



INDICADOR DE ATIVIDADE ANTROPOGÊNICA NAS ÁGUAS DO RIO PARAÍBA DO SUL. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.

INDICATOR OF ANTHROPOGENIC ACTIVITY IN WATERS OF PARAÍBA DO SUL RIVER. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY.

OTOMO, Juliana Ikebe^{1*}; MARTINS, Elaine Arantes Jardim²; SOUZA, Renata Rodrigues³; FURUSAWA, Hélio Akira⁴; PIRES, Maria Aparecida Faustino⁵

^{1,2,3,4,5}Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Química e Meio Ambiente, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, cep 05508-000, São Paulo – SP, Brasil(fone: +55 11 3133-9000; fax: +55 11 3133-9018)

*e-mail: julianaikebe@gmail.com

Received 02 April 2012; received in revised form 11 May 2012; accepted 27 July 2012

RESUMO

A crescente preocupação com a qualidade e composição das águas teve como consequência o aumento no número de estudos sobre monitoramento das águas naturais. Assim, a cafeína tem sido utilizada como marcador químico adequado por ser de fonte exclusivamente antropogênica, estando presente em fármacos, alimentos e bebidas de elevado consumo pela população. A área de estudo escolhida foi a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, por ter passado por um rápido processo de urbanização e industrialização. Para a garantia de resultados confiáveis, é necessário que as metodologias de análise sejam validadas para esse fim. Neste trabalho, o objetivo é apresentar o método desenvolvido e validado para análise de cafeína em águas superficiais do rio Paraíba do Sul, dentro dos parâmetros sugeridos pelo INMETRO sobre validação de ensaios químicos. O método apresentou resultados satisfatórios para a validação como: linearidade adequada com r^2 de 0,99, boa seletividade e especificidade, exatidão e precisão satisfatórias, apresentando índice z (Score) < 2 e limite de repetitividade indicando baixa dispersão dos dados. O método foi considerado robusto frente a pequenas variações e foi utilizado para quantificação das amostras, sendo encontradas concentrações na faixa entre $0 < LQ$ ($0,080 \mu\text{g L}^{-1}$) a $0,106 \mu\text{g L}^{-1}$, em Pindamonhangaba.

Palavras-chave: Cafeína, Marcadores, Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul, INMETRO.

ABSTRACT

The fast increasing concern about the quality and composition of water has also led to an increasing number of studies on natural waters monitoring. Caffeine has been used as suitable chemical marker because its source is exclusively anthropogenic. It is present in drugs, foods and beverages all of them highly consumed by population. The area chosen for this study was the basin of the Paraíba do Sul River. This is a heavily urbanized and industrialized area. To guarantee reliable results, it is necessary that the analysis methods are validated for this purpose. In this paper, we present the method developed and validated for analysis of caffeine in surface waters of the Paraíba do Sul River, concerning the parameters suggested by INMETRO to validate chemical analysis. The method have shown satisfactory results for validation including: adequate linearity with r^2 of 0.99, good selectivity and specificity, accuracy and precision with z (Score) < 2 and repeatability limit indicating low data dispersion. The method was considered to be robust after small variations and was used to quantify caffeine. Concentrations in the range between $< 0.080 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ) and $0.106 \mu\text{g L}^{-1}$ were found in Pindamonhangaba River.

Keywords: Caffeine, Markers, Paraíba do Sul watershed, INMETRO

INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são utilizados pelo homem para o desenvolvimento de diversas atividades, por isso devem apresentar condições físicas e químicas adequadas e estar disponível em quantidade suficiente e qualidade satisfatória para suprir as necessidades dos seus usuários. Entretanto, as atividades antrópicas representam uma das principais fontes de alteração deste cenário ideal. O consumo crescente de produtos industrializados pela sociedade moderna e o modelo de desenvolvimento adotado pelo homem nas últimas décadas, passou a contribuir para a degradação deste ambiente (Braga, 2002; Ghiselli, 2007; Otomo, 2010).

Nas últimas décadas, tem crescido a preocupação com a caracterização das águas quanto a sua qualidade e composição. Para monitoramento de contaminação de águas naturais por efluentes municipais têm-se utilizado indicadores bacteriológicos, como os coliformes termotolerantes. Entretanto, sua confiabilidade tem sido questionada devido ao seu tempo de vida relativamente curto no meio e sua fonte limitada, pois é característico de efluente doméstico, excluindo a contribuição de efluentes industriais que também são responsáveis pela degradação da qualidade das águas (Buerge, 2003; Libânio, 2008; Silva, 2008; Otomo, 2010).

O marcador ideal deve permitir uma elucidação inequívoca da fonte e quantificação da magnitude da poluição. Marcadores químicos têm sido sugeridos para traçar a poluição causada por atividades domésticas. Um dos requisitos para um bom marcador é que este seja de consumo regular e constante, prevendo ainda que o hábito dos consumidores não mude ou que o composto não seja abolido dentro dos próximos anos. Além disso, as quantidades descartadas com os efluentes devem ser suficientes a permitir quantificação analítica após dispersão no ambiente. Sendo assim, um potencial marcador químico de contaminação de efluentes domésticos é a cafeína (Buerge, 2003).

