca fortificada posteriormente (destacado em preto) para cada nitrosamina (Figura 10 a Figura 16).

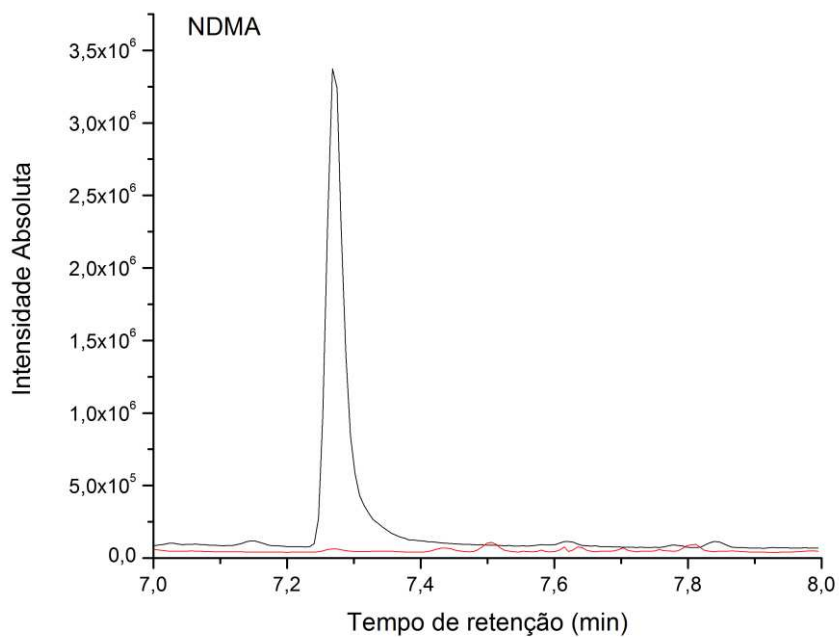


Figura 10. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NDMA.

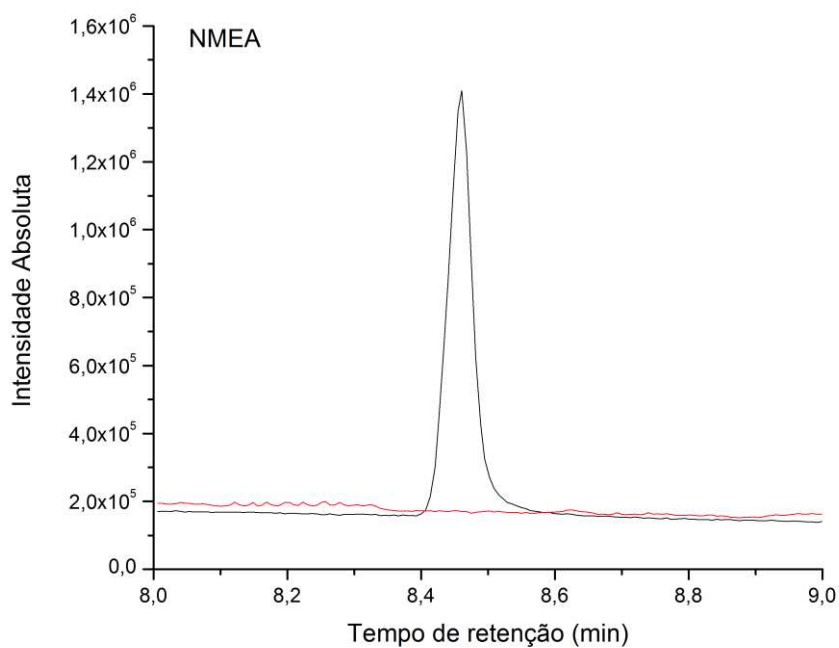


Figura 11. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NMEA.

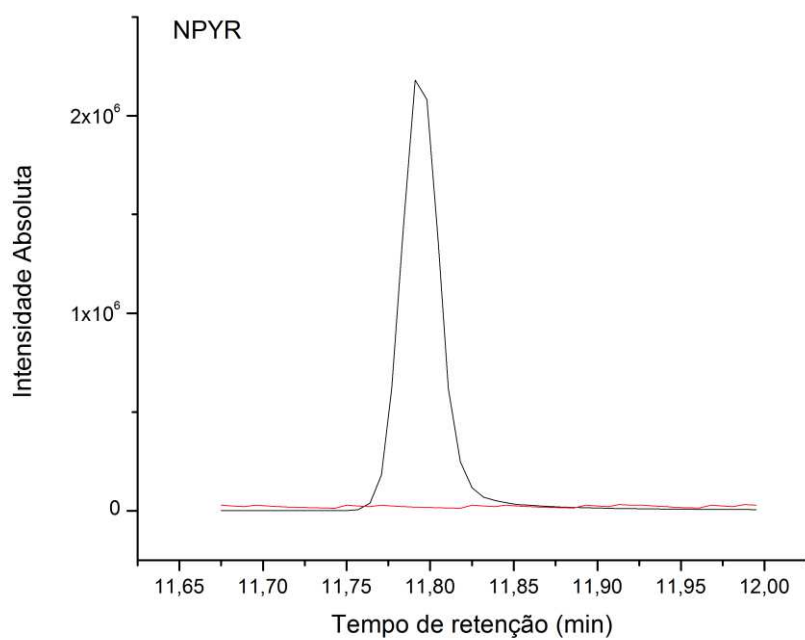


Figura 12. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NPYR.

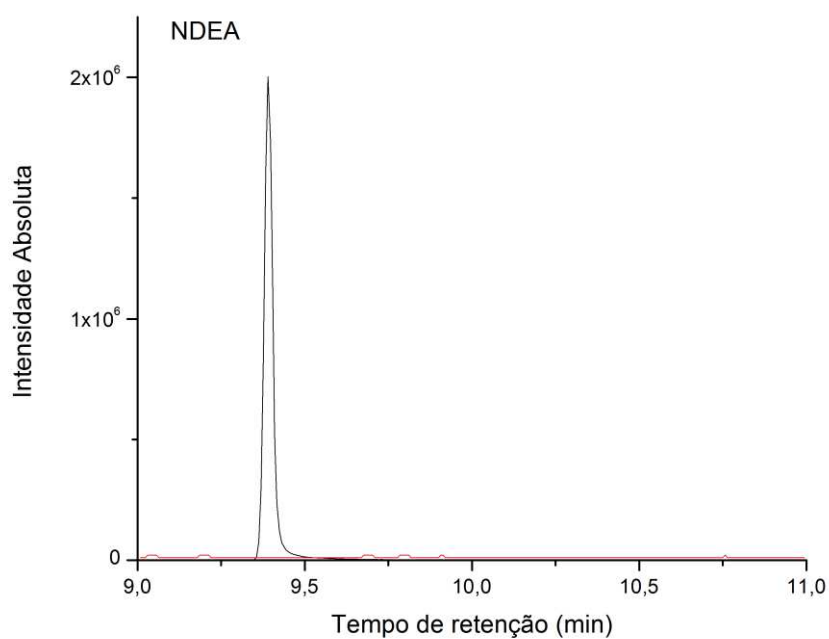


Figura 13. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NDEA.

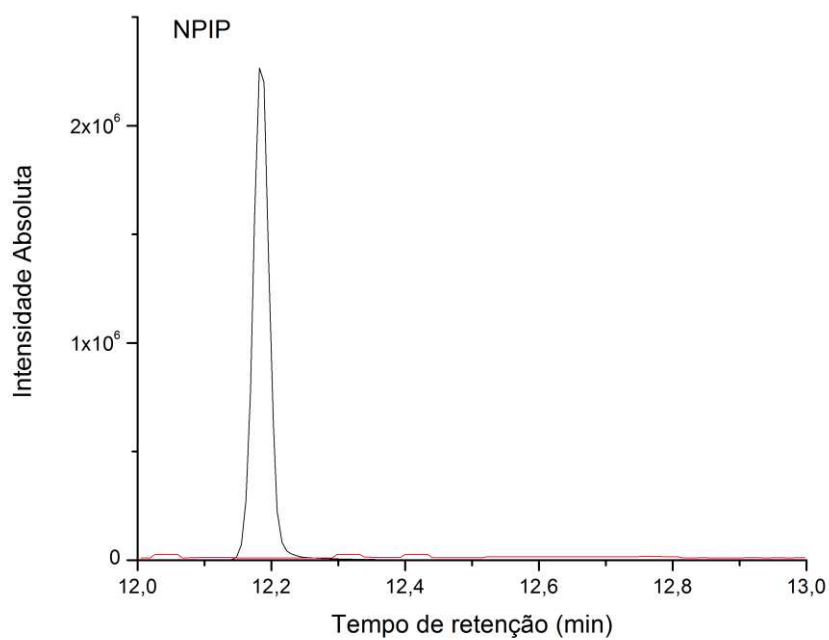


Figura 14. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NPIP.

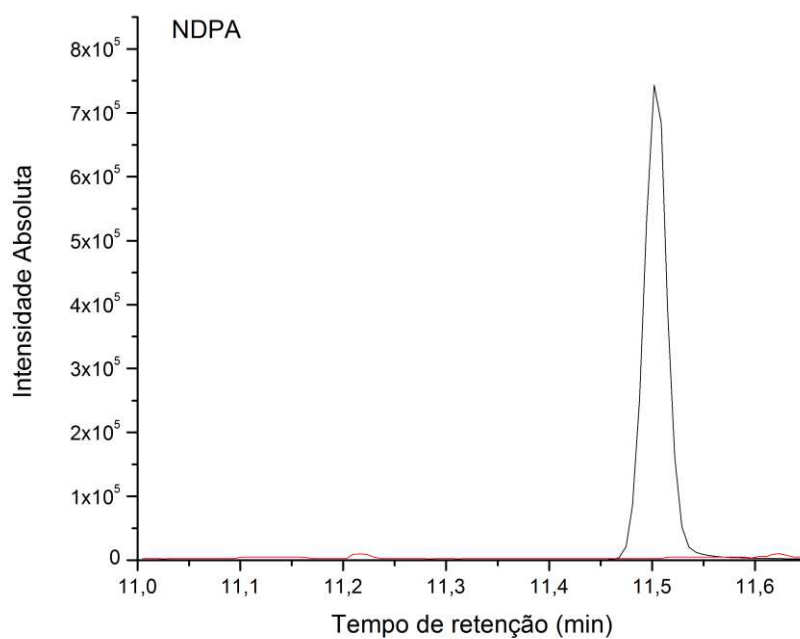


Figura 15. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NDPA.

