

ANDRÉ VICTOR SARTORI

VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO
ESTUDO DE CLOROFENÓIS

PPGVS/INCQS
RIO DE JANEIRO
2007

Vigilância da qualidade da água para consumo humano
Estudo de clorofenóis

André Victor Sartori

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr. Thomas Manfred Krauss
Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga

Rio de Janeiro
2007

Vigilância da qualidade da água para consumo humano
Estudo de clorofenóis

André Victor Sartori

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. Arthur de Lemos Scofield

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. Dalton Marcondes Silva

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Orientador: _____

Prof. Dr. Thomas Manfred Krauss

Orientadora: _____

Profa. Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga

Rio de Janeiro

2007

Sartori, André Victor

Vigilância da qualidade da água para consumo humano: estudo de clorofenóis./ André Victor Sartori. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007.

xv, 88 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2007. Orientador: Dr. Thomas Manfred Krauss e Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga.

1. Clorofenóis. 2. Água para consumo humano. 3. Cromatógrafo à Gás acoplado ao Detector Seletivo de Massas. 4. Vigilância e Controle da qualidade. I. Título.

“Não podemos entrar duas vezes no mesmo rio. Isto porque quando entramos pela segunda vez, tanto ele quanto nós já estamos mudados.”

Heráclito de Éfeso
(Ásia Menor: 540-480 aC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por acreditarem e incentivarem todas as minhas decisões;

À Isabela dos Santos Guerreiro, companheira nas horas boas e difíceis, sempre;

À Mônica, Ana Maria e todos os colaboradores do CICT / FIOCRUZ;

A todos do Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS, especialmente à Lúcia Helena pela generosidade, Maria Helena pelas aulas de validação e a Adherlene por entender minhas necessidades, por vezes atrasando seu próprio trabalho;

A todos da Vigilância Sanitária do Município do RJ, em especial ao Paulo;

À Rosália Maria de Oliveira pela confiança depositada e ensinamentos passados;

Ao meu orientador Thomas Manfred Krauss, pela credibilidade, incentivo e ensinamentos passados;

À minha orientadora Ana M. C. B. Braga - coração do tamanho do nome, pelos ensinamentos e exemplo de vida;

À Aida e Letícia, por inestimável ajuda no tratamento das amostras;

A todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

Clorofenóis consistem de um grupo de 19 isômeros incluindo mono-, di-, tri- e tetraclorofenóis, e o pentaclorofenol (PCF). São substâncias orgânicas sintéticas obtidas em larga escala industrial e comercial. Muitos são utilizados como agrotóxicos, principalmente como fungicidas para preservação de madeira. A presença de clorofenóis em sistemas hídricos é de grande interesse, devido à variedade de fontes contaminantes e propriedades físico-químicas dessas substâncias. O processo de desinfecção da água para consumo humano por cloração em presença de substâncias fenólicas pode resultar na formação de clorofenóis. O 2,4,6- Triclorofenol (2,4,6-TCF) é o principal isômero formado através desse processo. Clorofenóis são especialmente tóxicos e potencialmente carcinogênicos. Muitos são considerados poluentes prioritários para serem monitorados em água pela União Européia e pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos. A Portaria nº 518/2004, norma de potabilidade vigente no Brasil, inclui dois clorofenóis: 2,4,6-TCF e PCF, e estabelece o valor máximo permitido de 200 ng/mL e 9 ng/mL, respectivamente. Este estudo teve por objetivo implementar e validar metodologias analíticas para determinação de clorofenóis em água para consumo humano, em níveis de concentração exigidos, utilizando técnica de Cromatografia à Gás acoplada ao Detector Seletivo de Massas (CG-DSM). Incluem-se outros congêneres, além dos contemplados na referida portaria, sabendo-se do potencial de contaminação e da toxicidade dos mesmos. Foi avaliada a qualidade da água de sistemas e soluções alternativas de abastecimento do Município do Rio de Janeiro. Dois métodos analíticos foram validados, os quais demonstraram ser adequados aos objetivos do estudo. Podem ser utilizados em rotinas de controle e ações de vigilância da qualidade da água para consumo humano. As substâncias investigadas incluem todos os isômeros tri- e tetraclorofenóis, e o pentaclorofenol. Todas as substâncias apresentaram linearidade na faixa de trabalho. As recuperações variaram de 75 a 103 %. Os coeficientes de variação foram menores que 15%. Apenas o 2,4,6-TCF foi encontrado, representando 36 % das amostras analisadas. A faixa de concentração encontrada variou entre 0,008 e 0,238 ng/mL e a concentração média foi 0,0365 ng/mL. Os níveis de concentração encontrados são inferiores ao valor máximo permitido preconizado pela norma de potabilidade vigente.

ABSTRACT

Chlorophenols consist of a group of 19 different isomers which include mono-, di-, tri- and tetrachlorophenols, and pentachlorophenol (PCF). They are synthetic organic compounds, obtained on large industrial and commercial scales. Many of them are widely used as pesticides, mainly as fungicides for wood protection. The presence of chlorophenols in the aquatic environment is of great concern, due to their physical and chemical properties and the variety of contamination sources. Drinking water disinfection by chlorination treatments may form chlorophenols when phenolic compounds are already present in raw water. 2,4,6-Trichlorophenol (2,4,6-TCF) is the main isomer formed through this process. According to the International Agency for Research on Cancer, Chlorophenols are classified as possibly carcinogenic compounds (Group 2B). Therefore, most of them are considered high-priority pollutants in water by the European Union and the United States Environmental Protection Agency. Regulation N^o. 518/2004, the effective Brazilian potability norm, includes two chlorophenols: 2,4,6-TCF and PCF, and establish the maximum concentration acceptance of 200 ng/mL and 9 ng/mL, respectively. The objective of this study was to implement and validate analytical methods for the determination of chlorophenols in drinking water at levels of the concentration limits established in the potability norm. Two methods were validated for the determination of pentachlorophenol and all isomers of the tri- and tetrachlorophenols. Instrumental analysis has been done by gas chromatography and mass spectrometry. Both methods had shown to be suitable in the scope of the study, fast, easy to execute and not expensive. All studied analytes presented linear working range and correlation coefficients between 0,9988 and 0,9997. The recovery rates varied from 75 to 103%, and variation coefficients were all lower than 15%. After validation, water quality was evaluated in samples collected from common water supply systems and alternative solutions in the Municipality of Rio de Janeiro. 2,4,6-TCF residues were detected in 36% of the 28 analysed samples, varying from 0,008 to 0,238 ng/mL, and all other analytes were below quantitation limit. These results indicate that chlorophenols levels in the sampled drinking water supplies are well below the regulation limits. The validated methods had been shown to be suitable for application in quality control routines and surveillance action by public health authorities.

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Concentração Máxima Permitida de clorofenóis em água para consumo humano em diferentes países e documentos orientativos (ng/mL). | 8 |
| Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos clorofenóis. | 11 |
| Tabela 3: Programa de temperatura otimizado | 22 |
| Tabela 4: Intensidade relativa dos íons selecionados | 37 |
| Tabela 5: Valores obtidos pelo teste de Cochran ($C_{\text{calculado}}$) para as 10 substâncias investigadas..... | 42 |
| Tabela 6: Análise de variância na regressão (ANOVA) para confirmação da regressão linear das substâncias avaliadas. | 47 |
| Tabela 7: Coeficientes de Variação (CV) para todas as substâncias investigadas pelos dois métodos (10 e 200 mL de amostra) | 49 |
| Tabela 8: Comparação das variâncias obtidas na aplicação do método analítico a 10 mL de água ultra-pura e água de abastecimento. | 51 |
| Tabela 9: Avaliação da influência da matriz na precisão do método..... | 52 |
| Tabela 10: Avaliação da precisão entre os dois métodos analíticos (10 e 200 mL de amostra)..... | 53 |
| Tabela 11: Limite de repetibilidade (r) para as substâncias investigadas | 54 |
| Tabela 12: Ensaio de recuperação para as substâncias de interesse..... | 56 |
| Tabela 13: Avaliação da influência da matriz na exatidão do método analítico com 10 mL de amostra | 61 |
| Tabela 14: Avaliação da influência da matriz na exatidão do método analítico com 200 mL de amostra | 62 |
| Tabela 15: Avaliação da exatidão dos dois métodos (10 e 200 mL) | 63 |
| Tabela 16: Limites de Detecção (LD) dos clorofenóis em 10 e 200 mL de amostra..... | 64 |
| Tabela 17: Limites de Quantificação (LQ) dos clorofenóis em 10 e 200 mL de água..... | 65 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Caminho para sucessivas clorações do fenol | 14 |
| Figura 2: Reação de acetilação dos clorofenóis com anidrido acético | 18 |
| Figura 3: Cromatograma total de íons (50-350 m/z) obtido para os clorofenóis não derivatizados. | 23 |
| Figura 4: Espectros de massas obtidos para os clorofenóis acetilados | 24 |
| Figura 5: Procedimento analítico para determinação de clorofenóis em 10 mL de amostra de água | 30 |
| Figura 6: Procedimento analítico para determinação de clorofenóis em 200 mL de amostra de água | 31 |
| Figura 7: Cromatograma obtido pela análise de amostras fortificadas com as substâncias investigadas, em modo seletivo de íons..... | 36 |
| Figura 8: Curvas analíticas e coeficientes de correlação das substâncias de interesse..... | 43 |
| Figura 9: Distribuição dos resíduos obtidos na análise de variância da regressão ... | 45 |
| Figura 10: Faixa de concentração encontrada para 2,4,6 – Triclorofenol em amostras de água do Município do Rio de Janeiro, 2006..... | 66 |
| Figura 11: Concentrações máximas encontradas de 2,4,6-Triclorofenol por sistema e total das soluções alternativas de abastecimento, Município do Rio de Janeiro, 2006. | 67 |

SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| CV | Coeficiente de Variação |
| PNSB | Pesquisa Nacional de Saneamento Básico |
| µL | Microlitro, 10 ⁻⁶ L |
| ADWG | Australian Drinking Water Guidelines |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | Association of American Chemists |
| CEDAE | Companhia Estadual de Água e Esgoto |
| CEDAE-SRM | Companhia Estadual de Água e Esgoto - Superintendência da Região Metropolitana |
| CFs | Clorofenóis |
| CG-DSM | Cromatografia à Gás acoplada ao Detector Seletivo de Massas |
| CGVAM | Coordenação Geral de Vigilância Ambiental em Saúde |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DCE | Detector por Captura de Elétrons |
| DCF | Diclorofenol |
| DENSP | Departamento de Engenharia de Saúde |
| ETA | Estação de Tratamento de Água |
| FUNASA | Fundação Nacional de Saúde |
| g | Gramma |
| GCDWQ | Guidelines for Canadian Drinking Water Quality |
| GDWQ | Guidelines for Drinking-Water Quality |
| GDWQ | Guidelines for Drinking-Water Quality |
| GPS | Sistema de Posicionamento Global |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IE | Impacto de Elétrons |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| LACENs | Laboratórios Centrais de Saúde Pública |

| | |
|-----------|--|
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| m/z | Razão massa / carga |
| MEFS | Microextração em Fase Sólida |
| MES | Microextração com Solvente |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitros |
| MS | Ministério da Saúde |
| ng | Nanograma |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPAS | Organização Pan-americana de Saúde |
| p.a. | para análise |
| PCDD | Policlorodibenzo-p-dioxinas |
| PCDF | Policlorodibenzofuranos |
| PCF | Pentaclorofenol |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PI | Padrão interno |
| POP | Procedimento Operacional Padrão |
| SDWA | Safe Drinking Water Act |
| SES | Secretaria Estadual de Saúde |
| SVS | Secretaria de Vigilância em Saúde |
| TBrF | Tribromofenol |
| TCF | Triclorofenol |
| TeCF | Tetraclorofenol |
| U.S. EPA | Unite States Environmental Protection Agency |
| VISA | Vigilância Sanitária |
| VMP | Valor Máximo Permitido |
| WHO | World Health Organization |
| K_a | Constante de dissociação |
| $K_{o/w}$ | Coeficiente de partição octanol-água |
| r | Limite de repetibilidade |
| Sr | Desvio-padrão de repetibilidade |
| r | Coeficiente de correlação |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Página de Assinaturas | iii |
| Ficha Catalográfica | iv |
| Agradecimentos | vi |
| Resumo | vii |
| Abstract | viii |
| Índice de Tabelas | ix |
| Índice de Figuras | x |
| Siglas e Abreviaturas | xi |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| II. ASPECTOS GERAIS | 4 |
| II.1 ABORDAGEM NORMATIVA, PADRÕES DE QUALIDADE E CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO | 4 |
| II.2 VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA | 8 |
| II.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS CLOROFENÓIS | 10 |
| II.4 PRODUÇÃO, UTILIZAÇÃO E FONTES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL..... | 12 |
| II.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS..... | 14 |
| II.6 METODOLOGIA | 17 |
| III. OBJETIVOS | 21 |
| III.1 OBJETIVO GERAL: | 21 |
| III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 21 |
| IV. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| IV.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE..... | 22 |
| IV.1.1 EQUIPAMENTO | 22 |
| IV.1.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS..... | 22 |
| IV.1.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO..... | 22 |
| IV.2 PLANO DE AMOSTRAGEM, COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 25 |
| IV.3 VIDRARIAS E MATERIAIS | 26 |
| IV.4 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS | 26 |
| IV.5 LIMPEZA DA VIDRARIA E MATERIAIS UTILIZADOS | 26 |
| IV.6 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS..... | 27 |

| | | |
|-----------|---|----|
| IV.7 | PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO | 28 |
| IV.7.1 | SOLUÇÕES ESTOQUE | 28 |
| IV.7.2 | SOLUÇÕES INTERMEDIÁRIAS..... | 28 |
| IV.8 | METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 29 |
| IV.8.1 | ACETILAÇÃO DOS PADRÕES EM SOLUÇÃO PADRÃO | 29 |
| IV.8.2 | TRATAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 29 |
| IV.8.2.1 | Volume de 10 ml de amostra | 29 |
| IV.8.2.2 | VOLUME DE 200 ML DE AMOSTRA | 30 |
| IV.9 | VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 31 |
| V. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| V.1 | VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 33 |
| V.1.1 | SELETIVIDADE | 35 |
| V.1.2 | FAIXA DE TRABALHO | 37 |
| V.1.3 | LINEARIDADE..... | 38 |
| V.1.4 | PRECISÃO | 47 |
| V.1.4.1 | AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS | 49 |
| V.1.4.1.1 | INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 10 ML DE ÁGUA..... | 50 |
| V.1.4.1.2 | INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 200 ML DE ÁGUA..... | 51 |
| V.1.4.2 | COMPARAÇÃO DA PRECISÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS (10 E 200 ML DE AMOSTRA) | 52 |
| V.1.5 | LIMITE DE REPETIBILIDADE | 53 |
| V.1.5.1 | EXATIDÃO..... | 55 |
| V.1.5.2 | AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS | 59 |
| V.1.5.2.1 | INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 10 ML DE ÁGUA..... | 61 |
| V.1.5.2.2 | INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 200 ML DE ÁGUA..... | 62 |
| V.1.5.2.3 | COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS (10 E 200 mL DE AMOSTRA)..... | 63 |

| | | |
|---------|---|----|
| V.1.6 | DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO | 64 |
| V.1.6.1 | LIMITE DE DETEÇÃO (LD) | 64 |
| V.1.6.2 | LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)..... | 65 |
| V.2 | ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA | 65 |
| VI. | CONCLUSÕES | 73 |
| VII. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |
| | ANEXOS | 86 |

I. INTRODUÇÃO

A Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco à saúde, com ações eminentemente preventivas. Assegurar a qualidade da água para consumo humano é medida de grande impacto na prevenção de doenças, onde a avaliação laboratorial possui papel indispensável no suporte às ações executadas, requerendo resultados confiáveis para maior eficácia. Este estudo buscou contribuir com essas ações, através da validação de metodologias analíticas e avaliação da qualidade da água consumida no Município do Rio de Janeiro quanto à presença de clorofenóis.

A relação causal entre água para consumo humano e doenças apresenta-se como questão pertinente à saúde pública, onde o Estado deve assumir o papel de protetor legítimo promovendo medidas que proporcionam água em quantidade e qualidade adequadas (PONTES & SCHRAMM, 2004). No que se refere à qualidade, os riscos à saúde são ocasionados principalmente pela ingestão de água contaminada por microorganismos patogênicos ou substâncias químicas em níveis prejudiciais. Portanto, constitui-se em ação eficaz na prevenção de doenças de veiculação hídrica assegurar o fornecimento de água segundo padrões de potabilidade adequados (SILVA & ARAÚJO, 2003).

Nas últimas décadas ocorreram grandes avanços na tecnologia empregada no processo de tratamento da água para consumo humano (HELLER, 1997). No entanto, apenas a tecnologia não assegura a qualidade da água diante da possível falha no processo de tratamento, requerendo medidas de controle (BONINI, 2002). Assim, a realização do controle aliado às ações de vigilância da qualidade da água apresentam-se como ferramentas indispensáveis para assegurar a saúde dos consumidores (WHO, 1976).

No Brasil, o padrão de potabilidade e as responsabilidades relativos ao controle e vigilância são regulamentados através da Portaria nº 518, de 25 de março 2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). A vigilância da qualidade deve ser realizada pelas autoridades de saúde pública, onde as responsabilidades permeiam entre as três esferas do governo, em ações idealmente articuladas. O controle de qualidade deve ser realizado pelos prestadores de serviço responsáveis pelo abastecimento.

Quanto ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, na referida portaria são contemplados 2 clorofenóis: Pentaclorofenol (PCF) e 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCF). A contaminação de sistemas hídricos por clorofenóis, incluindo água para consumo humano, representa um risco potencial, devido, principalmente, à disposição e variedade de fontes e às características físico-químicas dessas substâncias (CZAPLICKA, 2004).

Um fato ocorrido em novembro de 2001 destaca a contaminação da água para consumo humano por clorofenóis no Município do RJ. Nesta ocasião, após forte chuva ocorrida na noite do dia 11 de novembro, a água fornecida à população do referido município e outros da Baixada Fluminense apresentava forte odor e gosto desagradável. Algumas pessoas relataram sintomas indesejáveis como enjôo, dores de cabeça, dentre outros, e atribuíram à ingestão da água (MONTEIRO *et al.*, 2001). Segundo a CEDAE - Superintendência da Região Metropolitana (CEDAE-SRM), responsável pelo fornecimento de água na região, o problema foi ocasionado pelo excesso de matéria orgânica carregada para a Estação de Tratamento (ETA) do Guandu. Para tratar a água bruta, a empresa aumentou a dosagem de cloro. Segundo a mesma, o mau cheiro seria resultado da reação do cloro em contato com a matéria orgânica (SIMÕES *et al.*, 2001). Esta reação pode levar a formação de substâncias de diversas classes, dentre elas as organocloradas e clorofenóis (STEVENS *et al.*, 1976; SITHOLE & WILLIAMS, 1986; GALLARD, 2002).

Apesar da suspeita da contaminação da água por essas substâncias, no dia 14 de novembro, anteriormente à veiculação dos laudos sobre as possíveis causas do problema, o diretor da CEDAE, através da imprensa, afirmou que *“apesar do mau cheiro e do gosto ruim, o problema não causa riscos à saúde”* (MONTEIRO *et al.*, 2001). No dia 19 de novembro foi entregue ao Ministério Público Estadual relatório da CEDAE atestando que a água distribuída à população encontrava-se dentro dos padrões para consumo humano, atribuindo a alteração nas características organolépticas à presença de cianobactérias, as quais atingiam níveis dez vezes menores que o estabelecido pela norma de potabilidade vigente (SIMÕES *et al.*, 2001). O problema se prorrogou por aproximadamente dez dias sem que a população tivesse informações suficientes sobre os riscos do consumo da água por parte do setor saúde e pelo prestador de serviço. A situação apresentada necessitava de ações imediatas das autoridades de saúde pública responsáveis, o

que não ocorreu. Ficou evidenciada a fragilidade das autoridades em apresentar soluções rápidas para o problema.

Na ocasião, amostras de água foram analisadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), onde foi encontrado o PCF (comunicação pessoal). Cabe registrar que, não havia e ainda não há método analítico implementado e validado no referido instituto, bem como em outros constituintes da rede de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) para identificação e quantificação destas substâncias em níveis requeridos pela norma de potabilidade vigente. Portanto, as substâncias não foram quantificadas e os resultados encontrados (qualitativos) não puderam ser utilizados para avaliar a qualidade da água em relação à legislação. A situação apresentada reflete a necessidade dos laboratórios de Saúde Pública possuírem metodologias analíticas validadas abrangendo todos os padrões de potabilidade contemplados na portaria, podendo desta forma dar suporte às ações de fiscalização.

Neste contexto, torna-se de suma importância implementar e validar metodologias analíticas capazes de identificar e quantificar clorofenóis em níveis de concentração exigidos pela norma de potabilidade vigente. Ainda, avaliar a qualidade da água fornecida à população do Município do R.J. quanto à presença dessas substâncias, proporcionando subsídios para assegurar a saúde dos consumidores.

II. ASPECTOS GERAIS

II.1 ABORDAGEM NORMATIVA, PADRÕES DE QUALIDADE E CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

A associação da qualidade da água para consumo humano e a ocorrência de doenças tornou-se questão relevante para a saúde pública a partir do século XIX, quando ocorreu grande avanço no reconhecimento dessa relação, principalmente, através de estudos científicos. Destaca-se o histórico estudo realizado por John Snow, concluído em 1884, o qual demonstrou a associação da água consumida pela população de Londres e a incidência do cólera, mesmo antes das descobertas de Louis Paster acerca dos organismos microscópicos (SNOW, 1990). O próprio processo de implantação dos sistemas coletivos de abastecimento, iniciado nesse mesmo século, revela reflexo positivo nas condições de saúde da população corroborando para o entendimento da relação entre qualidade da água e saúde (HELLER, 1997).

A evolução deste conhecimento e o desenvolvimento de tecnologias para tratamento e controle da qualidade possibilitam o fornecimento de água atendendo a padrões de qualidade específicos. O Estado possui papel de protetor legítimo da saúde pública, devendo intervir no processo de maneira decisiva e, desta forma, assegurar o fornecimento de água atendendo a padrões de qualidade adequados (PONTES & SCHRAMM, 2004). No entanto, a água distribuída através de grandes sistemas de abastecimento atendendo, assim, grande número de consumidores, pode configurar-se como um importante veículo de doenças (BONINI, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o padrão de potabilidade onde as características físico-químicas, microbiológicas e radiológicas, definidas a partir de conhecimento técnico científico, inclusive através de testes toxicológicos, não oferecem riscos à saúde com o consumo da água durante toda a vida. Esse conjunto de informações é atualizado periodicamente e fornecido através do documento: Critérios de Qualidade da Água Potável (do inglês: *Guidelines for Drinking-Water Quality - GDWQ*) (WHO, 2004).

Vários países seguem os valores recomendados pela OMS como referência para estabelecer as normas de potabilidade da água a serem cumpridas

pelos responsáveis pelo abastecimento. Esses valores não possuem caráter obrigatório e podem ser modificados segundo variáveis locais e/ou regionais relacionadas com aspectos econômicos, ambientais e sociais.

No Brasil, a partir do Decreto nº. 79.367, de 9 de março de 1977, as normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano tornam-se de competência do Ministério da Saúde (MS), regulamentadas através de Portaria, a ser observada em todo o território nacional (BRASIL, 1977b). A partir de então, o MS sancionou quatro portarias que dispõem sobre a potabilidade da água para consumo humano: Portaria nº. 56 Bsb/1977, Portaria nº. 36/1990, Portaria nº. 1469/2000 e Portaria nº. 518/2004.

Considerada a primeira norma de potabilidade sancionada, a Portaria nº. 56 Bsb, de 14 de março de 1977 abrange diferentes constituintes químicos e microbiológicos (BRASIL, 1977a). Nela, o setor saúde é incumbido das ações de fiscalização da qualidade da água, sendo reforçado na Constituição Federal de 1988 e, posteriormente, pelos dispositivos regulatórios da Lei 8080/1990 (Lei Orgânica da Saúde). Com os avanços ocorridos na área de saneamento nas décadas posteriores a publicação dessa portaria, tornou-se evidente a necessidade de realizar a revisão dos padrões de qualidade em vigência (SOARES *et al.*, 2002).

