CAPÍTULO XII

Aspectos analíticos para a determinação de contaminantes ambientais no contexto da ecotoxicologia

*Cassiana C. Montagner, Cristiane Vidal, Beatriz De Caroli Vizioli, Luiz Eduardo Thans Gomes

Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas

*ccmonta@unicamp.br

<https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-12>

RESUMO

O objetivo deste capítulo é apresentar ao leitor as três perguntas sobre contaminantes que são feitas com maior frequência para os químicos ambientais – “O que tem?”, “O quanto tem?” e “O que fazem?” - e que representam a intersecção entre química analítica e a ecotoxicologia, onde a primeira é a responsável por identificar, a segunda, por quantificar os poluentes químicos, e a terceira traz o aspecto interdisciplinar desta área, relacionando através da avaliação do risco, a exposição (dada pela ocorrência) com o perigo (mensurado pelos testes ecotoxicológicos), a fim de indicar os possíveis efeitos sobre a fauna, a flora ou aos seres humanos diante da presença dos poluentes químicos. Como se trata de um campo do conhecimento que contempla uma vasta gama de áreas e subáreas, o texto terá um caráter informativo/orientativo, principalmente de fornecer os requisitos, do ponto de vista técnico, necessários para se poder empregar um método analítico de maneira correta e confiável – empregando os parâmetros necessários para validação e quais as técnicas mais comumente utilizadas nas determinações químicas dos contaminantes, sejam em amostras ambientais ou em testes ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Compostos Emergentes; Cromatografia; Ecotoxicologia; Química Ambiental; Validação Analítica

INTRODUÇÃO

Ao nos depararmos com um copo de água, limpa e cristalina, temos a impressão de que ela é a mais pura das substâncias. Mas, infelizmente, pode haver um perigo invisível mesmo em águas claras e límpidas, sejam de rios ou de abastecimento público, porque algumas substâncias podem estar presentes na água em quantidades insuficientes para serem percebidas em atributos sensoriais (cor, odor, sabor, etc.), mas suficientes para ocasionarem algum efeito danoso aos organismos ou ao homem. Assim, para entender mais profundamente a qualidade de um rio com relação à estas substâncias imperceptíveis a olho nu, é necessário olhar para dois aspectos: a exposição e a toxicidade.

Neste capítulo, abordaremos o que são essas substâncias invisíveis, qual a ordem de grandeza que elas ocorrem, como se faz para medir essa ordem de grandeza a fim de obter dados de ocorrência, para, enfim, realizar uma avaliação de risco empregando os testes ecotoxicológicos mensurando o perigo.

Substâncias invisíveis: os contaminantes emergentes

Contaminantes orgânicos podem ser definidos como sendo substâncias químicas de origem sintética ou natural que estão presentes no meio ambiente em diferentes níveis de concentrações desde mg L^{-1} a ng L^{-1} ou menores (Luo et al., 2014). Alguns milhares deles têm chamado a atenção da comunidade científica nas últimas décadas e classificados como contaminantes emergentes, pois apresentam potencial de causar efeitos crônicos em concentrações traços (da ordem de ng L^{-1}), e não estão inseridos nas regulamentações vigentes. Algumas classes bastante populares estão listadas a seguir cuja evidências mostram capacidade de causarem efeitos nos sistemas endócrino e neurológico ou carcinogenicidade:

- Fármacos (antibióticos, analgésicos, antidepressivos)
- Pesticidas (herbicidas, inseticidas, acaricidas)
- Fenóis (bisfenol, octilfenol, nonilfenol)

- Produtos de higiene e beleza (filtros solares, antimicrobianos como o triclosan)
- Retardantes de chama (polifenilas bromadas, éter difíceis bromados)
- Hormônios naturais e sintéticos (estrone, estriol, estradiol e etinilestradiol)

A fonte majoritária destas substâncias para o ambiente são os efluentes domésticos e industriais, além das atividades agropecuárias. Como as estações de tratamento de esgoto (ETE) não foram projetadas para remover tais contaminantes, elas, juntamente com o aporte ilegal *in natura*, se tornam os principais meios de acesso destas substâncias ao meio ambiente (Montagner et al., 2017; Alves et al., 2017; Bolong et al., 2009).

Qual a ordem de grandeza que encontramos os contaminantes emergentes no ambiente?

A exposição de organismos aos contaminantes emergentes está relacionada com a quantidade da substância no compartimento ambiental. Em termos técnicos, quando consideramos a quantidade de uma substância presente em uma determinada massa de sedimento ou volume de água, ela é avaliada em termos de *concentração* dessa substância na amostra, ou seja, a *razão entre quantidade da substância e a massa ou o volume da amostra*. Em rios, a concentração dessas substâncias é muito pequena e os próximos parágrafos trarão uma reflexão da ordem de grandeza desse número e quanto trabalhoso é na prática a obtenção de um resultado confiável.

Concentrações podem ser expressas, por exemplo, como gramas por litro (g L^{-1}) ou gramas por quilograma (g kg^{-1}). Quando as concentrações são consideradas altas, elas podem ser expressas em termos de porcentagens (%). Quando expressas em porcentagem, é preciso observar se a relação é mássica (massa/massa, % m/m), volumétrica (volume/volume, % v/v) ou massa por volume (% m/v). Essa informação sobre a relação mássica ou volumétrica é importante porque a densidade do meio influencia. Por exemplo, a densidade da água oceânica é diferente da densidade da água de uma lagoa ou de um rio, assim, a comparação de resultados deve ser feita com cautela. Para enfatizar a importância das *unidades* dos parâmetros medidos, apresentaremos um

exemplo usando a substância açúcar. Ela não é considerada um contaminante, mas será utilizada por ser uma substância do dia a dia. Imaginemos uma colher de chá de açúcar (consideremos 10 g de açúcar nessa colher) adicionada a uma jarra contendo 1 litro de água. A porcentagem resultante de açúcar na água é de 1% m/v. Para a finalidade do exemplo, consideremos a densidade da água a $1,00 \text{ g cm}^3$ (1000 kg m^3), assim, a porcentagem mássica resultante também é 1,00% m/m. Mas se a mesma quantidade de açúcar (1 colher de chá, 10 g) for adicionada à 1 litro de óleo de soja, a concentração 1,00% m/v se mantém, porém, a porcentagem mássica é 1,12% m/m, considerando a densidade do óleo a $0,89 \text{ g cm}^3$. Assim, a padronização das *unidades* na expressão de uma concentração é essencial.

Se a mesma quantidade de açúcar (10 g) fosse adicionada agora a uma piscina infantil contendo 1.000 L (mil litros) de água, a concentração resultante do açúcar na água seria 0,001% m/v ($\sim 0,001 \% \text{ m/m}$). Para estas concentrações menores, torna-se mais prático expressá-las em termos de *partes* ou utilizando os prefixos mili (m, 10^{-3}), micro (μ , 10^{-6}) ou nano (n, 10^{-9}). Assim, essa mesma concentração pode ser expressa como 10 partes (a unidade de “parte” neste exemplo é o grama, considerando os 10 g de açúcar) em 1 milhão de partes de água ($1.000 \text{ L} \sim 1.000 \text{ kg} = 1.000.000 \text{ g} = 1 \times 10^6 \text{ g}$). Assim, a concentração de 0,001% m/m pode ser expressa simplesmente como 10 ppm, ou seja, 10 partes por milhão (ppm). Observa-se que é importante manter as unidades das “partes” constantes, por isso a conversão de litros em gramas. Em soluções em que a densidade é 1 g/cm^3 , a unidade *ppm* é equivalente a miligrama por litro (mg L^{-1}).