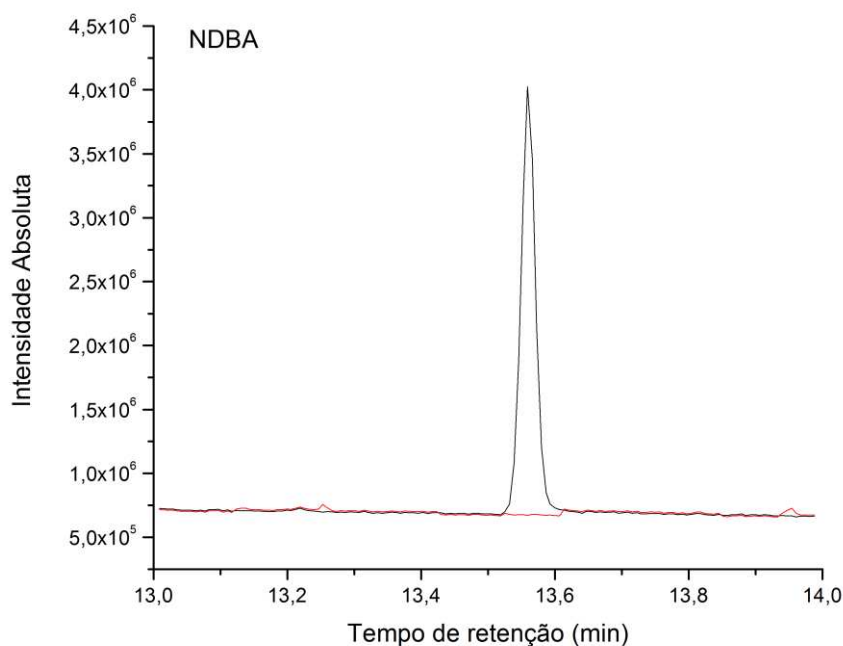


Figura 16. Cromatograma para extrato da matriz branca (vermelho) e extrato da matriz branca fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (preto) para NDBA.

A análise das figuras mostra que apenas o sinal relativo a cada composto está presente no tempo de retenção esperado e não há sinal correspondente a interferentes, portanto o método mostrou-se seletivo, uma vez que foi capaz de distinguir a resposta de cada nitrosamina em função da presença de possíveis interferentes.

4.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada estatisticamente nos quesitos de presença de valores anômalos ou *outliers* (teste de Grubbs), homocedasticidade (teste de Cochran), construção do modelo linear (regressão por OLS) e significância da regressão (ANOVA), nesta ordem. Todos os testes estatísticos foram realizados com uma significância de $\alpha = 5\%$.

(i) Teste de Grubbs

O teste de Grubbs unilateral foi utilizado para verificar a presença de valores anômalos.⁹⁶ O teste de Grubbs avalia as seguintes hipóteses:

$$H_0: x_i \text{ é valor extremo}$$

$$H_a: x_i \text{ não é valor extremo}$$

Cada conjunto de triplicatas obtido para cada nível de concentração foi avaliado com as seguintes estatísticas:

Se x_i é o menor ponto obtido, então:

$$G_0 = \frac{\bar{x} - x_i}{s} \quad \text{Equação 6}$$

Se x_i é o maior ponto obtido, então:

$$G_0 = \frac{x_i - \bar{x}}{s} \quad \text{Equação 7}$$

Em que x_i é a observação, $\bar{x}$ é a média das observações e s é o desvio padrão amostral.

A observação deve ser considerada anômala se o valor de G_0 é maior do que o valor de $G_{\text{crítico}}$.

$$\text{Se } G_0 > G_{\text{crítico}}, \text{ aceita} - \text{se } H_0$$

O valor de $G_{n=3; \alpha=0,05} = 1,153$.⁹⁶ Os valores de G_0 para os pontos inferiores e superiores para cada nível de concentração para cada nitrosamina foram inferiores ao valor de $G_{\text{crítico}}$, conforme apresentado na Figura 17. Isso significa que H_0 pôde ser rejeitada com 95% de confiança e o modelo não apresenta valores anômalos.

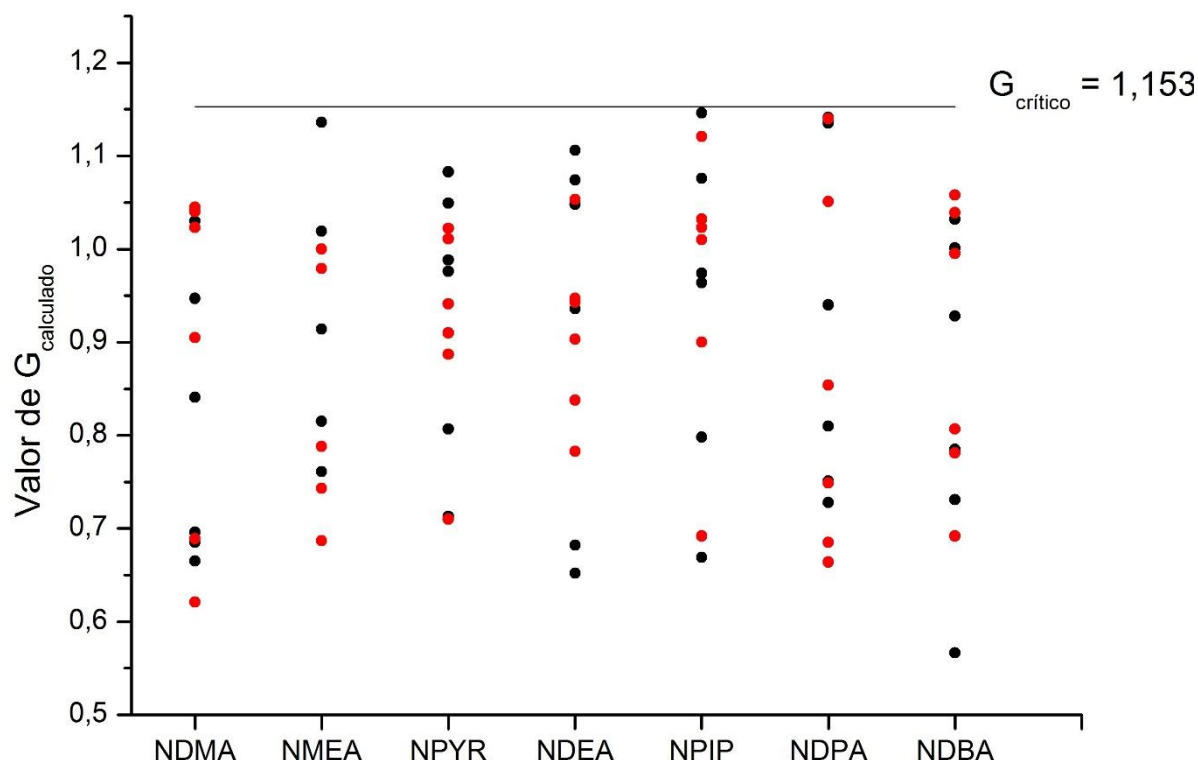


Figura 17. Valores de G para Teste de Grubbs obtidos para valores experimentais mínimos (preto) e máximos (vermelho).

(ii) Teste de Cochran

O teste de Cochran foi utilizado para verificar a homocedasticidade do modelo, ou seja, a homogeneidade da variância.⁹⁷ Este teste avalia a igualdade estatística das variâncias de cada ponto da curva analítica através da comparação da maior variância amostral com as demais variâncias obtidas, dado que o experimento seja balanceado, ou seja, $n_1 = n_2 = \dots = n_k$, com as seguintes hipóteses:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$$

H_a : pelo menos uma variância é diferente das demais.

O modelo para cada nitrosamina foi avaliado com a seguinte estatística:

$$C_0 = \frac{s_{máx}^2}{\sum_i^k s_i^2} \quad \text{Equação 8}$$

Em que $s_{máx}^2$ é a maior variância amostral e $\sum_i^k s_i^2$ é a somatória de todas as variâncias obtidas. O modelo deve ser considerado homocedástico se o valor de C_0 é menor do que o valor de $C_{crítico}$.

Se $C_0 < C_{crítico}$, aceita – se H_0

Os valores de $C_{\text{crítico}}$ (dado o número de pontos da curva e o número de réplicas) é $C_{m=6; n=3; \alpha=0,05} = 0,616$ (utilizado para NDMA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA e NDBA) e $C_{m=5; n=3; \alpha=0,05} = 0,684$ (utilizado para NMEA).⁹⁷

Os valores de C_0 para cada modelo foram inferiores ao valor de $C_{\text{crítico}}$, de acordo com a Tabela 15. Isso significa que H_0 pôde ser aceita com 95% de confiança e que os modelos são homocedásticos.

Tabela 15. Valores obtidos para teste de Cochran (C_0) para verificação de homocedasticidade do modelo, em comparação aos valores de $C_{\text{crítico}}$.

Nitrosamina	Valor de C_0	Valor de $C_{\text{crítico}}$
NDMA	0,593	0,684
NMEA	0,568	0,616
NPYR	0,589	0,684
NDEA	0,523	
NPIP	0,601	
NDPA	0,294	
NDBA	0,522	

É de extrema importância verificar a homocedasticidade do modelo, pois a aplicação de vários testes estatísticos pressupõe que as variâncias dos pontos amostrais sejam estatisticamente equivalentes.

A homocedasticidade descreve uma situação na qual o erro (ou perturbação aleatória) na variável dependente é o mesmo, qualquer que seja o valor da variável independente. Outra maneira de se entender a homocedasticidade é através da dispersão dos dados em torno da reta regressora. Em um modelo homocedástico, os dados se encontram menos dispersos e mais homogeneamente distribuídos. Um modelo heterocedástico apresenta uma forte dispersão dos dados em torno da reta.⁹⁸

A regressão por mínimos quadrados ordinários (OLS) dá o mesmo peso a todas as observações, mas quando há indícios de heterocedasticidade nos dados amostrais, as observações mais espaçadas (ou perturbadas) possuem maior peso do que as outras observações na construção do modelo. Desse modo, o método dos mínimos quadrados ordinários deixa de produzir os melhores estimadores da regressão. Neste caso, o modelo mais apropriado é a regressão por mínimos quadrados ponderados (WLS).