No entanto, anteriormente havia sido publicada a Portaria nº. 635/1975, a qual recomendava concentrações ótimas de fluoreto a serem mantidas na água potável em função da média das temperaturas máximas diárias do ar e consideradas adequadas à prevenção de cárie dentária (BRASIL, 1975a). A obrigatoriedade do processo de fluoretação em estações de tratamento é estabelecida na Lei nº. 6.050/1974 e regulamentada pelo Decreto nº. 76.872/1975 (BRASIL, 1974; BRASIL, 1975b).

Iniciada em 1988, a primeira revisão da norma de potabilidade contou com a participação de setores governamentais de saúde, companhias estaduais de abastecimento de água, vigilâncias sanitárias, LACENs, dentre outros, subsidiando a formulação da Portaria nº. 36, de 19 de janeiro de 1990. Além da inclusão e revisão de parâmetros de potabilidade, destaca-se a definição de controle e vigilância da qualidade da água e dos responsáveis por sua execução (BRASIL, 1990; FREITAS & FREITAS, 2005).

Em 1999, o Ministério da Saúde promoveu a segunda revisão da norma de potabilidade, por intermédio da Coordenação Geral de Vigilância Ambiental em

Saúde (CGVAM), em parceria com o Departamento de Engenharia de Saúde Pública (DENSP) e com a Representação no Brasil da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS / OMS) (BEZERRA *et al.*, 2004). Apesar do prazo máximo de cinco anos para a próxima revisão, a mesma foi realizada apenas no ano de 2000, onde em 29 de dezembro foi publicada a Portaria nº 1469 (BRASIL, 2001). Houve a ampliação do processo participativo na revisão, havendo contribuição de entidades dos setores público, privado e de organizações não-governamentais (FREITAS & FREITAS, 2005). Segundo BASTOS *et al.* (2001), como resultado, foram incorporadas informações atualizadas sobre os riscos associados a alguns microorganismos, dos mecanismos de remoção dos mesmos no processo de tratamento da água, do emprego de indicadores e as evidências toxicológicas de agravos à saúde decorrentes da ingestão de substâncias químicas. Nessa portaria os deveres e obrigações do Ministério da Saúde eram realizados por intermédio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Destaca-se a definição mais clara de solução alternativa de abastecimento, sendo especificado todas as modalidades de abastecimento coletivo, incluindo entre outras, a distribuição por veículos transportadores, poço comunitário e instalações condominiais. Esta portaria caracterizou-se pelo caráter universal e abrangente.

Em junho de 2003, foi instituída a Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS), que assumiu as atribuições do Centro Nacional de Epidemiologia (Cenepi), até então localizado na estrutura da FUNASA. Em virtude desse novo ordenamento, a Portaria nº. 1469/2000 foi revogada, passando a vigorar a Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. De acordo com o artigo 4º, água potável é a água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça risco à saúde. O controle da qualidade da água para consumo humano é o conjunto de atividades exercidas de forma contínua pelos responsáveis pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável, assegurando a manutenção desta condição. Este controle é realizado através da avaliação dos resultados das análises químicas, físicas, microbiológicas e radiológicas tanto da saída do sistema de abastecimento, geralmente uma Estação de Tratamento (ETA), como na rede de distribuição e reservatórios.

Apesar da obrigatoriedade, a realização do controle de qualidade da água pelos prestadores de serviço de abastecimento ainda não é uma realidade. Dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) do ano de 2000 revelam que a maioria dos distritos do estado recebeu água através da rede geral sem a devida realização do controle de qualidade, segundo a norma de potabilidade vigente (IBGE, 2002). Em estudo realizado por SARTORI & THIBAUT (2005) verificou-se que em apenas 3,5% dos sistemas de abastecimento do Estado, comprovou-se a realização do controle de qualidade, atendendo ao plano mínimo de amostragem da Portaria nº. 518/2004, em novembro de 2004. Ainda, verificou-se que, apesar da obrigatoriedade, o prestador de serviço responsável por atender à aproximadamente 50% da população (CEDAE-SRM), incluindo a capital, não enviou relatórios mensais à autoridade estadual responsável em 2004, especificando o controle de qualidade da água em todos os sistemas de abastecimento sob sua responsabilidade. Assim, a autoridade ficou impossibilitada de avaliar o cumprimento dos parâmetros de potabilidade contemplados na Portaria e assegurar a qualidade da água fornecida à população.

O panorama apresentado no Estado e Município do R.J. é preocupante e exige medidas efetivas de intervenção das autoridades de saúde pública responsáveis, considerando-se o risco do consumo de água onde não é assegurada a qualidade da mesma pelos prestadores de serviço através da realização do controle de qualidade.

As normas de potabilidade no Brasil, em geral, seguem as recomendações da OMS, como para os clorofenóis. Destes, dois clorofenóis são considerados: PCF e 2,4,6-TCF. Alguns países possuem regulamentação mais exigente quanto ao Valor Máximo Permitido (VMP), e incluem outros congêneres além dos recomendados pela OMS (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração Máxima Permitida de clorofenóis em água para consumo humano em diferentes países e documentos orientativos (ng/mL).

| Substâncias | Brasil | Canadá | Estados Unidos | Austrália | União Européia | OMS |
|--------------------------|--------|--------|----------------|-----------|----------------|-----|
| 2-clorofenol | - | - | - | 300 | - | - |
| 2,4-diclorofenol | - | 900 | - | 200 | - | - |
| 2,4,6-triclorofenol | 200 | 5 | - | 20 | - | 200 |
| 2,3,4,6- tetraclorofenol | - | 100 | - | - | - | - |
| Pentaclorofenol | 9 | 60 | 1 | 10 | 0,1 | 9 |

Fonte: BRASIL, 2004; GCDWQ, 1996; SDWA, 1996; ADWG, 2004; Directive 98/83/EC; WHO, 2004

Nos Estados Unidos, o 2,4,6-TCF está sendo avaliado como candidato à inclusão na lista de contaminantes controlados. A norma de potabilidade (Safe Drinking Water Act) está submetida ao órgão de controle ambiental desse país (USEPA). A Directive 98/83/EC é a norma atual de potabilidade com abrangência em todos os países da Europa.

II.2 VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA

Em 1976, a OMS publica o primeiro guia para a vigilância da qualidade da água a partir de um estudo iniciado em 1968, tomando como base métodos e procedimentos em desenvolvimento em alguns países. Foram reunidas informações e critérios para planejar, organizar e operar programas de vigilância da qualidade da água em nível regional e nacional. Todos os atores envolvidos no processo de fornecimento de água foram contemplados, como as autoridades de saúde pública e prestadores de serviço de abastecimento. A vigilância da qualidade da água foi definida como *“a constante e vigilante avaliação da saúde pública e o controle da segurança da qualidade dos sistemas de abastecimento de água potável”* (WHO, 1976).

Rojas (2002), em guia mais recente da OMS (do inglês: Guidelines for the surveillance and control of drinking water quality) conceitua vigilância da qualidade da água como a *“combinação de medidas adotadas pelas autoridades competentes para avaliar os riscos inerentes à qualidade da água distribuída à população pelos prestadores de serviço privados e públicos, bem como avaliar o grau de conformidade da mesma em relação aos padrões de qualidade exigidos pela*

legislação.” Verifica-se a inclusão da noção de risco quando comparado ao guia da OMS de 1976.

As autoridades de saúde pública possuem papel indispensável na promoção, regulamentação e vigilância da qualidade dos serviços de abastecimento. As ações de vigilância incluem atividades tais como o monitoramento da qualidade da água, combinado com inspeções e auditorias sanitárias dos sistemas de abastecimento (WHO, 2001).

No Brasil, a regulamentação de ações de vigilância pode ser identificada desde 1977, com a publicação do Decreto nº. 79.367/1977. Apesar de não definir vigilância, algumas normas são identificadas, nesse sentido, definindo responsabilidades às autoridades de saúde pública. Segundo o artigo 4º deste Decreto, cabe ao Ministério da Saúde, em articulação com as Secretarias Estaduais de Saúde (SES), a fiscalização e o controle do exato cumprimento das normas e padrões de potabilidade estabelecidos. Às SES cabe, ainda, segundo o artigo 6º, manter registros sobre a qualidade da água dos sistemas e a realização de notificação de eventuais fatos epidemiológicos que possam estar relacionados ao comprometimento da qualidade da água fornecida.

Em 1990, com a primeira revisão da norma de potabilidade, a definição e os responsáveis pela vigilância da qualidade da água são então regulamentados pela Portaria nº. 36/1990, definida como “*conjunto de atividades de responsabilidade da autoridade sanitária estadual competente, com a finalidade de avaliar a qualidade da água distribuída e de exigir a tomada de medidas necessárias, no caso da água não atender ao padrão de potabilidade*”. No entanto, as responsabilidades relativas às ações de vigilância da qualidade da água não foram bem definidas, dificultando sua implementação. Com a publicação da Portaria nº. 1469/2000, e mantida na Portaria nº 518/2004, esse aspecto é solucionado e a vigilância é definida como “*um conjunto de ações adotadas continuamente pela autoridade de saúde pública, para verificar se a água consumida pela população atende a essa norma e para avaliar os riscos que os sistemas e as soluções alternativas de abastecimento de água representam para a saúde humana.*” Na referida portaria são atribuídos deveres e obrigações para diferentes níveis governamentais, comprometendo as três esferas do governo nas ações de vigilância.

Os sistemas de controle e vigilância da qualidade da água em geral são muito limitados ou insuficientes. Apenas 52% da população das Américas possuem

sistemas efetivos de vigilância da qualidade da água, revelando precárias condições no processo de assegurar a qualidade dos serviços de abastecimento. A situação é ainda pior na América Latina, onde apenas 24% da população contam com sistemas de vigilância efetivos (WHO, 2001).

Como mencionado acima, no Brasil, apenas em 1990, a vigilância da qualidade da água é definida e em 2000, as responsabilidades são definidas com maior clareza. Segundo FREITAS & FREITAS (2005) a vigilância só foi implementada como um programa a partir da criação do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde, ou seja, ainda é recente e enfrenta dificuldades na implementação.

A Portaria nº 518/2004 surge em substituição à Portaria nº 1469/2000, mantendo o seu conteúdo em maioria, modificando alguns quesitos técnicos e prazo de adequação ao seu cumprimento. Estudo realizado por BEZERRA *et al.* (2004), no ano de 2003 verificou que a Portaria nº 1469/2000 estava implementada de forma parcial pelo setor saúde, necessitando um maior empenho das esferas federal, estadual e municipal. Dentre os problemas apontados, verificaram a necessidade de esclarecimento a respeito das competências dos diferentes atores envolvidos com as questões relativas à água para consumo humano. Esta condição mostrou desarticulação e ineficiência nas ações de vigilância. Apenas 19% dos Estados realizavam avaliações sistemáticas da vigilância da qualidade da água, visando à redução da morbi-mortalidade associada às doenças de veiculação hídrica. Ainda, no Estado do R.J., de acordo com os dados da PNSB 2000, verifica-se que aproximadamente 40% dos distritos abastecidos pela rede geral não contava com serviços de vigilância da qualidade da água (IBGE, 2002).

As ações de vigilância da qualidade da água realizadas pelo Estado, legítimo protetor da saúde da população, são indispensáveis para assegurar que os prestadores de serviço de abastecimento realizem o controle de qualidade do processo, mantendo a qualidade da água em padrões de consumo adequados para a população garantindo o cumprimento da legislação.

II.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS CLOROFENÓIS

Clorofenóis são substâncias orgânicas, onde um ou mais átomos de hidrogênio do fenol (1-hidroxibenzeno) são substituídos por um ou mais átomos de

cloro. Os 19 congêneres possíveis e suas propriedades físico-químicas estão descritos na Tabela 2.

Todos os congêneres são sólidos, com ponto de fusão entre 33 e 190 °C, exceto o 2-clorofenol, o qual é líquido com ponto de fusão de 9 °C. Possuem baixas pressões de vapor, principalmente as substâncias com maior peso molecular.

São pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos à exceção dos seus sais, muito solúveis em água. São ácidos relativamente fracos. A acidez aumenta com o aumento do número de átomos de cloro substituídos.

Em geral, com o aumento do número de átomos de cloro na molécula, ocorre a redução na pressão de vapor, aumento no ponto de ebulição e redução da solubilidade em água.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos clorofenóis.

| <i>Substâncias</i> | <i>Peso Molecular</i> | <i>Ponto de ebulição (°C)</i> | <i>Ponto de fusão (°C)</i> | <i>Solubilidade (g/L a 20°C)</i> | <i>pKa</i> | <i>Log K_{o/w}</i> |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|
| 2-clorofenol | 128.56 | 175 | 9.3 | 28 | 8.3-8.6 | 2.12-2.17 |
| 3-clorofenol | 128.56 | 214 | 33-34 | 26 | 8.8-9.1 | 2.48-2.50 |
| 4-clorofenol | 128.56 | 217-219 | 42-44 | 27 | 9.1-9.4 | 2.35-2.44 |
| 2,3-diclorofenol | 163.00 | 206 | 57-58 | - | 6.4-7.8 | 3.15-3.19 |
| 2,4-diclorofenol | 163.00 | 210 | 45 | 4.5 | 7.5-8.1 | 2.75-3.30 |
| 2,5-diclorofenol | 163.00 | 211 | 58-59 | - | 6.4-7.5 | 3.20-3.24 |
| 2,6-diclorofenol | 163.00 | 219 | 68 | - | 6.7-7.8 | 2.57-2.86 |
| 3,4-diclorofenol | 163.00 | 253-254 | 65-68 | - | 7.4-8.7 | 3.13-3.44 |
| 3,5-diclorofenol | 163.00 | 233 | 68 | - | 6.9-8.3 | 2.57-3.56 |
| 2,3,4-triclorofenol | 197.45 | sublima | 77-84 | 0.22 | 6.5-7.7 | 3.49-4.07 |
| 2,3,5-triclorofenol | 197.45 | 248-255 | 57-62 | 0.22 | 6.8-7.4 | 3.84-4.56 |
| 2,3,6-triclorofenol | 197.45 | 246 | 58 | - | 6.0-7.1 | 3.88 |
| 2,4,5-triclorofenol | 197.45 | sublima | 67-70 | 0.948 | 7.0-7.7 | 3.72-4.10 |
| 2,4,6-triclorofenol | 197.45 | 243-249 | 69 | 0.434 | 6.0-7.4 | 3.60-4.05 |
| 3,4,5-triclorofenol | 197.45 | 271-277 | 101 | - | 7.7-7.8 | 4.01-4.39 |
| 2,3,4,5-tetraclorofenol | 231.89 | sublima | 116-117 | 0.166 | 6.2-7.0 | 4.21-5.16 |
| 2,3,4,6-tetraclorofenol | 231.89 | 150 | 70 | 0.183 | 5.3-6.6 | 4.10-4.81 |
| 2,3,5,6-tetraclorofenol | 231.89 | 188 | 114-116 | 0.1 | 5.2-5.5 | 3.88-4.92 |
| Pentaclorofenol | 266.34 | 300 | 190 | 0.014 | 4.7-4.9 | 5.01-5.86 |

Fonte: CZAPLICKA, 2004

O destino e o transporte de substâncias químicas no ambiente aquático depende estritamente do valor da constante de dissociação (K_a) e do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$). No caso dos clorofenóis, a K_a e $K_{o/w}$ aumentam com o número de átomos de cloro na molécula, podendo se dissociar parcial ou totalmente.

Tal fato indica que quanto maior o número de átomos de cloro na molécula, maior a propensão à biocumulação.

II.4 PRODUÇÃO, UTILIZAÇÃO E FONTES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Clorofenóis são substâncias orgânicas sintéticas, obtidas em larga escala industrial e comercial, por dois métodos principais: cloração direta do fenol ou hidrólise alcalina de hexaclorobenzenos (EXON, 1984; CZAPLICKA, 2004). O primeiro processo realiza a cloração direta do fenol em presença de catalisador ou em altas temperaturas. Os principais isômeros formados por este método são o 2-CF, 2,4-DCF, 2,4,6-TCF e 2,3,4,6-TeCF. O segundo método é por hidrólise alcalina do hexaclorobenzeno (HCB) ou outros fenóis clorados em metanol ou outro solvente apropriado. Os principais isômeros produzidos são o 2,4,5-TCF e PCF. Ambos os métodos de produção podem levar à formação concomitante de substâncias altamente tóxicas destacando-se as policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs), os policlorodibenzofuranos (PCDFs), os benzenos policlorados, as bifenilas policloradas (PCBs) e os éteres difenílicos policlorados (KITUNEN *et al.*, 1985; VARTIANEN *et al.*, 1995a; ATDSR, 1999).

Clorofenóis podem ser formados naturalmente (HODIN *et al.*, 1991). HOEKSTRA *et al.*, 1999 demonstraram a formação de clorofenóis no ambiente natural através da cloração de ácidos húmicos naturais. Após 1 ano de incubação de solo contendo ácido húmico, contaminado com solução de Na³⁷Cl, os autores encontraram grandes quantidades do 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,5-triclorofenol, 2,6-diclorofenol e 2,4,5-triclorofenol. Além disso, alguns autores reportam a síntese de clorofenóis por fungos presentes no solo. ANDO *et al.* (1970) demonstraram a síntese do 2,4-diclorofenol por um fungo do grupo *Penicillium* presente no solo.

A formação pode também ocorrer através da biodegradação de agrotóxicos e herbicidas no meio ambiente. A degradação microbológica de herbicidas, especialmente dos ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), geram vários clorofenóis como metabólitos intermediários (EXON, 1984). A degradação do herbicida Lindano leva a formação de tetraclorofenóis e do pentaclorofenol (ADWG, 2004).

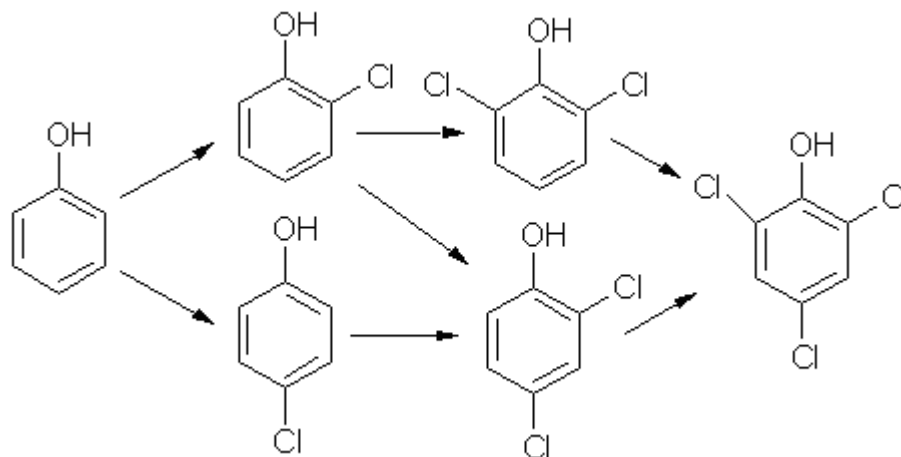
Os clorofenóis possuem amplo espectro de utilização. Alguns são utilizados como agrotóxicos, principalmente como preservantes de madeira, devido

as suas propriedades fungicidas (REE *et al.*, 1988), destacando-se o PCF, além do 2,3,4,6-tetraclorofenol e 2,4,6-triclorofenol (RENBERG & LINDSTRÖM, 1981). O PCF também possui ação bactericida e inseticida. Monoclorofenóis têm sido utilizados como antissépticos (CZAPLICKA, 2004). Também, são utilizados como intermediários na síntese de substâncias orgânicas, incluindo agrotóxicos.

Tanto a utilização dos clorofenóis obtidos sinteticamente, do qual destaca-se a utilização como preservativo de madeira, como a formação involuntária, representam importantes fontes de contaminação ambiental. Segundo EXON (1984), as principais fontes de contaminação do meio ambiente são: contaminantes ou produtos de degradação dos herbicidas ácido clorofenóxiacéticos, 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 2,4,5-triclorofenóxiacético (2,4,5-T); formação espontânea como resíduos em águas municipais e indústrias; no processo de desinfecção da água para consumo humano através da cloração; fontes industriais onde clorofenóis são produzidos ou usados como intermediários na síntese de outras substâncias; efluentes do processo de branqueamento da polpa de madeira ou produção papel; a utilização de PCF como preservante de madeira.

A indústria de papel e celulose contribui significativamente no processo de geração e contaminação do meio ambiente por clorofenóis. Durante o processo de branqueamento da polpa, estas substâncias são formadas como resultado da reação de ligninas com cloro (KRINGSTAD & LINDSTRÖM, 1984; LEE *et al.*, 1989; FREIRE *et al.*, 2000). Outros mecanismos representam importantes fontes de contaminação, como o processo de desinfecção de água para consumo humano por cloração em presença de substâncias fenólicas. O 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol são os principais sub-produtos formados nesse processo (WHO, 2004). A reação de cloração dos fenóis por este processo é uma típica reação de substituição eletrofílica (GE *et al.*, 2006). A cloração inicial ocorre preferencialmente nas posições *orto* ou *para* do anel aromático em relação à hidroxila, levando a formação do 2-clorofenol e 4-clorofenol, respectivamente.

Figura 1: Caminho para sucessivas clorações do fenol



Fonte: GE *et al.*, 2006.

Em geral, alta fração de substituição na posição *orto* é observada, correspondendo a aproximadamente 80% das reações (ACERO *et al.*, 2005). Como demonstrado na Figura 1, clorações sucessivas levam à formação de 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol e, finalmente, 2,4,6-triclorofenol (GALLARD & VON GUNTEN, 2002; ACERO *et al.*, 2005).

II.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Estudos epidemiológicos para avaliação da toxicidade de clorofenóis foram realizados em trabalhadores expostos no processo de produção dessas substâncias ou quando são utilizadas como matéria prima na síntese de agrotóxicos. Estes estudos estão sujeitos a vieses devido à exposição concomitante a outras substâncias, principalmente as PCDDs e os PCDFs, altamente tóxicos. Deste modo, apesar de terem sido observados efeitos indesejados nesses trabalhadores, além do aumento do risco da ocorrência de câncer, não se pode afirmar se os mesmos foram causados pelos clorofenóis ou por outras substâncias ou pela associação destas (WHO, 1989; ATSDR, 1999).

Estudos em animais demonstram a ocorrência de efeitos tóxicos quando essas substâncias são administradas. Dentre outros, verifica-se a presença de alterações no sistema imunológico e propensão a oncogênese (ATSDR, 1999).

Quanto a carcinogenicidade, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) considera dados experimentais (*in vivo e in vitro*) e epidemiológicos para estabelecer sistemas de classificação em grupos para os agentes carcinogênicos. Os clorofenóis são

classificados como possíveis carcinógenos humanos (grupo 2B). Esta classificação indica que há limitadas evidências de carcinogenicidade em humanos, porém evidências suficientes em animais (WHO, 1991).

Baseado em estudos de revisão podem ser realizadas algumas generalizações sobre a toxicidade dos clorofenóis. A toxicidade aumenta diretamente com o número de átomos de cloro na substância. Por exemplo, o efeito sobre a fosforilação oxidativa mitocondrial, considerado o principal mecanismo de toxicidade dos clorofenóis, segue essa premissa. No entanto, clorofenóis com átomos de cloro na posição 3 e 5 do anel aromático (“meta”), são mais tóxicos que o esperado, somente com base no número de átomos de cloro. Quando substituídos nessas posições verifica-se aumento dos efeitos sobre a fosforilação oxidativa (EXON, 1984; WHO, 1989).

A população pode ser exposta a clorofenóis através da ingestão de água para consumo humano, alimentos e inalação de ar contaminado e exposição ocupacional. Nesta última, tanto pessoas que trabalham na produção, como as que utilizam clorofenóis como agrotóxicos principalmente no tratamento de madeiras estão diretamente sujeitas a altos níveis de exposição a essas substâncias (ATSDR, 1999).

Clorofenóis, geralmente são encontrados em água para consumo humano em concentrações em torno de uma parte por trilhão (ppt). No entanto, devido às suas características lipofílicas e por apresentarem-se na forma não-ionizada em pH fisiológico são facilmente absorvidos após ingestão (EXON, 1984). O consumo de água contaminada por clorofenóis pode ser considerado uma importante via de exposição a essas substâncias. Estudos realizados em populações que consumiram água contaminada com clorofenóis demonstraram maior ocorrência de efeitos tóxicos quando comparados à área controle. Após longo período de exposição à clorofenóis em água para consumo humano numa comunidade da Finlândia, LAMPI *et al.* (2000) observaram diferenças significativas na ocorrência de sintomas gastrointestinal, náusea, indisposição, dor de cabeça, anorexia, cansaço exagerado e infecções respiratórias. Houve correlação com a dose-resposta, onde o alto consumo de água contaminada demonstrou aumento significativo dos sintomas reportados e, ainda, que os sintomas observados eram semelhantes aos observados em exposições ocupacionais. Em outro estudo realizado com a mesma população, verificou-se maior incidência de câncer em pessoas expostas à água e peixes

contaminados com clorofenóis quando comparado a áreas controle (LAMPI *et al.*, 1992).