Apesar de parecer pouco (uma colher de açúcar em 1.000 L de água), essa concentração ppm ou mg L^{-1} é considerada relativamente alta para fins de ocorrência ambiental de alguns contaminantes em águas. Na área ambiental, é comum relacionar que as substâncias ocorrem em nível traço, ou seja, ainda menores que ppm. Alguns contaminantes ocorrem em níveis de partes por bilhão (ppb). Para fornecer ao leitor uma noção da concentração na ordem de ppb, seria como dissolver a quantidade da colher de chá de açúcar em uma piscina olímpica completamente cheia de água, de dimensões (50 x 25 x 2) m. Nos casos de soluções infinitamente diluídas com densidade 1 g/cm^3 , podemos aproximar ppb como microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$). Outros contaminantes

ocorrem em concentrações ainda menores: em partes por trilhão (ppt), em geral também expresso como nanogramas por litro (ng L^{-1}). Neste caso, seriam os mesmos 10 g de açúcar em mil piscinas olímpicas.

São concentrações tão baixas que é difícil de dimensionar. Naturalmente surgem muitas dúvidas: Como é possível medir? Como confiar nos resultados? E a mais intrigante pergunta: uma concentração tão baixa assim “faz mal” aos organismos aquáticos ou ao homem?

As respostas para estas perguntas não são triviais e são necessários anos de estudos analíticos e ecotoxicológicos para respondê-las. Suponhamos que um rio esteja contaminado com um fármaco em nível de 20 ppb ou $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (é uma concentração considerada pouco provável de acontecer na prática, mas poderia acontecer). Suponhamos ainda que esse rio seja um manancial e que o tratamento na Estação de Tratamento de Água (ETA) não seja eficiente para remover este fármaco. Ao ser distribuída às casas, essa água pode ser ingerida por um cidadão. Ao ingerir 1 litro de água, a pessoa terá ingerido uma massa de 20 microgramas do fármaco. Se pensarmos que existem medicamentos que são formulados com essa quantidade de ingrediente ativo, ou seja, microgramas da substância em um único comprimido, faz-se a reflexão de que essa pequena concentração (ppb) é suficiente para provocar um efeito em um humano. Por analogia, seria como ingerir o equivalente a um comprimido de fármaco para cada litro de água ingerido. Estendendo o raciocínio, essa concentração no rio também poderia causar um efeito adverso a organismos aquáticos e por isso deveria ser investigado com mais detalhes.

A seguir abordaremos os conceitos para responder às perguntas de como medir, como confiar na medida, para, por fim, entender se faz mal, que seria o aspecto ecotoxicológico.

Como é feita a investigação dos contaminantes presentes na água?

A ocorrência de contaminantes emergentes em corpos aquáticos é preocupante mesmo em baixas concentrações e tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. As substâncias possuem comportamentos diferentes, o que faz com que algumas só causem efeitos adversos em nível ppm, enquanto que outras apresentem efeitos em nível ppt. A discussão sobre

esses efeitos e como eles são avaliados está descrita em detalhes nos outros capítulos deste livro.

Uma vez entendido que o perigo existe, como fazer para encontrar, isolar e medir essas concentrações tão baixas? Para isso, é necessária a aplicação do que se chama *método analítico*, o qual pode ter dois escopos: quantitativo e qualitativo. A aplicação de um método analítico para calcular uma concentração é o que se denomina *quantificação* ou *determinação*. Uma vez que se deseja saber o “quanto tem” de uma substância numa amostra, trata-se de uma *análise quantitativa*. Mas muitas vezes o interesse é saber “o que” tem numa amostra, sem necessariamente quantificar, ou seja, sem determinar quanto tem daquela substância. A identificação de uma substância é obtida por meio de uma *análise qualitativa*.

Independentemente de se tratar de uma análise quantitativa ou qualitativa, o método analítico apresenta três etapas principais: a amostragem, o processamento da amostra para torná-la adequada à medição que será realizada em um determinado equipamento e, por fim, a análise instrumental em si.

A amostragem deve ser representativa para se obter a resposta do cenário objeto do estudo (estudo pontual, sazonal, temporal, etc.). Por exemplo, para estudar a concentração instantânea de um contaminante num rio, pode-se realizar a amostragem em diferentes pontos do rio e avaliá-las separadamente. Esta amostragem é do tipo discreta. É também possível coletar em vários pontos do rio e unir todo o volume coletado em uma única amostra para obtenção de uma concentração média, assim como coletar várias vezes um mesmo local em função da vazão ou tempo. A amostra resultante é denominada de composta. A teoria de amostragem é muito importante, abrangente e considera aspectos estatísticos para representatividade, assim, uma discussão mais aprofundada não está no escopo deste capítulo. Para tanto, o leitor é convidado a consultar literatura específica sobre amostragem (Cetesb, 2011; Parron et al., 2011).

No entanto, ainda com relação à amostragem e sabendo que o interesse neste capítulo será a análise de traços de compostos orgânicos em matrizes aquáticas, é importante destacar que o volume de amostra a ser coletada em cada ponto deve ser suficiente para conter uma quantidade instrumentalmente

mensurável da substância de interesse ao final do preparo de amostra, considerando todas as etapas e as possíveis perdas envolvidas em cada processo. Já foi apresentada a ordem de grandeza em que estes contaminantes ocorrem, em mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} , assim, a escolha do volume amostrado deve considerar o processamento da amostra e o equipamento disponível para a análise quali ou quantitativa.

Foi visto que 1 L de água coletada de um corpo aquático pode conter microgramas ou nanogramas do contaminante que se deseja estudar e, por se tratar de uma amostra ambiental, vários outros constituintes também estarão presentes nesse volume em concentrações maiores: material particulado em suspensão, microorganismos, metais, sais, nutrientes e outros contaminantes orgânicos que não serão de interesse para a análise requerida. Estes constituintes são o que compõem a *matriz* da amostra e ela pode interferir na análise química dos contaminantes de interesse. Assim, após a amostragem, tem-se a etapa de preparo de amostras, que tanto visa isolar os compostos de interesse, quanto diminuir a interferência da matriz e, ao final, obter uma quantidade mensurável do analito (composto ou substância) que possa ser analisada pelo equipamento escolhido com o mínimo de interferentes possíveis.

Existem diversas técnicas de preparo de amostras e a escolha delas depende da matriz, da natureza do analito (a qual está relacionada com as propriedades físico-químicas dos mesmos), do nível de concentração em que se encontra na amostra, bem como a maneira em que os analitos de interesse devem estar disponibilizados para a análise instrumental, etc. Assim, todas as etapas do método analítico devem ser pensadas em conjunto para garantir a confiabilidade dos resultados e a representatividade diante do cenário que está sendo estudado.

A última etapa do método analítico, a análise instrumental, utiliza poucos microlitros de amostra, que precisam representar a amostra ou a população (ambiente) de onde a amostra foi coletada. Desta forma temos o preparo de amostras como uma ponte entre a amostragem e a detecção. De um lado, a amostragem deve ser representativa, mas em geral coleta-se cerca de mL ou poucos litros de amostra. Por outro lado, um volume muito pequeno é utilizado no final. Assim, é comum relacionar o preparo de amostras como a etapa de tornar a amostra mais concentrada em termos do analito, ou seja, existe uma

pré-concentração da amostra para a análise instrumental. Esta ponte do preparo de amostra é uma etapa crucial, que se não realizada de maneira adequada, pode comprometer todos os resultados.