A cafeína é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas, que são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso central (SNC), pois produzem um estado de alerta de curta duração. A cafeína é mundialmente utilizada como ingrediente de analgésicos, estimulantes e bebidas a base de cola,

energéticos e está naturalmente presente em mais de 60 espécies de plantas, como no guaraná, no mate e no cacau (Buerge, 2003; Monteiro, 2005; De Maria, 2007; Verenitch, 2008).

A cafeína é uma das drogas de uso não prescrito mais usada no mundo, devido a sua utilização em bebidas e alimentos, por isso tem sido estudada por vários pesquisadores. Tem maior importância em fármacos, pois intensifica o efeito de certos analgésicos como os destinados para tosse, resfriado e dor de cabeça. Ela está incluída na lista da USEPA das substâncias químicas de maior volume de produção (Verenitch, 2008; Buerge, 2003; Stackelber, 2004).

Assim, sua presença em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e em águas superficiais é um forte indício de ocupação urbana e ineficiência do tratamento oferecido, tanto em ETE como em ETA (Buerge, 2003; Verenitch, 2008; Otomo, 2010).

As características físico-químicas da cafeína também contribuem para sua adequação como marcador de atividade antrópica, tais como: persistência na coluna d'água, razoável solubilidade, pequeno coeficiente de partição octanol-água, pouca associação ao sedimento e baixa volatilidade (Tubbs, 2004).

Diversos estudos relacionaram a presença de cafeína com a ocupação antrópica na região avaliada, tendo as estações de tratamento de esgoto como a principal fonte de entrada desta substância no meio (Barber, 1995; Seiler, 1999; Standley, 2000; Kolpin, 2002; Siegener, 2002; Buerge, 2003; Tubbs, 2004; Stackelber, 2004).

1.1. Área de estudo

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul passou por um rápido processo de urbanização e industrialização, com a Mata Atlântica original restrita a parques e reservas florestais. Localizada na região sudeste do estado de São Paulo, a bacia drena três importantes estados brasileiros de significativa participação econômica: São Paulo na região conhecida como Vale do Paraíba Paulista, parte do estado de Minas Gerais, denominada Zona da Mata Mineira, além de metade do estado do Rio de Janeiro (Coppetec, 2006; Otomo, 2010).

A população urbana total da bacia é de

aproximadamente 5,5 milhões de habitantes e, além desta, cerca de 11 milhões de habitantes da região metropolitana do Rio de Janeiro são abastecidas pelas águas dessa bacia, que são transpostas pelo Sistema Guandu.

A maior contribuição para a situação de degradação da bacia é o despejo diário de aproximadamente um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento (Ceivap, 2009).

1.2. Validação de metodologia

A técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de espectrometria de massas (CG/EM) oferece elevada seletividade combinada com boa capacidade de identificação a níveis de traço (Richardson, 2009; Streck, 2009). Em matrizes ambientais, é necessário o isolamento e concentração dos compostos de interesse utilizando a extração em fase sólida, mais conhecida como SPE (*solid phase extraction*), sendo comumente aceitas como técnicas que, em conjunto, obtêm melhor concentração, separação, identificação e quantificação de compostos orgânicos (Reis Filho, 2006; Mansilha, 2010).

A validação de métodos analíticos é uma etapa imprescindível no processo de seu desenvolvimento para garantir resultados de forma segura e confiável. Os documentos indicados por órgãos como IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO (*International Organization for Standardization*), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e ICH (*International Conference on Harmonization*) não são mandatórios, entretanto fornecem diretrizes e recomendações essenciais para a execução do procedimento de validação, requisitos fundamentais para o processo de demonstração de competência técnica (Ribani, 2004; Bueno, 2007; Otomo, 2010).

Para garantir a reprodutibilidade do método analítico alguns parâmetros devem ser considerados, como seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão, exatidão, recuperação, robustez e estimativa de incerteza (Mansilha, 2010; Otomo, 2010; Souza, 2011).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é apresentar o método desenvolvido e validado seguindo os parâmetros do INMETRO

(2010; 2011), para a determinação de cafeína, utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização dos compostos foram coletadas amostras de mananciais de 4 municípios pertencentes a região paulista da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul: São José dos Campos, Taubaté, Pindamonhangaba e Guararema. As amostras foram coletadas e preservadas em frasco de vidro âmbar de 1 litro e mantidas a aproximadamente 4°C (CETESB, 1987).

As amostras coletadas foram filtradas em sistema de filtração *Sartorius* a vácuo com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, para remoção de sólidos suspensos e acidificada, com ácido clorídrico a pH 3 (Otomo, 2010). A cafeína presente na amostra foi extraída em fase sólida, utilizando-se cartuchos SPE ENVI™-18 (figura 1).

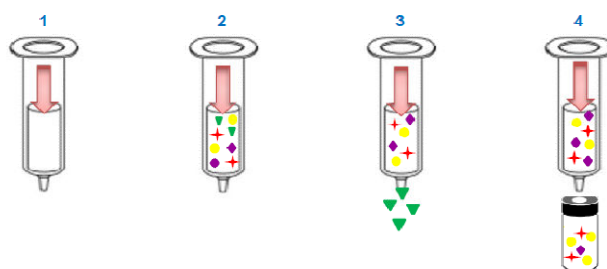


Figura 1. Esquema do procedimento de extração em fase sólida com as etapas de condicionamento (1), percolação da amostra (2), *clean up* (3) e eluição (4)

Fonte: Souza, 2011

Nesse processo, primeiramente foi feito o condicionamento (1) para ativação dos sítios e eliminação de impurezas. Em seguida a percolação (2) da amostra (1 L) pelo cartucho em fluxo de aproximadamente 5 a 6 mL min⁻¹, onde os compostos de interesse para análise ficam adsorvidos no material da coluna.