O PCF, único clorofenol utilizado como agrotóxico no país, teve o uso agrícola cancelado pelo Ministério da Agricultura na Portaria nº. 329, de 2 de setembro de 1985 (BRASIL, 1985). Seu uso em campanhas de saúde pública ou como domissanitários foi proibido através da exclusão de sua monografia pelo Ministério da Saúde, através da Portaria nº. 11, de 8 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998). Desde então, o PCF é regulamentado exclusivamente para utilização como preservante de madeiras. A utilização do PCF é liberada através da emissão de licenças, destinadas à preservação de dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas (ANVISA, 2006a). De acordo com a Portaria Interministerial nº. 292, de 28 de abril de 1989, a qual disciplina as atividades relacionadas à preservação de madeira e regulamentada pela Instrução Normativa nº 5, de 20 de outubro de 1992, as empresas que produzem e comercializam preservativos de madeira, bem como as que utilizam para este fim, são obrigadas a registrá-las junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (BRASIL, 1989; BRASIL, 1992). Considerando-se essa utilização específica, este produto oferece sérios riscos ambientais e para saúde humana, devido à alta toxicidade e eventual presença de contaminantes nas formulações comerciais.

No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo registro de agrotóxicos. Em suas monografias, regulamenta o uso e classifica essas substâncias de acordo com suas propriedades toxicológicas: classe I – Extremamente tóxicos; classe II – Altamente tóxicos; classe III – Medianamente tóxicos; classe IV – Pouco tóxicos. Toxicologicamente o PCF é classificado como de Classe I e, portanto, incluído entre os agrotóxicos mais tóxicos utilizados no país (ANVISA, 2006a). Cabe registrar que em formulações comerciais outros congêneres são encontrados. No entanto, não há qualquer menção a este fato na sua monografia.

Devido a algumas características intrínsecas a essa substância, como toxicidade para humanos e animais, persistência no meio ambiente, solubilidade em água, impurezas nas formulações, dentre outras, houve a necessidade de reavaliação quanto a sua utilização, realizado pela ANVISA, por intermédio da Gerência Geral de Toxicologia. Esta reavaliação culminou numa nota técnica publicada em 17 de julho de 2006, ficando estabelecido, além de restrições

imediatas quanto à produção e comercialização, a exclusão da monografia do PCF e seus sais em 30 de junho de 2007. Este produto está banido ou tem seu uso restrito em 25 países e sua importação está proibida em 67 países (ANVISA, 2006b).

II.6 METODOLOGIA

Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para determinação de substâncias fenólicas em água, incluindo clorofenóis. Dentre estas, destaca-se as que utilizam caminhos clássicos como métodos de extração, onde a Extração Líquido-Líquido (ELL), Extração em Fase Sólida (EFS) e Micro-extração em Fase Sólida (MEFS) são reportados com maior frequência (PUIG & BARCELÓ, 1996). Estes métodos estão associados, geralmente, a métodos de Cromatografia à Gás (CG) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Alguns métodos oficiais para determinação de substâncias fenólicas em água, como exemplo os da U. S. EPA 604, 625 e o 8041, utilizam ELL seguido de Cromatografia à Gás com Detector por Captura de Elétrons (DCE) e/ou Detector Seletivo de Massas (DSM) (U.S. EPA, 1995 (a) (b) (c)).

Clorofenóis são altamente polares e suas pressões de vapor são baixas, requerendo especial atenção no desenvolvimento de metodologias que utilizam CG. Estas propriedades podem causar problemas de adsorção no injetor e na coluna, obtendo-se, assim, cromatogramas com picos largos e com cauda que dificultam a separação cromatográfica e causam altos limites de detecção (CRESPÍN *et al.*, 1999).

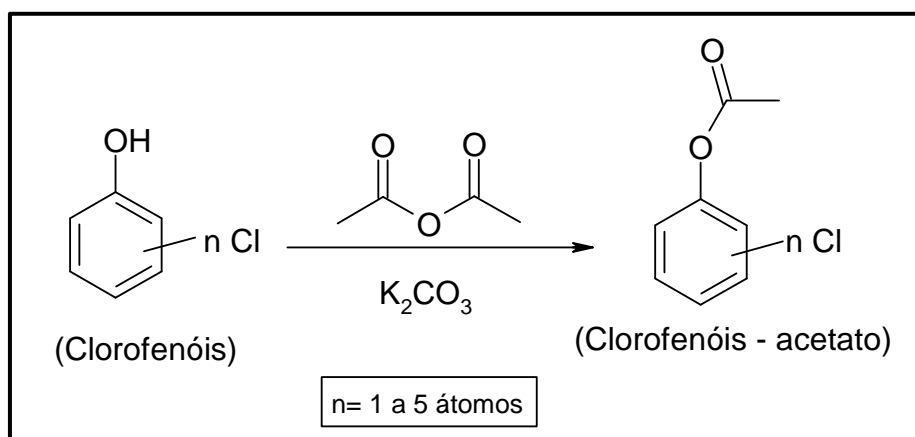
Análises de clorofenóis em água - utilizando como método a CG, em geral, são realizados por dois caminhos. Um envolve a análise direta de clorofenóis livres e, o outro, análises de clorofenóis derivatizados. Métodos envolvendo derivatização são mais longos, mas os derivados são geralmente fáceis para cromatografar e apresentam maior resposta a alguns detectores (LEE *et al.*, 1984a). Ambos os caminhos normalmente incluem extração com solventes orgânicos. No entanto, a extração dos clorofenóis livres, após acidificar a amostra, tem apresentado baixa recuperação para alguns deles.

A conversão em derivados menos polares é frequentemente empregada utilizando diversos agentes derivatizantes, destacando-se a esterificação com anidrido acético, a metilação com diazometano e a pentafluorobenzilação com

brometo de pentafluorbenzila (PFBBr) (LEE & CHAU, 1983; LEE *et al.*, 1984 (a,b); HAJŠLOVÁ *et al.*, 1988).

No processo de acetilação, os clorofenóis podem ser convertidos em seus respectivos acetatos diretamente em solução aquosa por simples reação com anidrido acético (CHAU & COBURN, 1974; COUTTS *et al.*, 1979). Este método apresenta algumas vantagens destacando-se a rapidez do processo, os produtos formados são extraídos da água com bom rendimento, além de possibilitarem a análise por técnica de CG (KRIJGSMAN & KAMP, 1977; JANDA & LANGENHOVE, 1989). A reação de acetilação dos clorofenóis com anidrido acético em meio aquoso alcalino está representada na Figura 2.

Figura 2: Reação de acetilação dos clorofenóis com anidrido acético



Diversos estudos reportam a acetilação de clorofenóis com anidrido acético, objetivando a análise destas substâncias em água, incluindo água para consumo humano. CHAU & COBURN (1974) reportaram o primeiro método para determinação de PCF em águas naturais e águas residuais, utilizando esterificação com anidrido acético. Nesse método, o PCF é extraído da água com benzeno e acetilado por reação com anidrido acético em solução alcalina. O acetato do PCF formado é então extraído com hexano e analisado por técnica de CG com Detector por Captura de Elétrons (DCE) com coluna empacotada. O método utilizado foi reprodutivo e com alto rendimento de reação. A recuperação média em água destilada foi 88 %. O limite de determinação do método foi menor que 0,01 ppb de PCF utilizando 1 L de água. Ainda foi demonstrado experimentalmente que os herbicidas ácido carboxílicos, como o ácido 2,4-D, silvex, dicamba, e ácido 2,4,5-T não reagem com o anidrido acético e portanto não interferem nas análises.

KRIJGSMAN & KAMP (1977) e RENDBERG & LINDSTRÖM (1981) utilizaram métodos baseados no descrito por CHAU & CORBUN (1974) para converter isômeros dos clorofenóis em seus respectivos acetatos. Os dois estudos utilizaram a técnica de CG-DCE. O primeiro utilizou a ELL obtendo boa recuperação, entre 80 e 100 %, para todos os 19 clorofenóis. A coluna utilizada por este foi a capilar de vidro de 30 m (SE-30). O segundo utilizou a EFS (cartucho de C₁₈) após derivatização, também, obtendo recuperação satisfatória (acima de 85 %).

COUTTS *et al.* (1979) reportaram um método para acetilação direta de substâncias fenólicas, incluindo clorofenóis, em solução aquosa. Neste método, as substâncias foram derivatizadas em 250 mL de água, com 10 g de NaHCO₃ (excesso) e 0,5 mL de anidrido acético. Os produtos foram extraídos com diclorometano (2 vezes de 10 mL). Este método eliminou as deficiências na recuperação incompleta de clorofenóis livres em amostras de água, pela técnica da ELL.

LEE *et al.* (1984a) reportaram um método para quantificação simultânea de 15 clorofenóis em águas naturais por acetilação com anidrido acético em presença de KHCO₃. Os produtos foram confirmados por CG-DSM e quantificados por CG-DCE. Várias condições experimentais foram verificadas, por exemplo: volume de amostra, solvente e tempo de extração, concentração de KHCO₃ e volume de anidrido acético. Obteve recuperações em águas naturais de 90 a 105%.

JANDA & LANGENHOVE (1989) determinaram a recuperação do método calculando a razão das áreas dos clorofenóis acetatos obtidos das amostras de água fortificadas com as áreas dos picos dos padrões (considerando 100% de recuperação), após correção das áreas dos picos com o padrão interno. Considera-se 100% de recuperação dos padrões o procedimento usando pequeno volume de solvente orgânico e a fase aquosa somente como meio para derivatização, de acordo com o método descrito anteriormente por RENBERG & LINDSTRÖM (1981). O método para derivatização e extração dos clorofenóis em água fortificada foi o mesmo descrito por COUTTS *et al.* (1979).

BALLESTEROS *et al.* (1990) reportaram um método para simultânea acetilação com anidrido acético e extração em sistema de extração contínua. As recuperações das substâncias fenólicas, incluindo clorofenóis, não foram maiores que 80 %, o que já era esperado utilizando essa técnica de extração.

BUCHHOLZ & PAWLISZYN (1994) realizaram a acetilação com anidrido acético para resolver problemas cromatográficos do método. Os clorofenóis acetilados foram extraídos pela técnica de Microextração em Fase Sólida (MEFS).

RODRÍGUEZ *et al.* (1996) reportaram procedimento modificado de RENBERG & LINDSTRÖM (1981) para acetilação dos padrões de clorofenóis. As condições do processo de acetilação utilizado no método foram otimizadas. O rendimento do processo de preparação dos padrões, verificada por CG-DCE, foi em torno de 90%, verificado para várias concentrações. TURNES *et al.* (1996) desenvolveu um novo método para determinação de clorofenóis em água potável, utilizando o método de derivatização reportado anteriormente e a Cromatografia à Gás com detecção por EM-EM (CG-EM-EM), obtendo limites de quantificação inferiores aos descritos anteriormente.

Em estudo mais recente, BAGUERI *et al.* (2004) utilizou a Microextração com Solvente (MES) para enriquecimento de traços de fenóis em água. O processo de derivatização dos padrões também foi como reportado RODRÍGUEZ *et al.* (1996).

Com o estudo das correntes metodologias descritas na literatura, verificou-se que as que utilizam derivatização com anidrido acético diretamente na água (*in situ*) apresentam maior rendimento no processo de extração, quando a técnica de ELL é utilizada posteriormente.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GERAL:

- Implementar e validar metodologias para determinação de clorofenóis em água para consumo humano, incluindo outros congêneres além dos contemplados na Portaria nº. 518 / 2004, sabendo-se do potencial de contaminação e da toxicidade dos mesmos.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar análises de clorofenóis em amostras de água provenientes de sistemas e soluções alternativas de abastecimento do Município do R.J. gerando resultados confiáveis através da aplicação do método validado;
- Avaliar a qualidade da água com base na norma de potabilidade;
- Fornecer os resultados das análises à Vigilância Sanitária Municipal;
- Elaborar um Procedimento Operacional Padrão (POP) do método validado visando à divulgação do conhecimento e utilização pelos laboratórios governamentais;
- Subsidiar a Secretaria de Vigilância em Saúde em ações de vigilância da qualidade da água.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

IV.1.1 EQUIPAMENTO

Cromatógrafo à Gás (CG) Hewlett-Packard (HP 6890) equipado com injetor split/splitless e Detector Seletivo de Massas (DSM) HP 5973, utilizando impacto de elétrons (70 eV). Hélio (99.999 %) utilizado como gás de arraste com razão de fluxo de 1mL/min. Todas as injeções foram realizadas em modo *split/splitless* pulsado. Coluna capilar HP-5MS com 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A interface do CG-DSM foi mantida em 280 °C. O DSM foi operado em modo *scan*, varrendo a faixa de 50 a 350 m/z. Para determinação quantitativa o DSM foi operado em modo seletivo de íons (SIM), selecionando os íons quantificadores e qualificadores para cada substância de interesse.

IV.1.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Após determinação da ordem de eluição das substâncias, através da injeção dos clorofenóis acetilados, o programa de temperatura do cromatógrafo foi otimizado (Tabela 3).

Tabela 3: Programa de temperatura otimizado

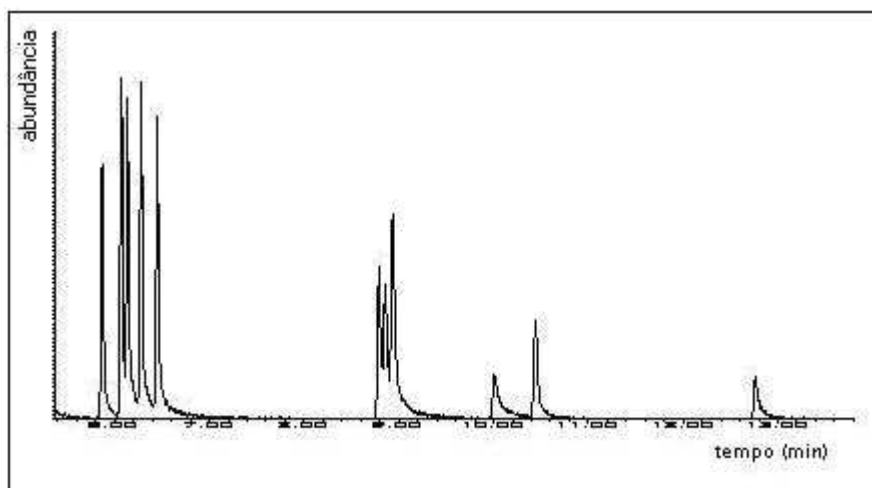
| °C / min | Temperatura (°C) | Tempo de permanência (min.) | Tempo total (min.) |
|----------|------------------|-----------------------------|--------------------|
| | 60 | 1 | |
| 30 | 140 | 0 | |
| 4 | 170 | 0 | |
| 40 | 280 | 5 | 23.88 |

IV.1.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Os clorofenóis investigados foram injetados sem derivatizar e em modo “*scan*” (Figura 3). Como esperado, o cromatograma obtido demonstra que os picos apresentaram cauda e resolução inadequada. Assim, a primeira etapa a ser

investigada foi a derivatização, uma vez que a análise destas substâncias por cromatografia à gás, com a coluna cromatográfica utilizada, torna-se inviável.

Figura 3: Cromatograma total de íons (50-350 m/z) obtido para os clorofenóis não derivatizados.

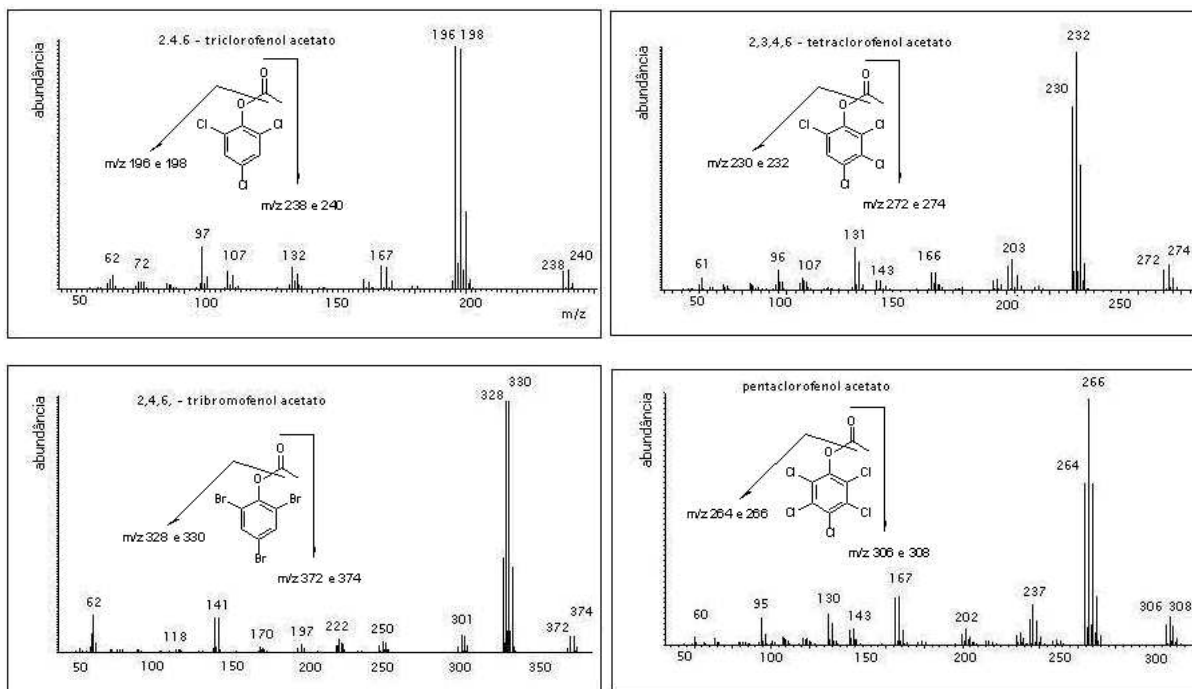


As substâncias de interesse foram derivatizadas separadamente em concentração intermediária, empregando procedimento utilizado na construção das curvas analíticas e injetados no CG/DSM para confirmação da formação dos derivados acetato e determinação dos tempos de retenção. Numa segunda etapa, foram realizados testes preliminares com uma solução padrão contendo todos os clorofenóis. Após esta, e otimização das condições cromatográficas, pôde-se construir o programa de aquisição dos grupos de íons, em modo seletivo de íons (SIM).

Através da inspeção dos espectros de massas, obtido em modo de varredura de íons, para cada composto, confirmou-se a formação dos derivados acetato nas condições utilizadas. A identificação dos picos foi baseada na presença do íon molecular (M^+), o íon do fenol parental ($M-42^+$), e os isótopos dos átomos de cloro nas regiões do íon M^+ e ($M-42^+$) (LEE *et al*, 1984a). Não foi observado o fragmento CH_3CO^+ ($m/z = 43$), pois a faixa de varredura dos íons foi fixada de 50 a 350 m/z.

Em todas as substâncias investigadas foi identificada a presença dos íons característicos dos congêneres, confirmando a acetilação. Como exemplo, a Figura 4 demonstra os espectros de massas obtidos para o 2,4,6 – triclorofenol, 2,3,4,6 – tetraclorofenol, 2,4,6 – tribromofenol e pentaclorofenol acetatos.

Figura 4: Espectros de massas obtidos para os clorofenóis acetilados



Na etapa de derivatização a razão molar entre a base utilizada e o anidrido acético tem sido investigada por ser considerada muito crítica. Isto ocorre, provavelmente, devido a diferentes razões de reação entre a acetilação do íon fenolato e a hidrólise do anidrido. Assim, se o pH da fase aquosa for muito alto, em relação à quantidade de anidrido adicionada, este será hidrolisado antes que o processo de acetilação tenha terminado. Por outro lado, em pH muito baixo, correspondendo a baixas concentrações de íons fenolato reativos, tem-se redução da eficiência da reação (RENERG & LINSTRÖM, 1981).

O procedimento para acetilação dos padrões (curva analítica) e para tratamento das amostras foi de acordo com o recentemente otimizado por RODRIGUEZ *et al.* (1996).

Para extração dos clorofenóis derivatizados utilizou-se a técnica de extração (líquido-líquido), inicialmente empregando hexano como solvente. Obteve-se rendimento satisfatório para extração das substâncias investigadas no método analítico utilizando 10 mL de amostra, no qual não é requerida etapa subsequente de concentração do extrato. No entanto, no tratamento de 200 mL de amostra, onde são utilizados grandes volumes de solvente, sendo necessário concentrar o extrato, obteve-se baixo rendimento do processo. Este fato ocorre devido a perdas dos analitos nas condições de temperatura e pressão requeridas na etapa de

concentração do extrato em rotaevaporador. Dessa forma, obteve-se rendimento insatisfatório, principalmente para os derivados mais voláteis. Para minimizar essas perdas foi utilizado isoctano como *keeper* (LEE *et al.*, 1989). Com a utilização de isoctano como *keeper* e hexano como solvente na extração, obteve-se melhora no rendimento na etapa de evaporação. Todavia, as substâncias mais voláteis continuavam a apresentar baixo rendimento. Esse problema foi resolvido com a utilização de diclorometano como solvente na extração, concomitante a adição do referido *keeper* na etapa de evaporação (COUTTS *et al.*, 1979).

IV.2 PLANO DE AMOSTRAGEM, COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O abastecimento de água para consumo humano da maioria da população do município do R.J. é realizado por 15 sistemas de abastecimento, todos sob responsabilidade da CEDAE. Principalmente pela indisponibilidade da rede de distribuição, ou por fatores econômicos também são utilizadas soluções alternativas, como poços artesianos, para abastecimento de residências, instalações comerciais, escolas, hospitais, dentre outros. Alguns locais utilizam os dois tipos de abastecimento (sistema e solução alternativa de abastecimento).

Quanto à população abastecida, o sistema Guandu (Estação de tratamento e rede de distribuição) fornece água à aproximadamente 96% da população, sendo considerado, portanto, o principal sistema de abastecimento que atende ao município. Na literatura científica, observa-se que a maioria dos estudos restringe-se a avaliar a qualidade da água desse sistema, com base na norma de potabilidade.

Os locais de coleta foram selecionados com o objetivo de representar uma significativa porção da água consumida. Em conjunto com a Vigilância Sanitária Municipal (VISA), foram coletadas amostras de água da rede de distribuição de 6 sistemas de abastecimento, incluindo o sistema Guandu, além de soluções alternativas de abastecimento. As coletas foram realizadas preferencialmente em locais públicos, como escolas, hospitais e postos de saúde. Entre outubro e novembro de 2006, foi coletada uma amostra em cada ponto de coleta selecionado, à exceção de três pontos de coleta da rede de distribuição da ETA Guandu, onde foram coletadas duas amostras em intervalo de sete dias. No total foram analisadas 28 amostras. A identificação dos pontos de coleta, realizada por Sistema de

Posicionamento Global (GPS), e a descrição dos sistemas e soluções alternativas estão demonstrados no Anexo I.

As amostras de água foram coletadas em frasco âmbar de 1000 mL, contendo 500 mg de tiosulfato de sódio para evitar oxidação das substâncias investigadas e mantidas em geladeira (2 a 8 °C) por no máximo 7 dias até realização das análises (RODRIGUEZ & CELA, 1997). Após tratamento das amostras, os extratos foram analisados imediatamente ou mantidos em congelador também por no máximo 7 dias.

IV.3 VIDRARIAS E MATERIAIS

- a) Pipetas volumétricas de capacidade: 1; 2; 3 e 5mL;
- b) Balões volumétricos de capacidades: 10; 25; 50; 100 e 200 mL;
- c) Tubos de ensaio de capacidade: 10 e 20 mL;
- d) Pipetas Pasteur;
- e) Espátulas de metal;
- f) Seringa de vidro de capacidade: 100 µL;
- g) Béqueres de vidro de capacidades: 10; 20; 100 e 200mL;
- h) Tubos concentradores com fundo graduado de 1 ml.