Existem diversas técnicas analíticas, clássicas ou modernas, para a etapa de pré-concentração de compostos orgânicos: extração líquido líquido (LLE, do inglês *liquid liquid extraction*), extração por *headspace*, extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), técnicas miniaturizadas (e.g. microextração em fase sólida, microextração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado), extração por fluido supercrítico, dentre outros. Por muitos anos a extração líquido-líquido, que emprega o princípio da partição entre uma fase orgânica e a água, foi a mais empregada para análise de compostos orgânicos, mas atualmente, as mais comuns são a SPE e a SPME, que se mostraram mais versáteis, empregando menos solventes orgânicos e, devido à grande variedade de fases extratoras comercializadas, trouxe ao preparo de amostras maior seletividade, o que facilitou a remoção de inúmeros interferentes que não eram facilmente separados por LLE, por exemplo. Detalhes sobre essas técnicas podem ser obtidos em literatura específica sobre o assunto (Borges et al., 2015; Moldoveanu and David, 2015; Simpson, 2000; Skoog et al., 2015, 2009).

Em seguida ao preparo de amostra, seguem-se as análises instrumentais, qualitativas ou quantitativas. Nas quantitativas, as concentrações dos analitos são determinadas por meio de curvas analíticas (regressão entre resposta instrumental em função da concentração de uma solução padrão, ou seja, uma solução preparada com concentração conhecida – a regressão será detalhada na próxima seção), de acordo com a Fig. 1. As soluções padrão podem ser preparadas em solvente ou na própria matriz (*matrix-matched standard*). O método de quantificação pode ser por padronização externa, padronização interna (em geral com uso de padrão isotopicamente marcado), adição de padrão, além do uso da curva na matriz. Para uma leitura sobre estratégias de quantificação, é sugerida ao leitor literatura específica (Čelić et al., 2017; Robards et al., 2004).

Fig.1. Exemplo de curva analítica. Sua obtenção se inicia pelo preparo de soluções padrão (de concentrações conhecidas e crescentes do composto de interesse) que são analisadas pelo equipamento na mesma condição da amostra e as respostas instrumentais são registradas. A curva analítica é a equação obtida pela regressão dos pontos de um gráfico que representa a resposta instrumental para cada uma das soluções-padrão em função da concentração do composto. No caso da cromatografia, utiliza-se como resposta a área do pico referente ao composto de interesse.

As técnicas instrumentais analíticas mais utilizadas para a determinação de compostos orgânicos em nível traço são as cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS). Citam-se a cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC), acopladas à MS sequencial ou não.

Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica que está entre as mais usadas mundialmente, com sua aplicação abrangendo diversas áreas (farmacêutica, alimentícia, médica, agrícola, etc.). Seu princípio consiste em fazer a amostra de interesse passar através de uma fase estacionária imiscível (coluna cromatográfica), arrastada por uma fase móvel (que pode ser líquida ou gasosa), separar os componentes desta amostra devido as interações com a fase estacionária, e então detecta-los e quantifica-los através de alguma propriedade intrínseca à estes componentes, tais como absorção de luz ultravioleta, índice de refração, propriedades eletrônicas, espectro de massas, etc.

Atualmente existe uma vasta gama de colunas cromatográficas com características específicas para a análise de um determinado grupo de

compostos. O advento dos sistemas de alta e ultra pressão (próprios da cromatografia líquida) e a automação dos sistemas de injeção de amostra no sistema tornaram as análises mais rápidas, viabilizando o aumento do número de amostras.

Aliado a tudo isso e mais especificamente na área ambiental, a integração da cromatografia à espectrometria de massas, conferiu à parte analítica um alto grau de especificidade, característica essencial quando se lida com matrizes complexas, como águas superficiais e subterrâneas.

Cromatografia Líquida de Alta Pressão (ou Performance) - HPLC

É o mais difundido e, devido à evolução tecnológica, o mais sofisticado sistema cromatográfico disponível. Suas principais vantagens são a versatilidade e a possibilidade de muitas alternativas de fases móveis e estacionárias, as quais combinadas oferece uma variedade de configurações para a separação dos compostos.

A instrumentação básica de um cromatógrafo líquido (comercialmente conhecido por sua sigla em inglês, HPLC, de *High Pressure Liquid Chromatography*, alguns definem como *High Performance Liquid Chromatography*) está sumarizada na figura 2, que representa um esquema geral desse sistema cromatográfico. O acoplamento com a espectrometria de massas, trouxe a nomenclatura mais simples de cromatografia líquida (do inglês, LC, *Liquid Chromatography*). O emprego de pressões maiores que as usualmente empregadas, conferiu ainda a alguns sistemas o nome de HRLC, do inglês, *High Resolution Liquid Chromatography*. Porém todos com o mesmo princípio básico descrito na Fig. 2.

Fig. 2. Representação esquemática de um sistema de HPLC.

O sistema consiste em uma bomba capaz de gerar altas pressões (podem chegar a 10000 psi) que impulsiona a fase móvel pelo sistema. A amostra, que estará dissolvida/diluída em um solvente apropriado (muitas vezes a própria fase móvel) é introduzida neste percurso através do injetor e consequentemente na coluna cromatográfica (fase estacionária) onde os seus componentes serão separados e depois direcionados para um detector, o qual produzirá um sinal que será captado por um *software*.

Importante mencionar que na maioria dos tipos de cromatografia líquida (fase reversa, fase normal, troca iônica) a separação ocorrerá devido a interações dos componentes da amostra (também chamados analitos) tanto com a coluna quanto com o solvente. Dependendo por quem o analito tiver uma maior afinidade, ele terá um tempo de retenção maior ou menor. Como o solvente da fase móvel tem essa propriedade de “retirar” ou eluir um analito da coluna, ele também é chamado de eluente.

Cromatografia Gasosa

Como o próprio nome já sugere, este tipo de cromatografia tem um gás inerte (os mais comuns são Hélio e Nitrogênio) como fase móvel (também chamada de gás de arraste), mas ao contrário da maioria dos casos da cromatografia líquida, este gás só tem função de transportar as moléculas dos analitos através do sistema cromatográfico, sem nenhuma participação na separação. A Fig. 3 mostra uma representação esquemática simplificada da cromatografia gasosa.

Fig. 3. Representação esquemática de um sistema de cromatografia gasosa

Existem muitas similaridades operacionais entre a cromatografia gasosa e líquida: amostra é injetada no sistema, arrastada pela fase móvel, tem seus componentes separados na coluna cromatográfica e monitorados por um detector apropriado.

Porém, cada etapa apresenta diferenças conceituais. A amostra é injetada no estado gasoso ou líquido (sendo vaporizada posteriormente), o que já aponta uma exigência da técnica – os analitos de interesse da amostra devem ser voláteis ou passíveis de serem transformados, através de reação química, em compostos com tais características. Os analitos são separados não só devido as interações com a coluna cromatográfica, mas também devido a sua volatilidade e pressão de vapor, através da aplicação de um gradiente de temperatura durante a corrida cromatográfica – esta também é a razão da coluna estar fixada dentro de um forno no cromatógrafo a gás (Lanças, 2009, 1993).

Cromatografia acoplada à espectrometria de massas

Todos os tipos de detectores utilizados na cromatografia, seja ela líquida ou gasosa, devem apresentar uma boa sensibilidade, o que lhe permite detectar e quantificar concentrações baixas do analito de interesse, e a máxima seletividade possível, o que evitará que analitos interferentes sejam analisados no lugar do analito de interesse. Como mencionado anteriormente, muitos contaminantes ambientais estão presentes nas matrizes aquáticas, que por si só são consideradas matrizes complexas e dinâmicas (podem conter um número grande de interferentes), em concentrações de nível traço, ou seja, na faixa de ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$) e ppt (ng L^{-1}), o que torna mandatório a utilização de um detector extremamente sensível e seletivo para que os resultados tenham confiabilidade. Atualmente, o detector que supre tais necessidades da química ambiental é o espectrômetro de massas.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica muito utilizada para a caracterização/identificação de compostos orgânicos, cujo princípio está fundamentado em medir a propriedade denominada relação massa e carga (m/z) de uma substância, a qual se fragmenta em outros íons moleculares característicos oriundos do composto precursor de interesse. Estes fragmentos iônicos também são separados em função de m/z . Como cada composto apresenta uma fragmentação própria, caracterizada pelos fragmentos formados e a abundância dos mesmos, isto acaba funcionando como uma impressão digital do composto analisado. Com a união da cromatografia e a

espectrometria de massas, foi possibilitada a confirmação da identidade dos compostos analisados, bem como detectá-los e quantificá-los em concentrações de nível traço (Moldoveanu and David, 2017).