Outro problema associado à heteroscedasticidade é o fato de que os desvios padrão são tendenciosos. Portanto, dependendo do grau heterogeneidade das variâncias, a análise de variância pode ter sua significância estatística comprometida. O impacto da violação do pressuposto da homocedasticidade é uma questão de grau, aumentando à medida em que a heterocedasticidade aumenta. Assim, dada a robustez do método de OLS, a violação da suposição de homocedasticidade deve ser bastante severa para comprometer seriamente o modelo.⁹⁹

(iii) Construção do modelo linear

Confirmada a homocedasticidade, foi possível construir o modelo de regressão utilizando o método de mínimos quadrados ordinários.

A regressão linear fornece uma equação que estima a condicional da variável dependente y , dado o valor da variável independente x , conforme a Equação 9. O coeficiente linear b_0 indica a intersecção da reta regressora com o eixo y e o coeficiente angular b_1 representa a sensibilidade do método, de acordo com a Equação 9.⁹⁸

$$y = b_0 + b_1x \quad \text{Equação 9}$$

Os valores dos coeficientes linear e angular com suas respectivas estimativas de desvio padrão estão apresentados na Tabela 16 e as curvas analíticas de área *versus* concentração com regressão linear e os respectivos gráficos de resíduos padronizados *versus* valores ajustados são apresentados na Figura 18 à Figura 24.

Tabela 16. Parâmetros da regressão linear para modelos construídos pelo método de mínimos quadrados ordinários para cada nitrosamina.

Nitrosamina	b_0	s_{b0}	b_1	s_{b1}
NDMA	-68982	26935	36370	288
NMEA	-126449	45308	29931	442
NPYR	-102948	45387	30828	485
NDEA	-50310	32844	30146	351
NPIP	-79163	31767	32054	339
NDPA	-25528	(12654	10103	135
NDBA	-18887	7507	4113	80

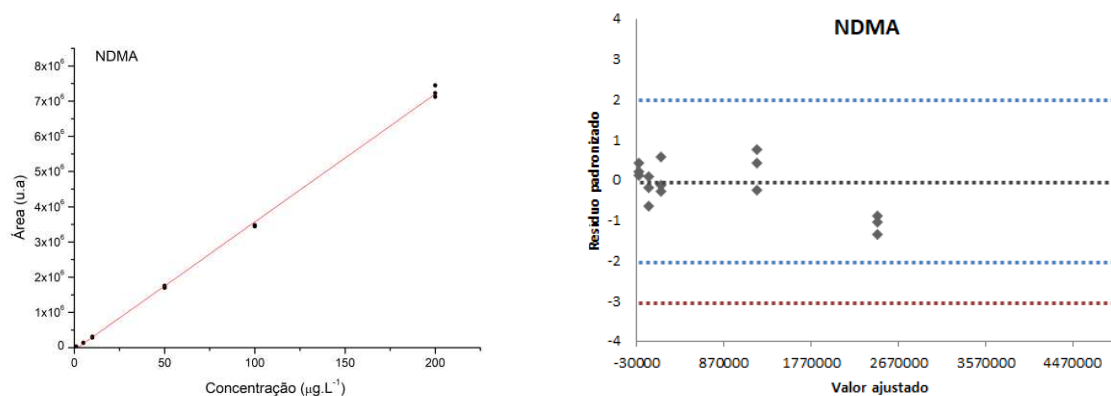


Figura 18. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDMA.

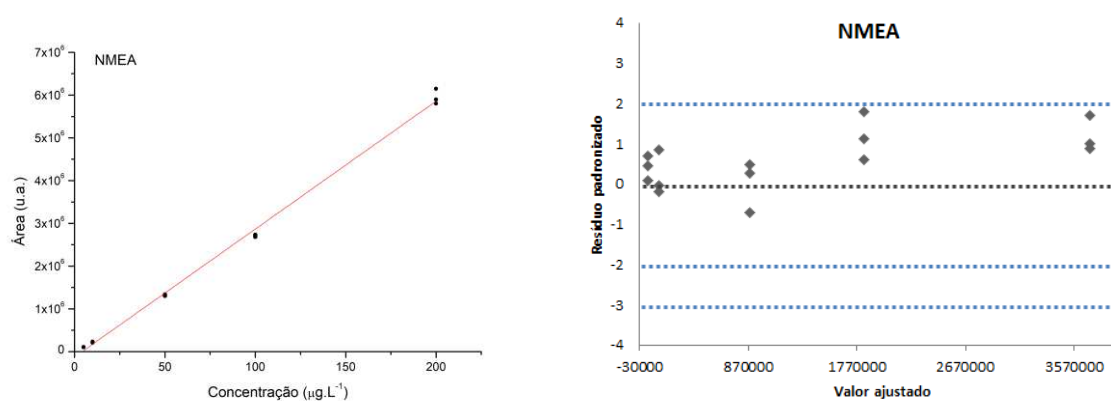


Figura 19. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NMEA.

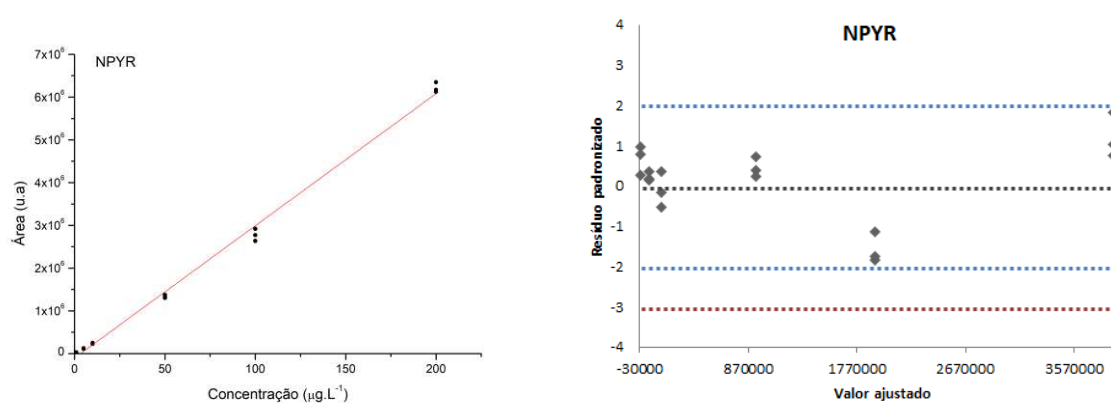


Figura 20. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NPYR.

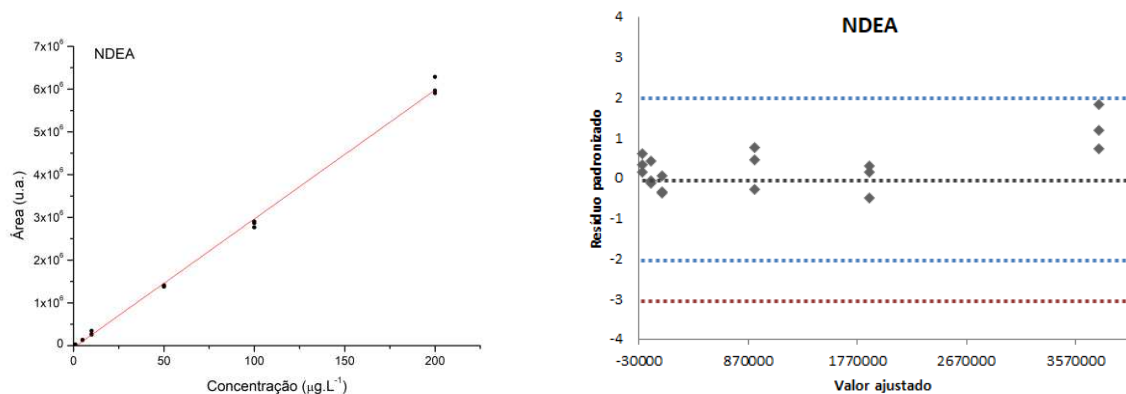


Figura 21. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDEA.

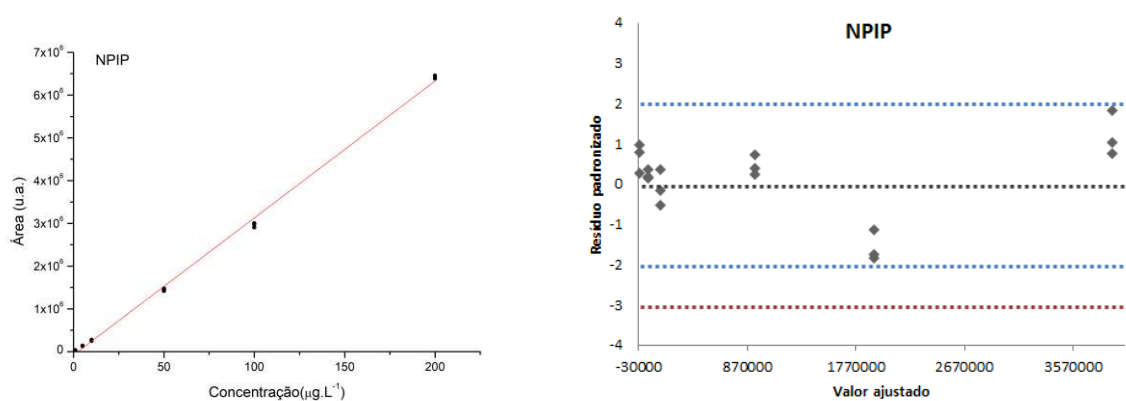


Figura 22. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NPIP.

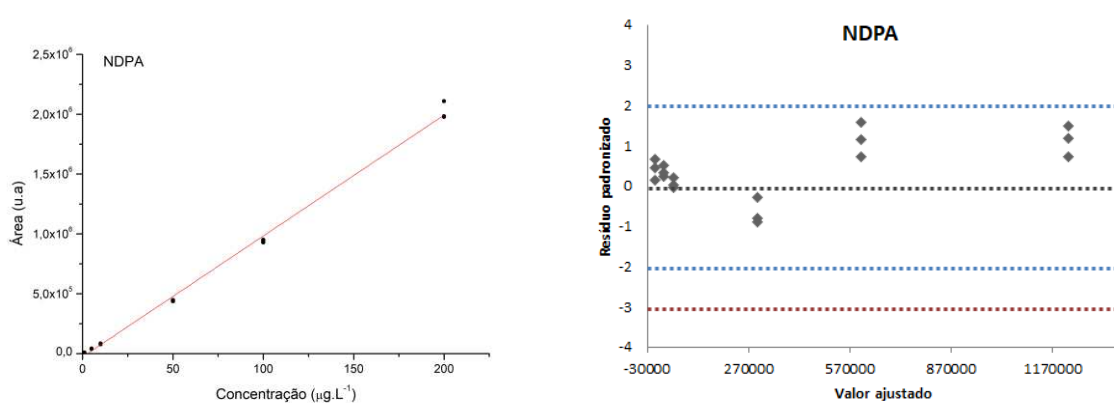


Figura 23. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDPA.