IV.4 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- a) Cromatógrafo à Gás (Agilent 6890N Series), com Detector Seletivo de Massas (Agilent 5973);
- b) Balança analítica (Mettler AE 200)
- c) Ultra-som (Branson, 5210);
- d) Manta de aquecimento (Fisatom, Brasil);
- e) Evaporador rotatório à vácuo (Büchi Rotavapor R 134, Suíça);
- i) Suporte universal;
- j) Agitador de tubos (Phonix AT 56, Brasil).

IV.5 LIMPEZA DA VIDRARIA E MATERIAIS UTILIZADOS

As vidrarias e materiais utilizados no estudo foram submetidos ao processo de lavagem seguindo as etapas do procedimento descrito abaixo. Este procedimento está validado para análise de resíduos de agrotóxicos pelo Laboratório

de Análise de Micropoluentes Orgânicos do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

- a) Descontaminação do material utilizado com acetona para análise (P. A.);
- b) Lavagem com água corrente;
- c) Imersão do material lavado em solução de detergente alcalino (Extran 5 % (v/v)) por, no mínimo, doze horas;
- d) Sonificação com Extran a 5 % (v/v): três vezes de quinze minutos cada;
- e) Lavagem com água corrente;
- f) Sonificação com água corrente: três vezes de quinze minutos cada;
- g) Sonificação com água ultra-pura: três vezes de quinze minutos cada;
- h) Lavagem com água ultra-pura;
- i) Rinsagem com acetona grau resíduo de pesticida;
- j) Rinsagem com hexano grau resíduo de pesticida;
- k) Secagem do material em local plano e em temperatura ambiente;

IV.6 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

- a) Água ultra-pura (MILLI-Q, Milipore);
- b) n - Hexano para análise de resíduos – Omnisolv (Merck, Estados Unidos);
- c) Acetona para análise de resíduos (Proquímios, Brasil);
- d) Acetona p. a. (Merck, Alemanha);
- e) Isooctano para análise de resíduos – Suprasolv (Merck, Alemanha);
- f) Detergente alcalino - Extran MAO1 (Merck, Brasil);
- g) Sulfato de sódio anidro granulado p.a. (Merck, Alemanha);
- h) Carbonato de Potássio p. a. (tratado em mufla a 400°C, por 12 horas para eliminar a presença de interferentes);
- i) Anidrido acético (Vetec, Brasil): bidestilado a 139 °C, para eliminar a presença de interferentes. Armazenado em geladeira (2 – 8°C) para minimizar a formação de ácido acético;
- j) Tiosulfato de sódio p. a. (Merck, Alemanha);
- l) Diclorometano para análise de resíduos (Merck, Alemanha);
- m) Metanol para análise de resíduos (Omnisolv, Estados Unidos)

IV.7 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO

No preparo das soluções-padrão todas as diluições foram realizadas com o auxílio de pipetas volumétricas.

IV.7.1 SOLUÇÕES ESTOQUE

Foram preparadas soluções-padrão estoque individuais de concentração 400 mg/L a partir da solubilização de 0,01 g de cada substância em metanol, utilizando balões volumétricos de 25 mL, avolumados com metanol.

IV.7.2 SOLUÇÕES INTERMEDIÁRIAS

Retirou-se 1 mL da solução estoque de cada padrão para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução com todas as substâncias de interesse a uma concentração de 4 mg/L, avolumado com metanol;

Solução intermediária de concentração 2 mg/L: 5 mL da solução de concentração 4 mg/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;

Solução intermediária de concentração 1 mg/L: 5 mL da solução de concentração 2 mg/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;

Solução intermediária de concentração 300 ng/mL: 3 mL da solução de concentração 1mg/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;

Soluções intermediárias utilizadas na construção das curvas analíticas:

- a) Solução de concentração 150 ng/mL: 5 mL da solução de concentração 300 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;
- b) Solução de concentração 120 ng/mL: 4 mL da solução de concentração 300 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;
- c) Solução de concentração 90 ng/mL: 3 mL da solução de concentração 300 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;

- d) Solução de concentração 60 ng/mL: 2 mL da solução de concentração 300 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;
- e) Solução de concentração 30 ng/mL: 1 mL da solução de concentração 300 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;
- f) Solução de concentração 3 ng/mL: 1 mL da solução de concentração 30 ng/L foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, avolumado com metanol;

IV.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Através da análise das metodologias descritas na literatura, foram selecionadas para implementação e validação no laboratório as que utilizam anidrido acético como agente derivatizante e a extração líquido-líquido, principalmente, pela disponibilidade do reagente e pelo baixo custo do procedimento, respectivamente. Foram implementadas e validadas duas metodologias analíticas, utilizando diferentes volumes de amostra, caracterizadas como uma metodologia rápida (10 mL de amostra) e um método mais sensível (200 mL de amostra).

IV.8.1 ACETILAÇÃO DOS PADRÕES EM SOLUÇÃO PADRÃO

Em tubo de ensaio de capacidade para 10 mL, 2 mL de solução de Carbonato de potássio (K_2CO_3) a 5 % e 2 mL de hexano contendo 200 μ L de anidrido acético foram adicionados a 1 mL da solução dos clorofenóis em metanol nos níveis de concentração estudados. A mistura foi agitada por 1 minuto e em seguida a fase orgânica separada. A fase aquosa (água – metanol) foi extraída com 1 mL de hexano agitando a mistura por 1 minuto. As fases orgânicas (hexano) foram então misturadas, adicionado sulfato de sódio anidro e analisada por CG - DSM.

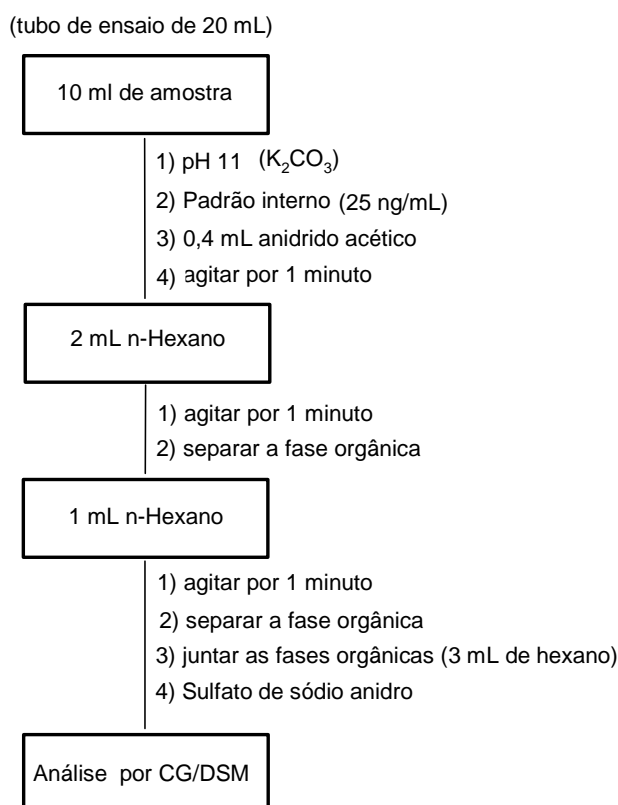
IV.8.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

IV.8.2.1 VOLUME DE 10 ML DE AMOSTRA

Em tubo de ensaio o pH da amostra (10 mL) foi corrigido com K_2CO_3 (pH = 11-11,5), adicionados o padrão interno (2,4,6-tribromofenol) e 0,4 mL de anidrido

acético. O tubo de ensaio foi então agitado por 1 minuto. Após, 2 mL de hexano foram adicionados e o tubo de ensaio agitado por 1 minuto, seguindo a separação da fase orgânica (hexano). A fase aquosa foi novamente extraída com 1 mL de hexano, agitando a mistura por 1 minuto. As fases orgânicas (hexano) foram então juntadas, adicionado sulfato de sódio anidro e analisada por CG-DSM. O procedimento utilizado para tratamento das amostras está esquematizado na Figura 5.

Figura 5: Procedimento analítico para determinação de clorofenóis em 10 mL de amostra de água

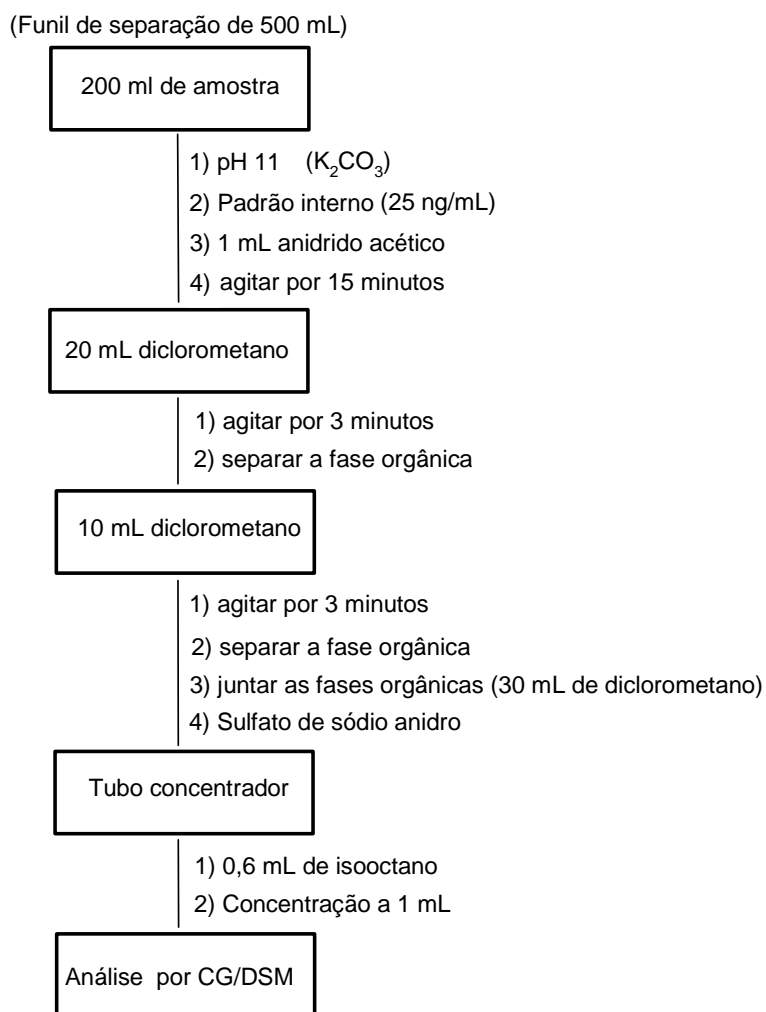


IV.8.2.2 VOLUME DE 200 ML DE AMOSTRA

Em funil de separação o pH da amostra (200 mL) foi corrigido com K₂CO₃ (pH = 11-11,5), adicionados o padrão interno (2,4,6-tribromofenol) e 1 mL de anidrido acético. O funil de separação foi submetido à agitação por 15 minutos. Para extração, foram adicionados 20 mL de diclorometano e o funil de separação agitado por três minutos. A fase orgânica foi separada e 10 mL diclorometano foram adicionados a fase aquosa. O funil de separação foi novamente agitado por três minutos e posteriormente a fase orgânica separada. Sulfato de sódio anidro foi adicionado para retirar a água residual da fase orgânica, a qual foi posteriormente

concentrada a 1 mL em evaporador rotatório à temperaturas nunca superiores a 28 °C, sob vácuo de 500 mmHg e 100 rotações por minuto (rpm), com auxílio de tubo concentrador de fundo volumétrico com capacidade de 1 mL. Utilizou-se 0,6 mL de isooctano no processo de concentração. O procedimento está esquematizado na Figura 6.

Figura 6: Procedimento analítico para determinação de clorofenóis em 200 mL de amostra de água



IV.9 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Utilizou-se o processo de validação intralaboratorial, tendo como base documento orientativo do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) e da Eurachem Working Group (EURACHEM, 1998), além da ISO/IEC 17025 (ABNT, 2001) e estudos publicados na literatura científica. Foram determinados os

parâmetros de desempenho do método, descritos abaixo, onde as soluções padrão, brancos de amostras e amostras adicionadas de soluções padrão foram submetidos aos procedimentos analíticos otimizados (RUELA *et al.*, 2005).

- a) Seletividade: verificação de possíveis interferentes na matriz; determinação da resolução cromatográfica; determinação da abundância relativa entre os íons selecionados (quantificador e qualificador) utilizando fortificação da matriz e aplicação do método analítico.
- b) Faixa de trabalho: determinado através da análise de soluções padrão em níveis de concentração próximos ao valor esperado nas amostras.
- c) Linearidade: verificação de valores aberrantes (testes de Grubbs e Dixon); análise de resíduos da calibração por gráficos de resíduos; análise da variância dos resíduos; confirmação do modelo matemático utilizado na construção das curvas analíticas.
- d) Precisão: utilização de testes de recuperação em vários níveis de concentração; determinada pelo Coeficiente de variação (CV %); comparação da precisão dos métodos por teste F (Snedecor).
- e) Exatidão: utilização de testes de recuperação em vários níveis de concentração; determinada pela taxa de recuperação; comparação da exatidão dos métodos por teste T (Student).
- f) Limite de Detecção e Quantificação: determinado pelo método da relação sinal / ruído através da fortificação de amostras.
- g) Limite de repetibilidade: determinado a partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios de recuperação realizados sob condição de repetibilidade.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

O principal produto de um laboratório de química analítica é a informação sobre a composição química do material em análise, para um ou mais componentes, em termos qualitativos e/ou quantitativos. Estas informações são usadas em inúmeras situações, inclusive como fator de decisão, por exemplo, em processos judiciais.

Sempre que as decisões forem baseadas em resultados analíticos, é importante ter alguma indicação quanto à qualidade dos resultados, ou seja, qual o nível de confiabilidade dos mesmos. A qualidade dos resultados deve ser obtida através de um processo integral, onde a validação dos métodos analíticos utilizados apresenta-se como etapa essencial (VAN ZONEN *et al.*, 1999), caracterizada por um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, fornecendo evidências objetivas de ser adequado para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

Normas governamentais, estudos publicados em periódicos e documentos guias apresentam definições, procedimentos, parâmetros e estratégias para validação de métodos. Quanto às definições de validação de métodos, há grande disparidade na literatura. Assim, algumas foram transcritas a seguir:

- a) *“Verificações realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico”* (ANVISA, 2004).
- b) *“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”* (ANVISA, 2003).
- c) *“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”* (EURACHEM, 1998).

- d) “*Confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos*” (ABNT, 2001).
- e) “*Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos foram atendidos*” (INMETRO, 2003).

A validação de métodos analíticos é justificada por razões legais, técnicas e comerciais. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento ou certificação (do inglês “*accreditation or certification*”) fundamentados em padrões de qualidade internacionais e “*guidelines*” (VAN ZONEN *et al.*, 1999).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). O primeiro estabelece documentos com poder de lei. O segundo estabelece guias, as quais são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. As guias são recomendações e são intencionalmente vagas para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-las de acordo com o método a ser usado. Esses órgãos, bem como os órgãos credenciadores internacionais, exigem o item validação de métodos analíticos como requisito fundamental na comprovação de competência técnica. Para a validação de métodos de ensaios químicos, o INMETRO possui um documento, de caráter orientativo, servindo de guia para laboratórios acreditados com a NBR ISO/IEC 17025.

De acordo com a NBR ISO/IEC 17025, para confirmar que os métodos são apropriados para os usos pretendidos, o laboratório deve validar: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; e ampliações e modificações de métodos normalizados. Métodos normalizados são aqueles desenvolvidos por organismos de normalização ou outras organizações cujos métodos são aceitos pelo setor técnico dos organismos normalizadores. Métodos não-normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados (INMETRO, 2001).

A validação de métodos analíticos depende da determinação dos parâmetros totais de desempenho do método (ou parâmetros de validação), os quais são obtidos durante o desenvolvimento do método e através de estudos interlaboratoriais ou seguindo protocolos de validação interna (EURACHEM/CITAC, 2002).

Os principais parâmetros de desempenho determinados nos estudos de validação de métodos são: seletividade/especificidade; linearidade e faixa de trabalho; precisão; exatidão e tendência; limite de detecção; limite de quantificação; robustez; e incerteza de medição (PINTO *et al.*, 1999; BOLZ *et al.*, 2000; LÉON *et al.*, 2006; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2004; RUELA *et al.*, 2005; RANGEL, 2006).

A necessidade de se determinar cada um destes parâmetros para validação de um método em particular depende do escopo e da natureza do mesmo (VAN ZOOENEN *et al.*, 1999), como exemplo, a frequência com que o método será utilizado, análise qualitativa e/ou quantitativa, análise de traços ou substâncias majoritárias, dentre outros (RIBANI *et al.*, 2004).

Os métodos propostos para análise de 10 e 200 mL de amostra foram validados determinando-se os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade; faixa de trabalho; linearidade; precisão; limite de repetibilidade; exatidão; limite de detecção e quantificação.

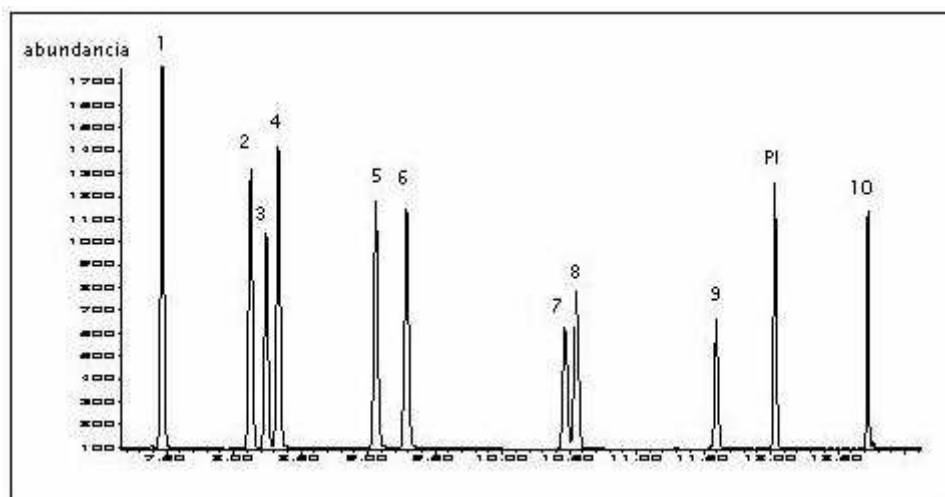
V.1.1 SELETIVIDADE

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de maneira inequívoca, as substâncias sob análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Pode-se verificar a seletividade de um método cromatográfico através da injeção de brancos (várias amostras) obtidos com a mesma matriz a ser analisada. Como condição para seletividade do método, deve-se observar a ausência de picos na região do tempo de retenção das substâncias de interesse (LANÇAS, 2004; RUELA, 2005).

A seletividade dos métodos foi testada através da análise da mistura de padrões e do branco da matriz (n= 6). Idealmente, a matriz não deve apresentar interferentes que coincidam com os tempos de retenção (t_R) das substâncias investigadas. A seletividade do método está claramente demonstrada na Figura 7,

onde se observa a separação cromatográfica com resolução adequada para todas as substâncias investigadas. Não foram observadas substâncias interferentes na matriz.

Figura 7: Cromatograma obtido pela análise de amostras fortificadas com as substâncias investigadas, em modo seletivo de íons.



(1) 2,4,6-triclorofenol; (2) 2,3,6-triclorofenol; (3) 2,3,5-triclorofenol; (4) 2,4,5-triclorofenol; (5) 2,3,4-triclorofenol; (6) 3,4,5-triclorofenol; (7) 2,3,5,6-tetraclorofenol; (8) 2,3,4,6-tetraclorofenol; (9) 2,3,4,5-tetraclorofenol; (PI) 2,4,6-tribromofenol (padrão interno); (10) pentaclorofenol.

Os tempos de retenção relativos (t_R substância investigada / t_R do padrão interno) foram determinados para todas as substâncias investigadas através da fortificação de amostras de água ($n= 10$). Como critério de aceitação, o t_R relativo da substância a analisar deve ser idêntico ao da substância padrão na matriz, considerando uma margem de $\pm 0,5 \%$. A substância usada como padrão interno deve ter características similares à substância a ser quantificada, como por exemplo, ter tempo de retenção próximo a esta substância. Esta técnica elimina erros decorrentes de pequenas mudanças em variáveis experimentais, sendo extremamente útil e, por isso, amplamente utilizada (RIBANI *et al.*, 2004). Utilizou-se o 2,4,6-tribromofenol como padrão interno por apresentar características similares aos clorofenóis, participando de todas as etapas do método analítico além de ter sido utilizado com sucesso por outros estudos na determinação de clorofenóis em água para consumo humano (FINGLER *et al.*, 1992).

Foram verificadas as intensidades relativas dos íons quantificadores e qualificadores para todas as substâncias investigadas através de amostras

fortificadas (n= 6). A média das injeções de seis replicatas está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Intensidade relativa dos íons selecionados

| <i>Substâncias</i> | <i>Íon qualificador m/z</i> | <i>Íon quantificador m/z</i> | <i>Intensidade relativa (%)</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 2,4,6-triclorofenol | 196 | 198 | 96 |
| 2,3,6-triclorofenol | 196 | 198 | 95 |
| 2,3,5-triclorofenol | 196 | 198 | 96 |
| 2,4,5-triclorofenol | 196 | 198 | 96 |
| 2,3,4-triclorofenol | 196 | 198 | 98 |
| 3,4,5-triclorofenol | 196 | 198 | 96 |
| 2,3,5,6-tetraclorofenol | 230 | 232 | 124 |
| 2,3,4,6-tetraclorofenol | 230 | 232 | 128 |
| 2,3,4,5-tetraclorofenol | 230 | 232 | 127 |
| Pentaclorofenol | 268 | 266 | 156 |

As intensidades relativas dos íons monitorados na amostra devem ser idênticas às obtidas para a substância de referência, com uma margem de $\pm 10\%$, quando utilizada a técnica de ionização por impacto de elétrons (SPISSO, 1998). Este foi o critério de aceitação utilizado para análise das substâncias investigadas nas amostras.

V.1.2 FAIXA DE TRABALHO

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado, sendo esta uma faixa que apresente condições de linearidade. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2003).

A faixa de trabalho de 1 a 50 ng/mL demonstrou-se adequada para construção das curvas analíticas, segundo os critérios de aceitabilidade de linearidade.

V.1.3 LINEARIDADE

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003). A quantificação de analitos requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Esta relação, obtida por diversas maneiras, pode ser descrita através de uma equação matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2003).

A quantificação das substâncias de interesse pode ser realizada através da padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição padrão. Utilizou-se o método de padronização interna, realizado através do preparo de soluções-padrão das substâncias de interesse em seis níveis de concentrações eqüidistantes (3, 30, 60, 90, 120, 150 ng/mL), às quais adicionou-se quantidade conhecida do padrão interno. O método de derivatização dos padrões foi então realizado em triplicata para cada nível de concentração. Para o tratamento estatístico empregado na construção da curva analítica (linearidade), seis níveis de concentração são suficientes. (CALCUTT & BODDY *apud* VALENTE, 2001).

As soluções foram analisadas por técnica de CG-DSM. Realizou-se tratamento estatístico dos dados e construiu-se um gráfico relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno) com a concentração da substância.

Na construção das curvas analíticas utilizou-se o método dos mínimos quadrados, que fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima. A aplicabilidade deste método exige que algumas suposições sobre a natureza dos erros associados às medidas sejam válidas, comprovadas através de tratamento estatístico. Alguns erros associados às medidas são causados pelo desenho do estudo experimental, e principalmente no preparo das soluções-padrão (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996). Como estas etapas foram realizadas de maneira criteriosa, no tratamento estatístico esses erros foram considerados desprezíveis.

No tratamento estatístico, inicialmente verificou-se a ocorrência de valores aberrantes (*outliers*) entre os dados obtidos para a construção da curva analítica. Os valores aberrantes são aqueles gerados por erros grosseiros durante as etapas de validação do método e, portanto, não fazem parte da população dos valores. A existência de *outliers* pode afetar a confiabilidade dos testes estatísticos (médias, desvios-padrão e variâncias), inclusive fornecer conclusões errôneas sobre os modelos matemáticos utilizados na construção das curvas analíticas (SPISSO, 1998).