Para análise de traço de compostos orgânicos, o analista pode optar pela análise *target* ou *non-target*. Em geral se utiliza uma estratégia chamada de *análise target* (com tradução livre para análise alvo), quando de antemão o analista sabe o composto que ele quer procurar na matriz e ele utiliza um padrão de referência para confirmação. Assim, escolhe-se uma condição instrumental em que o equipamento é configurado a procurar um composto específico (de acordo com seu padrão de referência) e a análise responde a pergunta “*tem esse composto na amostra?*”. Se a resposta desejada for apenas “sim” ou “não”, ela é uma análise qualitativa, apesar de ser *target*. Entretanto, na maioria das vezes, o interesse do analista numa *análise target* é saber a quantidade ou concentração dessa substância. Então, é necessário fazer uma *curva analítica* utilizando este padrão de referência para que seja possível quantificar o composto. Entretanto, as matrizes ambientais podem conter diversas substâncias, bem como seus produtos de transformação no ambiente. Neste caso, quando se deseja responder à pergunta “quais compostos podem ter na amostra”, de maneira qualitativa, a análise é referida como “*non-target*”. Isso significa que o analista, de antemão, não conhece a amostra e busca saber os possíveis compostos daquela amostra. Assim, o instrumento é configurado para fazer uma varredura (*scan* ou *screening*) e a resposta é comparada a bibliotecas do próprio equipamento. Para estas análises, é necessário o uso de espectrometria de massas de alta resolução. Em casos em que a comparação com a biblioteca sugere a alta probabilidade da presença de um composto, uma outra análise chamada de “*suspect screening*” pode ser realizada para investigar a ocorrência do composto suspeito, ainda sem o padrão de referência, por comparação de biblioteca. Uma vez que o padrão de referência é adquirido para se *confirmar* a presença do composto, a análise passa a ser *target* e pode ser realizado por espectrometria de massas tanto de alta quanto de baixa resolução (Gago-Ferrero et al., 2016; Sander et al., 2017).

Para a confiabilidade dos resultados obtidos, principalmente de análise quantitativa, uma série de parâmetros normatizados devem ser estudados, como descrito a seguir.

Como confiar nos resultados? A validação

O objetivo de qualquer análise química é obter dados consistentes, confiáveis e precisos, para que possam ser interpretados de maneira correta. Contudo, todo resultado de uma análise é influenciado por diversos erros e incertezas inerentes ao processo que produzem uma dispersão de resultados, ou seja, provocam uma variação nos valores experimentais obtidos. Por conta disso, é impossível realizar uma análise química totalmente livre de erros ou incertezas. Isto significa que nunca será possível garantir condições perfeitamente idênticas para cada análise. Assim, se o mesmo método for repetido inúmeras vezes para uma mesma amostra, diferentes resultados serão obtidos no final, isto se refere aos chamados erros aleatórios das análises químicas.

Uma vez que os erros e incertezas nunca poderão ser completamente eliminados, os dados obtidos podem fornecer apenas uma estimativa do valor verdadeiro. A aceitação dos resultados dependerá de tratamentos estatísticos que confirmarão (ou não) sua confiabilidade. Embora nem sempre seja fácil estimar a confiabilidade de dados experimentais, é sempre importante fazê-lo, pois dados com qualidade desconhecida tornam-se improdutivos.

Neste sentido, a validação torna-se uma ferramenta necessária na química analítica para demonstrar o desempenho do método e a confiabilidade dos resultados obtidos. Portanto, antes que um método seja implementado, ele deve ser validado para demonstrar que é adequado para a finalidade a qual se destina, e que os resultados compõem uma sequência aleatória, ou, que o método está em condições de controle estatístico.

Segundo a definição da *International Organization for Standardization* (ISO), validação é a "confirmação, através de evidência objetiva, de que os requisitos para o uso específico pretendido ou para uma aplicação foram atendidos". A validação é tida como o processo de garantir que um procedimento analítico seja confiável e possa atender às expectativas de uma aplicação específica, de modo a garantir que todos os resultados experimentais obtidos estejam de acordo com o valor verdadeiro (e desconhecido) do analito na amostra, além de estabelecer as limitações de desempenho do método e de identificar fatores que possam influenciá-las.

Validação de um método

Os resultados da validação do método podem ser utilizados para avaliar a qualidade, confiabilidade e a consistência dos resultados analíticos, portanto, é parte integrante de boas práticas analíticas. Atualmente, existem várias organizações nacionais e internacionais que fornecem diretrizes sobre validação. Como exemplo podemos citar: Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *International Organization for Standardization* (ISO), *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC), *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), *Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry* (CITAC), entre muitos outros. Apesar da vasta literatura disponível sobre validação, há ainda muitas divergências entre os guias. Embora exista um consenso geral entre as diretrizes de validação, a diversidade prevalece em termos de nomenclatura, metodologia empregada e critérios de aceitação. No Brasil, a Resolução 169 da Anvisa (ANVISA, 2017) e o guia DOQ-CGCRE-008 do Inmetro (Inmetro, 2016), são documentos que podem servir de guia na execução da validação de um método.

A validação de método é um processo longo e muitas vezes complexo. Ela inicia quando um método é implementado e termina quando ele é descontinuado. A validação implica não apenas em definir e avaliar os parâmetros mais importantes de desempenho do método, mas também deve ser um protocolo detalhado sobre como operar e transferir métodos analíticos e procedimentos envolvidos.

O primeiro passo em um procedimento de validação deve ser a identificação do problema analítico e dos requisitos necessários para solucioná-lo. Em seguida deve-se definir o motivo da validação, os parâmetros (figuras de mérito) a serem avaliados e seus experimentos associados e os requisitos que precisam ser atingidos. Assim, a validade de um método deve ser comprovada em sua documentação, que deve descrever como o método foi realizado, quais parâmetros foram investigados durante o processo de validação e quais foram os resultados do estudo de validação. O método será considerado totalmente

validado quando todos os requisitos forem atendidos e todo o processo estiver documentado.

Após a definição dos parâmetros de desempenho, sua metodologia associada e a realização dos experimentos necessários, uma decisão deve ser tomada sobre a qualidade dos resultados. Como, no entanto, o valor "*verdadeiro*" ou "*correto*" do resultado nunca poderá ser determinado exatamente, devido aos erros aleatórios, a questão principal será: a partir de que ponto os resultados podem ser considerados válidos? Ou, qual é a maior incerteza que se pode tolerar neste resultado?

Quando os métodos são retirados de leis ou diretrizes, os requisitos devem ser obrigatoriamente seguidos de acordo com o estipulado e a decisão de validação deve basear-se neles. Quando a decisão sobre a adequação da validação é baseada em guias, cada parâmetro poderá ter uma decisão separada. Por fim, se não houver requisitos externos, o analista poderá estabelecer seus próprios requisitos com base em seu conhecimento e experiência.

Figuras de mérito

A escolha dos parâmetros a serem avaliados pode variar de acordo com o problema analítico; cada técnica analítica empregada possui características próprias e, portanto, indicam quais parâmetros de validação precisam ser investigados. No entanto, as principais figuras de mérito para a validação de um método analítico são apresentadas a seguir.