Após a adsorção pode ser feito o *clean-up* (3) para retirada de resíduos sem interesse para análise, embora não tenha sido necessário para esta metodologia. Por fim, feita a eluição (4) com uma mistura de Diclorometano e Metanol (DCM:MeOH na proporção 6:4) experimental detalhado de acordo com Otomo

(2010). Esse eluato foi evaporado sob fluxo de N_2 , e avolumado a 1 mL, sendo então injetado no CG/EM.

A quantificação da cafeína foi realizada no modo de aquisição SIM (*selected ion monitoring*) para aumentar a sensibilidade da técnica (Kolpin, 2002), utilizando 5 fragmentos de íon com relação massa/carga de 109, 165, 193, 194 e 195.

O equipamento utilizado neste estudo foi um cromatógrafo a gás, da Shimadzu modelo GC-17A, acoplado ao detector de espectrometria de massas, também da Shimadzu modelo QP5000 e microprocessador de dados equipado com o programa GC/MS Solution.

As condições do método cromatográfico definidas experimentalmente foram as seguintes: temperatura do injetor a 265°C; temperatura da interface a 270°C; rampa de aquecimento da coluna de 80°C a 270°C com isotermas em 215°C, 243°C e 248°C; fluxo na coluna de 1,6 mL min⁻¹; injeção de 1 µL do extrato, utilizando coluna capilar DB-5 (5% fenil e 95% dimetilolisiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme) e aquisição de dados no modo SIM monitorando cinco fragmentos de massa mencionados anteriormente.

Os reagentes utilizados são de grau analítico e os solventes de grau cromatográfico. Como não havia disponível matriz certificada para os elementos estudados, as determinações para o desenvolvimento da metodologia foram realizadas a partir da adição de padrões na própria amostra da área de estudo, ou seja, o método de superposição de matriz e padronização externa, como sugere o procedimento do INMETRO (2010; 2011). Padrão analítico de cafeína com certificado de pureza de procedência Aldrich Chemical Co. foi utilizado para a preparação da solução padrão utilizada tanto nas curvas de calibração como nos ensaios de validação.

Para avaliação da seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão foram realizados ensaios com matriz de água bruta e somente em solvente (a mesma mistura de DCM/MeOH da eluição). Esses ensaios envolvem análises em sete replicatas de cada uma das oito concentrações, dentro da faixa de trabalho desejável, alguns experimentos em um mesmo dia e outros em dias diferentes. As

áreas dos picos obtidos, com as injeções desses ensaios, foram utilizadas em cálculos estatísticos como o teste F (*Snedecor*) e teste *t* de *Student*. Os limites LD e LQ foram avaliados segundo o documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010; 2011). A exatidão foi avaliada pelo índice *z* Score e a precisão pelo limite de repetitividade. A robustez foi determinada aplicando-se um teste que consiste no planejamento fatorial de 7 variáveis combinadas em 8 experimentos (planejamento fracionário saturado). Para os cálculos estatísticos utilizou-se a planilha elaborada por Furusawa (2007) a qual segue o procedimento INMETRO (2007; 2010; 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o cálculo dos testes, foram utilizados os dados de áreas obtidos dos cromatogramas gerados em ensaios de adição padrão em amostra de água bruta e somente no solvente.

3.1. Seletividade

A seletividade e especificidade da metodologia desenvolvida foram avaliadas pela observação do cromatograma, comportamento das curvas analíticas do ensaio com matriz e sem matriz, além dos testes estatísticos F (*Snedecor*) e *t* de *Student*. Pelo cromatograma, observa-se que foi possível identificar o composto de interesse sem nenhuma interferência de possíveis compostos provenientes da matriz. Na figura 2 pode ser observado o pico referente a cafeína em concentração de 0,052 µg mL⁻¹ em matriz de água bruta.

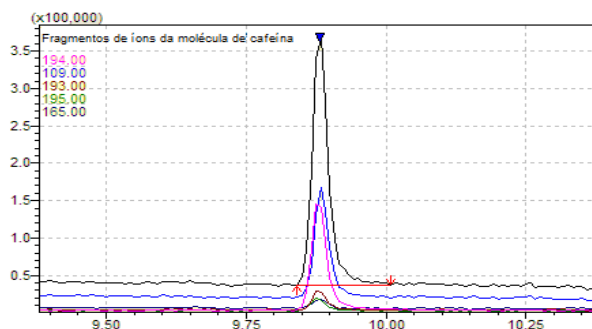


Figura 2. Cromatograma no modo SIM, com os fragmentos de íons da cafeína, em matriz de água bruta

Avaliando o comportamento das curvas analíticas (figura 3), uma confeccionada na matriz de água bruta e outra somente em solvente, observam-se as variâncias entre esses dois conjuntos de dados. Visualmente, pode-se concluir que há diferença entre as duas retas, logo os resultados de quantificação do analito serão diferentes se for utilizada uma curva analítica preparada em matriz semelhante ou somente em solventes.