Cada nível de concentração da curva analítica foi realizado em triplicatas independentes e injetados no CG-DSM em duplicata. Assim, para cada nível de concentração foram obtidos seis resultados a serem avaliados quanto à presença de valores aberrantes. Para detecção dos valores aberrantes foram utilizados os testes de Grubbs simples e pareado, para rejeição de um resultado aberrante e para rejeição de dois resultados aberrantes, respectivamente (HORWITZ, 1995) e também o teste de Dixon, ambos para um nível de significância estatística de 5 %.

Os valores de Grubbs tabelados (G_{tabelado}) são utilizados como parâmetros para rejeição de um e dois valores aberrantes em função do número de replicatas (n) e do nível de significância estatística adotado. Na detecção de um valor aberrante, o valor de Grubbs calculado ($G_{\text{calculado}}$) para o valor suspeito foi determinado pela equação 1.0:

$$G = \frac{\left(y_i - \bar{y} \right)}{s} \quad (\text{Eq. 1.0})$$

onde, y_i = valor suspeito de ser aberrante; \bar{y} = média dos valores obtidos para uma determinada concentração; s = desvio padrão dos valores obtidos. Para a detecção simultânea de dois valores aberrantes, o valor de $G_{\text{calculado}}$ foi determinado pela equação 1.1:

$$G = 100 \left(1 - \frac{s_2}{s_1} \right) \quad (\text{Eq. 1.1})$$

onde, s_2 = desvio padrão descartando um par de valores suspeitos; s_1 = desvio padrão sem descartar os valores. Nos dois casos, como critério de exclusão avalia-

se como se segue: se $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$, o valor suspeito não é aberrante; se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$, o valor suspeito é considerado aberrante.

O teste de Grubbs foi utilizado seguindo recomendação de HORWITZ (1995), onde primeiro aplica-se o teste de Grubbs simples e posteriormente o pareado. Através do teste de Grubbs simples (*para rejeição de um resultado aberrante*), sete valores aberrantes foram detectados, ou seja, para estes os valores de $G_{\text{calculado}}$ foram maiores que o valor de G_{tabelado} (1,89), para um nível de significância de 5 % e $n= 6$. Esses valores aberrantes foram identificados no último nível de concentração da curva analítica, em diferentes substâncias e compreendendo sempre os maiores valores da série. Ainda, pelo teste de Grubbs pareado ($G_{\text{tabelado}} = 79,6$ para um nível de significância de 5% e $n= 6$) foram detectados dois valores inferiores da série, apenas para uma substância, no segundo nível de concentração da curva analítica. Assim, aplicando-se os testes de Grubbs à série de valores obtidos foram detectados e, conseqüentemente, rejeitados nove valores aberrantes.

O teste de Dixon também foi empregado na detecção de valores aberrantes aplicando-se a equação 2.0. Este teste é recomendado pelo *Codex Alimentarius* na detecção de valores aberrantes (CODEX ALIMENTARIUS, 2000).

$$Q = \frac{(x - x_1)}{\text{intervalo}} \quad (\text{Eq. 2.0})$$

Onde, x = valor suspeito de ser aberrante; x_1 = valor mais próximo do suspeito de ser aberrante; *intervalo* = diferença entre o maior e o menor valor. O valor de Q calculado deve ser inferior ao valor de Q tabelado em função do número de replicatas e o nível de significância escolhido. Caso isso não ocorra o valor é considerado aberrante.

Através do teste de Dixon foram detectados quatro valores aberrantes ($Q_{\text{tabelado}} = 0,628$, para um nível de significância de 5% e $n = 6$) sendo que apenas um desses valores não foi detectado pelo teste de Grubbs. Este valor foi também rejeitado. Assim, o teste de Grubbs foi mais restritivo como critério de rejeição dos valores verificados no estudo, quando comparado ao teste de Dixon. Cabe registrar que o teste de Grubbs tem sido indicado em substituição ao tradicional teste de

Dixon, por aumentar a probabilidade de rejeição correta de um valor aberrante (HORWITZ, 1988; KELLY, 1990).

Como critério para escolha do método dos mínimos quadrados a ser utilizado (ordinal ou ponderado) é necessário avaliar as variâncias dos resíduos, ou seja, diferenças entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo ao longo da curva analítica. As variâncias dos resíduos são homogêneas quando os erros nas medidas são constantes nos diversos pontos da curva analítica e heterogêneas quando estes variam. No primeiro caso, o critério de mínimos quadrados ordinais pode ser aplicado; no segundo, o critério de mínimos quadrados ponderados, ou seja, as diferentes variâncias nos pontos da curva analítica são levadas em conta usando-se ponderação (BARROS NETO *et al.*, 2002; PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

A verificação das variâncias dos resíduos e conseqüente escolha do melhor modelo a ser utilizado na construção das curvas analíticas foi realizada através do teste de Cochran. Baseia-se na comparação da variância máxima com todas as variâncias dos grupos de valores, aplicando-se a equação 3.0.

$$C = \frac{s_{y_i}^2 \max}{\sum s_{y_i}^2} \quad (\text{Eq. 3.0})$$

onde, $s_{y_i}^2 \max$ = maior variância; $\sum s_{y_i}^2$ = somatório das variâncias. Na avaliação dos resultados, se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}}$, não há diferença significativa nas variâncias dos resíduos (homocedasticidade); se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$, há diferenças significativas nas variâncias dos resíduos (heterocedasticidade).

Para aplicação do teste de Cochran é necessário que haja o mesmo número de valores em cada nível de concentração da curva analítica. Como alguns valores foram rejeitados por serem considerados aberrantes, o teste não poderia ser aplicado para as seis replicatas (n=6). No entanto, realizou-se a média das injeções em duplicatas, obtendo-se, assim, três valores para cada nível de concentração da curva analítica. Nos casos em que um dos valores das duplicatas havia sido rejeitado, o outro valor foi utilizado. Assim, aplicou-se o teste para seis níveis de concentração (comparações) e três repetições, considerando um nível de significância de 5%. Os resultados obtidos para o teste de Cochran ($C_{\text{calculado}}$) para as 10 substâncias de interesse estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores obtidos pelo teste de Cochran ($C_{\text{calculado}}$) para as 10 substâncias investigadas.

| <i>Substâncias</i> | <i>C calculado</i> |
|--------------------|--------------------|
| 2,4,6-TCF | 0,609 |
| 2,3,6-TCF | 0,609 |
| 2,3,5-TCF | 0,423 |
| 2,4,5-TCF | 0,611 |
| 2,3,4-TCF | 0,564 |
| 3,4,5-TCF | 0,774 |
| 2,3,5,6-TeCF | 0,347 |
| 2,3,4,6-TeCF | 0,451 |
| 2,3,4,5-TeCF | 0,386 |
| PCF | 0,604 |

Pelos resultados verifica-se que para nove substâncias de interesse foram obtidos valores de $C_{\text{calculado}}$ menores que o valor de C_{tabelado} (0,616), para três repetições autênticas e nível de significância de 5%. Este fato revela que as variâncias dos resíduos são homogêneas (homocedasticidade) e, portanto, as equações da reta para essas substâncias foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

No entanto, uma substância investigada (3,4,5-TCF) apresentou variâncias dos resíduos heterogêneas (heterocedasticidade), já que o valor de $C_{\text{calculado}}$ excedeu o valor de C_{tabelado} . Nesse caso, o método dos mínimos quadrados ordinários não deve ser empregado, pois as estimativas dos parâmetros não mais terão variância mínima.

De acordo com PIMENTEL & BARROS NETO (1996), nessa perspectiva, três procedimentos podem ser adotados: restringir a faixa de concentração da curva analítica até que a variância seja constante; realizar uma transformação estabilizadora da variância e então aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários; usar o método dos mínimos quadrados ponderados. Este último pode ser utilizado como alternativa na construção da curva analítica para o 3,4,5-TCF, já que o programa utilizado para operacionalizar o CG-DSM, o qual é utilizado em análises de rotina, possui essa ferramenta. Ainda, há disponibilidade de um aplicativo do

Microsoft Excel[®] (Calwer 2.2) com a opção de análise por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados. No entanto, nesse estudo retirou-se o ponto da curva analítica com maior variância. O teste de Cochran foi então aplicado à nova série de valores, a qual apresentou variâncias homogêneas, ou seja, o valor de $C_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor de C_{tabelado} . Assim, a curva analítica para a substância em questão também foi construída pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

A Figura 8 apresenta as curvas analíticas das substâncias investigadas, construídas através da análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários, bem como as equações das retas e respectivos coeficientes de correlação (r).

Figura 8: Curvas analíticas e coeficientes de correlação das substâncias de interesse

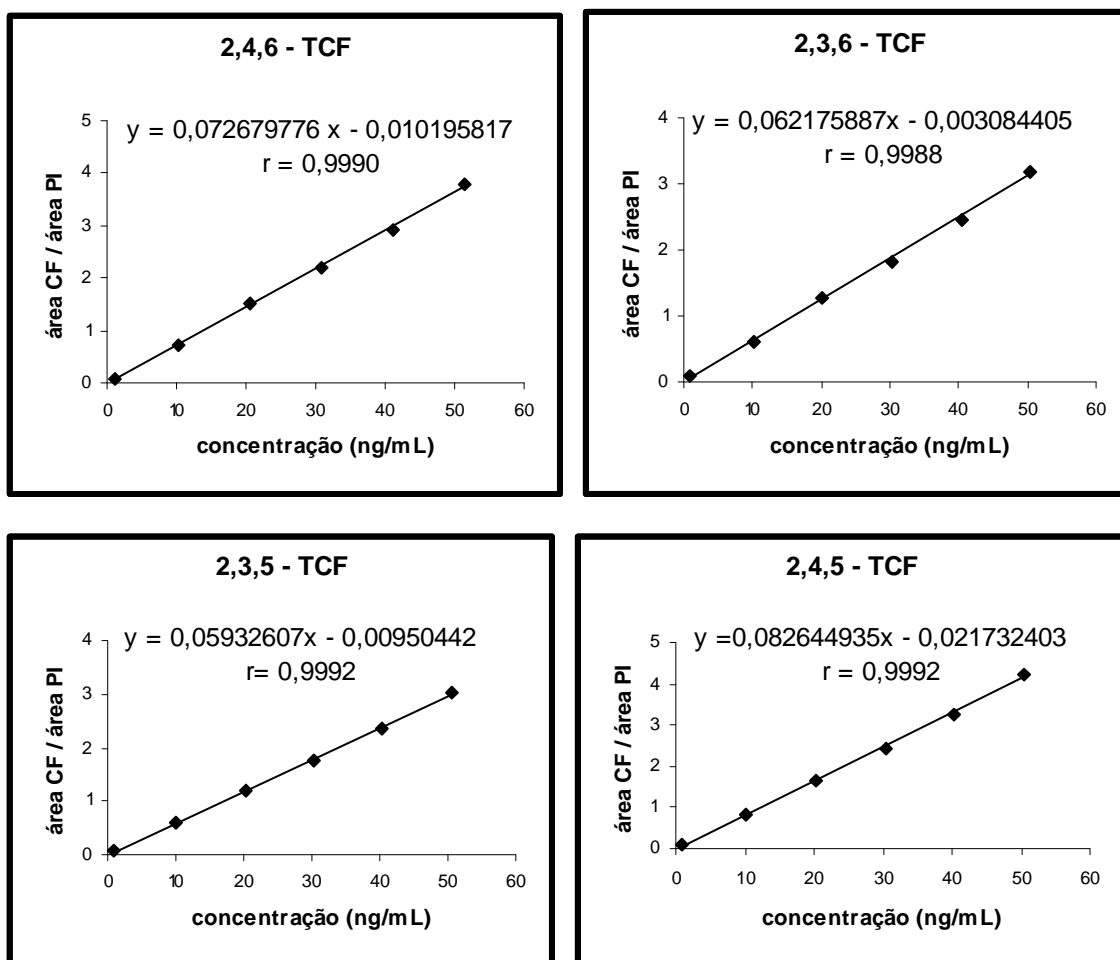
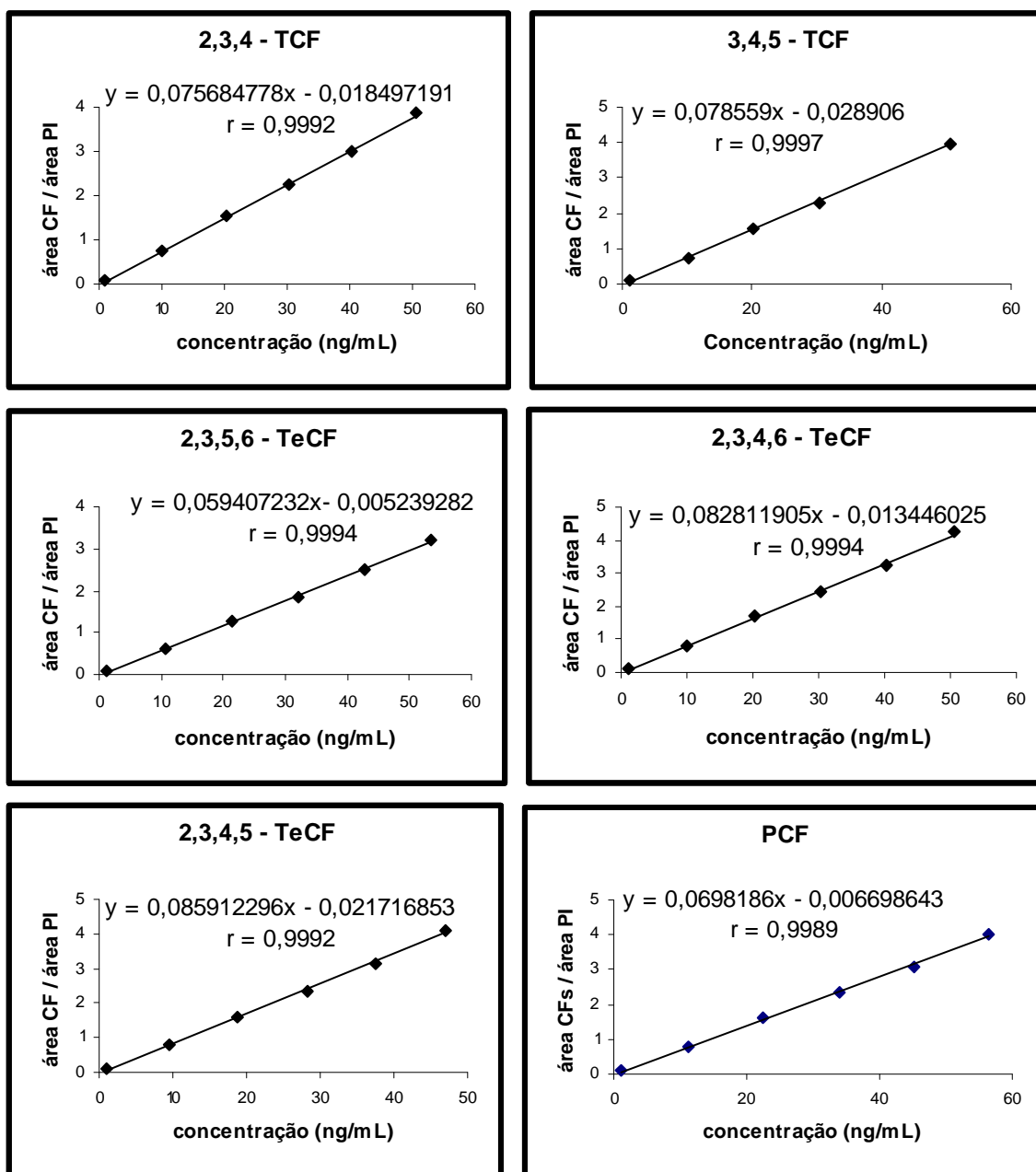


Figura 8 (cont.): Distribuição dos resíduos obtidos na análise de variância da regressão



Cabe notar que foram encontrados valores de (r) sempre superiores a 0,99. A ANVISA reporta o valor do coeficiente de correlação como sendo maior ou igual a 0,99 e o INMETRO valores maiores que 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003). Valores de correlação altos, assim como os reportados pela ANVISA e INMETRO, e os encontrados nesse estudo são por vezes erroneamente utilizados para avaliar o ajuste obtido pelo modelo. O (r) expressa a correlação entre os valores observados e os estimados pelo modelo. De acordo com BARROS NETO *et al.* (2002), o (r) só faz sentido para a relação de variáveis aleatórias não tendo,

portanto, nenhum significado neste tipo de calibração, já que os valores de concentração (x) em um experimento de calibração não são grandezas aleatórias.

Após rejeição dos valores aberrantes e aplicação do teste de Cochran para verificar as variâncias, os resíduos foram analisados visualmente através da construção de gráficos. Pode-se avaliar se o modelo linear é adequado verificando a distribuição dos resíduos nos vários níveis na curva analítica (BARROS NETO *et al.*, 2002). Os gráficos de resíduos das substâncias de interesse estão mostrados na Figura 9.

Figura 9: Distribuição dos resíduos obtidos na análise de variância da regressão

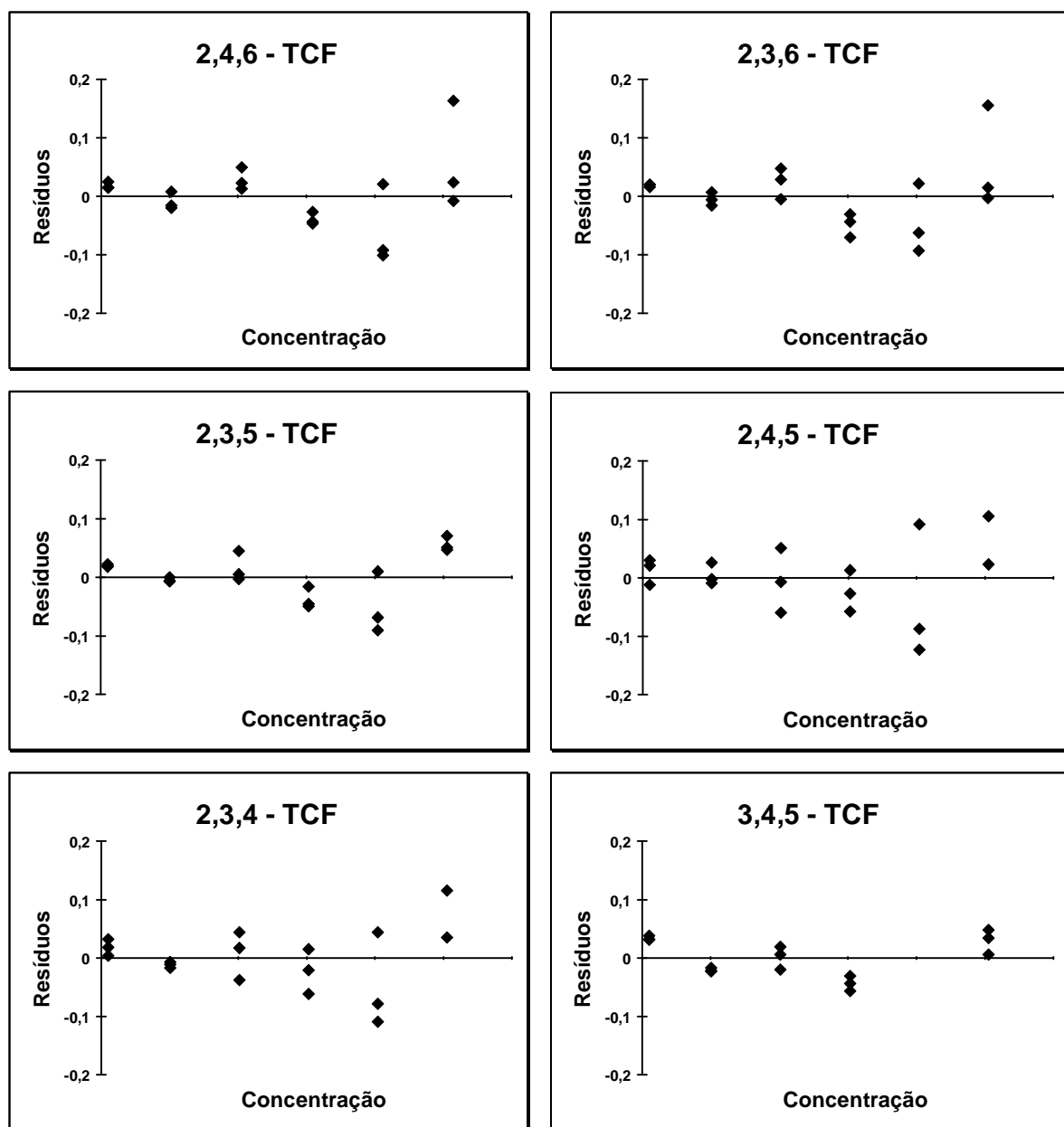
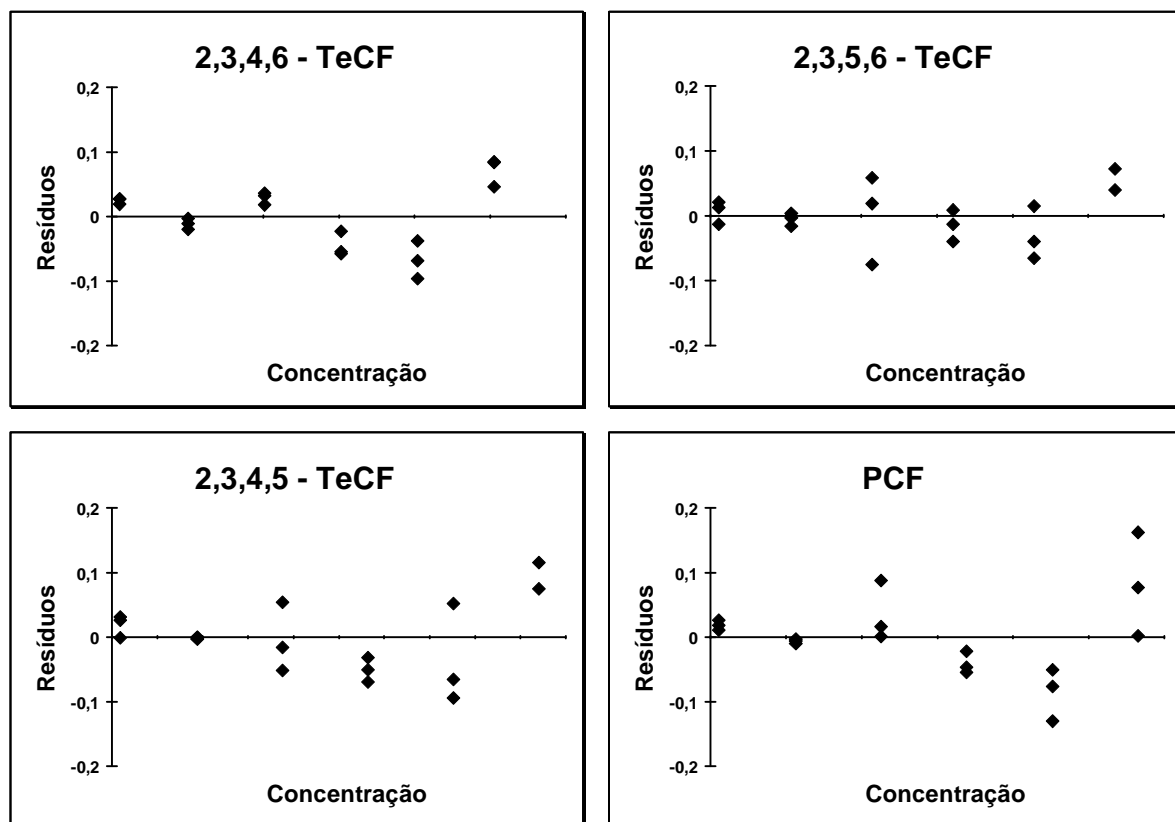


Figura 9 (cont.): Distribuição dos resíduos obtidos na análise de variância da regressão



Os gráficos foram avaliados verificando-se distribuição dos resíduos ao longo da curva analítica. Verificou-se que os erros distribuem-se aleatoriamente em torno da linha zero, ou seja, os erros não apresentam desvios sistemáticos indicando que o modelo linear é adequado.

Na avaliação correta de um modelo e a conclusão que o ajuste da reta é satisfatório deve-se usar o teste F (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996). Para isso, utilizou-se análise de variância na regressão por ANOVA com um nível de significância de 5%. O ajuste do modelo é considerado satisfatório, ou seja, a regressão linear é aceita, se o valor do F de significância for menor que o F calculado. Na Tabela 6 estão demonstrados os valores de F obtidos através da análise de variância na regressão (ANOVA), onde se verifica que para todas as 10 substâncias de interesse o valor de F de significância é menor que o valor de F calculado. Desta forma, a regressão linear para todas as substâncias de interesse foi confirmada e aceita.