Robustez

A robustez é uma medida da capacidade do método analítico em permanecer inalterado sob pequenas variações internas. Ela avalia a constância dos resultados quando variáveis inerentes ao método (parâmetros operacionais) variam deliberadamente, fornecendo uma indicação da confiabilidade do método durante seu uso.

O teste de robustez determina a influência que cada parâmetro operacional tem sobre os resultados da análise e, se a influência estiver dentro de uma tolerância especificada, diz-se que o parâmetro está dentro da faixa de

robustez do método. Desse modo, o estudo da robustez também auxilia a avaliar a necessidade de revalidação do método quando um ou mais parâmetros precisam ser alterados.

Para realizar o estudo da robustez há duas abordagens possíveis; o procedimento de um fator por vez (OFAT, *one factor at a time*) e o procedimento de planejamento experimental.

O procedimento OFAT avalia o efeito na resposta com a variação de um único fator, enquanto os outros fatores são mantidos fixos. Esta abordagem univariada, embora frequentemente adotada, não é a mais recomendada para o estudo da robustez, pois além de exigir um número maior de experimentos, não leva em consideração a possibilidade de interação entre fatores. Portanto, a maneira mais conveniente de determinar a robustez de um método é usando procedimentos de planejamento experimental que variam todos os fatores estudados simultaneamente. Não obstante, avaliação da robustez é geralmente complexa e laboriosa dado que o número de parâmetros a serem estudados costuma ser grande, portanto, é interessante considerar o estudo da robustez durante a fase de desenvolvimento do método analítico.

Seletividade/Especificidade

Obter um sinal livre da influência de outras espécies contidas em uma amostra e, assim, inequivocamente atribuí-lo ao analito de interesse, sempre foi um grande desafio na química analítica. As amostras quase sempre contêm compostos (que não são de interesse para a análise), porém com propriedades semelhantes às do analito; esses compostos são chamados de interferentes. Portanto, a identidade de um sinal presumivelmente pertencente ao analito deve ser, antes de tudo, confirmada. A busca por seletividade ou especificidade é de grande importância principalmente em amostras em que o analito encontra-se em baixas concentrações, pois interferentes em potencial podem estar presentes em concentrações mais altas que o analito de interesse.

Um interferente pode tanto agir como o analito e produzir um sinal indistinguível do sinal do analito, como suprimir ou aprimorar o sinal do analito de interesse. Nesse sentido, a seletividade ou a especificidade do método devem fornecer um discernimento sobre sua confiabilidade.

Embora possuam significados diferentes, é muito comum ver ambos os termos serem utilizados sem distinção. Seletividade refere-se à extensão em que um método pode determinar vários analitos em uma mistura complexa sem a interferência de outros componentes. A especificidade, por sua vez avalia a capacidade do método em produzir um sinal que dependa quase exclusivamente de um analito em questão.

Essa definição é frequentemente usada de maneira equivocada como equivalente à especificidade. Contudo, especificidade deve ser considerada a seletividade perfeita, ou a ausência absoluta de interferentes; significa que nenhuma interferência deve ocorrer. Por definição, a especificidade é a capacidade de avaliar inequivocamente o analito na presença de componentes que possivelmente encontram-se na amostra.

A seletividade só pode ser descrita para um sistema matriz-analito em particular, pois o mesmo método pode ter diferentes seletividades para o mesmo analito em matrizes distintas.

A avaliação de seletividade pode tornar-se um processo longo e várias estratégias podem ser adotadas, as quais dependerão das técnicas envolvidas e do tipo de sinal fornecido.

Uma das estratégias mais utilizadas para a avaliação da seletividade é o estudo experimental sistemático da interação do analito com seus possíveis interferentes. A seletividade é avaliada através da comparação de análises de amostras branco (sem o analito) contendo os interferentes, em relação a análises de amostras contendo tanto o analito quanto os interferentes. Assim, deve-se certificar a ausência de sinal de interferentes onde espera-se o sinal do analito nas amostras branco demonstrando que o analito não será falsamente identificado e que sua quantificação não será prejudicada.

Por fim, a validação deve demonstrar que é possível confirmar a identidade do analito corretamente, porém, a confirmação de identidade nas amostras reais deve ser feita durante o uso contínuo do método. Isso pode ser realizado através da análise constante de uma amostra de controle adequada contendo concentrações conhecidas do analito e interferentes.

Estabilidade

Outro desafio encontrado no início do desenvolvimento de método é garantir a estabilidade do analito. Os compostos químicos podem se decompor antes ou durante as análises, comprometendo seu resultado. Assim, a estabilidade passa a ser um parâmetro de validação importante, mas que ainda não é suficientemente avaliado, visto que não é universalmente incluído nas diretrizes dos guias de validação. Este parâmetro pode ser definido como a estabilidade química de um analito em uma determinada matriz, sob condições específicas para determinados intervalos de tempo. Perguntas como: “*Quanto tempo é possível armazenar uma amostra até a análise química?*”, ou “*É preciso mantê-la refrigerada?*” podem ser respondidas por testes de estabilidade.

A estabilidade do analito durante todo o procedimento analítico é importante para uma quantificação confiável e, a menos que dados sobre a estabilidade estejam extensivamente discutidos e disponíveis na literatura, a validação completa de um método deveria incluir experimentos de estabilidade para várias etapas do método. A instabilidade do analito é essencialmente um erro sistemático, porém pode ser fortemente dependente de detalhes experimentais como o tipo de matriz, pH, temperatura, luz, etc. Desse modo, é importante realizar testes de estabilidade para o analito em amostras reais e em soluções padrão, levando em consideração os parâmetros de maior importância. O teste de estabilidade é importante não apenas para estimar o intervalo de tempo permitido entre a coleta e a análise da amostra, como verificar a melhor maneira de conservação da amostra e do padrão.

Acurácia, precisão e exatidão

Embora todas as etapas da validação analítica sejam importantes, a precisão e a exatidão podem ser consideradas a essência de um método analítico. Estes dois parâmetros além de guiar a realização dos outros testes da validação, representam a confiabilidade do método.

A precisão avalia a proximidade de resultados de preparações independentes provenientes da mesma amostra e sua realização não compreende apenas uma etapa. Os testes que são feitos são:

Repetibilidade: avalia a capacidade do método de emitir resultados concordantes quando preparações independentes da mesma amostra são analisadas no mesmo equipamento, pelo mesmo analista, no mesmo local e em um mesmo momento.

Precisão intermediária: avalia a capacidade do método de emitir resultados concordantes quando preparações independentes da mesma amostra são analisadas nas mesmas condições da repetibilidade, porém por analistas diferentes.

Reprodutibilidade: avalia a capacidade do método de emitir resultados concordantes quando preparações independentes da mesma amostra são analisadas em laboratórios diferentes, em equipamentos diferentes (aqui pode-se variar o fabricante e o modelo) por analistas diferentes em um período de tempo que não necessita ser pequeno. É um teste realizado em estudos interlaboratoriais quando se está padronizando metodologias).

Precisão instrumental (quando aplicável): avalia a capacidade do instrumento utilizado em dar respostas iguais para uma mesma preparação da amostra.

Já a **exatidão** avalia a proximidade de um resultado analítico experimental fornecido pelo método com o valor esperado em uma amostra de concentração conhecida. O teste de exatidão é realizado através da fortificação de amostras - adição do(s) analito(s) de interesse em pelo menos 3 níveis (baixo, médio, alto) de concentrações conhecidas diretamente na matriz que será investigada.