A diferença entre a curva na matriz com a curva sem matriz pode estar relacionada ao fato da matriz ser proveniente de um corpo d'água superficial, onde ocorre naturalmente a presença de muito material orgânico que pode interferir na análise cromatográfica, tanto suprimindo como intensificando o sinal medido, o que pode também variar de um composto para outro (Xu, 2008; Mansilha, 2010; Wang, 2012).

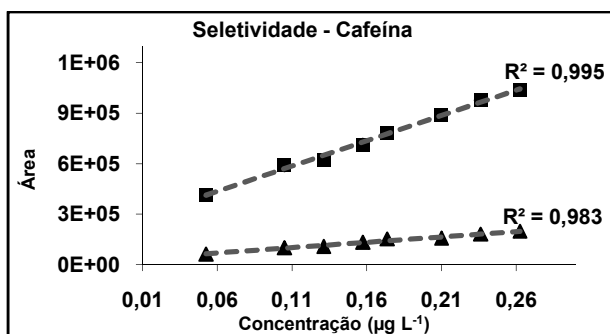


Figura 3. Curvas analíticas da cafeína em água bruta (■) e somente no solvente (▲).

Comprovando estatisticamente o resultado da figura 2, aplica-se o teste F (*Snedecor*) para verificar a variância entre as amostras, segundo a Equação 1, onde o maior valor de variância deve ficar no numerador.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

S_1^2 = maior variância das áreas obtidas pela injeção de sete replicatas de uma concentração no ensaio, nesse caso foi com a matriz;

S_2^2 = menor variância das áreas obtidas pela injeção de sete replicatas de uma concentração no ensaio, nesse caso foi sem a matriz.

Para o teste F, considerando (n-1, sendo n=7) graus de liberdade e 95% de confiança, tem-se como valor crítico $F_{6,95\%} =$

4,28 (F_{tabelado}), que quando comparado com os valores de $F_{\text{calculado}}$ é possível observar que a matriz interfere consistentemente na precisão das medidas, pois para todas as concentrações o valor de $F_{\text{calculado}}$ (tabela 1) foi superior ao $F_{\text{crítico}}$. Para o resultado de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, efetua-se o teste de *Student* para a significância da diferença das médias, com a Equação 2, onde o grau de liberdade do t_{tabelado} é calculado pela Equação 3.

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

Onde:

$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$ = diferença da média das replicatas das 7 injeções nas soluções com e sem a matriz, no mesmo nível de concentração.

$$v = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2+1}} - 2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Do mesmo modo, comparando os valores de $t_{\text{calculado}}$ (tabela 1) com o valor crítico de t (ou t_{tabelado}), observou-se que a matriz utilizada afeta os ensaios para praticamente todas as concentrações avaliadas, pois os valores calculados estão acima do valor crítico.

Tabela 1. Resultados dos valores calculados nos testes F e t Student. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,306$.

Concentração (µg L ⁻¹)	F _{calc}	t _{calc}
0,053	133	16
0,105	59	21
0,131	53	14
0,158	36	16
0,174	547	8
0,210	57	24
0,236	67	14
0,263	113	20

Pela avaliação dos valores estatísticos, fica evidenciado que resultados obtidos contra uma curva analítica preparada somente com os solventes serão diferentes de uma curva preparada com uma matriz igual ou semelhante à amostra.

3.2. Linearidade

A linearidade corresponde à correlação entre uma determinada concentração do analito e o sinal correspondente medido por um método analítico (Ribani, 2004; Bueno, 2007; Otomo, 2010). O coeficiente de determinação (r^2) indica a qualidade da curva, ou seja, quanto mais próxima de 1 for o r^2 , mais ela se aproxima de uma reta, sendo adequada para as determinações. Para a curva da cafeína na matriz o coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 está em conformidade com as exigências do INMETRO ($r > 0,90$) e da ANVISA ($r > 0,99$), e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,995 indica que na faixa de concentração considerada o método é linear e pode ser seguramente utilizado para quantificação das amostras.

No gráfico da figura 4(a), estão plotados os resultados do teste t de *Student* para a análise de resíduos, obtidos pela Equação 4.

$$t_{calculado} = \frac{residuo}{\frac{S_r}{\sqrt{n}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

Resíduo = $|X_{medido} - X_{calculado}|$;

S_r = desvio padrão dos resíduos;

n = número de pontos.

Assim é possível fazer uma avaliação da oscilação das replicatas de cada concentração. Conforme apresentado na figura, observa-se que existe uma variação muito pequena entre as replicatas de cada concentração, o gráfico da figura 4(b), com os mesmos valores normalizados, apresenta um comportamento linear, demonstrando não haver valores discrepantes (*outliers*).