Tabela 6: Análise de variância na regressão (ANOVA) para confirmação da regressão linear das substâncias avaliadas.

| Substâncias | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{significação}}$ |
|--------------------|--|---|
| 2,4,6 – TCF | 8172,54 | 4,17621E-23 |
| 2,3,6 – TCF | 6479,84 | 2,66348E-22 |
| 2,3,5 – TCF | 6621,13 | 2,24225E-22 |
| 2,4,5 – TCF | 10176,11 | 7,24853E-24 |
| 2,3,4 – TCF | 10605,57 | 5,21004E-24 |
| 3,4,5 – TCF | 13332,57 | 8,37168E-25 |
| 2,3,5,6- TeCF | 12917,25 | 1,07804E-24 |
| 2,3,4,6- TeCF | 13077,09 | 9,7714E-25 |
| 2,3,4,5-TeCF | 10284,95 | 6,65795E-24 |
| PCF | 14489,21 | 4,30605E-25 |

V.1.4 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da dispersão dos resultados de ensaios independentes, obtidos em uma série de medidas repetidas de uma mesma amostra (ANVISA, 2003), amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003). Normalmente é estimada em estudos de repetibilidade, utilizando ensaios de recuperação. A repetibilidade, também chamada de repetitividade, é o grau de concordância entre os resultados de medições, sob as chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento sob as mesmas condições; mesmo local; e repetições dentro de um curto período de tempo (INMETRO, 2003).

Pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. De acordo com a ANVISA (2003), pode-se verificá-la por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste. O INMETRO (2003) sugere que sejam realizadas sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração e que seja calculado o limite de repetibilidade (r), utilizado como

critério para determinar o nível de significância entre análises duplicatas de uma amostra.

A repetibilidade dos dois métodos (10 e 200 mL de água) foi determinada através de ensaios de recuperação, mediante a fortificação com os analitos em água ultra-pura, em concentrações próximas ao limite de detecção, à concentração máxima permissível e à média da faixa de trabalho. Para o primeiro método, os padrões foram adicionados em 10 mL de água, em cinco níveis de concentração finais: 3; 6; 9; 12; 15 ng/mL. O método analítico foi então aplicado em triplicata para cada nível de concentração. Para o segundo método, os padrões foram adicionados em 200 mL de água ultra-pura, em quatro níveis de concentração finais: 0,005; 0,05; 0,15 e 0,25 ng/mL. Para cada nível de concentração foram efetuadas no mínimo três repetições.

A repetibilidade foi estimada pelo desvio padrão relativo (% DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV %), o qual expressa a dispersão dos resultados entre todas as replicatas em cada nível de concentração estudado. Com esse intuito a equação abaixo foi aplicada, onde s = desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado e \bar{y} = média dos resultados obtidos.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{y}} 100 \quad (\text{Eq. 4.0})$$

O cálculo da repetibilidade foi realizado individualmente para cada nível de concentração. As faixas dos CV (%), nos vários níveis de concentração estudados, estão demonstradas na Tabela 7.

Tabela 7: Coeficientes de Variação (CV) para todas as substâncias investigadas pelos dois métodos (10 e 200 mL de amostra)

| Substâncias | CV % (10 mL de amostra) | CV % (200 mL de amostra) |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 2,4,6 - TCF | 0,8 – 3,4 | 3,6 – 14,6 |
| 2,3,6 - TCF | 0,9 – 3,1 | 3,8 – 13,2 |
| 2,3,5 - TCF | 1,0 – 3,2 | 2,1 – 11,0 |
| 2,4,5 - TCF | 0,6 – 2,7 | 1,8 – 11,5 |
| 2,3,4 - TCF | 1,2 – 2,5 | 2,1 – 9,8 |
| 3,4,5 - TCF | 1,0 – 3,0 | 3,4 – 8,1 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 0,7 – 2,6 | 2,3 – 7,2 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,4 – 2,7 | 3,9 – 6,9 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 0,7 – 2,2 | 4,8 – 8,6 |
| PCF | 1,0 – 2,0 | 3,8– 6,4 |

A avaliação do CV deve considerar o nível de concentração estudado no ensaio de recuperação. Quanto menor a concentração maior o valor do CV aceito. Em métodos de análise de traços ou impurezas, normalmente são aceitos valores de até 20 % (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003). Para melhorar a precisão de um método, pode-se aumentar o número de replicatas utilizadas nos testes. Assim, os erros aleatórios tenderão a se cancelar no cálculo da média (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996). Esse artifício não precisou ser utilizado, já que, como demonstrado na tabela acima, ambos os métodos apresentam precisão adequada, com CV% sempre inferiores a 15%.

V.1.4.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Como a precisão dos métodos foi determinada através de testes de recuperação utilizando água ultra-pura, verificou-se a necessidade de proceder a validação do método em água para consumo humano, matriz a ser analisada. Com essa finalidade, a variabilidade dos valores da distribuição em torno das medidas centrais deve ser conhecida, através da aplicação do método analítico em água ultra

pura e na água tratada. Normalmente, tem-se utilizado a variância como medida de precisão de métodos analíticos (SKOOG *et al.*, 1996). Para comparação das variâncias, ou seja, das precisões de métodos analíticos, pode-se recorrer ao teste de *Snedecor* (teste *F*). Fundamenta-se no cálculo da razão entre as variâncias (*s*) dos dois métodos, de acordo com a equação 5.0, onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada amostra, com a maior variância sempre no numerador.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Eq. 5.0})$$

O valor obtido é então comparado ao *F* tabelado. Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões (EURACHEM/CITAC, 2002; ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Em todos os procedimentos de validação onde se utilizou água para consumo humano, foi adicionado tiosulfato de sódio (500 mg/L) à matriz para evitar a oxidação das substâncias investigadas.

V.1.4.1.1 INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 10 ML DE ÁGUA

Para avaliação da influência da matriz na precisão do método analítico foram preparados dois grupos de amostras, um com a matriz (água para consumo humano) e o outro sem (água ultra-pura). As amostras testes foram fortificadas com os clorofenóis no mesmo nível de concentração e sendo este um ponto intermediário da faixa de trabalho. No total foram preparadas e analisadas, através da aplicação do método analítico, seis amostras para cada grupo. O teste de *Snedecor* foi então aplicado para comparação das variâncias das respostas obtidas em cada grupo, em um nível de significância de 5%. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Comparação das variâncias obtidas na aplicação do método analítico a 10 mL de água ultra-pura e água de abastecimento.

| Substâncias | Variâncias das recuperações | | Teste de Snedecor | |
|--------------------|---|---|--------------------------|-------------------|
| | 10 mL de água ultra-pura (n=6) | 10 mL de água de abastecimento (n=6) | F calculado | F tabelado |
| 2,4,6 - TCF | 0,005926 | 0,00372 | 1,59 | 5,05 |
| 2,3,6 - TCF | 0,00326 | 0,004331 | 1,33 | 5,05 |
| 2,3,5 - TCF | 0,003161 | 0,001865 | 1,70 | 5,05 |
| 2,4,5 - TCF | 0,005209 | 0,002414 | 2,16 | 5,05 |
| 2,3,4 - TCF | 0,003628 | 0,001635 | 2,22 | 5,05 |
| 3,4,5 - TCF | 0,004104 | 0,001306 | 3,14 | 5,05 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 0,014938 | 0,003047 | 4,90 | 5,05 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,003495 | 0,014577 | 4,17 | 5,05 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 0,001007 | 0,004625 | 4,59 | 5,05 |
| PCF | 0,002067 | 0,008071 | 3,90 | 5,05 |

Como $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ para todas as substâncias investigadas, a matriz não influencia significativamente na precisão do método analítico.

V.1.4.1.2 INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 200 ML DE ÁGUA

A avaliação da influência da matriz na precisão do método analítico foi verificada como descrito no item anterior, à exceção do volume de água utilizado (200mL) e do número de replicatas (4) para cada grupo. Os resultados obtidos para o teste de *Snedecor*, para um nível de significância de 5%, estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9: Avaliação da influência da matriz na precisão do método

| <i>Substâncias</i> | <i>Variâncias das medidas</i> | | <i>Teste de Snedecor</i> | |
|--------------------|----------------------------------|--|--------------------------|-------------------|
| | <i>200 mL de água ultra-pura</i> | <i>200 mL de água de abastecimento</i> | <i>F calculado</i> | <i>F tabelado</i> |
| 2,4,6 - TCF | 0,077975 | 0,026159 | 2,98 | 9,28 |
| 2,3,6 - TCF | 0,046434 | 0,016506 | 2,81 | 9,28 |
| 2,3,5 - TCF | 0,033608 | 0,01361 | 2,47 | 9,28 |
| 2,4,5 - TCF | 0,065827 | 0,028713 | 2,29 | 9,28 |
| 2,3,4 - TCF | 0,043829 | 0,018097 | 2,42 | 9,28 |
| 3,4,5 - TCF | 0,003264 | 0,020654 | 1,58 | 9,28 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 0,017138 | 0,009637 | 1,78 | 9,28 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,026678 | 0,014831 | 1,80 | 9,28 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 0,004102 | 0,004915 | 1,20 | 9,28 |
| PCF | 0,003334 | 0,000869 | 3,84 | 9,28 |

Como $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ para todas as substâncias investigadas, a matriz não influencia significativamente na precisão do método analítico.

V.1.4.2 COMPARAÇÃO DA PRECISÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS (10 E 200 ML DE AMOSTRA)

É prática comum em laboratórios analíticos se analisar a precisão entre dois métodos, em um nível de significância requerido. Ou seja, se os métodos apresentam diferenças significativas entre si quanto às suas precisões. Para essa avaliação também se pode recorrer ao teste F , como descrito anteriormente (EURACHEM/CITAC, 2002; ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A repetibilidade dos dois métodos (10 e 200 mL de água) foi determinada mediante a fortificação com os analitos em água de abastecimento em um nível de concentração intermediário da faixa de trabalho. Para o primeiro método, os padrões foram adicionados em 10 mL de água de abastecimento e o método analítico foi então aplicado em 6 replicatas genuínas. Para o segundo método, os padrões foram adicionados em 200 mL de água de abastecimento e o método analítico foi então aplicado em 4 replicatas genuínas. O método de adição padrão demonstrou ser adequado não sendo encontradas substâncias interferentes no branco da amostra, o qual foi realizado em triplicatas para os dois métodos.

As variâncias dos dois métodos foram então comparadas através do teste F , admitindo-se um nível de significância de 5%. Os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10: Avaliação da precisão entre os dois métodos analíticos (10 e 200 mL de amostra)

| <i>Substâncias</i> | <i>Variâncias das medidas (S)</i> | | <i>Teste de Snedecor</i> | |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|
| | <i>10 mL de</i> | <i>200 mL de</i> | <i>F calculado</i> | <i>F tabelado</i> |
| | <i>água de</i> | <i>água de</i> | | |
| | <i>abastecimento</i> | <i>abastecimento</i> | | |
| 2,4,6 - TCF | 0,00372 | 0,026159 | 7,03 | 5,41 |
| 2,3,6 - TCF | 0,004331 | 0,016506 | 2,66 | 5,41 |
| 2,3,5 - TCF | 0,001865 | 0,01361 | 5,59 | 5,41 |
| 2,4,5 - TCF | 0,002414 | 0,028713 | 8,60 | 5,41 |
| 2,3,4 - TCF | 0,001635 | 0,018097 | 8,20 | 5,41 |
| 3,4,5 - TCF | 0,001306 | 0,020654 | 12,84 | 5,41 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 0,003047 | 0,009637 | 2,350 | 9,01 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,014577 | 0,014831 | 1,676 | 9,01 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 0,004625 | 0,004915 | 3,213 | 9,01 |
| PCF | 0,008071 | 0,000869 | 9,29 | 5,41 |

Através dos resultados demonstrados na tabela acima pode-se verificar que há diferença significativa quanto à precisão dos métodos avaliados para seis substâncias investigadas, já que os valores de $F_{\text{calculado}}$ são maiores que o valor de F_{tabelado} . Este fato pode ser decisivo na escolha da metodologia a ser utilizada, o que dependerá dos objetivos do estudo. No entanto, as duas metodologias possuem precisão adequada, dentro dos critérios de validação adotados.

V.1.5 LIMITE DE REPETIBILIDADE

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios realizados sob condição de repetibilidade é aconselhável calcular o limite de repetibilidade (r) utilizado como critério de decisão para verificar se a diferença entre análises em duplicata de uma amostra é significativa. Para um nível de significância de 5%, o r é avaliado pela equação 6.0, onde Sr é o desvio-padrão de repetibilidade associado aos resultados considerados (INMETRO, 2003; LANÇAS, 2004):

$$r = 2,8 Sr \quad (\text{Eq. 6.0})$$

O limite de repetibilidade dos dois métodos (10 e 200 mL de água) foi determinado mediante a fortificação com os analitos em água ultra-pura em um nível de concentração intermediário da faixa de trabalho. Para o primeiro método, os padrões foram adicionados em 10 mL de água e o método analítico foi então aplicado em 6 replicatas genuínas. Para o segundo método, os padrões foram adicionados em 200 mL de água e o método analítico foi então aplicado em 4 replicatas genuínas. Os resultados encontrados para o " r ", onde o S_r foi determinado utilizando o valor da razão da área da substância investigada e a área do padrão interno para cada substância investigada, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Limite de repetibilidade (r) para as substâncias investigadas

| Substâncias | (r) | (r) |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| | 10 mL de amostra | 200 mL de amostra |
| 2,4,6 - TCF | 0,22 | 0,78 |
| 2,3,6 - TCF | 0,16 | 0,60 |
| 2,3,5 - TCF | 0,16 | 0,51 |
| 2,4,5 - TCF | 0,20 | 0,72 |
| 2,3,4 - TCF | 0,17 | 0,59 |
| 3,4,5 - TCF | 0,18 | 0,51 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 0,15 | 0,37 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,17 | 0,46 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 0,08 | 0,18 |
| PCF | 0,04 | 0,16 |

Se o S_r para as amostras analisadas em duplicata for menor ou igual ao limite de repetibilidade determinado e demonstrado na tabela acima, pode-se dizer que não há diferença significativa entre as análises realizadas, para um nível de significância de 5%.

Em todas as amostras analisadas o valor de S_r encontrado foi menor que o valor de r determinado. Assim, considerou-se que não houve diferença significativa entre as duplicatas e os valores foram aceitos.

V.1.5.1 EXATIDÃO

Exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003), sendo expresso em termos de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (SKOOG *et al.*, 1996). Assim, a exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos/ensaios interlaboratoriais; realização de ensaios de recuperação e adição padrão (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão dos dois métodos foi determinada por meio de ensaios de recuperação. A recuperação consiste na relação percentual entre a concentração da substância determinada mediante aplicação do procedimento analítico e a concentração aceita como verdadeira (BRITO *et al.*, 2003). Para tanto, seguiu-se exatamente o mesmo procedimento de fortificação das amostras utilizado nos testes de repetibilidade. Para determinação da recuperação dos analitos foi empregada a equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} 100 \quad (\text{Eq. 7.0})$$

Na tabela 12 estão demonstrados os valores de recuperação das substâncias de interesse em cada nível de fortificação realizado, bem como os respectivos valores dos CV %, para os dois métodos.

Tabela 12: Ensaios de recuperação para as substâncias de interesse

| <i>Substâncias</i> | <i>Volume de amostra</i> | <i>ng/mL</i> | <i>n</i> | <i>Recuperação (%)</i> | <i>Coefficiente de Variação (CV %)</i> |
|---------------------------|--------------------------|--------------|----------|------------------------|--|
| | | 0,005 | 3 | 79,8 | 5,8 |
| | | 0,05 | 4 | 81,3 | 3,6 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 87,0 | 14,6 |
| | | 0,25 | 4 | 74,9 | 6,6 |
| <u>2,4,6 - TCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 99,5 | 0,8 |
| | | 6 | 3 | 98,7 | 2,1 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 101,9 | 3,4 |
| | | 12 | 3 | 99,7 | 2,3 |
| | | 15 | 3 | 98,3 | 1,5 |
| | | 0,005 | 3 | 76,3 | 4,1 |
| | | 0,05 | 4 | 82,1 | 3,8 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 89,0 | 13,2 |
| | | 0,25 | 4 | 77,4 | 4,3 |
| <u>2,3,6 - TCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 100,6 | 2,0 |
| | | 6 | 3 | 100,1 | 2,0 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 103,3 | 3,1 |
| | | 12 | 3 | 100,4 | 2,1 |
| | | 15 | 3 | 98,9 | 0,9 |
| <u>2,3,5 - TCF</u> | | | | | |
| | | 0,005 | 3 | 80,0 | 5,08 |
| | | 0,05 | 4 | 83,6 | 2,07 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 90,9 | 11,5 |
| | | 0,25 | 4 | 80,4 | 3,4 |
| | 10 mL | 3 | 3 | 98,4 | 1,0 |
| | | 6 | 3 | 98,6 | 1,2 |
| | | 9 | 3 | 98,9 | 3,2 |

| <i>Substâncias</i> | <i>Volume de amostra</i> | <i>ng/mL</i> | <i>n</i> | <i>Recuperação (%)</i> | <i>Coefficiente de Variação (CV %)</i> |
|---------------------------|--------------------------|--------------|----------|------------------------|--|
| | | 12 | 3 | 98,4 | 2,3 |
| | | 15 | 3 | 96,4 | 1,1 |
| | 200 mL | 0,005 | 3 | 81,2 | 4,7 |
| | | 0,05 | 4 | 84,1 | 1,8 |
| | | 0,15 | 4 | 91,4 | 11,5 |
| | | 0,25 | 4 | 80,7 | 3,5 |
| <u>2,4,5 - TCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 98,4 | 1,6 |
| | | 6 | 3 | 99,2 | 2,1 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 99,2 | 2,7 |
| | | 12 | 3 | 98,4 | 2,1 |
| | | 15 | 3 | 97,1 | 0,6 |
| | 200 mL | 0,005 | 3 | 83,6 | 5,8 |
| | | 0,05 | 4 | 87,5 | 2,5 |
| | | 0,15 | 4 | 95,5 | 9,8 |
| | | 0,25 | 4 | 85,8 | 2,1 |
| <u>2,3,4 - TCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 99,8 | 2,1 |
| | | 6 | 3 | 98,3 | 1,5 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 101,1 | 2,5 |
| | | 12 | 3 | 100,1 | 1,9 |
| | | 15 | 3 | 98,6 | 1,2 |
| <u>3,4,5 - TCF</u> | | | | | |
| | | 0,005 | 3 | 83,0 | 3,7 |
| | | 0,05 | 4 | 90,8 | 3,4 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 96,6 | 8,1 |
| | | 0,25 | 4 | 86,6 | 4,1 |
| | 10 mL | 3 | 3 | 99,6 | 1,4 |
| | | 6 | 3 | 97,6 | 1,4 |
| | | 9 | 3 | 98,9 | 3,0 |

| <i>Substâncias</i> | <i>Volume de amostra</i> | <i>ng/mL</i> | <i>n</i> | <i>Recuperação (%)</i> | <i>Coefficiente de Variação (CV %)</i> |
|-----------------------------|--------------------------|--------------|----------|------------------------|--|
| | | 12 | 3 | 98,8 | 1,7 |
| | | 15 | 3 | 97,2 | 1,0 |
| | | 0,005 | 3 | 92,3 | 7,2 |
| | | 0,05 | 4 | 87,4 | 4,2 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 93,7 | 7,5 |
| | | 0,25 | 4 | 89,2 | 2,3 |
| <u>2,3,5,6- TeCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 97,8 | 1,7 |
| | | 6 | 3 | 95,5 | 1,7 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 98,8 | 2,7 |
| | | 12 | 3 | 97,2 | 2,3 |
| | | 15 | 3 | 96,3 | 0,4 |
| | | 0,005 | 3 | 96,9 | 3,9 |
| | | 0,05 | 4 | 92,6 | 6,5 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 96,7 | 6,9 |
| | | 0,25 | 4 | 86,2 | 4,7 |
| <u>2,3,4,6- TeCF</u> | | | | | |
| | | 3 | 3 | 98,8 | 1,7 |
| | | 6 | 3 | 95,5 | 1,8 |
| | 10 mL | 9 | 3 | 98,8 | 2,7 |
| | | 12 | 3 | 97,2 | 2,4 |
| | | 15 | 3 | 96,3 | 0,4 |
| <u>2,3,4,5- TeCF</u> | | | | | |
| | | 0,005 | 3 | 90,3 | 4,9 |
| | | 0,05 | 4 | 91,8 | 8,6 |
| | 200 mL | 0,15 | 4 | 102,9 | 5,1 |
| | | 0,25 | 4 | 93,8 | 5,9 |
| | 10 mL | 3 | 3 | 98,1 | 2,2 |
| | | 6 | 3 | 97,4 | 1,1 |
| | | 9 | 3 | 97,7 | 0,7 |

| Substâncias | Volume de amostra | ng/mL | n | Recuperação (%) | Coefficiente de Variação (CV %) |
|--------------------|--------------------------|--------------|----------|------------------------|--|
| | | 12 | 3 | 96,3 | 2,1 |
| | | 15 | 3 | 94,9 | 1,1 |
| | 200 mL | 0,005 | 3 | 86,2 | 6,4 |
| | | 0,05 | 4 | 89,3 | 6,0 |
| | | 0,15 | 4 | 100,4 | 3,8 |
| | | 0,25 | 4 | 92,9 | 6,0 |
| <u>PCF</u> | | | 3 | 3 | 100,5 |
| | 10 mL | 6 | 3 | 97,6 | 1,0 |
| | | 9 | 3 | 97,7 | 1,0 |
| | | 12 | 3 | 98,4 | 2,0 |
| | | 15 | 3 | 96,9 | 1,2 |

O *Codex Alimentarius* estabelece o intervalo de recuperação de agrotóxicos em alimentos em função da faixa de concentração dos analitos. Foram aceitos os valores de recuperação compreendidos entre o valor mínimo de 70% e máximo de 120 %, como exatidão adequada.

Através dos resultados apresentados na tabela acima verifica-se que todas as substâncias apresentaram recuperação compreendida entre a faixa estipulada, em todos os níveis de concentração estudados e nos métodos utilizando 10 e 200 mL de amostra.

V.1.5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Como a exatidão dos métodos foi determinada através de testes de recuperação utilizando água ultra-pura, verificou-se a necessidade de proceder a validação do método em água de abastecimento, matriz a ser analisada. Para isso, pode-se recorrer ao teste t (Student) para comparação de médias, com um determinado nível de significância estatística (INMETRO, 2003). No entanto, como critério para seleção do teste t adequado, anteriormente torna-se necessário verificar as variâncias dos grupos através do teste *F*, onde:

a) se o teste *F* não é significativo, isto é, se *F* calculado for menor que o *F* tabelado, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método. Neste

caso, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testado com a distribuição t de Student. Neste caso, aplica-se as equações 8.0 e 8.1, onde \bar{x}_1 e \bar{x}_2 = médias das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz” na mesma faixa de concentração; s_1 e s_2 = desvios-padrão das respostas dos analitos dos dois grupos de amostras.

$$t = \frac{\left| \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \right|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{Eq 8.0})$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (\text{Eq.8.1})$$

O valor de t tabelado é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e um nível de significância desejado, normalmente 5 %.

b) Se o teste F é significativo, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método. Assim, as variâncias podem ser consideradas desiguais e o t calculado é determinado pela equação 9.0.

$$t = \frac{\left| \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \right|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)}} \quad (\text{Eq. 9.0})$$

Neste caso, para obtenção do t tabelado, o número de graus de liberdade é determinado pela equação 9.1:

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (\text{Eq. 9.1})$$

Para os dois casos (condição “a” e “b”), se $t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$, para a confiança estatística desejada considera-se que não há diferença significativa entre a exatidão dos dois métodos.