Uma importante observação é que a fortificação deve ser feita idealmente em uma matriz livre do(s) analito(s) que estão sendo estudados, algo que muitas vezes não é possível quando se trata de amostras ambientais, onde o objetivo será estudar possíveis contaminantes e por isso já presentes na matriz. Para contornar esta limitação, pode-se adotar a utilização de uma amostra branco - uma amostra que não será fortificada e o valor da concentração dos analitos presentes será descontada das amostras fortificadas. (Esta *amostra branco* fará parte do mesmo grupo das amostras que serão fortificadas, ou seja, coletadas na mesma hora e local). Outras opções são: a utilização de *surrogate*, que seria um composto com estrutura química similar ao analito de interesse e que teria comportamento semelhante na execução de

um método analítico (é requisito que o *surrogate* escolhido não esteja presente na matriz ambiental), ou o emprego de padrão isotopicamente marcado, que é o próprio analito mas com pelo menos um hidrogênio substituído por um isótopo deutério (^2H) ou um carbono 12 (^{12}C substituído por um isótopo carbono 13 (^{13}C)).

Limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

Entender sobre os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método analítico ainda é um grande desafio entre os “*não químicos*” e, por ser muito importante para se planejar um ensaio toxicológico ou a análise de uma amostra ambiental, deve ser entendido com clareza de forma a evitar falsos positivos ou interpretações erradas dos resultados finais de uma análise.

Para iniciarmos, é importante lembrar que há diferenças importantes entre os limites de detecção e quantificação instrumentais (aqui denominados LDI e LQI, respectivamente) e os limites de detecção e quantificação do método analítico (denominados então como LD e LQ, respectivamente). O LDI e LQI consideram apenas as incertezas associadas às medidas instrumentais, normalmente obtidas pela curva analítica ou curva de calibração e não consideram a natureza ou o preparo de amostras. O LD e LQ, por sua vez, são parâmetros que consideram as incertezas envolvidas em todas as etapas do método analítico, desde o preparo de amostras até a análise instrumental. Há diferentes maneiras de se calcular LDI e LQI e estão apresentadas as seguir. O LD e LQ do método, por sua vez, considera etapas do preparo de amostras como concentração ou diluição dos analitos, volume de amostra empregado em cada análise, além dos efeitos causados pela complexidade das matrizes. Sendo assim, podemos ter um mesmo método instrumental com LDI e LQI definidos pelas incertezas associadas às curvas analíticas obtidas pelo uso de padrões de referências, sendo aplicado à amostras que passaram por diferentes preparos desde a amostragem até a análise instrumental, nesses casos, os LDI/LQI serão os mesmos, mas os LD/LQ do método como um todo podem variar significativamente e devem ser reportados separadamente. Por exemplo, se uma amostra de efluente bruto foi preparada por SPE empregando 100 mL de amostra e obtendo 1 mL de extrato final (o qual será destinado a

análise instrumental) e, uma outra amostra, agora de água de abastecimento público, para a qual a SPE empregou 1 L de amostra da qual os analitos foram concentrados em 1 mL de extrato final. Teremos uma variação no fator de concentração de 10 vezes entre a análise da amostra de efluente e da amostra de água de abastecimento público. Se o mesmo método instrumental está sendo usado para quantificar os analitos de interesse no extrato final, teremos o mesmo LDI/LQI para ambas determinações, porém o LD e LQ do método analítico considerará o LDI/LQI e os fatores relacionados ao preparo de amostras e, neste exemplo será 10 vezes menor para a análise de água de abastecimento público, uma vez que o fator de concentração associado ao volume de amostra extraído foi 10 vezes maior (100 mL de amostra → 1 mL de extrato, fator de concentração para a amostra de efluente foi igual a 100 vezes, enquanto que para a amostra de abastecimento público obteve-se um fator de concentração de 100 vezes a partir de 1 L de amostra → 1 mL de extrato).

O limite de detecção instrumental (LDI) é a menor quantidade detectável do analito de forma confiável e distinta de zero ou de ruídos do sistema, porém estatisticamente, ainda não é passível de quantificação. Os LDI são muito úteis em análises qualitativas. Já o limite de quantificação instrumental (LQI) é a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. LDI é o ponto em que um valor medido é maior que a incerteza associada a ele, enquanto LQI é um parâmetro de ensaios quantitativos para baixas concentrações e utilizado para a quantificação do analito. A quantificação abaixo do LQ do método é, portanto, evidentemente inaceitável. Abaixo do LQ, um método poderá produzir apenas dados semiquantitativos ou qualitativos.

Para a determinação do LDI e do LQI, diferentes abordagens podem ser utilizadas. A técnica mais simples para determinação do LDI seria a inspeção visual; o limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas, estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser detectado com segurança. Já a técnica mais simples para a determinação do LQ seria definir valores de precisão e exatidão aceitáveis e encontrar a menor concentração do analito que se adequa a estes parâmetros.

Uma abordagem também muito comum é a determinação com base na relação sinal/ruído (S/N), calculado como a razão entre a altura do pico do

analito (sinal) e a amplitude entre o ponto mais alto e o mais baixo da linha de base (ruído), em uma determinada área ao redor do pico do analito. Para o LDI, geralmente é necessário que a razão seja igual ou superior a 3 e para o LQI, igual ou superior a 10.

Por fim, o LDI e o LQI podem ser determinados através da razão s/b em que b é o coeficiente angular da regressão e s é o desvio padrão que pode ser obtido de três maneiras: desvio padrão do intercepto com o eixo y de curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; desvio padrão residual da linha de regressão; desvio padrão dos brancos da amostra. Assim, o LDI e o LQI são calculados como 3 e 10 vezes o valor da razão obtida, respectivamente.

Faixa de trabalho

A faixa de trabalho de um método analítico é o intervalo entre as concentrações mínima e máxima do analito em que o método fornece resultados quantitativos com precisão, exatidão e linearidade adequadas. O limite inferior da faixa equivale ao limite de quantificação. Já o limite superior deve ser testado com concentrações sucessivamente mais altas até que a precisão, exatidão e/ou a linearidade não se mantenham dentro do esperado.

Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade de obter uma relação proporcional entre a resposta analítica e a concentração do analito, dentro de um determinado intervalo que deve abranger a faixa de trabalho na qual a concentração esperada do analito seja contemplada. Este parâmetro é determinado pela análise de uma série de réplicas de diversos níveis de concentração do padrão, que devem cobrir toda a faixa de trabalho e ser uniformemente espaçadas. É necessário ter um número suficiente de níveis de concentração do analito para definir o perfil de resposta em relação à concentração, além de ter um número suficiente de réplicas para um mesmo ponto a fim de reduzir erros aleatórios e aumentar a precisão. Em geral, quanto mais pontos existirem na curva de calibração, melhor. Contudo, para fins

práticos, um valor entre 5 a 10 pontos com 3 a 6 réplicas cada é considerado satisfatório.

Em seguida, é necessário encontrar um modelo matemático que descreva adequadamente o grau de associação entre a concentração do analito (variável independente) e o sinal analítico obtido (variável dependente), chamado de modelo de regressão. Existem vários métodos de regressão, lineares ou não, que podem ser testados no conjunto de dados obtidos. Porém, o método mais comum é a regressão linear por mínimos quadrados, por ser um método simples e de fácil aplicação (vide figura 1: curva analítica obtida por esse método).

Existem duas técnicas de ajuste para o modelo método dos mínimos quadrados: método de mínimos quadrados ordinários (MMQO) e o método de mínimos quadrados ponderados (MMQP). Essa classificação é baseada no comportamento dos desvios ou variações padrão da resposta sobre a faixa de trabalho selecionada da curva de calibração. Portanto, é necessário analisar o comportamento da variância dos dados. Se a variância dos dados for constante, tem-se o fenômeno de homocedasticidade e o ajuste deverá ser realizado por MMQO. Caso contrário, os dados apresentam heterocedasticidade e o ajuste por MMQP é o mais apropriado.

