

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE MONOCLOROACETATO DE SÓDIO E DICLOROACETATO DE SÓDIO EM COCOAMIDO,N-[(3-DIMETILAMINO)PROPIL],BETAÍNA VIA CROMATOGRAFIA A GÁS: GC/FID, GC/ECD e GC/MS

CLÁUDIO LEÃO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador: Prof. Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

São Paulo 2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia associada à Universidade de São Paulo

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE MONOCLOROACETATO DE SÓDIO E DICLOROACETATO DE SÓDIO EM COCOAMIDO,N-[(3-DIMETILAMINO)PROPIL],BETAÍNA VIA CROMATOGRAFIA A GÁS: GC/FID, GC/ECD e GC/MS

CLÁUDIO LEÃO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador: Prof. Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

Versão Corrigida Versão Original disponível no IPEN

> São Paulo 2016

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelos valores, incentivo e apoio incondicional, eu dedico este trabalho e todas as outras conquistas.

Ao Prof. Dr. Oscar Vega, pela motivação, transferência de conhecimentos e inúmeras críticas. Enfim, por demonstrar o genuíno sentido do termo orientação.

Aos colegas do Laboratório de Gases do CQMA-IPEN, por todo tipo de ajuda, discussões técnicas, aconselhamentos e muito companheirismo.

Aos laboratórios dos Prof.(s) Dr.(s) Elâine Martins e Paulo Lainetti, por todo o apoio e infraestrutura.

À toda a nação CQMA-IPEN, sinônimo de acolhimento, eficiência e produção científica.

Às demais áreas do IPEN - Ensino, Biblioteca, CTR, CCCH, CEMSA - pela colaboração na realização das disciplinas e da parte experimental.

Aos colegas de Clariant e Amazul, pelas valiosas contribuições de ordem técnica e motivacional.

Além da gratidão, registre-se a minha sincera admiração por todos.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE MONOCLOROACETATO DE SÓDIO E DICLOROACETATO DE SÓDIO EM COCOAMIDO,N-[(3-DIMETILAMINO)PROPIL],BETAÍNA VIA CROMATOGRAFIA A GÁS: GC/FID, GC/ECD e GC/MS.

CLÁUDIO LEÃO

RESUMO

O monocloroacetato de sódio (MCAS) e o dicloroacetato de sódio (DCAS) são compostos tóxicos e irritantes ao ser humano e nocivos ao meio ambiente, sendo impurezas indesejáveis na cocoamido propil betaína (CAPB), que é um surfactante anfótero utilizado em produtos de consumo dos segmentos cosmético e domiciliar. Diante dos requisitos de concentração em nível de mg/kg exigidos pelos órgãos reguladores de saúde do governo, tornou-se mandatório o emprego de metodologia com limite de quantificação, precisão e exatidão adequados aos rígidos controles de processo pelos fabricantes da CAPB, bem como, dispor de técnicas convencionais com poder de resolução e proficiência pelo controle de qualidade e neste contexto inseriu-se a cromatografia a gás. Neste estudo foram estabelecidos os procedimentos analíticos que definiram as melhores condições para identificar e quantificar as impurezas MCAS e DCAS na matriz CAPB por meio da cromatografia a gás. A preparação das amostras consistiu da derivação das impurezas MCAS e DCAS a ésteres etílicos e a extração líquido-líquido em hexano para separar dos demais constituintes da matriz. Os modos de detecção acoplados à cromatografia a gás foram a ionização pela chama (GC/FID), a captura de elétrons (GC/ECD) e a espectrometria de massas (GC/MS). A validação comprovou que as metodologias são lineares entre 4 e 50 mg/kg com recuperação de 70 a 120%, apresentam limites de quantificação inferiores a 10 mg/kg e produziram médias e incertezas similares na amostra examinada, constituindo-se alternativas para a determinação de cloroacetatos em betaínas.

(Palavras-chave: surfactante, anfótero, cromatografia, cloroacetato)

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF SODIUM MONOCHLOROACETATE AND SODIUM DICHLOROACETATE IN COCOAMIDE,N-[(3-DIMETHYLAMINE)PROPYL],BETAINE BY GAS CHROMATOGRAPHY: GC/FID, GC/ECD e GC/MS.