V.1.5.2.1 INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 10 ML DE ÁGUA

O teste F já foi aplicado no item V.1.4.1.1 para a mesma série de valores, obtendo resultado de $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ para todas as substâncias investigadas. Assim, o teste t foi calculado pela aplicação das equações (8.0 e 8.1). Os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13: Avaliação da influência da matriz na exatidão do método analítico com 10 mL de amostra

| <i>Substâncias</i> | <i>Média dos grupos</i> | | <i>Teste t (Student)</i> | |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| | <i>10 mL de água</i> | <i>10 mL de água de abastecimento</i> | <i>t calculado</i> | <i>t tabelado</i> |
| | <i>ultra-pura (n=6)</i> | <i>(n=6)</i> | | |
| 2,4,6 - TCF | 2,24 | 1,92 | 0,976 | 2,306 |
| 2,3,6 - TCF | 1,89 | 1,61 | 0,886 | 2,306 |
| 2,3,5 - TCF | 1,73 | 1,55 | 0,777 | 2,306 |
| 2,4,5 - TCF | 2,42 | 2,23 | 1,029 | 2,306 |
| 2,3,4 - TCF | 2,26 | 2,11 | 0,906 | 2,306 |
| 3,4,5 - TCF | 2,28 | 2,17 | 0,897 | 2,306 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 1,85 | 1,70 | 1,159 | 2,306 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 2,42 | 2,35 | 1,507 | 2,306 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 2,29 | 2,28 | 1,240 | 2,306 |
| PCF | 1,46 | 1,35 | 0,898 | 2,306 |

Note que o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor que t_{tabelado} para todas as substâncias investigadas, demonstrando que a matriz não apresenta efeito significativo na exatidão do método, em um nível de significância de 5%

V.1.5.2.2 INFLUÊNCIA DA MATRIZ NA EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COM 200 ML DE ÁGUA

O teste F já foi aplicado no item V.1.4.1.2 para a mesma série de valores, obtendo resultado de $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ para todas as substâncias de interesse. Assim, o teste t foi calculado pela aplicação das equações 8.0 e 8.1. Os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14: Avaliação da influência da matriz na exatidão do método analítico com 200 mL de amostra

| Substâncias | Média dos grupos (área CFs / área PI) | | Teste t (Student) | |
|--------------------|--|--|--------------------------|-------------------|
| | 200 mL de água ultra-pura (n=4) | 200 mL de água de abastecimento (n=4) | t calculado | t tabelado |
| | 2,4,6 - TCF | 1,91 | 1,82 | 1,359 |
| 2,3,6 - TCF | 1,63 | 1,52 | 1,117 | 2,776 |
| 2,3,5 - TCF | 1,59 | 1,49 | 1,078 | 2,776 |
| 2,4,5 - TCF | 2,23 | 2,11 | 1,54 | 2,776 |
| 2,3,4 - TCF | 2,13 | 2,01 | 1,405 | 2,776 |
| 3,4,5 - TCF | 2,23 | 2,11 | 1,469 | 2,776 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 1,74 | 1,73 | 1,188 | 2,776 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 2,39 | 2,33 | 1,564 | 2,776 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 2,46 | 2,46 | 1,354 | 2,776 |
| PCF | 1,49 | 1,52 | 0,767 | 2,776 |

Verifica-se que o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor que t_{tabelado} para todas as substâncias investigadas, demonstrando que a matriz não apresenta efeito significativo na exatidão do método.

V.1.5.2.3 COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS (10 E 200 mL DE AMOSTRA)

O teste F já foi aplicado anteriormente para a série de valores avaliada, obtendo resultado de $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ para as seguintes substâncias: 2,3,6 – TCF; 2,3,5,6 – TeCF; 2,3,4,6 – TeCF; 2,3,4,5 – TeCF; PCF. Assim, o teste t foi calculado pela aplicação das equações 8.0 e 8.1. Para as demais substâncias foram aplicadas as equações 9.0 e 9.1, já que foram observadas diferenças significativas entre as variâncias ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$). Os resultados encontrados para o teste t estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15: Avaliação da exatidão dos dois métodos (10 e 200 mL)

| Substâncias | Média dos grupos | | Teste t (Student) | |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| | 10 mL de água (n=6) | 200 mL de água (n=4) | t calculado | t tabelado |
| 2,4,6 - TCF | 1,92 | 1,82 | 1,151 | 2,776 |
| 2,3,6 - TCF | 1,61 | 1,54 | 1,111 | 2,306 |
| 2,3,5 - TCF | 1,55 | 1,51 | 0,836 | 2,776 |
| 2,4,5 - TCF | 2,23 | 2,13 | 1,272 | 3,182 |
| 2,3,4 - TCF | 2,11 | 2,03 | 1,269 | 2,776 |
| 3,4,5 - TCF | 2,17 | 2,13 | 0,643 | 2,776 |
| 2,3,5,6 - TeCF | 1,70 | 1,74 | 1,263 | 2,306 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 2,35 | 2,35 | 1,647 | 2,306 |
| 2,3,4,5 - TeCF | 2,28 | 2,47 | 1,311 | 2,306 |
| PCF | 1,35 | 1,53 | 4,644 | 2,571 |

Através dos resultados apresentados, verifica-se que o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor que t_{tabelado} para as substâncias investigadas, demonstrando que não há diferenças significativas quanto à exatidão dos métodos avaliados, à exceção do PCF. Assim, as metodologias poderiam ser utilizadas com o mesmo nível de exatidão nos resultados obtidos em análises de clorofenóis, à exceção do PCF.

V.1.6 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

V.1.6.1 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Pode ser calculado utilizando três procedimentos diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). O método relação sinal-ruído pode ser aplicado em processos analíticos que exibem linha de base. Assim, utilizou-se o método relação sinal-ruído, ferramenta oferecida pelo programa de operacionalização do equipamento (CG-DSM), para determinação dos LD das substâncias de interesse. A relação sinal-ruído foi realizada por comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas das substâncias de interesse na matriz e um branco (matriz isenta das substâncias de interesse) destas amostras. A relação sinal/ruído aceita como estimativa do limite de detecção foi 3:1; significa dizer que o sinal das respostas dos analitos investigados foi 3 vezes maior do que o sinal do ruído da linha base do cromatograma (RIBANI et al., 2004). Os LD para as substâncias investigadas estão demonstrados na tabela abaixo.

Tabela 16: Limites de Detecção (LD) dos clorofenóis em 10 e 200 mL de amostra

| <i>Substâncias</i> | <i>LD (ng/mL) (n= 6)</i> | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>10 mL de amostra</i> | <i>200 mL de amostra</i> |
| 2,4,6 - TCF | 0,145 | 0,002 |
| 2,3,6 - TCF | 0,104 | 0,002 |
| 2,3,5 - TCF | 0,128 | 0,002 |
| 2,4,5 - TCF | 0,112 | 0,002 |
| 2,3,4 - TCF | 0,123 | 0,002 |
| 3,4,5 – TCF | 0,149 | 0,002 |
| 2,3,5,6 – TeCF | 0,185 | 0,002 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,186 | 0,003 |
| 2,3,4,5 – TeCF | 0,184 | 0,003 |
| PCF | 0,254 | 0,004 |

V.1.6.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições de análise utilizadas. Para se calcular o LQ foi adotado o mesmo procedimento utilizado na determinação do LD. A relação sinal/ruído aceita como estimativa do limite de quantificação foi 10:1, o que significa dizer que o sinal das respostas dos analitos de interesse foi 10 vezes maior do que o sinal do ruído da linha base do cromatograma (RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de LQ das substâncias de interesse estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17: Limites de Quantificação (LQ) dos clorofenóis em 10 e 200 mL de água

| <i>Substâncias</i> | <i>LQ (ng/mL) (n= 6)</i> | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>10 mL de amostra</i> | <i>200 mL de amostra</i> |
| 2,4,6 - TCF | 0,483 | 0,008 |
| 2,3,6 - TCF | 0,348 | 0,006 |
| 2,3,5 - TCF | 0,427 | 0,007 |
| 2,4,5 - TCF | 0,374 | 0,006 |
| 2,3,4 - TCF | 0,409 | 0,007 |
| 3,4,5 – TCF | 0,497 | 0,008 |
| 2,3,5,6 – TeCF | 0,617 | 0,010 |
| 2,3,4,6 - TeCF | 0,618 | 0, 010 |
| 2,3,4,5 – TeCF | 0,613 | 0,010 |
| PCF | 0,848 | 0,014 |

Os dois métodos, com 10 mL e 200 mL de água obtiveram LQ, pelo menos, 10 vezes menores que os estabelecidos na portaria. Assim, os dois métodos poderiam ser utilizados em análises de rotina para controle da qualidade da água em níveis de concentração exigidos pela norma de potabilidade vigente.

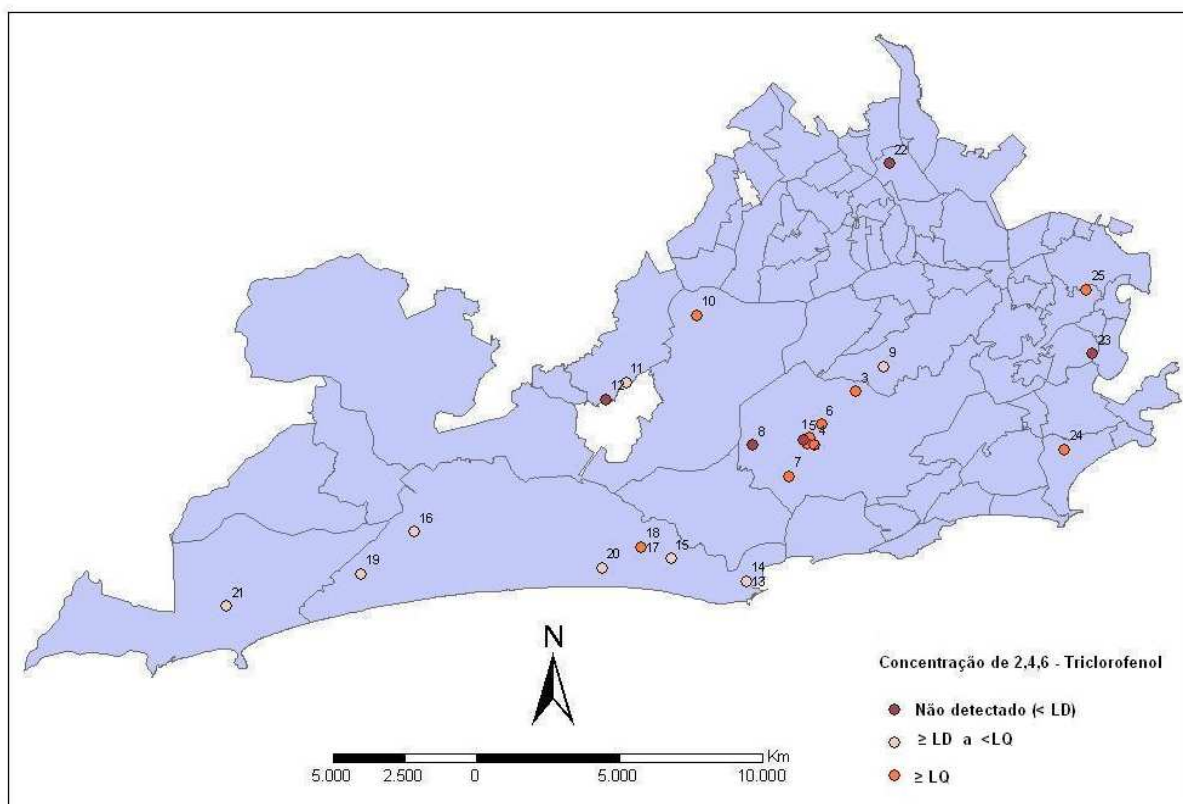
V.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Após validação das metodologias analíticas, realizou-se as análises das 28 amostras de água coletadas através da aplicação da metodologia analítica utilizando 200 mL de amostra, sempre em duplicata. Esta metodologia foi

selecionada por apresentar maior sensibilidade em relação à que utiliza 10 mL de amostra. As amostras foram analisadas quanto à presença de todos os congêneres dos triclorofenóis e tetraclorofenóis, além do pentaclorofenol, totalizando dez substâncias investigadas.

Apenas o 2,4,6 – TCF foi encontrado em concentrações acima do LQ, representando 39% das amostras analisadas. A faixa de concentração encontrada foi entre 0,008 e 0,238 ng/mL e a concentração média de 0,0365 ng/mL. A distribuição dos pontos de coleta e a faixa de concentração encontrada estão demonstradas na Figura 10.

Figura 10: Faixa de concentração encontrada para 2,4,6 – Triclorofenol em amostras de água do Município do Rio de Janeiro, 2006.



Na construção do mapa considerou-se o resultado das análises com maiores níveis de concentração para os pontos de coleta onde foram coletadas duas amostras com intervalos de tempo. Assim, o mapa apresenta os resultados das análises de 25 amostras. A identificação de todos os pontos de coleta e respectivo sistema ou solução alternativa de abastecimento e os resultados encontrados para 2,4,6-TCF estão demonstrados no Anexo I.

Neste estudo foram coletadas amostras da rede de distribuição de seis sistemas de abastecimento, a mérito de comparação da qualidade da água e possíveis inferências à efetividade dos processos de tratamento utilizados.

Os seis sistemas de abastecimento avaliados apresentaram níveis de concentração acima do limite de quantificação pelo menos para uma amostra coletada na respectiva rede de abastecimento.

Na rede do sistema de abastecimento Afonso Viseu foi encontrado a maior concentração do 2,4,6–TCF, sendo que as três amostras provenientes de pontos da rede de distribuição apresentaram níveis de concentração acima do LQ.

No principal sistema de abastecimento do município (Guandu), o qual abastece aproximadamente 50% da população do Estado do R.J., foram coletadas amostras em 12 pontos da rede de distribuição, sendo que em três pontos localizados nos bairros do Flamengo, Copacabana e Santa Teresa foram coletadas duas amostras em intervalo de sete dias, perfazendo 15 amostras. Em três amostras foram encontradas concentrações acima do LQ. Em Santa Teresa foi encontrada a maior concentração (0,0306 ng/mL).

Foram analisadas também a água de cinco soluções alternativas de abastecimento que atendem uma escola municipal, um hospital, uma clínica e duas instalações comerciais. Em apenas uma amostra foi encontrado o 2,4,6-TCF em concentração acima do LQ. As concentrações máximas encontradas nos sistemas e soluções alternativas de abastecimento estão demonstradas na Figura 11.

Figura 11: Concentrações máximas encontradas de 2,4,6-Triclorofenol por sistema e total das soluções alternativas de abastecimento, Município do Rio de Janeiro, 2006.



Clorofenóis podem ser alocados em dois grupos, distinguindo os presentes em águas naturais e os formados durante o processo de tratamento da água por cloração. Os presentes em águas naturais podem resultar de inúmeras fontes, como efluentes industriais e domésticos, por derramamento químico ocasional, lixiviação em regiões onde são utilizados com agrotóxicos, dentre outras reportadas anteriormente.

O PCF tem sido encontrado em águas naturais com maior frequência e em maiores níveis de concentração em relação à água tratada. Este fato pode ser explicado já que sua formação não ocorre no processo de cloração da água (NIEMINSKI *et al.*, 1993). O próprio processo de tratamento da água pode eliminar ou diminuir os níveis deste contaminante.

Poucos estudos detectam o PCF em água tratada, ou quando detectam, em níveis menores que em água natural. Já o 2,4,6-TCF têm sido encontrado com maior frequência e concentração na água tratada em relação à água natural. SITHOLE & WILLIANS (1986) determinaram a presença de clorofenóis, em água para consumo humano, abrangendo 39 cidades distribuídas geograficamente, em proporção de população e cobrindo aproximadamente 40% dos consumidores do Canadá. O estudo foi realizado nos anos de 1984 e 1985. Foram analisados os 19 isômeros possíveis na água natural (antes da estação de tratamento) e na água após tratamento. Na água natural, PCF foi encontrado com maior frequência (mais de 20% das amostras). Já em água tratada, 2-CF, 4-CF, 2,4-DCF, 2,6-DCF e 2,4,6-TCF foram encontrados com maior frequência. Também, foi observado aumento nos níveis de concentração destas substâncias em água tratada, em relação à água natural, indicando a formação destas substâncias como sub-produtos do processo de desinfecção da água. Ainda, verificou-se menores concentrações de PCF em água tratada em relação à água natural. O 2,4,6-TCF foi encontrado em torno de 10% das amostras analisadas e em maiores níveis de concentração na água tratada, atingindo a concentração máxima de 0,719 ng/mL.

As características físico-químicas dos CFs implicam que os mesmos podem ser adsorvidos em material em suspensão na água, com maior propensão ao PCF. Dessa maneira, essa substância pode ser transportada por longos percursos, chegando a atingir fontes de captação de água para tratamento. A adsorção do PCF é também influenciada pelo pH da água. Em pH geralmente encontrado em águas naturais (levemente ácido), este é transportado principalmente na forma não

dissociada e, portanto, adsorvida nas partículas em suspensão (ZUIN *et al.*, 1999). Os resultados encontrados mostram que a água captada não foi contaminada por essa substância e/ou que ela foi retirada no processo de tratamento. No caso das soluções alternativas avaliadas apenas a cloração é utilizada no processo de tratamento, medida não efetiva na retirada desse contaminante. Isto indica que a água captada não estava contaminada ou apresentava níveis residuais dessa substância, abaixo do LD. Resultados semelhantes foram encontrados por GASPAR *et al.* (1997) avaliando a qualidade da água de abastecimento de cinco cidades do Estado de São Paulo.

Apesar do PCF não ter sido encontrado nas amostras analisadas, deve-se avaliar a qualidade da água de acordo com a legislação vigente, prevendo eventuais falhas nos processos de tratamento e sabendo-se da potencial contaminação de águas naturais. Em alguns estudos pode-se verificar que o processo de purificação da água fornecida a população nem sempre foi suficientemente eficaz para retirar essa substância. FINGLER & DREVENKAR (1988) realizaram análises da água para consumo humano que abastece a cidade de Zagreb e FINGLER *et al.*, (1992) da água que atende as cidades de Sisak e Labin, ambas cidades da Croácia. Por serem regiões extremamente industrializadas, a qualidade da água que atende a população depende da eficácia dos processos de purificação da água captada. Entre os CFs avaliados, o PCF foi encontrado em maiores concentrações e frequência nos dois estudos, revelando a contaminação de águas naturais por essa substância e a ineficiência nos processos de tratamento da água.

Outros estudos têm demonstrado a contaminação de águas naturais. VAN ZOEST & VAN ECK (1991) determinaram a presença de micropoluentes em águas do estuário de Scheldt, região nordeste da Bélgica, onde são recebidas grandes quantidades de efluentes industriais, principalmente por via fluvial. Neste estudo foram encontradas concentrações de PCF entre 0,02 e 1,1 ng/mL. Estudo realizado por MUIR & EDULJEE (1999) mostram concentrações de PCF de 0,008 a 200 ng/mL em amostras de água, em vários rios da Europa, durante vários anos na década de 1990. Em estudo mais recente realizado na Alemanha, o PCF foi encontrado nas águas do Lago Schwelvollert e em águas subterrâneas (MONTERO *et al.*, 2005).

A contaminação de águas naturais por PCF também tem sido demonstrada no Brasil. ZUIN *et al.* (1999) determinaram PCF em água natural de superfície em áreas afetadas por resíduos industriais (São Vicente–SP), onde a

maior parte da população utiliza poços pouco profundos para o abastecimento. A concentração máxima encontrada foi 0,0266 ng/mL. DEL GRANDE *et al.* (2003) determinaram PCF nas águas da bacia do Rio Piracicaba (SP). A região é extensamente industrializada, despejando na bacia efluentes de indústrias de papel e celulose, químicas, refinaria de petróleo, dentre outras. Também, são despejadas em suas águas efluentes domésticos de 40 municípios. Além dos problemas para o meio ambiente, a contaminação da bacia oferece riscos à saúde das populações de 30 municípios que captam essas águas para abastecimento público. Foram encontradas concentrações máximas de 0,0223 ng/mL de PCF em água.

A ausência de clorofenóis nas amostras pode ser explicada, além do mencionado acima, pela oxidação dessas substâncias pelo Cloro Residual Livre (CRL), resultante da cloração (RODRIGUEZ & CELA, 1997). Essa propriedade oxidante foi observada em laboratório, através da fortificação de amostras de água tratada com CFs, seguindo-se a execução da metodologia analítica sem a adição de tiosulfato de sódio. Algumas amostras teste, coletadas após passagem pela caixa d'água ou cisterna, apresentaram níveis de 2,4,6-TCF menores que os encontrados quando as amostras foram coletadas diretamente da rede de distribuição, ou seja, com menor tempo de contato com o CRL.

Na maioria das amostras, no momento da coleta, foi determinado a concentração de cloro residual livre e o pH. Não se observou correlação aparente desses parâmetros com a concentração da substância encontrada. O pH influencia na velocidade e eficiência da formação dos clorofenóis. No entanto as amostras analisadas apresentaram valores de pH muito próximos, não sendo possível estabelecer uma correlação entre esses parâmetros.

Pode-se indicar o processo de cloração como possível fonte de contaminação por essa substância, fato reportado em outros estudos. Há grande variação na frequência de amostras contaminadas, principalmente devido a diferenças nos LD dos métodos utilizados, e concentração máxima de 2,4,6-TCF encontrada em estudos anteriores. NIEMINSKI *et al.* (1993) avaliaram a ocorrência de subprodutos da cloração da água para consumo humano em Utah (USA), dentre eles o 2,4,6-triclorofenol. Para este, foi encontrada concentração máxima de 1,10 ng/mL. SITHOLE & WILLIAMS (1986) em aproximadamente 10% das amostras analisadas e concentração máxima de 0,719 ng/mL. FINGLER & DREVENKAR (1988)

encontraram essa substância em 40% das amostras e concentração máxima de 0,009 ng/mL.

Em relação às características toxicológicas e organolépticas dos clorofenóis verifica-se que os limites com base nos efeitos toxicológicos, para a maioria dos clorofenóis, são superiores aos limites relativamente ao sabor e odor da água. Os clorofenóis são reconhecidos pelos seus baixos valores de limiar de percepção organoléptica. Para o 2,4,6 – TCF, o valor máximo recomendado pela OMS e adotado pela Portaria 518/2004 (200 ng/mL), considerado seguro para não ocorrência de câncer durante um consumo por toda a vida, excede o valor recomendado para não ocorrência da alteração gosto da água (2 ng/mL). Os níveis de 2,4,6-TCF encontrados neste estudo são inferiores ao VMP, não oferecendo riscos à saúde humana. Os níveis de concentração encontrados para esta substância são próximos aos recomendados para não alteração das características de sabor.

A coleta das amostras foi realizada em período onde não ocorreram precipitações pluviométricas. É sabido que com as chuvas aumenta o teor de matéria orgânica nas águas, levando a um aumento no teor de subprodutos da cloração formados, dentre eles o 2,4,6-TCF (SHITOLE & WILLIANS, 1986). Assim, os níveis de concentração encontrados para essa substância podem ser maiores nestes períodos. Nessas situações a eficiência da desinfecção não deve ser comprometida. Para tanto, deve-se otimizar os processos de tratamento e reduzir o teor de substâncias orgânicas na água antes da cloração, reduzindo assim o nível de subprodutos da cloração potencialmente tóxicos formados.

Apesar do PCF não ter sido detectado nas amostras de água analisadas, não é descartada a contaminação de águas naturais por essas substâncias, já que, como mencionado essa substância pode ter sido eliminada no processo de tratamento da água. A contaminação por PCF requer especial atenção das autoridades de saúde pública, devido à sua alta toxicidade e dos contaminantes presentes nas formulações comerciais. Vários estudos têm demonstrado a presença de substâncias com alto poder toxicológico no meio ambiente, introduzidas através da utilização de clorofenóis comerciais. Estas substâncias podem estar presentes como contaminantes em formulações de clorofenóis comerciais, produzidos como subprodutos da síntese dos mesmos. KITUNEN *et al.*, (1985) determinaram a presença de PCDF e fenoxifenóis policlorados em água (superficial e subterrânea) e

solo, na Finlândia. A contaminação foi atribuída a utilização do fungicida comercial KY-5. Neste produto, a composição dos principais clorofenóis pode variar dependendo do lote: 2,3,4,6-TeCF (78-83%), 2,4,6-TCF (7-14%) e PCF (5-10%) (VALO *et al.*, 1984).

Em estudo realizado no lago Valkjärvi (Finlândia) por VARTIANEN *et al.*, (1995a), entre outros, foram encontrados traços de isômeros dos PCDD e PCDF, reportados como possíveis contaminantes do KY-5. Também, foram analisadas pessoas da vila de Kärköläque as quais consumiam água de abastecimento sabidamente contaminadas com clorofenóis em altas concentrações (70 a 140 ng/mL de clorofenóis). Foram encontradas níveis de concentração levemente maiores para PCBs, PCDD e PCDF, em relação à área controle (VARTIANEN *et al.*, 1995b).