Normalmente, a escolha do ajuste dependerá da faixa de trabalho de interesse. Quando a faixa é estreita, geralmente o modelo por MMQO é satisfatório, porém, quando a faixa cobrir concentrações com ordens de grandeza diferentes, o modelo pode exigir um ajuste ponderado ou mais complexo.

A adequação do modelo de calibração escolhido sempre deve ser confirmada. A aceitabilidade do modelo é frequentemente analisada através informações gráficas, parâmetros numéricos e testes estatísticos.

Normalmente o primeiro passo para a avaliação da linearidade é a inspeção visual do gráfico de dados experimentais com o modelo de regressão ajustado e do gráfico de resíduos. Esta inspeção inicial pode dar alguma noção de quão bem a curva se ajusta aos dados e identificar possíveis ocorrências de valores atípicos, que não estejam obedecendo o comportamento observado pelas outras medidas. Estes pontos também são conhecidos por *outliers*. Contudo, a linearidade não pode ser demonstrada pela simples observação

visual dos gráficos, pois é um processo um tanto subjetivo. Assim, faz-se necessário o cálculo de alguns parâmetros numéricos usados para avaliar a qualidade do ajuste. Os parâmetros numéricos mais relevantes são o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio padrão residual da linha de regressão. Por fim, é necessário aplicar testes de significância da regressão para verificar se a equação que define a calibração é apropriada, como o teste de análise de variância, ANOVA.

Faz mal? Como medir os efeitos destas concentrações? Ecotoxicidade

O suporte que a química analítica oferece à ecotoxicologia é fundamental tanto pelo lado qualitativo (“o que tem”) quanto o lado quantitativo (“o quanto tem”). Porém, qual o significado real dos resultados obtidos? O contaminante identificado pode ser nocivo à fauna e flora do local onde ele está presente?

Ao responder tais perguntas, estamos realizando o que chamamos de avaliação do risco, para a qual tem-se a ecotoxicologia como a principal aliada da química ambiental. A ecotoxicologia por definição é o campo da ciência que estuda a interação entre os seres vivos e as substâncias químicas que podem ser potenciais poluentes ambientais. Estas interações são determinadas através da observação dos efeitos decorrentes da exposição destes seres vivos a amostras que tenham uma ou mais substâncias químicas. Estes efeitos podem ser a taxa de mortalidade de uma determinada população, alteração no padrão de reprodução, mudanças de comportamento, inibição da respiração celular, alterações hepáticas ou neurológicas, etc.

Neste contexto, é importante entender a diferença entre um contaminante e um poluente. Um contaminante se refere a uma substância que não deveria estar naquele compartimento ambiental ou está presente em concentrações acima das concentrações naturais, ou seja, o que chamamos de *background*. Um poluente, por sua vez, se refere a um contaminante presente em um determinado ambiente em concentrações que exercem efeitos adversos aos organismos.

Estes contaminantes são comumente classificados de acordo com a sua origem (natural ou antrópica), os efeitos causados nos organismos (como por exemplo, mutagenicidade, carcinogenicidade, interferência endócrina, etc.) ou

com relação às suas características físico-químicas (voláteis, persistentes, ou com capacidade de se acumularem nos organismos, etc.).

Diferentes abordagens e detalhes desta área estão sendo discutidos em outros capítulos deste livro e, portanto, apenas alguns aspectos mais importantes serão destacados aqui a fim de se entender melhor a atuação dos químicos na ecotoxicologia quando aplicada à avaliação do risco ambiental.

Os testes de toxicidade são largamente utilizados para avaliar efeitos adversos de uma substância química em organismos vivos sob condições padronizadas e reprodutíveis que permitam comparações entre diferentes organismos, substâncias e laboratórios. Devem seguir protocolos rigorosos de controle de qualidade e, dentre eles, a quantificação das concentrações reais das substâncias testadas tem aproximado ainda mais os ecotoxicologistas dos químicos analíticos. Como descrito anteriormente, a mesma técnica analítica pode ser empregada para a quantificação das concentrações de uma dada substância tanto em amostras ambientais como nas amostras dos testes toxicológicos. A principal diferença em termos de método analítico está no preparo de amostras. Em geral, as concentrações empregadas nos testes variam em uma grande escala de concentração, sendo que em alguns casos pode haver a necessidade de concentração dos analitos (como geralmente é feito com as amostras coletadas no ambiente em que os contaminantes estão em níveis traço), em outros, apenas a necessidade de um *clean-up* antes da análise instrumental e, em um terceiro cenário, pode haver ainda a necessidade de diluição das amostras. A escolha do melhor preparo de amostras para atender a essa demanda depende da faixa linear de trabalho construída para a análise instrumental. Uma vez que as concentrações dos analitos no extrato analisado deverá estar entre os limites mínimos (LQI) e máximos da curva analítica, para garantir um resultado confiável e reprodutivo.

Diferentes organismos e métodos são usados nos testes toxicológicos e, portanto, é de se esperar que diferentes efeitos de matriz possam interferir nas análises químicas, bem como o volume de amostra disponível para a análise, pH, salinidade, etc. Tais parâmetros precisam ser criteriosamente avaliados para se obter o melhor preparo de amostras de forma a garantir a exatidão, a precisão na determinação, sem causar danos significativos ao instrumento de

medida. A seguir, uma breve descrição sobre os testes toxicológicos para finalizarmos o conteúdo deste capítulo.

Organismos utilizados

A utilização de seres vivos para os testes de toxicidade se deve ao fato que as respostas só ocorrem no campo biológico. Os seres vivos mais comumente utilizados em testes de toxicidade são bactérias, microalgas, microcrustáceos e peixes. Eles serão diretamente responsáveis em sinalizar se uma amostra apresenta algum grau de toxicidade ou não, apontado pelo efeito (ou *endpoint*) que está sendo avaliado.

As características desejáveis para que um organismo seja escolhido em um teste de toxicidade são: disponibilidade, biologia e fisiologia conhecidas, estabilidade genética, facilidade de cultivo em laboratório e que, preferencialmente, esteja presente no local de onde a amostra é proveniente (este último quesito, apesar de importante, não é mandatório).

Nas avaliações de risco são considerados os testes de toxicidade realizados com organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, pois os efeitos tóxicos de uma mesma substância podem ser observados de maneira diferente para diferentes organismos. Para tal, a derivação de um critério de qualidade considera dentre os testes toxicológicos realizados com diferentes organismos, aquele que apresentou efeitos em menor concentração, ou seja, o mais restritivo, de forma que o critério derivado seja protetivo para o organismo mais sensível e, conseqüentemente para os demais organismos.

Tipos de testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos empregados com maior frequência são os testes de toxicidade aguda e crônica. Como dito anteriormente, ambos têm com princípio básico a exposição de uma população de organismos vivos a amostras que contenham um ou mais contaminantes químicos e a observação dos efeitos.

Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda consiste em expor diretamente, por um tempo determinado (intervalos até 96 horas) uma população de organismos teste a uma amostra concentrada e/ou em várias diluições, que contenha supostos contaminantes químicos e observar um efeito que normalmente é a taxa de mortalidade desta população (para invertebrados também pode-se observar a taxa de imobilidade). É considerada uma metodologia rápida e as informações mais importantes que são extraídas deste teste é a Concentração Letal Média (CL₅₀), que também pode ser denominada Concentração Efetiva Média (CE₅₀), que seria a concentração da amostra necessária para causar uma taxa de letalidade de 50% em uma população no tempo especificado.