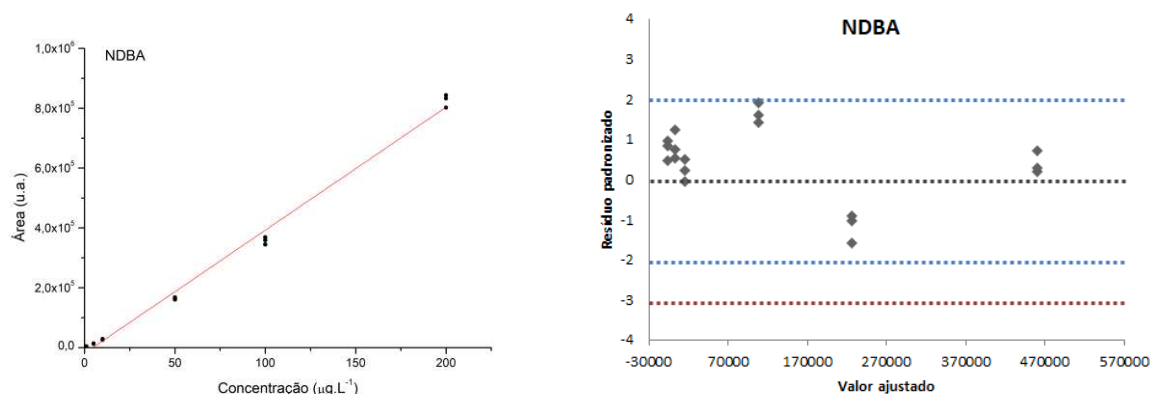


Figura 24. Gráficos da curva analítica e resíduos padronizados para NDBA.

O resíduo padronizado é uma medida da diferença entre os valores observados e os esperados. Ele é normalizado em unidades de desvio padrão, distribuídos em torno da média $\mu = 0$ e desvio padrão $\sigma = 1$. A vantagem de se utilizar resíduos padronizados é que se torna possível analisar os resíduos em termos de desvio padrão. Para uma distribuição normal, 95% dos valores de z encontram-se na faixa de $\pm 1,96\sigma$. Isso significa que se mais de 5% dos pontos amostrais apresentarem resíduos padronizados com um valor absoluto de 1,96, há evidência de que o modelo não seja adequado. Normalmente recomenda-se que os resíduos padronizados estejam contidos na faixa de $\pm 2\sigma$ (95,44%) ou $\pm 3\sigma$ (99,73%). Resíduos padronizados com um valor absoluto maior do que 3,00 podem ser preocupantes pois a probabilidade de um ponto amostral apresentar um valor como este é muito baixa. O modo com que os resíduos padronizados se distribuem também é importante. Resíduos padronizados que apresentam distribuição aleatória em torno do zero indicam que o modelo é linear e homocedástico.⁹⁸

O gráfico dos resíduos padronizados *versus* valores ajustados indica que os pontos estão aleatoriamente distribuídos em torno do 0, sem nenhum comportamento ou tendência. Além disso, os resíduos estão compreendidos entre $\pm 2\sigma$, indicando que o modelo linear está adequado.

(iv) Análise de variância

Para comprovar se a variância total explicada pelo modelo de regressão é estatisticamente significativa, utilizou-se o teste F compreendido na ANOVA, que testa as seguintes hipóteses.⁹⁸

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_a: b_1 \neq 0$$

A hipótese nula do teste diz que, se o coeficiente angular (b_1) é zero, não existe relação linear significativa entre as variáveis, ou seja, a variação de y não depende de x . Rejeitando-se H_0 , admite-se que y é função de x . O valor de F é calculado como a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos:

$$F_0 = \frac{MQ_{regressão}}{MQ_{resíduos}} \quad \text{Equação 10}$$

Valores de F_0 maiores do que $F_{crítico}$ indicam que b_1 deve ser diferente de zero e que H_0 pode ser rejeitada.

$$Se F_0 > F_{crítico}, \text{ rejeita-se } H_0$$

Os valores de $F_{crítico}$ são $F_{v=16; \alpha=0,05} = 4,49$ (utilizado para NDMA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA e NDBA) e $F_{v=13; \alpha=0,05} = 4,67$ (utilizado para NMEA).⁹⁷ O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida do ajuste do modelo linear em relação aos valores observados e varia de 0,0 a 1,0. O R^2 também é uma forma de avaliar a qualidade do ajuste e é uma medida da quantidade de variabilidade amostral observada que pode ser explicada pelo modelo de regressão ajustado. Assim, quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R^2 , mais explicativo o modelo será. O valor de R^2 pode ser calculado como a razão entre a soma quadrática da regressão e a soma quadrática total.⁹⁸

$$R^2 = \frac{SQ_{regressão}}{SQ_{total}} \quad \text{Equação 11}$$

A Tabela 17 resume os testes de análise de variância feitos para cada regressão linear e os valores dos coeficientes de determinação. Conforme a tabela, a variação explicada pela regressão é superior a 99,5% para todos os compostos e os valores de F calculados para todas as regressões são muito superiores aos valores críticos, o que indica que todas as regressões são altamente significativas.

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para modelos de regressão linear por mínimos quadrados ordinários (OLS) para cada nitrosamina.

NDMA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	F	R ²
<i>Regressão</i>	1	1202386	1202386		
<i>Resíduos</i>	16	1203	75	15992	0,9995
<i>Total</i>	17	1203589			
NMEA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	F	R ²
<i>Regressão</i>	1	699838	699838		
<i>Resíduos</i>	13	1700	131	5352	0,9986
<i>Total</i>	14	701538			
NPYR					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	F	R ²
<i>Regressão</i>	1	869492	869492		
<i>Resíduos</i>	16	3416	213	4073	0,9980
<i>Total</i>	17	872908			
NDEA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	Valor de F	R ²
<i>Regressão</i>	1	8344755	8344755		
<i>Resíduos</i>	16	24715	1545	5402	0,9989
<i>Total</i>	17	8369470			
NPIP					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	Valor de F	R ²
<i>Regressão</i>	1	933974	933974		
<i>Resíduos</i>	16	1673	105	8932	0,9991
<i>Total</i>	17	935647			
NDPA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	Valor de F	R ²
<i>Regressão</i>	1	92773	92773		
<i>Resíduos</i>	16	266	17	5590	0,9986
<i>Total</i>	17	93038			
NDBA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática*	Média Quadrática*	Valor de F	R ²
<i>Regressão</i>	1	15375	15375		
<i>Resíduos</i>	16	93	6	2633	0,9970
<i>Total</i>	17	15469			

*Dividido por 10⁸

4.2.3 Faixa Linear de Trabalho

Os valores da faixa linear de trabalho definidos para cada nitrosamina estão apresentados na Tabela 18 no item 4.2.4, juntamente com os valores de LDI e LQI.

4.2.4 Limites de Detecção e Quantificação Instrumentais

O limite de detecção instrumental e o limite de quantificação instrumental foram calculados com base na relação sinal/ruído (STR), determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado (LDI) e quantificado (LQI) com confiança, de acordo com a Equação 12 e a Equação 13.⁹⁸ Os valores de LDI e LQI foram determinados nas razões de 3:1 e 10:1, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação instrumentais para cada nitrosamina estão apresentados na Tabela 18.

$$LDI = 3SNR \quad \text{Equação 12}$$

$$LQI = 10SNR \quad \text{Equação 13}$$

Tabela 18. Limite de detecção instrumental, limite de quantificação instrumental e faixa linear de trabalho para método de quantificação de nitrosaminas por GC-MS.

Nitrosamina	LDI ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQI ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NDMA	0,4	1,0	1 – 200
NMEA	2,0	5,0	5 – 200
NPYR	0,5	1,0	1 – 200
NDEA	0,3	1,0	1 – 200
NPIP	0,3	1,0	1 – 200
NDPA	0,4	1,0	1 – 200
NDBA	0,3	1,0	1 – 200

4.2.5 Exatidão e Precisão

A exatidão foi determinada em termos da recuperação em porcentagem do analito (Rec), calculada de acordo com a Equação 14, em que $\bar{c}_{experimental}$ é a média da concentração obtida após a recuperação e $c_{teórica}$ é a concentração teórica esperada para 100% de recuperação⁹⁸.

$$Rec = 100 \frac{\bar{c}_{experimental}}{c_{teórica}} \quad \text{Equação 14}$$

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade (porcentagem da dispersão de resultados) através do coeficiente de variação (CV), que pode ser calculado como a porcentagem da razão entre o desvio padrão amostral s e a média amostral $\bar{x}$, segundo a Equação 15.⁹⁸

$$CV = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Equação 15}$$

A Tabela 19, a Tabela 20 e a Figura 25 apresentam os valores de recuperação e coeficiente de variação calculados para os três níveis de fortificação nos dois tipos de matriz estudados.

Tabela 19. Parâmetros de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas. Fortificação em 3 níveis em água ultrapura, n = 3.

Composto	Nível (ng L⁻¹)	Recuperação (%)	CV (%)
NDMA	20	68,2	6,6
	100	64,3	3,4
	200	63,1	4,0
NMEA	20	83,2	6,2
	100	75,2	3,2
	200	71,5	3,1
NPYR	20	81,4	7,5
	100	74,9	4,0
	200	70,2	3,0
NDEA	20	86,8	5,3
	100	67,9	3,8
	200	65,3	3,3
NPIP	20	72,0	7,6
	100	65,1	4,9
	200	64,9	2,9
NDPA	20	75,7	5,2
	100	69,1	3,5
	200	64,0	3,3
NDBA	20	85,5	5,1
	100	74,7	4,5
	200	65,1	3,1

Tabela 20. Valores de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas por nível de fortificação. Fortificação em 3 níveis em água tratada, n = 3.