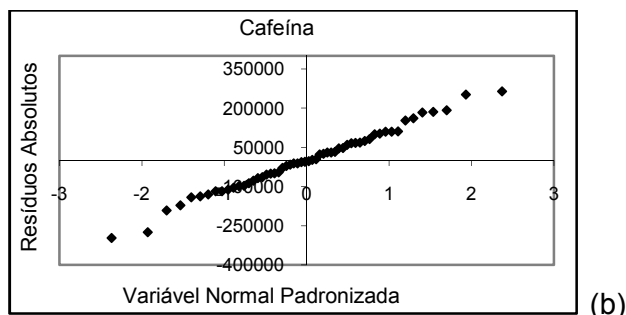
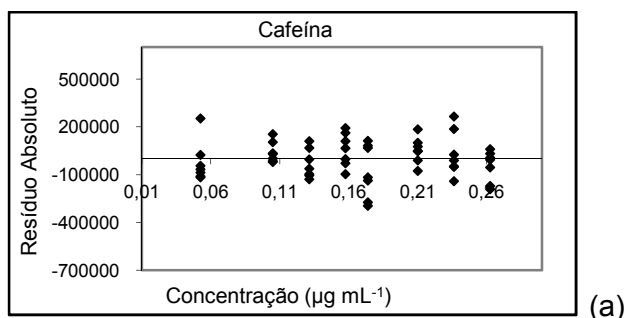


Figura 4. Gráficos de resíduo absoluto (a) e valores normalizados (b) para cafeína em matriz de água bruta.

Sendo assim, pode-se considerar que o método é linear e adequado para mensurar o analito em uma matriz cuja concentração é desconhecida.

3.3. LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação do método representam a menor concentração que pode ser detectada com confiabilidade e quantificada com segurança, respectivamente.

O cálculo do LD é feito pela multiplicação do desvio padrão das 7 replicatas de menor concentração da curva analítica pela distribuição t de *Student* para ($n-1$) graus de liberdade com 95% de confiança. O LQ é resultante da média das 7 replicatas da concentração mais baixa somado a cinco vezes o desvio padrão obtido das mesmas (INMETRO, 2010). Para a matriz de água bruta foram obtidos valores de LD e LQ diferentes dos obtidos na validação somente no solvente (tabela 3), como era esperado devido ao efeito que a matriz tem sobre o composto.

Tabela 3. LD e LQ da metodologia desenvolvida para cafeína em matriz de água bruta e sem matriz.

Cafeína	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sem matriz	0,014	0,078
Água Bruta	0,013	0,080

3.4. Exatidão

A exatidão é de suma importância no processo de validação, medindo o grau de concordância entre um resultado encontrado e o valor de referência aceito como verdadeiro, para uma mesma concentração. Os métodos mais utilizados para a avaliação da exatidão consistem na utilização de material de

referência certificado, comparação de métodos e ensaios de recuperação (Ribani, 2004; Bueno, 2007; Otomo, 2010).

Normalmente utiliza-se o índice *z* (*Score*), calculado de acordo com a Equação 5. Usando como critério: $|z| < 2$, o resultado está satisfatório; $2 < |z| < 3$, o resultado é questionável e $|z| > 3$, o resultado é insatisfatório (Ribani, 2004; Bueno, 2007; Otomo, 2010).

$$z = \frac{(X_{\text{laboratório}} - X_{\text{verdadeiro}})}{s} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

$X_{\text{laboratório}}$ = valor obtido pelo laboratório;

$X_{\text{verdadeiro}}$ = valor aceito como verdadeiro

s = desvio padrão do conjunto de valores do ensaio de proficiência.

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos nos dois ensaios, podendo ser considerados satisfatórios na faixa de concentração avaliada.

Tabela 4. Resultados de *z* Score para cafeína na matriz de água bruta (AB) e no ensaio sem matriz.

Composto	z Score	
	AB	Sem matriz
Cafeína	0,103	0,203

3.5. Precisão

A precisão avalia a dispersão dos valores das replicatas de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões nas condições estabelecidas (Otomo, 2010; Souza, 2011). Para verificar a precisão do método, foram realizadas repetições de análises de concentrações distintas, no mesmo dia e em dias diferentes e, a partir dos dados obtidos, calculou-se o limite de repetitividade (*r*) pela Equação 6.

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot s \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da estatística *t* de Student para $n-1$ graus de liberdade no intervalo de confiança estabelecido

s = desvio padrão para as n replicatas

executadas.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Resultados do teste de repetitividade para cafeína na matriz de água bruta

Composto	Valores de <i>r</i>		
	Baixa	Média	Alta
Cafeína	0,044	0,042	0,085

Esses resultados indicam uma boa precisão do método, pois a diferença entre as replicatas não foi superior aos valores de *r* obtidos.

3.6. Robustez

A robustez mede o quão sensível um método é frente a pequenas variações, sem que interfiram significativamente na confiabilidade em condições normais de operação. Caso não sejam constatadas variações significativas, o método é considerado robusto (Ribani, 2004; Bueno, 2007).

Como recomendação do INMETRO (2007; 2010; 2011), neste estudo foi aplicado o teste de *Youden* para avaliar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final. Esse teste prevê um Planejamento Fatorial Saturado de 7 variáveis do método que possam ter maior influência no resultado da análise, sendo combinadas em 8 ensaios diferentes. Pelo cálculo sugerido na equação 7, estas variáveis serão avaliadas simultaneamente (Ribani, 2004; Furusawa, 2007; Otomo, 2010). As variáveis selecionadas são apresentadas na tabela 6 de modo que em uma coluna estejam apresentados os valores nominais (em letras maiúsculas) dessas variáveis e na outra os valores das variações (em letras minúsculas) sugeridas.

Na tabela 7, é apresentado o arranjo dessas variáveis através do algoritmo de Dong (pequenos experimentos), sendo possível identificar quanto cada variável influencia sobre a metodologia (Ribani, 2004; Bueno, 2007; Furusawa, 2007).