CLÁUDIO LEÃO

ABSTRACT

The sodium monochloroacetate (MCAS) and the sodium dichloroacetate (DCAS) are toxic and irritating compounds to humans and harmful to the environment, being undesirable impurities in cocoamidepropyl betaine (CAPB), which is a amphoteric surfactant used in consumer products of cosmetic and household segments. Considering the content requirements at level mg/kg defined by governmental health agency, became mandatory the use of analytical methods with appropriate precision, accuracy and quantification limit to rigid process controls by CAPB manufacturers, as well as, to have available conventional techniques with good resolution and proficiency for guality control staff and in this context was inserted the gas chromatography. In this study, the analytical procedures were established to define the best conditions to identify and quantify the impurities MCAS and DCAS in CAPB matrix by gas chromatography. The sample preparation consisted of MCAS and DCAS derivation to ethyl esters and liquid-liquid extraction in hexane to separate them from the other constituents of matrix. The detection modes coupled to gas chromatography were the flame ionization (GC/FID), electron capture (GC/ECD) and mass spectrometry (GC/MS). The validation ensured that the methodologies are linear between 4 and 50 mg/kg with recovery 70 to 120%, presents quantification limits less than 10 mg/kg and produced similar averages and uncertainties in the examined sample, constituting an alternative for determination of chloroacetates in betaines.

(Keywords: surfactant, amphoteric, chromatography, chloroacetate)

SUMÁRIO

1		1
2		5
ა		0
	2 O controlo do gualidado	0
		11
	.3 A preparação da amostra: derivação e extração	12
	.4 A tecnica cromatografica: GC/FID, GC/ECD e GC/MS	14
	.5 A validação e a incerteza da medição	22
	3.5.1 Seletividade	25
	3.5.2 Linearidade	26
	3.5.3 Precisao	27
	3.5.4 Exatidao	29
	3.5.5 Limite de detecção e limite de quantificação	30
	3.5.6 Robustez	31
	3.5.7 Incerteza da medição cromatografica	31
4	IATERIAIS E METODOS	33
	.1 Materiais	34
	.2 Métodos	36
	4.2.1 Preparo das soluções	37
	4.2.2 Preparo da curva de calibração e da amostra em exame	37
	4.2.3 Condições de operação do cromatograto a gás	38
_	4.2.4 Validação das metodologias	40
5		42
	.1 Preparação da amostra: derivação e extração	42
	.2 Determinação cromatográfica	45
	5.2.1 Otimização da determinação por GC/MS	45
	5.2.2 Otimização da determinação por GC/ECD	49
	5.2.3 Otimização da determinação por GC/FID	50
	.3 Validação das metodologias	52
	5.3.1 Seletividade	52
	5.3.2 Linearidade	54
	5.3.3 Precisão	58
	5.3.4 Exatidão	60
	5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação	62
	5.3.6 Robustez	63
	5.3.7 Incerteza da medição cromatográfica	63
_	.4 Determinação em amostras comerciais	67
6	ONCLUSOES	72
	RABALHOS FUTUROS	73
	PENDICE: Resumo do artigo publicado e apresentado na 2015	74
	nternational Nuclear Atlantic Conference - INAC 2015 – realizada em	
	ão Paulo entre 4 e 9 de outubro de 2015	
	EFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Constituintes da cocoamido propil betaína (CAPB)	10
TABELA 2	Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA	24
TABELA 3	Características das colunas capilares DB-1 e DB-5	36
TABELA 4	Volume de alíquotas e balões para o preparo da curva de	37
	calibração	
TABELA 5	Parâmetros e ensaios relativos à validação das	40
	metodologias	
TABELA 6	Resultados da seletividade pela aplicação do teste F para	54
	GC/ECD, GC/FID e GC/MS por adição de padrões MCAS	
	e DCAS à matriz CAPB, considerando $F_{tabelado} = 4,28$	
TABELA 7	Resultados de $\mathbf{t}_{calculado}$ na análise do desvio padrão dos	57
	resíduos para MCAS, considerando $\mathbf{t}_{tabelado}$ = 2,776	
TABELA 8	Resultados de $\mathbf{t}_{calculado}$ na análise do desvio padrão dos	58
	resíduos para DCAS, considerando $\mathbf{t}_{tabelado}$ = 2,776	
TABELA 9	Repetitividade (r) para as áreas dos compostos MCAS e	59
	DCAS estudados sem a presença de matriz CAPB	
TABELA 10	Recuperação de MCAS em amostras de CAPB	60
TABELA 11	Recuperação de DCAS em amostras de CAPB	61
TABELA 12	LD calculado para MCAS e DCAS por GC/ECD, GC/FID e	62
	GC/MS	
TABELA 13	LQ calculado para MCAS e DCAS por GC/ECD, GC/FID e	63
	GC/MS	
TABELA 14	Teste t para equivalência das técnicas GC/ECD, GC/FID e	68
	GC/MS para a determinação de MCAS em CAPB	
TABELA 15	Teste t para equivalência das técnicas GC/ECD, GC/FID e	69
	GC/MS para a determinação de DCAS em CAPB	
TABELA 16	Resultados da determinação de MCAS e DCAS em	70
	amostra comercial de CAPB reportando a média e o	
	desvio padrão para sete replicatas por cada técnica e a	
	incerteza expandida calculada pelo método simulado	
	EURACHEM	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Produtos de consumo que empregam a CAPB na	3
	formulação	
FIGURA 2	Síntese CAPB a partir dos insumos AGC, DMAPA e MCAS	8
FIGURA 3	Detector FID ilustrando a formação de íons pela queima de	17
	composto orgânico em chama de H₂ e O₂	
FIGURA 4	Detector ECD, ilustrando o anodo com a fonte ß emissora	18
	de ⁶³ Ni, a saída de gases, o catodo, a cavidade onde há	
	supressão da corrente e a coluna cromatográfica	
FIGURA 5	Detector MS onde ocorre a formação de íons de	19
	compostos orgânicos na fonte de íons, separados por m/z	
	no analisador de massas e quantificados no detector	
FIGURA 6	Fluxograma da determinação de MCAS e DCAS por GC	33
	FID/ECD/MS	
FIGURA 7	Forno do cromatógrafo adaptado para a esterificação	43
FIGURA 8	Perfis cromatográficos no GC/MS para MCAS e DCAS	44
	esterificados com etanol (A) e butanol (B)	
FIGURA 9	Perfil cromatográfico no GC/MS para MCAS e DCAS este-	45
	rificados e extraídos por agitação com barra magnética	
FIGURA 10	Perfil cromatográfico no GC/MS para MCAS e DCAS com	46
	varreduras de m/z 29-200	
FIGURA 11	Perfis cromatográficos no GC/MS modo SIM para	47
	MCAS (A) e DCAS (B)	
FIGURA 12	Perfil cromatográfico no GC/MS modo SIM ilustrando o	47
	pico obtido para MCAS na região da isoterma a 70ºC	
FIGURA 13	Perfil GC/MS modo SIM split 1:10 para MCAS	48
FIGURA 14	Perfil cromatográfico no GC/MS modo SIM para MCAS	48
	com aumento na temperatura do injetor	
FIGURA 15	GC/MS modo SIM com três m/z específicos e a resposta	49
	nos tempos de retenção 5,5 minutos (MCAS 16,8 mg/kg) e	
	7,5 minutos (DCAS 18,4 mg/kg)	
FIGURA 16	Perfil cromatográfico no modo de detecção ECD para	50
	MCAS e DCAS com tempos de retenção 5,0 e 6,3 min.	