Composto	Nível (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)	CV (%)
NDMA	20 100 200	60,7 55,1 48,0	8,4 5,8 4,4
NMEA	20 100 200	77,8 65,9 52,0	7,1 5,5 3,8
NPYR	20 100 200	76,4 62,4 53,9	8,2 6,7 3,9
NDEA	20 100 200	71,3 58,4 46,9	6,2 7,2 3,6
NPIP	20 100 200	65,4 47,1 40,5	8,9 6,0 3,4
NDPA	20 100 200	71,4 41,0 40,1	6,4 6,8 4,0
NDBA	20 100 200	79,2 55,1 38,4	6,2 5,8 3,9

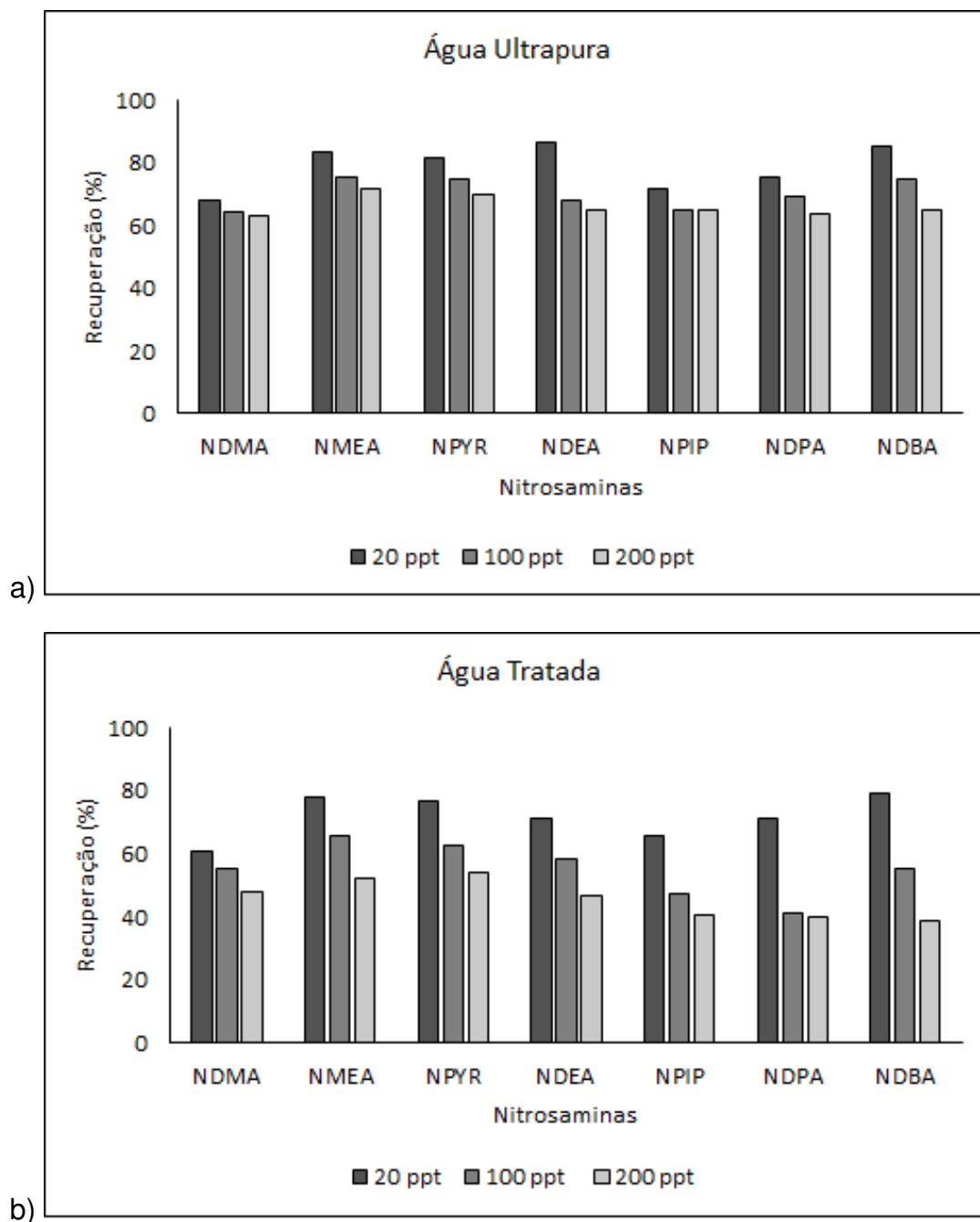


Figura 25. Recuperação para cada nível de fortificação para matrizes de a) água ultrapura e b) água tratada.

Normalmente, os critérios de aceitação de recuperação e coeficiente de variação para um método analítico estão atrelados à faixa de concentração do analito na amostra. Usualmente, quanto menor for a concentração do composto de interesse, maior será o intervalo de recuperação aceitável e menor será a precisão do método.

O método USEPA 521 estabelece critérios de aceitação de recuperação entre 70 e 130% e de coeficiente de variação menor do que 20%.⁵¹ Embora os valores de

coeficiente de variação obtidos no ensaio de recuperação estejam abaixo do aceito pela USEPA, nem todos os valores de recuperação estão contemplados na faixa desejada. A recuperação média das nitrosaminas para os três níveis variou de 65,2 a 76,6% para água ultrapura e está bem próxima ao aceito pela USEPA, com uma média geral de 71,8%. Já para água tratada a recuperação média das nitrosaminas para os três níveis variou de 51,0 a 65,2%, com uma média geral de 57,5%. O coeficiente de variação médio das nitrosaminas variou de 4,0 a 5,1% para água ultrapura, com uma média geral de 4,4% e de 5,3 a 6,3% para água tratada, com uma média geral de 5,8% (Tabela 21).

Tabela 21. Valores médios de exatidão (recuperação) e precisão (coeficiente de variação) para nitrosaminas.

Nitrosamina	Água ultrapura		Água tratada	
	Recuperação média (%)	CV médio (%)	Recuperação média (%)	CV médio (%)
NDMA	65,2	4,7	54,6	6,2
NMEA	76,6	4,2	65,2	5,5
NPYR	75,5	4,8	64,2	6,3
NDEA	73,3	4,1	58,9	5,7
NPIP	67,3	5,1	51,0	6,1
NDPA	69,6	4,0	50,8	5,7
NDBA	75,1	4,2	57,6	5,3
Média	71,8	4,4	57,5	5,8

No geral, nota-se uma tendência de diminuição da recuperação da matriz água ultrapura para a matriz água tratada. Também há uma tendência de diminuição da recuperação conforme o aumento do nível de fortificação. Estas tendências podem ser explicadas em parte por efeitos da diferença de composição das matrizes, o chamado efeito matriz.

O modelo de calibração adotado neste projeto é o de calibração por padrão externo. Este método é o mais utilizado para quantificação de compostos, devido à sua simplicidade e facilidade de interpretação. A denominação de padrão externo é devido ao fato de que o padrão está separado da amostra de concentração desconhecida.⁹⁰

O modelo de calibração por padrão externo leva quatro quesitos em consideração: (i) o sinal do instrumento é diretamente proporcional à concentração conhecida das soluções padrão; (ii) o sinal é proveniente apenas do analito; (iii) a sensibilidade é a mesma para amostras e padrões e (iv) efeitos de matriz ou flutuação do sinal referente ao instrumento não são considerados e corrigidos.⁹⁸

Infelizmente, estabelecer esta similaridade de matriz em análises de amostras mais complexas nem sempre é viável, o que resulta na introdução de erros experimentais nos resultados.

Desse modo, a principal desvantagem do método utilizado é que justamente ele não permite corrigir o efeito matriz, pois assume-se que qualquer diferença entre a matriz dos padrões e a matriz das amostras não afeta a inclinação da curva analítica (sensibilidade).

O método de calibração por padrão interno é o mais comumente utilizado para corrigir flutuações de leituras instrumentais e efeitos da matriz. Neste método, uma quantidade fixa do padrão interno é adicionada a todas as amostras e padrões. O sinal de resposta considerado é a razão entre o sinal do analito e o do padrão interno. Entretanto, obter um padrão interno com propriedades físico-químicas compatíveis com o analito não é simples, além de que o padrão interno não deve estar presente na amostra.⁹⁰

Mesmo sem a correção dos resultados experimentais obtidos por padronização interna, os valores obtidos para recuperação estão entre a faixa de 40 a 120% e os valores de coeficiente de variação estão abaixo de 30%, conforme recomenda a *Association Of Analytical Communities* (AOAC).¹⁰⁰ A Tabela 22 apresenta os valores esperados para recuperação e coeficiente de variação definidos pela AOAC em função da concentração do composto de interesse na amostra.

Estes resultados indicam que, apesar da recuperação não se enquadrar nos valores desejáveis de acordo com o método USEPA 521, os valores de coeficiente de variação indicam que o método é bastante preciso e que a baixa recuperação pode ser aceita. Desse modo, o método possui as características necessárias para a obtenção de resultados confiáveis com qualidade exigida.

Tabela 22. Valores de recuperação e coeficiente de variação esperados de acordo com nível de concentração do analito, definidos pela AOAC.

Porcentagem do analito (%)	Razão do analito	Unidade	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
100	1	100%	98-102	1,3
10	10 ⁻¹	10%	98-102	1,9
1	10 ⁻²	1%	97-103	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	80-110	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60-115	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40-120	30

4.2.6 Limite de Detecção do Método

Para o cálculo do MDL, utilizou-se 7 amostras de água ultrapura preparadas de modo independente e fortificadas em um nível de 5 ng L⁻¹. As amostras foram preparadas e analisadas em três conjuntos em três dias diferentes (3 amostras no primeiro dia, 2 amostras no segundo dia e 2 amostras no terceiro dia). O MDL para cada nitrosamina foi calculado de acordo com a Equação 16, em que t é o valor para o Teste t de Student unilateral para ν graus de liberdade e significância de 1% e s_s é o valor do desvio padrão amostral das análises das amostras para cada nitrosamina,⁹¹ considerando $t_{\nu=6; \alpha=0,01} = 3,143$.⁹⁸

$$MDL = t_{\nu=n-1; \alpha=0,01} \times s_s \quad \text{Equação 16}$$

A USEPA define o limite de quantificação do método (LOQ) como 10 vezes o valor de s_s :

$$LOQ = 10 \times s_s \quad \text{Equação 17}$$

A Tabela 23 apresenta os valores de recuperação em porcentagem, concentração média e desvio padrão amostral para o ensaio de determinação do MDL e os valores de LOQ calculados. Já a Tabela 24 apresenta os valores de MDL

calculados em comparação com os valores de MDL descritos pelo método USEPA 521.

Tabela 23. Valores de recuperação, concentração média e estimativa do desvio padrão para ensaio de determinação do MDL.