Tabela 7. Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando o algoritmo de Dong (pequenos experimentos)

Valor do Fator	Combinação Ensaída							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

A variação de cada fator é calculada pela diferença entre a média dos 4 resultados correspondentes às letras maiúsculas e a média dos 4 resultados correspondentes às minúsculas. Por exemplo, como apresentado na Equação 7.

$$\text{Efeito } \frac{B}{b} = \frac{(s+t+w+x)}{4} - \frac{(u+v+y+z)}{4} \quad (\text{Eq. 7})$$

Pelos resultados obtidos (figura 5), observa-se que o fator de grande influência positiva é a voltagem do detector, e o fator de maior influência negativa é o fluxo na coluna.

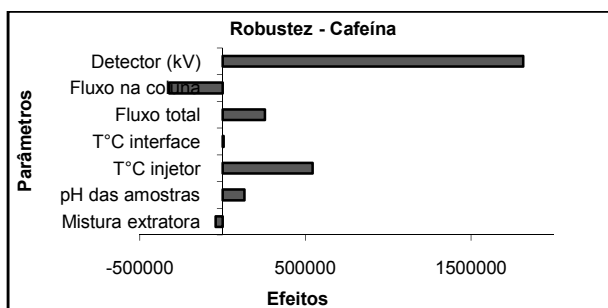


Figura 5. Gráfico dos efeitos proporcionados por cada variável.

Pelo gráfico Rankit (figura 6), conclui-se que os efeitos observados não afetam de forma significativa os resultados, visto que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro mais crítica (ME) e bem abaixo da margem de erro superior (SME). Exceto para a voltagem do detector (G) que permaneceu no limite da margem ME, significando que para essa variável é necessário uma maior atenção na aplicação da metodologia.

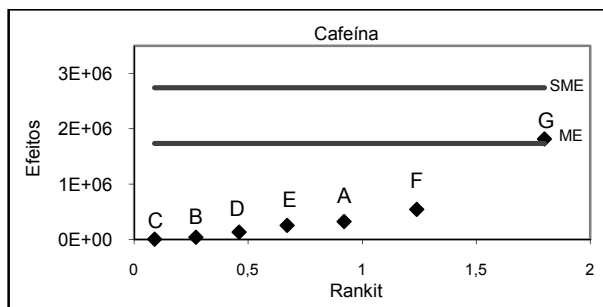


Figura 6. Gráfico de rankit para cafeína.

3.7. Cálculo de Incerteza

Para garantir a qualidade dos resultados gerados em química analítica, é necessário fazer uma estimativa da medida de incerteza, a fim de minimizar os possíveis erros de medições. A apresentação de um resultado obtido por um método analítico somente é completa se estiver associada à incerteza de medição envolvida na obtenção desse valor, isto é, uma estimativa dos limites dentro dos quais os desvios do valor de um mensurando são previstos de se situar. Assim, o conceito de incerteza está diretamente associado à variabilidade do resultado analítico (Eurachem, 2009; Otomo, 2010).

A incerteza pode ser obtida por meio do desvio padrão experimental de sucessivas medições, que é considerado o modo direto. Ou ainda, por fontes externas como certificados de fabricantes, materiais de referência certificados, dados de manuais entre outros, obtidos por outros meios que não o desvio padrão, é considerado o modo indireto.

A incerteza é a combinação das medidas de todas as fontes que puderem ser identificadas, tais como pureza de padrões, amostragem, efeito matriz, interferentes, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações atribuídas ao método ou à medição e variação aleatória (Guia Eurachem, 2002; Eurachem, 2009; Otomo, 2010). Para identificar mais facilmente essas fontes de incerteza, adotou-se o diagrama de causa e efeito (Ishikawa). Na figura 7, são apresentadas as “grandezas de saída” e os fatores que influenciam na medida dessa grandeza, denominados “grandezas de entrada” (Eurachem, 2009; Otomo, 2010).

O conjunto das incertezas identificadas para uma grandeza de entrada levará à

estimativa da incerteza combinada para o resultado do mensurando (y). Em seguida se faz a combinação pela soma quadrática das grandezas de entrada (Equação 8), resultando na Incerteza Padrão Combinada, $u_c(y)$.

$$u_{c(C_{caf})} = \sqrt{(u_{V_{final}})^2 + (u_R)^2 + (u_{curva})^2} \quad (\text{Eq.8})$$

Por fim, a incerteza expandida (u_E) é obtida pela multiplicação da $u_c(y)$ por um Fator de Abrangência, $k=2$ para 6 graus de liberdade e 95% de confiança, sendo essa a incerteza reportada junto com o resultado final.]

Na figura 8 é representada graficamente a influência das principais incertezas envolvidas, onde pode ser observado que a maior contribuição para a incerteza global está associada à curva analítica, provavelmente por estar relacionada à concentração e à resposta obtida pelo equipamento.