- FIGURA 17Perfil cromatográfico no modo de detecção FID para5MCAS e DCAS com tempos de retenção 5,0 e 6,3 min.
- FIGURA 18 Cromatograma da matriz CAPB por GC/ECD evidenciando 52 os analitos MCAS e DCAS nos tempos de retenção de 5,1 e 6,3 min.
- FIGURA 19 Cromatograma da matriz CAPB por GC/FID evidenciando 53 os analitos MCAS e DCAS nos tempos de retenção de 5,0 e 6,3 min.
- FIGURA 20 Cromatograma da matriz CAPB por GC/MS no modo SIM 53 evidenciando as resoluções dos compostos MCAS e DCAS identificados nos tempos de retenção 5,5 e 6,6 min.
- FIGURA 21Representação da linearidade do MCAS para a faixa de55trabalho de 3 a 50 mg/kg por GC/ECD, GC/FID e GC/MS
- FIGURA 22 Representação da linearidade do DCAS para a faixa de 56 trabalho de 4 a 55 mg/kg por GC/ECD, GC/FID e GC/MS
- FIGURA 23 Diagrama de Ishikawa que identifica as contribuições à 65 incerteza da medição na preparação da amostra e determinação cromatográfica
- FIGURA 24 Balanço das incertezas-padrão para preparar cinco 66 concentrações de ácido dicloroacético DCAA, demonstrando a contribuição da incerteza da pureza do padrão u(P), da repetitividade do volume do balão e pipeta u(V2), incerteza da balança u(m), incerteza da volume do balão u(V1) e da influência da temperatura na variação do volume u(V3) para a incerteza combinada uc
- FIGURA 25 Balanço das incertezas-padrão para a determinação de 67 DCAS por GC/ECD, demonstrando a contribuição da área do pico u(A), do desvio no ensaio de recuperação expresso pela intercepção e inclinação u(Int) e u(Inc) e da preparação dos padrões u(Prep) para a incerteza combinada uc