Nitrosamina	Recuperação (%)	$\bar{x}$ (ng L⁻¹)	s_s (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)
NDMA	71,0	3,55	0,51	5,1
NMEA	84,2	4,21	1,00	10,0
NPYR	83,4	4,17	0,62	6,2
NDEA	88,2	4,41	0,45	4,5
NPIP	75,0	3,75	0,50	5,0
NDPA	78,4	3,92	0,67	6,7
NDBA	88,4	4,42	0,39	3,9

Tabela 24. Comparação de valores de MDL obtidos para o método proposto e para o Método USEPA 521.

Nitrosamina	Método Proposto	USEPA 521
N	7	8
Fortificação (ng L ⁻¹)	5	1
MDL (ng L⁻¹)		
NDMA	1,61	0,28
NMEA	3,14	0,28
NPYR	1,96	0,35
NDEA	1,42	0,26
NPIP	1,58	0,66
NDPA	2,11	0,32
NDBA	1,23	0,36

Os valores de MDL obtidos para o método proposto são mais altos do que os atingidos pela USEPA. Isso pode ocorrer por duas razões: a falta de correção com um padrão interno e a diferença de equipamento utilizado; enquanto a USEPA utilizou um equipamento de GC-CI-MS/MS com injeção de grandes volumes, o método proposto utilizou um equipamento de GC-EI-MS. Tanto a ionização por CI quanto a utilização da espectrometria de massas sequencial e grandes volumes de injeção contribuem para o aumento de detectabilidade do método.

Apesar disso, os valores de MDL obtidos para o método proposto atingem o nível de concentração de ng L^{-1} satisfatoriamente, mostrando a capacidade de utilização do método em analisar nitrosaminas em concentrações traço.

4.2.7 Aplicabilidade do método desenvolvido

O método proposto foi empregado em amostras reais de água tratada para abastecimento público a fim de testar sua aplicabilidade. As amostras procederam da cidade de Campinas e foram coletadas e analisadas ao longo do mês de fevereiro de 2019.

A Tabela 25 e a Figura 26 apresentam as concentrações encontradas nas três amostras para cada nitrosamina. A NDMA, NPYR e NPIP foram detectadas nas três amostras, enquanto que a NDEA, NDPA e NDBA foram detectadas em duas amostras e a NMEA não foi detectada em nenhuma amostra.

Tabela 25. Concentração de nitrosaminas (ng L^{-1}) para teste de aplicabilidade do método em amostras de água tratada da cidade de Campinas-SP.

Amostra	NDMA (ng L^{-1})	NMEA (ng L^{-1})	NPYR (ng L^{-1})	NDEA (ng L^{-1})	NPIP (ng L^{-1})	NDPA (ng L^{-1})	NDBA (ng L^{-1})
AM01	57	<LD	8	7	16	<LD	<LD
AM02	45	<LD	33	5	31	<LD	10
AM03	29	<LD	10	<LD	20	7	4

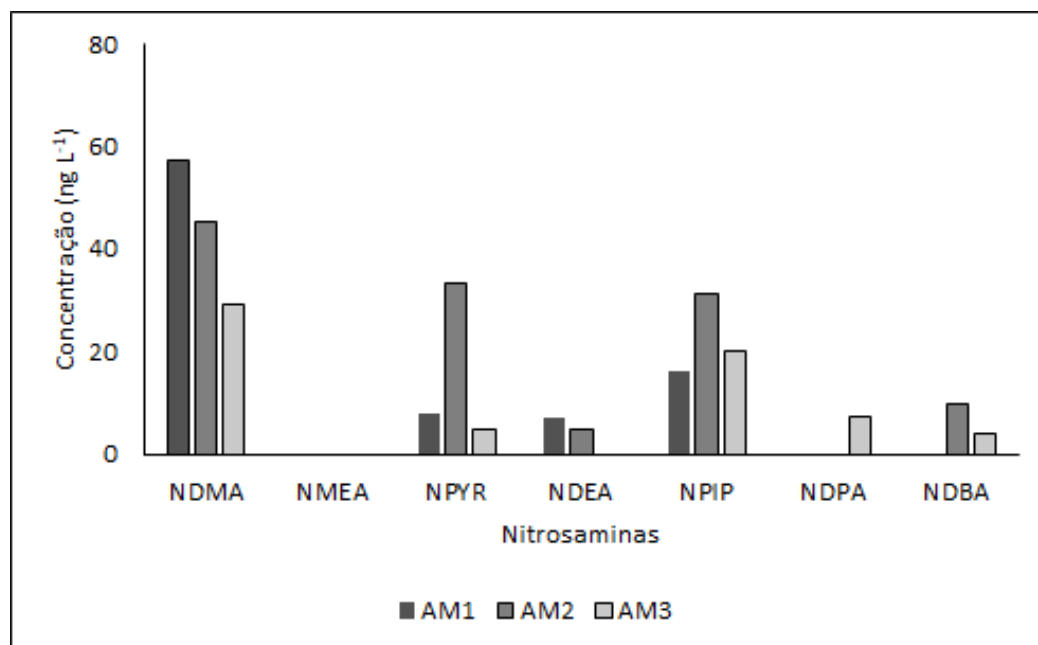


Figura 26. Concentração de nitrosaminas (ng L⁻¹) para teste de aplicabilidade do método em amostras de água tratada cidade de Campinas-SP.

A amostragem inicial atestou que o método foi capaz de detectar e quantificar nitrosaminas em água tratada em concentrações traço e também serviu como o primeiro diagnóstico da presença de nitrosaminas em águas para abastecimento público na cidade de Campinas.

4.3 Estudo de caso: ocorrência de nitrosaminas em águas de abastecimento público na RMC

O estudo de caso proposto neste trabalho contemplou a análise de nitrosaminas em 13 de 20 municípios da Região Metropolitana de Campinas.

A amostragem foi pontual e realizada no mês de maio de 2019. As amostras foram diretamente coletadas de residências das cidades de Americana, Campinas (3 pontos de coleta), Cosmópolis, Hortolândia, Indaiatuba, Itatiba, Jaguariúna, Monte Mor, Paulínia, Santa Bárbara D'Oeste, Sumaré, Valinhos e Vinhedo. A Tabela 26 apresenta os valores de parâmetros de oxigênio dissolvido, pH, potencial de oxirredução, condutividade e carbono orgânico total para a amostragem realizada e a Tabela 27 apresenta as concentrações de nitrosaminas quantificadas nas 15 amostras

das 13 diferentes cidades. Os resultados da Tabela 27 foram apresentados também na Figura 27, que expressa as concentrações totais de nitrosaminas por município amostrado.

Tabela 26. Valores de oxigênio dissolvido (OD), pH, potencial redox (ORP), condutividade elétrica (CE) e carbono orgânico total (TOC) para amostragem do estudo de caso realizado em 13 cidades da Região Metropolitana de Campinas.

Cidade	Abreviação	pH	OD (mg L⁻¹)	ORP (mV)	CE (μS)	TOC (ppm)
Americana	AMR	7,21	5,11	621,7	298	13,76
Campinas ETAs 3 e 4	CPS3e4	7,47	5,52	553,2	270	16,10
Campinas ETA Capivari	CPSCap	7,18	5,38	449,7	331	19,41
Campinas ETAs 1 e 2	CPS1e2	7,71	4,84	468,0	255	18,94
Cosmópolis	COS	6,66	5,74	449,9	101	9,36
Hortolândia	HOR	6,58	6,88	428,8	178	9,66
Indaiatuba	IND	6,99	5,11	602,7	230	8,41
Itatiba	ITB	7,12	5,71	647,2	170	7,52
Jaguariúna	JAG	7,37	5,47	614,5	457	13,32
Monte Mor	MMR	7,43	5,50	642,7	198	10,32
Paulínia	PLN	6,79	6,94	462,7	185	14,68
Santa Bárbara D'Oeste	STB	7,47	5,30	613,5	145	7,65
Sumaré	SUM	7,23	5,02	507,9	441	9,35
Valinhos	VAL	7,17	5,94	530,5	283	8,34
Vinhedo	VIN	7,13	5,27	601,8	218	7,12

Tabela 27. Concentração de nitrosaminas (ng L⁻¹) para amostragem do estudo de caso realizado em 13 cidades da Região Metropolitana de Campinas.

Cidade	NDMA	NMEA	NPYR	NDEA	NPIP	NDPA	NDBA	# NAs	Total
Americana	27	7	<LD	<LD	16	<LD	13	4	63
Campinas 3 e 4	62	<LD	8	8	21	<LD	18	5	117
Campinas Capivari	67	<LD	<LD	20	22	17	<LD	4	126
Campinas 1 e 2	33	<LD	7	6	16	8	<LD	5	70
Cosmópolis	19	<LD	10	5	<LD	<LD	12	4	46
Hortolândia	33	11	11	7	<LD	7	<LD	5	69
Indaiatuba	<LD	<LD	<LD	5	25	12	<LD	3	42
Itatiba	15	<LD	10	<LD	20	<LD	<LD	3	45
Jaguariúna	46	<LD	16	<LD	35	5	12	5	114
Monte Mor	17	<LD	16	<LD	28	<LD	<LD	3	61
Paulínia	28	14	30	18	<LD	<LD	7	5	97
S. Bárbara D'Oeste	<LD	<LD	<LD	<LD	15	7	<LD	2	22
Sumaré	23	<LD	<LD	<LD	12	13	12	4	60
Valinhos	24	<LD	11	<LD	27	<LD	<LD	3	62
Vinhedo	8	<LD	13	11	<LD	<LD	<LD	3	32

<LDI: menor do que o limite de detecção.