O teste de toxicidade aguda, quando aplicado às amostras ambientais complexas, com vários compostos presentes, na maioria das vezes não fornecerá um resultado diretamente conclusivo sobre a causa da toxicidade – se um contaminante, ou até mesmo um conjunto deles é responsável direto pela toxicidade da amostra. O teste só apontará se a amostra é tóxica ou não, e em quais concentrações, e indicará a possibilidade da existência de um efeito sinérgico entre os contaminantes presentes na amostra estudada. Uma das limitações do teste agudo é que muitas vezes um efeito pode ser observado em um período de tempo além do estipulado no teste (Silva et al., 2015).

Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica de uma amostra é determinada através da exposição de uma população de organismos vivos a frações diluídas da amostra de interesse e por um tempo mais elevado que o utilizado na toxicidade aguda – pode compreender todo o ciclo de vida do organismo envolvido. A quantidade de efeitos observados também é mais ampla, envolvendo alterações fisiológicas, reprodutivas e comportamentais.

O teste de toxicidade crônica pode ser realizado de forma complementar ao de toxicidade aguda – através da utilização do valor de CL₅₀ obtido com a realização deste último e assim calculam-se as diluições que a amostra deve sofrer para que as concentrações de trabalho não sejam demasiadamente letais, ou de forma conclusiva, se durante o teste de toxicidade aguda uma

amostra não apresentar indícios de toxicidade devido ao período curto de exposição, esses efeitos podem aparecer durante a exposição mais prolongada demandado pelo teste de toxicidade crônica (Magalhães and Ferrão-Filho, 2008).

Biomonitoramento Automático em Tempo Real

Os testes mencionados anteriormente, apesar de serem essenciais, têm uma limitação inerente a ambos: o fornecimento de dados contempla apenas um panorama momentâneo da situação e muitos efeitos causados pelos poluentes podem somente aparecer após intervalos de tempo maiores e causados por concentrações menores do que aquelas empregadas nos testes (Magalhães and Ferrão-Filho, 2008). Desta maneira, o biomonitoramento automático aparece como uma alternativa para um acompanhamento constante e geração de resultados imediatos.

O sistema de biomonitoramento consiste em acompanhar as reações dos organismos vivos empregados nos testes de maneira permanente através da aplicação de dispositivos com sensores eletrônicos automatizados que possibilitem isto. Alguns exemplos que ilustram este sistema são: (i) a utilização de fluorímetros para monitorar a produção de clorofila de uma população de fitoplâncton; (ii) sensores de movimento e câmeras para o monitoramento do padrão natatório de peixes; (iii) monitoramento da intensidade da luz produzida por bactérias luminescentes, etc.

Normas Técnicas

No Brasil, a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), é a responsável por emitir os documentos orientativos para a realização dos testes de toxicidade e desta maneira padronizá-los. A Tab. 1 mostra alguns destes documentos. Sempre é bom salientar que aqui no Brasil cada unidade da federação tem seu próprio órgão ambiental (por exemplo, CETESB em São Paulo, IPEA no Rio de Janeiro, etc.) e estes também emitem normas padrão sobre a realização destes testes.

Tab. 1. Normas ABNT referentes a ensaios ecotoxicológicos

Norma	Finalidade
NBR 15469:2007	Preservação e preparo de amostras
NBR 12713:2009	Toxicidade aguda – Método de ensaio com <i>Daphnia spp</i>
NBR 13373:2010	Toxicidade Crônica – Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia spp</i>
NBR 15088:2011	Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixes
NBR 15499:2007	Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de ensaio com peixes
NBR 12648:2011	Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)
NBR 15470:2007	Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com <i>Hyalella spp</i> (Amphipoda)
NBR 15308:2011	Método de ensaio com misídeos (Crustácea)

Fonte: modificada de Silva et al., 2015

Para uma melhor visualização dos caminhos a se tomar em um procedimento que conjuga química analítica e análise ecotoxicológica, o fluxograma apresentado na Fig.4, sintetiza as alternativas possíveis.

Fig. 4. Fluxograma com as etapas de um procedimento analítico/ecotoxicológico

CONCLUSÃO

Este capítulo buscou abordar de forma didática os aspectos analíticos para a determinação de contaminantes ambientais (sejam eles considerados contaminantes emergentes ou não), em concentrações traços nas amostras ambientais ou nos testes toxicológicos, buscando dentro do contexto da ecotoxicologia, aproximar químicos e biólogos para esta, que é uma área interdisciplinar tão importante para a preservação da vida no nosso planeta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, T., Girardi, R., Pinheiro, A., 2017. Micropoluentes orgânicos: ocorrência, remoção e regulamentação. Rev. Gestão Água da América Lat. 14, 1–20. <https://doi.org/10.21168/rega.v14e1>

ANVISA, 2017. RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 [WWW Document]. URL

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 (accessed 6.6.19).

Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>

Borges, K.B., Figueiredo, E.C. de, Queiroz, M.E.C., 2015. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. LTC.

Čelić, M., Farré, M., Lopez de Alda, M., Perez, S., Barceló, D., Petrović, M., 2017. Environmental analysis: Emerging pollutants, in: *Liquid Chromatography*. Elsevier, pp. 451–477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00015-3>

Cetesb, 2011. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos., Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. <https://doi.org/C737g>

Gago-Ferrero, P., Schymanski, E.L., Hollender, J., Thomaidis, N.S., 2016. Nontarget Analysis of Environmental Samples Based on Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS), in: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., pp. 381–403. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.01.012>

Inmetro, 2016. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos [WWW Document]. URL http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf (accessed 9.2.20).

Lanças, F.M., 2009. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE. Editora Átomo, Campinas.

Lanças, F.M., 1993. Cromatografia em Fase Gasosa. Acta, São Carlos.

Li, X., Shang, X., Luo, T., Du, X., Wang, Y., Xie, Q., Matsuura, N., Chen, J., Kadokami, K., 2016. Screening and health risk of organic micropollutants in rural groundwater of Liaodong Peninsula, China. *Environ. Pollut.* 218, 739–748. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.070>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Magalhães, D. de P., Ferrão-Filho, A. da S., 2008. A Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Aust.* 12, 355–381. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>

Moldoveanu, S., David, V., 2017. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Elsevier, Boston. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.01001-5>

Moldoveanu, S., David, V., 2015. Modern Sample Preparation for

Chromatography, 1st ed. Elsevier, Amsterdam.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54319-6.01001-X>

Montagner, C.C., Vidal, C., Acayaba, R.D., 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim. Nova* 40, 1094–1110.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>

Parron, L.M., Muniz, D.H. de F., Pereira, C.M., 2011. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa, Colombo.

Robards, K., Haddad, P.R., Jackson, P.E., 2004. Qualitative and Quantitative Analysis, in: *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press, Boston, pp. 457–490. <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-08-057178-2.50012-1>

Sander, L.C., Schantz, M.M., Wise, S.A., 2017. Environmental analysis: Persistent organic pollutants, in: *Liquid Chromatography*. Elsevier, pp. 401–449.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00014-1>

Silva, D.C.V.R. da, Pompêo, M., Paiva, T.C.B. de, 2015. A ecotoxicologia no Contexto atual no Brasil, in: *Ecologia de Reservatórios e Interfaces*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 340–353.
<https://doi.org/https://doi.org/10.11606/9788585658526>

Simpson, N. K., 2000. Solid-Phase Extraction. Principles, Techniques and Applications. Marcel Dekker, Nova Iorque.

Skoog, D.A., Holler, F., Crouch, S.R., 2009. *Princípios de Análise Instrumental*, 6th ed. Bookman, Porto Alegre.

Skoog, D.A., West, D.M., Crouch, S.R., Holler, F., 2015. *Fundamentos De Química Analítica*, 9th ed. Cengage, São Paulo.