VI. CONCLUSÕES

O principal escopo do estudo foi atingido. Foram implementadas e validadas duas metodologias, utilizando-se 10 e 200 mL de amostra, em níveis de sensibilidade requeridos pela norma de potabilidade vigente. A primeira metodologia é adequada para análises de rotina de controle de qualidade da água para consumo humano, pois é requerido pequeno volume de amostra e reagentes, não inclui etapa de evaporação do extrato, sendo um método rápido, fácil e relativamente pouco oneroso. O propósito da segunda metodologia é quantificar clorofenóis em água para consumo humano em níveis de concentração extremamente pequenos. Nesses níveis de concentração os clorofenóis podem ocasionar odor e gosto desagradáveis na água, afetando sua potabilidade.

Em amostras com altos níveis de concentração, fato pouco reportado na literatura, pode-se empregar o método utilizado para determinar o branco da curva analítica, ou seja, 2 mL da amostra seriam derivatizados, extraídos e analisados por técnica de CG-DSM. Assim, as metodologias possibilitam a determinação dessas substâncias em amostras com ampla faixa de concentração em água, em níveis de parte por trilhão (ppt) e parte por bilhão (ppb).

Quanto à validação das metodologias, todos os parâmetros associados ao desempenho do método apresentaram-se em concordância com o estabelecido pelos órgãos reguladores como o INMETRO e ANVISA demonstrando que as metodologias são adequadas para o que se propõem.

No delineamento do plano de amostragem, o suporte da VISA foi fundamental, principalmente na identificação da rede de distribuição dos sistemas e soluções alternativas de abastecimento, bem como na logística para coleta das amostras. Dessa forma, pôde-se avaliar a qualidade da água quanto à presença de clorofenóis em diferentes sistemas de abastecimento, além de soluções alternativas, como determinado pela norma de potabilidade vigente, e abrangendo grande parcela da população do referido município.

Apenas o 2,4,6-TCF foi detectado nas amostras. As concentrações encontradas foram sempre inferiores ao VMP estabelecido pela norma de potabilidade vigente. De acordo com informações do relatório situacional dos LACENs, até o ano de 2004 nenhum dos laboratórios realizava análise dessa

substância em água para consumo humano (ANVISA, 2005). Assim, a disponibilização do POP da metodologia analítica validada para esses laboratórios se faz necessária.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERO, J. L.; PIRIOU, P.; VON GUNTEN, U. Kinetics and Mechanisms of Formation of Bromophenols During Drinking Water Chlorination: Assessment of Taste and Odor Development. **Water Research**, vol. 39, 2979 – 2993, 2005.

AUSTRALIAN DRINKING WATER GUIDELINES (ADWG). **National Water Quality Management Strategy**, 511 p., 2004.

ANDO, K.; KATO, A.; SUZUKI, S. Isolation of 2,4-Diclorophenols from a soil fungus and its biological significance. **Biochem. Biophys. Res. Acta**, vol. 39, 1104 – 1111, 1970.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação**. Série Acreditação, 1 ed. Brasília: ANVISA, vol. 1, 80p., 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – 2006a. **Monografia Pentaclorofenol**. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/monografias.pdf>>. Acesso em: 08 nov. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Relatório situacional dos LACEN** (ano-base 2004). 61 pág., 2005. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/reblas/lacens/relatorio_2005.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2007

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**; 02 de maio de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - 2006b. Nota técnica sobre a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo pentaclorofenol e seus sais. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao/penta.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2007.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Chlorophenols**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. International Standard Organization (ISO); ISO/IEC 17025, 2001.

BAGUERI, H.; SABER, A.; MOUSAVI, S. R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1046, p. 27-33, 2004.

BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Gas chromatographic determination of phenol compounds with automatic continuous extraction and derivatization. **Journal of Chromatography**, vol. 518, p. 59-67, 1990.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, vol. 25, nº. 5, p.856-865, 2002.

BASTOS, R. K. X. *et al.* Revisão da Portaria 36 GM/90: Premissas e princípios norteadores. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais**, pp. 1-12, João Pessoa: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001.

BEZERRA, N. R. *et al.* Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano no Brasil: a Aplicação da Portaria MS N°1469/2000 pel o Setor Saúde (Cd Rom), **Anais**, I Congresso Interamericano de Saúde Ambiental, Porto Alegre, 2004.

BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H. Development and validation of a CG/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. **Chemosphere**, 40, 929-935, 2000.

BONINI, E. M. **O setor saúde estadual nos comitês de bacias hidrográficas do Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Portaria Interministerial nº. 292, DE 28 DE ABRIL DE 1989. **D.O.U. – Diário Oficial da União, Poder Executivo**, de 02 de maio de 1989.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Instrução Normativa nº 5, de 20 de outubro de 1992. Disciplinar os procedimentos a serem observados quando do cumprimento do estabelecido na Portaria Interministerial nº. 292, de 28 de abril de 1989. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 21 de outubro de 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe a comercialização, uso e distribuição de produtos agrotóxicos organoclorados destinados à agropecuária. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 03 de setembro de 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 11, de 08 de janeiro de 1998. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 21 de janeiro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 635, de 26 de dezembro de 1975a. Aprova Normas e Padrões, a seguir, sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento, destinada ao consumo humano. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 30 de janeiro de 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº. 76.872, de 22 de dezembro de 1975b. Regulamenta a Lei No. 6.050, de 24 de maio de 1974. Dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, 23 de dezembro de 1975.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº. 6.050, de 24 de maio de 1974. Dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas de abastecimento quando existir estação de tratamento. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**; 27 de maio de 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 11, de 08 de janeiro de 1998. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 21 de janeiro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras

providências. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 26 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 56/Bsb, de 14 de março de 1977. Normaliza o padrão de potabilidade da água a serem observados em todo território nacional. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, V.16, n.1, p. 26-30, 1977a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 23 de janeiro de 1990.

BRASIL. Poder Executivo. Decreto Federal nº 79.367, de 9 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 10 de março de 1977b.

BRITO, N. M.; POSSIDÔNIO, O. A. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

BUCHHOLZ, K.D.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 160-167, 1994.

CHAU, A. S. Y.; COBURN, J. A. Determination of pentachlorophenol in natural and waste waters. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**, v. 57, nº2, p. 389-393, 1974.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide residues in food: methods of analysis and sampling**. 2.ed., v. 2A, part. 1, 2000.

COUTTS, R. T.; HARGESHEIMER, E. E.; PASUTTO, F. M. Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. **Journal of Chromatography**, v. 179, p. 291-299, 1979.

CRESPÍN, M. A. *et al.* Discrimination of structural isomers of chlorinated phenols in waters using gas chromatography-mass spectrometry in the negative chemical ionization mode. **Journal of Chromatography A**, 830, 165-174, 1999.

CZAPLICKA, M. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment – Review. **Science of the Total Environment**, vol. 322, 21–39, 2004.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, O. Distribution of Organochlorine Compounds in Water and Sediments from Piracicaba River Basin/SP - Brazil. **Química Nova**, vol.26, nº. 5, 678-686, 2003.

Directive 98/83/EC. **On the quality of water intended for human consumption**. Disponível em: <http://ec.europa.eu>. Acesso em: 12 nov. 2007.

EPA Method 604. Phenols. Environmental Protection Agency, 40 CFR, Part 136, Appendix A – Revised as of July 1st, 1995 (a).

EPA Method 625. **Base / Neutrals and Acids**. Environmental Protection Agency, 40 CFR, Part 136, Appendix A – Revised as of July 1st, 1995 (b).

EPA Method 8041. **Phenols by Gas Chromatography: Capillary Column Technique**, Washington DC, 1995 (c).

EURACHEM / CITAC. **Determinando a incerteza na medição analítica**, Primeira edição brasileira, 2002.

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

EXON, J. H. A review of chlorinated phenols. **Vet. Hum. Toxicol.**, vol. 26, nº 6, 508-520, 1984.

FINGLER, S.; DREVENKAR, V. Chlorophenols in the river before, in and after the Zagreb city area. Impact on the purity of the city ground and drinking waters. **Toxicol. Environ. Chem.**, vol. 17, 319-328, 1988.

FINGLER, S. *et al.* Levels of Polychlorinated Biphenyls, Organochlorine Pesticides, and Chlorophenols in the Kupa River Water and in Drinking Waters from Different Areas in Croatia. **Bull. Environ. Toxicol.**, vol. 49, 805-812, 1992.

- FREIRE, R. S. *et al.* New Trends for Treatment of Industrial Effluents Containing Organochloride Species. **Química Nova**, vol. 23, nº. 4, 504-511, 2000.
- FREITAS, M. B.; FREITAS, C. M. A Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano – Desafios e Perspectivas para o Sistema Único de Saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, vol. 10, nº. 4, 993-1004, 2005.
- GALLARD, H.; VON GUNTEN, D. Chlorination of Phenols: Kinetics and Formation of Chloroform. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 36, 884 – 890, 2002.
- GE, F.; ZHU, L.; CHEN, H. Effects of pH on the Chlorination of Phenols in Drinking Water. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 133B, 99-105, 2006.
- GASPAR, I. F. Determination of pentachlorophenol in drinking water. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Vol. 8, No. 5, 515-518, 1997.
- GUIDELINES FOR CANADIAN DRINKING WATER QUALITY (GCDWQ). Supporting Document, 6th Edition, 1996, 90 p.
- Hajslová J. *et al.* Gas chromatographic determination of chlorinated phenols in the form of various derivatives. **Journal of Chromatography**, vol. 439, 307 - 316, 1988.
- HELLER, L. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OPAS/OMS). **Saneamento e Saúde**. Brasília, 103 p., 1997.
- HODIN, F. *et al.* Formation of chlorophenols and related compounds in natural and technical chlorination processes. **Water Science and Technology**, vol. 24, nº. 3-4, 403 -410, 1991.
- HOEKSTRA, E. J. *et al.* Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 33, 2543-2549, 1999.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure & Appl. Chem.**, vol. 67, nº. 2, 331-343, 1995.
- HORWITZ, W. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 71, nº. 1, 160-172, 1988.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações para adoção da NBR ISO/IEC 17025 pelos laboratórios credenciados e postulantes ao credenciamento**. DOQ-DQUAL-006, 2001.

JANDA, V.; LANGENHOVE, H. V. Determination of chlorophenols in water by direct acetylation and solid-phase extraction. **Journal of Chromatography**, vol. 472, 327-330, 1989.

KELLY, P. C. Outlier detection in collaborative studies. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 73, nº. 1, 58-64, 1990.

KITUNEN, V.; VALO, R.; SALKINOJA-SALONEN, M. Analysis of chlorinated phenols, phenoxyphenols and dibenzofurans around wood preserving facilities. Intern. **J. Environ. Anal. Chem**, vol. 20, 13-28, 1985.

KRIJGSMAN, W.; KAMP, C. V. G. Determination of chlorophenols by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, vol. 131, 412-416, 1977.

KRINGSTAD, K. P.; LINDSTRÖM, K. Spent Liquor from Pulp Bleaching. **Environ. Sci. Technol.**, vol. 18, 236A-248A, 1984.

LAMPI, P. *et al.* Increase of specific symptoms after long-term use of chlorophenol polluted drinking water in a community. **European Journal of Epidemiology**, vol. 16, 245-251, 2000.

LAMPI, P. *et al.* Cancer incidence following chlorophenols exposure in a community in southern Finland. **Archives of Environmental Health**, vol. 47, nº. 31, 67-175, 1992.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Ed. Rima, 62 pág., 2004.

LEE, H. B.; CHAU, A. S. Y. Analysis of pesticide residues by chemical derivation. VII. Chromatographic properties of pentafluorobenzyl ether derivatives of thirty-two phenols. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 66, nº. 4, 1029-1038, 1983.

LEE, H. B.; WENG, L. D.; CHAU, A. S. Y. Chemical derivatization analysis of pesticide residues. VIII. Analysis of 15 chlorophenols in natural water by in situ acetylation. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 67, nº. 4, 789-794, 1984(a).

LEE, H. B.; WENG, L. D.; CHAU, A. S. Y. Chemical derivatization analysis of pesticide residues. IX. Analysis of phenol and 21 chlorinated phenols in natural waters by formation of pentafluorobenzyl ether derivatives. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 67, nº. 6, 1984(b).

LEE, H. B.; HONG-YOU, L.; FOWLIE, P. J. A. Chemical Derivatization Analysis of Phenols. Part VI. Determination of Chlorinated Phenolic in Pulp and Paper Effluents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, vol. 72, nº. 6, 1989.

LÉON, V.M. *et al.* Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry Part II: Method validation. **Analytica Chimica Acta**, vol. 558, 261–266, 2006.

MONTEIRO, C.; ROCHA, G.; MARQUEIRO, P. Odor na torneira, sujeira no Guandu. **O Globo RIO**, Rio de Janeiro, pág. 12, 14 de nov. de 2001.

MONTERO, L. *et al.* Determination of phenols in lake and ground water samples by stir sorptive extraction-thermal desorption Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of chromatography A**, vol. 1071, 163-169, 2005.

MUIR, J.; EDULJEE, G. PCP in the Freshwater and Marine Environment of the European Union. **Sci. Total Environ.**, vol. 236, 411, 1999.

NIEMINSKI, E. C.; CHAUDHURI, S.; LAMOREAUX T. The Occurrence de DBPs in Utah Drinking Waters. **J. Am. Water Works Association**, vol. 85, 98-105, 1993.

PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of bentazon residues in water by high-performance liquid chromatography: Validation of the method. **Journal of Chromatography A**, 846, 369–374, 1999.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, vol. 19, nº. 3, 268-277, 1996.

PONTES, C. A. A.; SCHRAMM, F. R. Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 20, nº. 5, 1319-1327, 2004.

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 15, nº. 8, 1996.

RANGEL, T. B. A. **Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite longa vida**. Rio de Janeiro, Dissertação em Vigilância Sanitária, INCQS / FIOCRUZ, 81 p., 2006.

REE, K.C.; EVERS, E.H.G.; VAN DER BERG, M. Mechanism of Formation of Polychlorinated Dibenzo(p)dioxins (PCDDs) and Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) from Potential Industrial Sources. **Toxicological and Environmental Chemistry**, vol. 17, 171-195, 1988.

RENNBERG, L.; LINDSTRÖM, K. C18 reversed-phase trace enrichment of chlorinated phenols, guaiacols and catechols in water. **Journal of Chromatography**, vol. 214, 327-334, 1981.

RIBANI, M. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, Vol. 27, nº. 5, 771-780, 2004.

RODRIGUEZ, I.; CELA, R. Combination of solid-phase extraction procedures with gas chromatographic hyphenated techniques for chlorophenol determination in drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 16, nº. 8, 463-475, 1997.

RODRÍGUEZ, I. *et al.* Determination of chlorophenols at the sub-ppb level in tap water using derivatization, solid-phase extraction and gas chromatography with plasma atomic emission detection. **Journal of Chromatography A**, vol. 721, 297-304, 1996.

ROJAS, R. **Guidelines for the surveillance and control of drinking water quality**. (PAHO / WHO / CEPIS), Lima, 2002.

RUELA, I. C. A. *et al.* Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 25, nº.1, 139-146, 2005.

SAFE DRINKING WATER ACT (SDWA). United States Environmental Protection Agency. U. S. EPA, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/safewater/sdwa/index.html>. Acesso em: 31 de maio de 2006.

SARTORI, A. V.; THIBAUT, J. P. B. **Vigilância da Qualidade da Água de Abastecimento no Estado do Rio de Janeiro: Portaria nº 518/2004**. 2005. 76 f. Monografia (Especialização em Toxicologia Aplicada à Vigilância em Saúde). Escola Nacional de Saúde Pública, CESTEH – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

SILVA, R. C. A.; ARAUJO, T. M. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Ciê. Saúde Coletiva**, vol. 8, nº. 4, 1019-1028, 2003.

SIMÕES, D.; PESSOA, F.; MENDES, T. MP investiga água da Cedae. **O Globo RIO**, pág. 12, 20 de nov. de 2001.

SITHOLE, B. B.; WILLIAMS, D. T. Halogenated Phenols in Water at Forty Canadian Potable Water Treatment Facilities. **Journal Assoc. Off. Anal. Chem**, Vol 69, nº5, 1986.

SOARES, S. R. A.; BERNARDES, R. S.; CORDEIRO NETTO, O. M. Relações entre saneamento, saúde pública e meio ambiente: elementos para formulação de um modelo de planejamento em saneamento. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 18, nº. 6, 1713-1724, 2002.

SPISSO, B. F. **Determinação de beta 2-agonistas em urina animal: comparação de dois procedimentos de extração / clean-up para análise por CGAR-EM**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ, IQ, 1998, 244 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. Seventh Edition, Saunders College Publishing, 1996.

SNOW, J. **Sobre a maneira de transmissão do cólera**. 2ed. São Paulo: HUCITEC - ABRASCO, 1990. 249p.

STEVENS, A. A. *et al.* Chlorination of Organics in Drinking Water. **J. Am. Water Works Association**, vol. 68, 615-620, 1976.

TURNES, I. *et al.* Determination of chlorophenols in drinking water with high resolution gas chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, vol. 734, p. 283-292, 1996.

VALENTE, L. M. S. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, vol. 60, p. 79-84, 2001.

VALO, R. *et al.* Chlorinated Phenols as Contaminants os Soil and Water in the Vicinity of Two Finnish Sawmills. **Chemosphere**, vol. 13, 835-844, 1984.

VAN ZOEST, R.; VAN ECK, G. T. M. Occurence and Behaviour of Several Groups of Organic Micropollutants in the Scheldt Estuary. **The Science of the Total Environment.**, vol. 103, 57-71, 1991.

VAN ZONEN, P. *et al.* Some Practical Examples of Method Validation in the Analytical Laboratory. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 18, nº9 -10, 1999.

VARTIANEN, T. *et al.* Polychlorodibenzo-p-Dioxin and Polychlorodibenzofuran Concentrations in Lake Sediments and Fish After a Ground Water Pollution With Chlorophenols. **Chemosphere**, vol. 30, nº. 8, 1439-1451, 1995(a).

VARTIANEN, T. *et al.* Polychlorodibenzo-p-Dioxin and Polychlorodibenzofuran Concentrations in Human Fat Samples in Village Pollution of Drinking Water With Chlorophenols. **Chemosphere**, vol. 30, nº. 8, 1429-1438, 1995(b).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Internatinal Agency for Reserch on Cancer (IARC). **Monographs on the Evalution of Carcinogênic Risks to Humans**, vol. 53, p. 371, 1991. Disponível em: <www-cie.iarc.fr>. Acesso em: 19 de setembro de 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Drinking Water Quality. Recommendations.** Geneva, 3 rd, v. 1. WHO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Salud, água potable y saneamiento em el desarrollo humano sostenible.** 128^a. Sesión Del Comitê Elecutivo. Washington, D. C., U.S.A., 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Surveillance of drinking-water quality.** Monograph Series nº 63. Geneva, WHO, 135 pp., 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chlorophenols other than pentachlorophenol. **Environmental Health Criteria**, vol. 93, 208 p., 1989

ZUIN, V. G. *et al.* Determination of Pentachlorophenol and Hexachlorobenzene in Natural Waters Affected by Industrial Chemical Residues. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol.10, nº.1, 25 – 30 p., 1999.

ANEXOS

Anexo I: Pontos de coleta de amostras de água e concentração de 2,4,6-TCF encontrada.

| Código das amostras | Nome do Sistema | Instituição | Endereço | GPS | 2,4,6-TCF (ng/mL) |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------|
| 1 | Afonso Viseu | Centro de Acolhimento Floriano Lemos | Rua Boa Vista, 120, Alto da Boa Vista | S 22°57. 818' W 043°16. 591' | 0,009 |
| 2 | Afonso Viseu | UACPS Nicola Albano | Rua Boa Vista, 190, Alto da Boa Vista | S 22°57. 927' W 043°16. 637' | 0,008 |
| 3 | Afonso Viseu | Escola Municipal Mario Faccini | Avenida Edson Passos, 711, | S 22°56. 934' W 043°15. 666' | 0,238 |
| 4 | Dois Murinhos | Residência | Rua Ferreira de Almeida, 72, | S 22°57. 943' W 043°16. 512' | 0,01 |
| 5 | Dois Murinhos | Colégio Santa Marcelina | Estada do Açude, 250, | S 22°57. 859' W 043°16. 725' | < LQ |
| 6 | Taylor | Residência | Rua Boa Vista, 4575, Alto da Boa Vista | S 22°57. 564' W 043°16. 365' | 0,008 |
| 7 | Gávea Pequena | C. C. Mata Machado | Estrada das Furnas, 1467 | S 22°58. 542' W 043°17. 013' | 0,0111 |
| 8 | Solução Alternativa | Escola Municipal Diogo Feijó | Estrada da Paz, 1474 | S 22°57. 967' W 043°17. 765' | <LQ |
| 9 | Guandu | Colégio Marista São José | Rua Conde de Bonfim, 1067, Usina | S 22°56. 453' | <LQ |

| Código das amostras | Nome do Sistema | Instituição | Endereço | GPS | 2,4,6-TCF (ng/mL) |
|----------------------------|------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| | | | | W 043°15. 094' | |
| 10 | Ciganos | Hospital Cardoso Fontes | Av. Menezes Cortes, 3245, Freguesia | S 22°55. 536' W 043°18. 926' | 0,0349 |
| 11 | Guandu | Clínica de Doenças Renais – CDR | Estrada de Jacarepaguá, 7094, Largo do Anil | S 22°56. 810' W 043°20. 362' | <LQ |
| 12 | Guandu | Escola Municipal Poeta Mario Quintana | Av. Tenente Coronel Muniz de Aragão, 898, Jararepaguá | S 22°57. 143' W 043°20. 782' | < LQ |
| 13 | Guandu | Renalvida | Rua Einstein, 89, Barra da Tijuca | S 22°00. 530' W 43°17. 851' | <LQ |
| 14 | Solução Alternativa | Renalvida | Rua Einstein, 89, Barra da Tijuca | S 22°00. 530' W 043°17. 851' | <LQ |
| 15 | Solução Alternativa | Supermercado EXTRA | Av. das Américas, 900, Barra da Tijuca | S 23°00. 128' W 043°19. 410' | <LQ |
| 16 | Solução Alternativa | Hospital Rio Mar | Av. Candido Portinari, 555, Barra da Tijuca | S 22°59. 675' W 043°24. 670' | <LQ |
| 17 | Solução Alternativa | Sendas (Pão de Açúcar) | Av. das Américas, 2000, Barra da Tijuca | S 22° 59. 916' W 043° 20. 022' | 0,0174 |
| 18 | Guandu | Shopping | Av. das Américas, 2000, Barra da Tijuca | S 22° 59. 916' W 043° 20. 022' | < LQ |
| 19 | Guandu | Escola Municipal Vice Almirante Paulo | Av. Adolfo de Vasconcelos, 264, Barra da Tijuca | S 23° 00. 480' | <LQ |

| Código das amostras | Nome do Sistema | Instituição | Endereço | GPS | 2,4,6-TCF (ng/mL) |
|----------------------------|------------------------|--|---|-----------------------------------|--------------------------|
| | | Castro Moreira da Silva | | W 043° 25. 758' | |
| 20 | Guandu | Escola Municipal Sergio Buarque de Holanda | Rua Jornalista Ricardo Marinho, 455, Barra da Tijuca | S 23° 00. 317' W 043° 20. 824' | <LQ |
| 21 | Guandu | Edifício Bellis | Rua Almirante Ari Rangel, 290, Recreio dos Bandeirantes | S 23° 01. 112' W 043° 28. 497' | <LQ |
| 22 | Guandu | Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) | FIOCRUZ/CESTEH, Av. Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos | S 22°52. 626' W 043°15. 038' | <LQ |
| 23 | Guandu | Residência | Rua Paissandu, 279, Flamengo | | <LQ |
| 24 | Guandu | Residência | Rua Figueiredo Magalhães, 279, Copacabana | | 0,0163 |
| 25 | Guandu | Residência | Santa Teresa | | 0,0306 |
| 26 | Guandu | Residência | Santa Teresa | | 0,0132 |
| 27 | Guandu | Residência | Rua Figueiredo Magalhães, 741, Copacabana | | < LQ |
| 28 | Guandu | Residência | Rua Paissandu, 279, Flamengo | | < LQ |