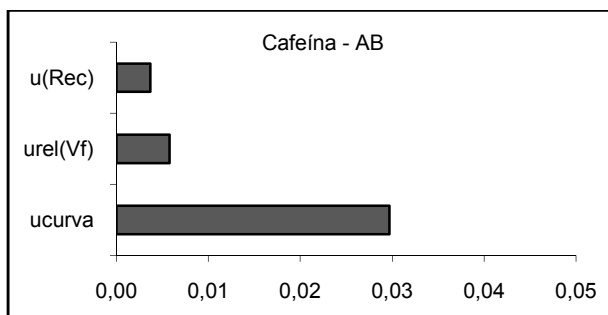


Figura 8. Influência das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação da cafeína em matriz de água bruta

3.8. Aplicação da metodologia

Após a comprovação da adequação do método para determinação de cafeína em águas superficiais, por meio da validação, este foi aplicado em amostras de água superficial do rio Paraíba do Sul, sendo possível reportar com confiabilidade e segurança os resultados obtidos. Na tabela 8 são apresentados os resultados de seis períodos amostrados, 3 em 2010 (junho, setembro e novembro) e 3 em 2011 (junho, outubro e dezembro).

Os valores são referentes às médias de 3 medições e os resultados são reportados com os respectivos valores das incertezas associadas. O período amostral abrangeu épocas semelhantes de anos diferentes para

que se possa fazer uma comparação.

Com os resultados obtidos observa-se uma baixa concentração dos compostos estudados para todos os pontos de coleta da região avaliada. A cidade de Guararema se mostrou a menos impactada pois em todas as campanhas apresentou concentrações abaixo do LD. Já as outras cidades apresentaram valores, em sua maioria, entre o LD e o LQ, como era de se esperar pois Guararema é a que possui menor população dentre os quatro municípios estudados. Pindamonhangaba, apesar de ter uma população menor que São José dos Campos, apresentou concentrações mais elevadas, levantando a hipótese de que possa haver alguma descarga entre os dois municípios.

CONCLUSÕES:

O método desenvolvido se mostrou adequado para a identificação e quantificação de cafeína, atingindo o objetivo principal deste trabalho, apresentando boa seletividade, linearidade, precisão e exatidão, além de mostrar-se robusta para as pequenas variações avaliadas.

A utilização da cafeína como marcador para controle da qualidade das águas é uma forte indicação da contribuição antrópica, entretanto diferentes fatores ambientais como dispersão e diluição dos poluentes na água e possíveis descargas entre os pontos avaliados, devem ser levados em consideração sendo necessário fazer um estudo mais aprofundado a fim de elucidar tais fatores.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem: à SABESP pela logística e coleta das amostras; ao IPEN-CNEN/SP pela disponibilidade da infraestrutura dos laboratórios e pela oportunidade de desenvolver este trabalho; e à CNPQ, FAPESP e CAPES pelos diferentes apoios financeiros.

REFERÊNCIAS:

1. Barber, L. B.; Leenheer, J. A.; Pereira, W. E.; Noyes, T. I.; Brown, G. K.; Tabor, C. F.; Writer, J. H. U.S. Geological Survey Circular 1133, 1995, 115.
2. Braga, B.; Hespanhol, I.; Conejo, J.G.L.; Barros, M.T.L. de.; Spencer, M.; Porto,

- M.; Nucci, N.; Juliano, N.; Eiger, S. *Introdução à Engenharia Ambiental*. 1 ed. Prentice Hall: São Paulo, 2002.
3. Bueno, P. C. P. *Dissertação Mestrado*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
 4. Buerge, I. J., Poiger, T., Muller, M. D., Buser, H-R. *Environ Sci Technol* 2003, 37, 691.
 5. Ceivap. Relatório de situação. Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul. <http://www.ceivap.org.br/downloads2011/relsit2011.pdf>, acessada em dezembro 2011.
 6. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1987.
 7. COPPETEC. Diagnóstico dos recursos hídricos. Relatório final. <http://www.ceivap.org.br/downloads/PSR-010-R0.pdf>, acessada em abril 2010.
 8. DE Maria, C. A. B., Moreira, R. F. A. *Quim. Nova* 2007, 30, 99, 2007.
 9. EURACHEM-CITAC. <http://www.measurementuncertainty.org>, acessada em abril 2009.
 10. Furusawa, H. A. Planilha eletrônica para Validação de Ensaios Químicos – trabalho não publicado
 11. Ghiselli, G.; Jardim, W. F. *Quim. Nova* 2007, 30, 695.
 12. GUIA EURACHEM. Determinando a incerteza na medição analítica. 2ed. Versão Brasileira. 2002.
 13. INMETRO – Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007
 14. INMETRO – Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010.
 15. INMETRO – Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011.
 16. Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1202.
 17. Libânio, M. *Fundamentos de qualidade e tratamento de água*. 2.ed. Editora Átomo: Campinas, 2008.
 18. Mansilha, C.; Melo, A.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Pinho, O.; Domingues, V.; Pinho, C.; Gameiro, P. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 6681.
 19. Monteiro, M. C.; Trugo, L. C. *Quim. Nova* 2005, 28, 637.
 20. Otomo, J. I. *Dissertação de mestrado*, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares /USP, Brasil, 2010.
 21. Reis Filho; R. W.; Araújo, J. C.; Vieira, E.M. *Quím. Nova* 2006, 29, 817.
 22. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Quim. Nova* 2004, 27, 771.
 23. Richardson, S. D. *Anal. Chem.* 2009, 81, 4645.
 24. Seiler, R. L.; Zaugg, S. D.; Thomas, J. M.; Howcroft, D. L. *Ground Water* 1999, 37, 405.
 25. Siegener, R.; Chen, R. F. *Mar. Pollut. Bull.* 2002, 44, 383.
 26. Silva, A. M.; Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
 27. Souza, R. R. *Dissertação de mestrado*, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares /USP, Brasil, 2011.
 28. Stackelber, P. E.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, E. D.; Henderson, A. K.; Reissman, D. B. *Sci. Total Environ.* 2004, 329, 99.
 29. Standley, L. J.; Kaplan, L. A.; Smith, D. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 3124.
 30. Streck, G., *Trends in Analytical Chemistry* 2009, 28, 63.
 31. Tubbs Filho, D. ; Freire, R. B. ; Yoshinaga, S. In: XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2004, Cuiabá.
 32. Verenitch, S. S.; Mazumder, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 2635.
 33. Wang, H. X.; Zhou, Y.; Jiang, Q. W. *Microchemical Journal* 2012, 100, 83.
 34. Xu, J.; Wu, /I.; Chen, W.; Chang, A. C. *Journal of Chromatography A.* 2008, 1202, 189.