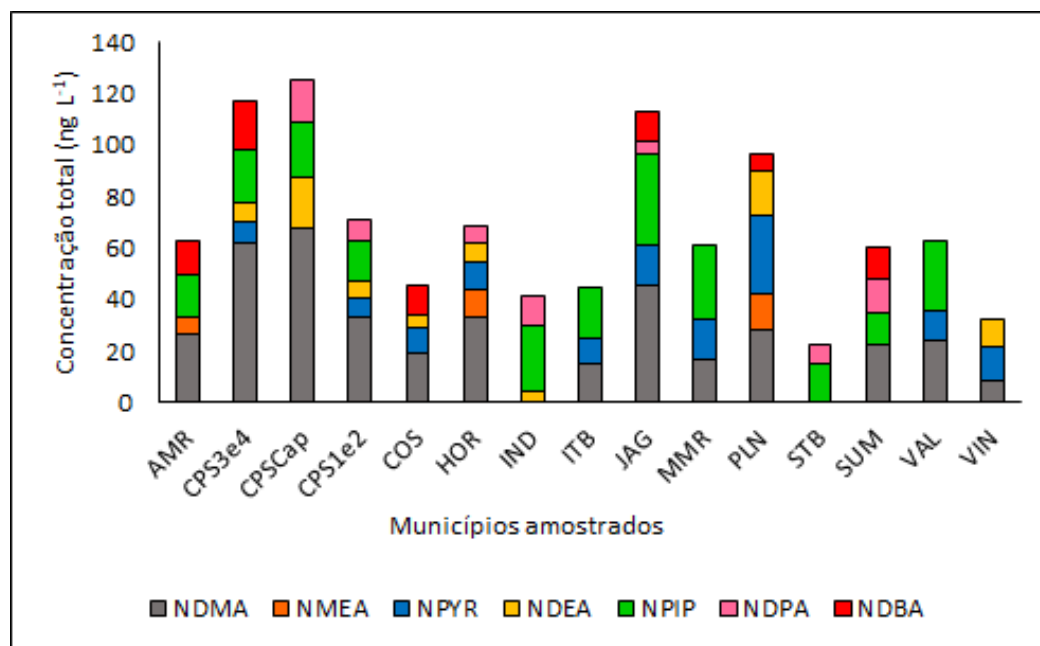


Figura 27. Concentrações totais de nitrosaminas por município amostrado.

É possível notar que municípios maiores e mais populosos abastecidos por mananciais mais impactados como Campinas, Hortolândia, Jaguariúna e Paulínia, possuem as maiores concentrações de nitrosaminas totais, corroborando com o fato de que mananciais mais impactados contribuem mais para a formação destes compostos.

As concentrações mínimas (quando o composto foi detectado e quantificado), médias e máximas das nitrosaminas encontraram-se nas faixas de 4 a 12 ng L⁻¹, 10 a 31 ng L⁻¹ e 14 a 67 ng L⁻¹, respectivamente (Tabela 28 e Figura 28).

Tabela 28. Frequência de detecção e concentrações mínima, média e máxima (ng L⁻¹) de nitrosaminas para amostragem do estudo de caso realizado em 13 municípios da Região Metropolitana de Campinas.

Nitrosamina	Frequência (%)	Mín (ng L ⁻¹)	Méd (ng L ⁻¹)	Máx (ng L ⁻¹)
NDMA	87	8,7	31,0	67,3
NMEA	20	6,8	10,5	14,0
NPYR	67	7,4	13,2	30,1
NDEA	53	4,4	9,8	20,1
NPIP	73	12,2	21,6	34,9
NDPA	47	6,9	9,9	16,5
NDBA	40	6,7	12,3	18,4
Média	55	7,6	15,5	28,8

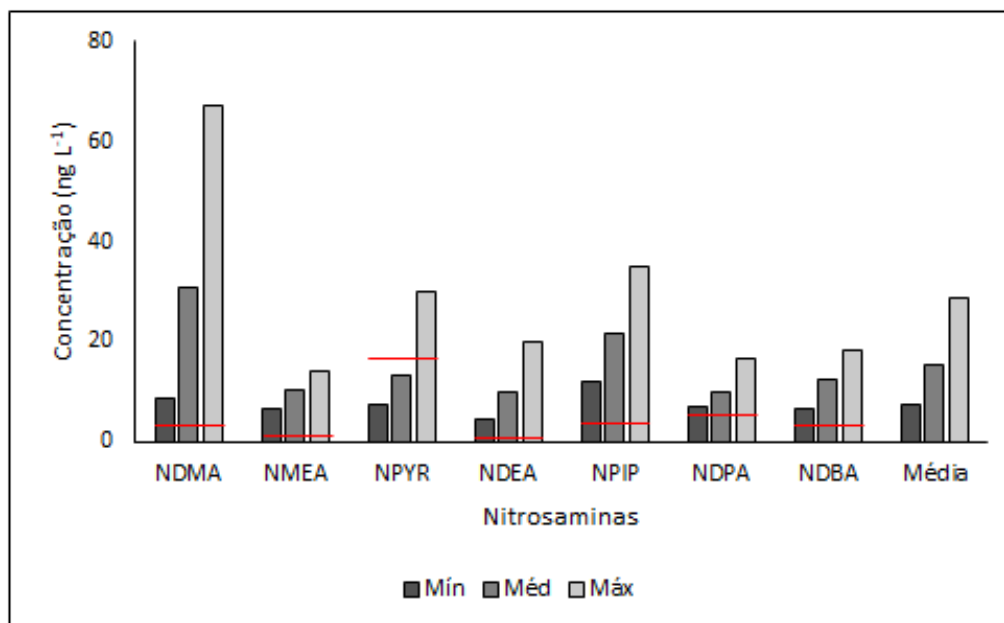


Figura 28. Concentrações mínima, média e máxima para cada nitrosamina. Valores de 10^{-6} cancer risk level (Estado da Califórnia, EUA) em vermelho.⁴⁰

A presença de nitrosaminas nos processos de tratamento de água tem sido relatada em níveis médios tipicamente inferiores a 10 ng L^{-1} . As concentrações médias determinadas neste estudo de caso são condizentes com as concentrações médias encontradas em estudos da China e Estados Unidos conforme a Figura 29, embora a amostragem tenha sido significativamente menor. A NDMA foi a nitrosamina detectada com maior frequência (87%) e a NMEA foi a nitrosamina detectada com menor frequência (20%), conforme o relatado na literatura.^{46 48}

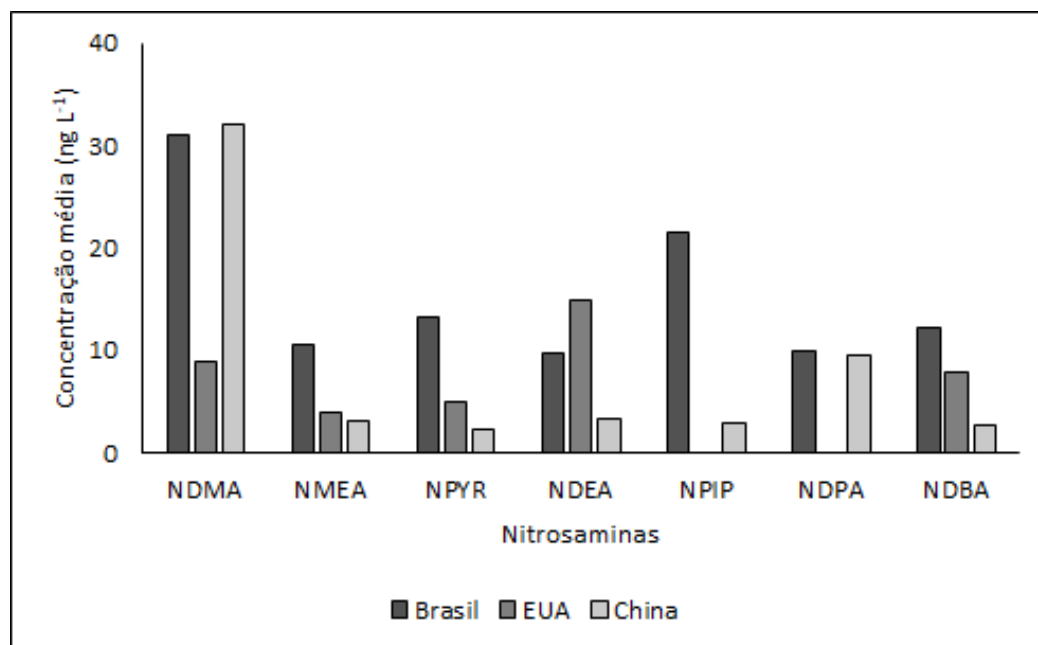


Figura 29. Concentrações médias para nitrosaminas no presente trabalho (Brasil), em comparação com Estados Unidos e China.^{46 48}

Apesar desta amostragem ter sido realizada apenas uma vez, a análise da Figura 28 mostra que as concentrações detectadas na água tratada são geralmente muito superiores aos níveis de risco determinados por agências regulatórias internacionais e que, portanto, estes compostos podem apresentar um potencial risco à saúde da população abastecida devido à exposição crônica.

Os resultados apresentados neste trabalho apresentam um diagnóstico preliminar da presença de nitrosaminas em água tratada de uma região com alta densidade populacional, resultado da baixa qualidade dos mananciais de abastecimento público e da utilização de tratamentos convencionais que não contemplam o controle de formação ou remoção de DBPs como as nitrosaminas.

Cabe ressaltar que, mesmo que ainda haja uma incerteza quanto aos riscos ocasionados pela exposição a estes compostos, a potencial presença de nitrosaminas (e outros DBPs) em água tratada reafirma a necessidade da revisão dos padrões de potabilidade estabelecidos atualmente. O Brasil ainda é um tanto recente nos estudos de contaminantes emergentes e seus riscos associados à exposição crônica. Não só isso, ainda há uma escassez de dados relacionados à ocorrência destes contaminantes no Brasil.

Contudo, espera-se que este trabalho seja base para que novas amostragens possam ser realizadas a fim de fornecer um cenário mais realista em diversas regiões do Brasil e que seja possível expandir a discussão sobre contaminantes emergentes e, conseqüentemente, promover uma atualização das legislações brasileiras.

5 Conclusões

O método desenvolvido e validado para determinação das 7 nitrosaminas NDMA, NMEA, NPYR, NDEA, NPIP, NDPA e NDBA empregando o preparo de amostras por SPE e a análise por GC-MS mostrou-se eficaz para determinação destes compostos em água tratada para abastecimento público.

O método foi validado de acordo com as especificações do INMETRO e possui as características necessárias para a obtenção de resultados confiáveis com qualidade exigida.

A amostragem inicial realizada em Campinas no mês de fevereiro de 2019 atestou a aplicabilidade do método proposto, que apresentou seletividade e detectabilidade suficientes para atuar em níveis de concentração traço (ng L^{-1}).

O estudo de caso realizado na Região Metropolitana de Campinas no mês de maio de 2019 configurou-se preliminar, porém a elevada frequência de detecção das nitrosaminas juntamente às concentrações médias encontradas indicam um cenário preocupante, pois compõem um risco potencial à população abastecida.

Por esse motivo, os dados obtidos neste trabalho poderão ser usados para incentivar novos estudos de ocorrência e direcionar as avaliações da qualidade da água tratada fornecida para abastecimento público.

6 Referências Bibliográficas

1. Petrovic, M., Sabater, S., Elosegi, A., Barceló, D. (Eds.) Emerging Contaminants in River Ecosystems. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer International Publishing, 2016; Vol. 46.
2. Stefanakis, A. I., Becker, J. A. A Review of Emerging Contaminants in Water: Classification, Sources and Potential Risks. In *Impact of Water Pollution on Human Health and Environmental Sustainability*, IGI Global, 2016; 55-80.
3. USEPA. White Paper Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern, Part I: General Challenges and Recommendations, USEPA, 2008.
4. Richardson, S. D., Ternes, T. A. *Analytical Chemistry*, **2018**, 90, 398–428.
5. Noguera-Oviedo, K., Aga, D. S. *Journal of Hazardous Materials*, **2016**, 316, 242–251.
6. Rook, J. J. *Water Treatment and Examination*, **1974**, 23, 234–243.
7. National Research Council. Drinking Water and Health, Volume I. National Academies Press, 1977.
8. BRASIL. Portaria de Consolidação no5, de 28 de setembro de 2017. Ministério da Saúde. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde.
9. Barceló, D. (Ed.) Emerging Organic Contaminants and Human Health. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012; Vol. 20.
10. Geuther, A. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. **1863**, 128, 151–156.
11. Klein, G., Weinhouse, S. & Haddow, A. (Eds.) *Advances in Cancer Research*, Academic Press, 1973, Vol. 17, 235-271.
12. NIH. Hazardous Substances Data Bank.
<<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>
13. IARC. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans.
<<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>>
14. Freund, H. *Annals of Internal Medicine*. **1937**, 10, 1144-1155.
15. Hamilton, A., Hardy, H. *Industrial Toxicology*, 2ª ed. Hoeber, 1949.
16. Barnes, J. M., Magee, P. N. *British Journal of Industrial Medicine*. **1954**, 11,

167–174.

17. Magee, P. N., Barnes, J. M. *British Journal of Cancer*, **1956**, 10, 114–122.
18. Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds*. Cambridge Press, 1992.
19. Ender, F. *et al. Naturwissenschaften*. **1964**, 51, 637–638.
20. Hotchkiss, J. H. *Cancer Surveys*. **1989**, 8, 295–321.
21. Walker, R. *Food Additives & Contaminants*. **1990**, 7, 717–768.
22. Crosby, N. T. & Sawyer, R. *N-Nitrosamines: A Review of Chemical and Biological Properties and Their Estimation in Foodstuffs*. Elsevier, 1976.
23. Fan, T. Y. *et al. Food and Cosmetics Toxicology*. **1977**, 15, 423–430.
24. Matyska, M. T., Pesek, J. J., Yang, L. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 887, 497–503.
25. Schothorst, R. C., Stephany, R. W. *International Journal of Cosmetic Science*. **2001**, 23, 109–114.
26. Westin, J. B. *et al. Cancer Letters*. **1990**, 50, 157–160.
27. Wang, L., Hsia, H., Wang, C. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2006**, 29, 1737–1751.
28. Taguchi, V. Y. *et al. Canadian Journal of Applied Spectroscopy*. **1994**, 39, 87–93.
29. Bogovski, P., Bogovski, S. *International Journal of Cancer*. **1981**, 27, 471–474.
30. Preussmann, R. *IARC Scientific Publications*. **1983**, 45, 3-17.
31. Preussmann, R. & Stewart, B. W. *Chemical Carcinogens*. **1984**, 2, 643–828.
32. Chu, E. H. Y., Generoso, W. M. *Mutation, Cancer and Malformation*. Plenum Press, 1984.
33. Fristachi, A., Rice, G. *Journal of Water and Health*. **2007**, 5, 341–355.
34. CDPH. Nitrosamines—Drinking Water Issues.
<www.cdph.ca.gov/certlic/drinkingwater/Pages/NDMA.aspx>
35. HC. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality.
<<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/water-quality/drinking-water/canadian-drinking-water-guidelines.html>>
36. NHMRC. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy.
<<https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-drinking-water-guidelines>>

37. WHO. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum.
<https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/drinking-water-quality-guidelines-4-including-1st-addendum/en/>
38. Mumpower, J. *Risk Analysis*. **1986**, 6, 437–46.
39. USEPA. Integrated Risk Information System.
<<https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?keyword=>>
40. CSWRCB. NDMA and Other Nitrosamines - Drinking Water Issues.
<waterboards.ca.gov/drinking_water/certlic/drinkingwater/NDMA.html>
41. Zhao, Y. Y. *et al. Environmental Science & Technology*. **2008**, 42, 4857–4862.
42. Krasner, S. W. *et al. Water Research*. **2013**, 47, 4433–4450
43. Mitch, W. A. *et al. Environmental Engineering Science*. 2003, 20, 389–404.
44. Bull, S., Collins, C. *Environmental Geochemistry and Health*. **2013**, 35, 101–109.
45. Liew, D. *et al. ACS Symposium Series*. **2015**, 1990, 135–149.
46. Bei, E. *et al. Water Research*. **2016**, 98, 168–175.
47. Asami, M., Oya, M.; Kosaka, K. *Science of the Total Environment*. **2009**, 407, 3540–3545.
48. USEPA. Occurrence Data for the Unregulated Contaminant Monitoring Rule.
<<https://www.epa.gov/dwucmr/occurrence-data-unregulated-contaminant-monitoring-rule#2>>
49. Dillon, G. *et al. NDMA: concentrations in drinking water and factors affecting its formation*.
< http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70_2_210.pdf>
50. Boyd, J. M. *et al. Trends in Analytical Chemistry*. **2011**, 30, 1410–1421.
51. USEPA. Method 521: Determination of Nitrosamines in Drinking Water By Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography With Large Volume Injection and Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry (MS/MS). USEPA, 2004.
52. NIH. PubChem.
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>
53. Druckrey, H. *et al. Zeitschrift fur Krebsforschung*. **1967**, 69, 103–201.
54. Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M. *Journal of Chromatography A*.

2007, 1154, 66–73..

55. Grebel, J. E., Suffet, I. H. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1175, 141–144.
56. Qian, Y. *et al. Analytical Chemistry*. **2015**, 87, 1330–1336.
57. Agilent Technologies. Sample Preparation Fundamentals for Chromatography. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf>.
58. Byun, M. W. *et al. Journal of Chromatography A*. **2004**, 1054, 403–407.
59. Scheeren, M. B. *et al. Food Additives & Contaminants Part A*. **2015**, 32, 1436–1447.
60. USEPA. Method 607: Nitrosamines. USEPA, 1984.
61. Najm, I., Trussell, R. R. *Journal - American Water Works Association*. **2001**, 93, 92–99.
62. Mitch, W. A., Sedlak, D. L. *Environmental Science and Technology*. 2002, **36**, 588–595.
63. Cheng, R. C. *et al. Journal - American Water Works Association*. **2006**, 98, 82–96.
64. Charrois, J. W. *et al. Environmental Science & Technology*. **2004**, 38, 4835–4841.
65. Zhao, Y. Y. *et al. Environmental Science & Technology*. **2006**, 40, 7636–7641.
66. Planas, C. *et al. Talanta*. 2008, 76, 906–913.
67. Krauss, M., Hollender, J. *Analytical Chemistry*. **2008**, 80, 834–842.
68. Wang, W. *et al. Water Research*. **2011**, 45, 4930–4938.
69. Ripollés, C., *et al. Analytica Chimica Acta*. **2011**, 702, 62–71.
70. Pozzi, R. *et al. Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 1808–1814.
71. McDonald, J. A. *et al. Talanta*. 2012, 99, 146–154..
72. Ngongang, A. D., Duy, S. V., Sauvé, S. *Analytical Methods*. **2015**, 7, 5748–5759 (2015).
73. Pawliszyn, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Chemical Industry Press, 2009.
74. Grebel, J. E., Young, C. C., Suffet, I. H. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1117, 11–18.
75. Hung, H. W. *et al. Water Air & Soil Pollution*. **2010**, 213, 459–469.
76. Llop, A., Borrull, F., Pocurull, E. *Journal of Separation Science*. **2010**, 33, 3692–3700.
77. Amayreh, M. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2019, 44, 269–278.

78. Kulshrestha, P. *et al. Environmental Science & Technology*. 2010, 44, 3369–3375.
79. Dai, N., Mitch, W. A. *Environmental Science & Technology*. **2013**, 47, 3648–3656.
80. Breider, F., Von Gunten, U. *Analytical Chemistry*. **2017**, 89, 1574–1582.
81. ANA. Relatório de Conjuntura dos Recursos Hídricos.
<http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/conj2017_rel-1.pdf>
82. ANA. Atlas Brasil: Abastecimento Urbano de Água.
<<http://atlas.ana.gov.br/atlas/forms/analise/Geral.aspx?est=6&mapa=sist.>>
83. IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico.
<<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45351.pdf>>
84. IBGE. Cidades e Estados.
<<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/campinas.html?>>
85. SÃO PAULO. Lei Complementar no 870, de 19 de junho de 2000. Dispõe sobre a criação da Região Metropolitana de Campinas.
86. PNUD. Atlas do Desenvolvimento Humano do Brasil.
<http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/o_atlas/quem_faz/atlas_regiao_metropolitana/>
87. AGEMCAMP. Perfil Municipal.
<<http://www.agemcamp.sp.gov.br/produtos/perfilrnc/view/perfil.php#>>
88. INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 7. INMETRO, 2018.
89. Sodré, F. F., Locatelli, M. A. F., Jardim, W. F. *Química Nova*. **2010**, 33, 216–219.
90. Skoog, D., West, D., Holler, J, Crouch, S. Fundamentos de Química Analítica. Cengage Learning, 2009.
91. USEPA. Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit —Revision 2. USEPA, 2016.
92. Collins, C., Braga, G., Bonato, P. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp, 2009.
93. Peris-Vicente, J., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. *Analytical Separation Science*. **2015**, 25, 1757–1808.
94. Poole, C. The Essence of Chromatography. Elsevier, 2003.
95. Heftmann, E. (Ed.). Chromatography: Fundamentals and Applications of

Chromatography and Related Differential Migration Methods, Part A: Fundamentals and Techniques. Elsevier Science, 2004.

96. Grubbs, F. E. *Technometrics*. **1969**, 11, 1–21.
97. Kokoska, S., Nevison, C. Statistical Tables and Formulae. Springer, 1989.
98. Miller, J., Miller, J. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson, 2010.
99. Miliken, G., Johnson, D. Analysis of Messy Data Volume 1: Designed Experiments. Chapman and Hall, 2009.
100. AOAC International. *Official Methods for Analysis AOAC International*. 2016, Appendix F, 1–18.