Tabela 6. Fatores selecionados para a avaliação da robustez

Fator		Nominal		Variação
Mistura extratora	A	60 _{DCM} :40 _{MeOH}	a	40 _{DCM} :60 _{MeOH}
pH das amostras	B	3	b	6
Temperatura do injetor °C	C	265	c	240
Temperatura da interface °C	D	270	d	250
Fluxo total, mL.min ⁻¹	E	28	e	35
Fluxo na coluna, mL.min ⁻¹	F	1,6	f	2
Voltagem do detector, kV	G	2,5	g	2,2

Tabela 8. Resultados (em µg.L⁻¹) da análise de cafeína em amostras (1 L) de água bruta de Guararema, Pindamonhangaba, Taubaté e São José dos Campos.

Período de coleta	São José dos Campos	Guararema	Pindamonhangaba	Taubaté
junho/2010	< 0,080	< LD	0,101 ± 0,055	< 0,080*
setembro/2010	< 0,080	< LD	0,106 ± 0,052	< 0,080*
novembro/2010	< LD	< LD	< 0,080*	< 0,080*
junho/2011	< 0,080*	< LD	< 0,080*	< 0,080*
outubro/2011	< LD	< LD	< LD	< LD
dezembro/2011	< LD	< LD	< LD	< LD

* LQ = 0,080 µg.L⁻¹

LD = 0,013 µg.L⁻¹

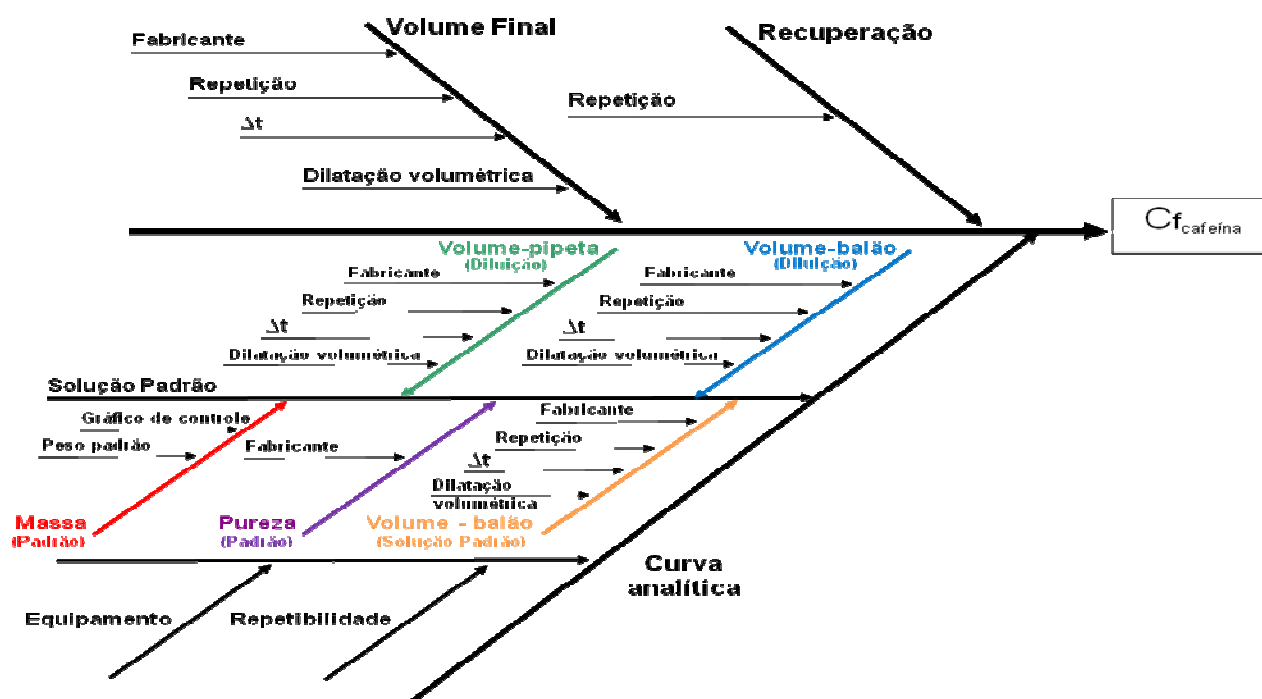


Figura 7. Diagrama de causa e efeito com as grandezas de incerteza que foram identificadas