51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGC	Ácido graxo de coco
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSTFA	Bis(trimetilsilil) trifluoracetamida
САРВ	Cocoamido propil betaína
СМС	Concentração micelar crítica
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
GC	Gas chromatography (cromatografia a gás)
GC/ECD	Gas chromatography with electron capture detector (cromatografia a
	gás acoplada ao detector por captura de elétrons)
GC/FID	Gas chromatography with flame ionization detector (cromatografia a
	gás acoplada ao detector de ionização pela chama)
GC/MS	Gas chromatography with mass spectrometry (cromatografia a gás
	acoplada à espectrometria de massas)
DCAA	Ácido dicloroacético
DCAS	Dicloroacetato de sódio
DMAPA	Dimetilamino propilamina
DPR	Desvio padrão relativo
EPA	Environmental Protection Agency
EURACHEM	Rede europeia de organizações com o objetivo de estabelecer um
	sistema de rastreabilidade internacional
F	Teste de Fisher-Snedocor
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements
	for Pharmaceuticals for Human Use
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
	Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCAA	Ácido monocloroacético

MCAS	Monocloroacetato de sódio
MSTFA	Metil trimetilsilil trifluoracetamida
NIST	National Institute of Standards and Technology
P.A.	Categoria de reagentes com grau de pureza para fins analíticos
рН	Potencial hidrogeniônico
r	Limite de repetitividade
S	Estimativa do desvio padrão
SIM	Selected ion monitoring (monitoramento por íon selecionado)
t	Teste t-Student
TCD	Thermal conductivity detector (detector por condutividade térmica)
TMS	Reagentes químicos derivatizantes que possuem o grupo trimetil silil
TMSDEA	Trimetilsilil dietilamina
USP	Organização científica dos Estados Unidos que estabelece normas
	para medicamentos e ingredientes ou suplementos de alimentos
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da ciência e da tecnologia, tudo em nosso cotidiano se beneficia do uso de produtos químicos, cada vez mais indispensáveis para o desenvolvimento da economia global e para o bem-estar da sociedade. A partir do momento que todos fazem uso desses produtos, o grande desafio é garantir que sejam sintetizados, manipulados e aplicados em condições controladas e descartados em condições seguras, protegendo a vida humana e o meio ambiente.

Uma classe de produtos químicos de grau técnico empregada na indústria são os surfactantes ou tensoativos. Segundo Hawley (2007), os surfactantes são compostos que em meio aquoso reduzem a tensão interfacial (líquido-líquido ou líquido-sólido) e a tensão superficial (líquido-gás).

Os surfactantes apresentam composição química variável, mas possuem como característica comum o fato de suas moléculas conterem um componente hidrófobo (cadeias alquílicas apolares) e outro hidrófilo (grupos funcionais polares). Desta maneira, uma vez dissolvidos em água, as extremidades hidrófilas interagem com a fase aquosa e as hidrófobas com a outra fase. Se a outra fase for uma partícula de detrito, ela será envolta por uma película de surfactante, promovendo a formação de uma micela que se desprende do substrato a ser limpo, de acordo com o modelo proposto por Farn (2006).

Os surfactantes possuem diversas aplicações em química. Apresentam afinidade por óleos, gorduras e superfícies das soluções com sólidos, líquidos ou gases, como também pela água, podendo pertencer aos dois meios. Essas características permitem que os surfactantes sejam utilizados como "conciliadores" dessas fases imiscíveis, formando emulsões, espumas, suspensões ou propiciando a umectação, formação de filmes líquidos e detergência de superfícies, conforme descrito por Daltin (2011).

Os surfactantes são utilizados em amplo espectro de processos químicos, porque as propriedades mencionadas os habilitam a agir como emulsificantes, molhantes, dispersantes, espumantes ou antiespumantes. De acordo com Schramm *et al.* (2003), as aplicações incluem os sistemas gasosos, as indústrias de petróleo e

1

emulsões, produtos de limpeza e os sistemas biológicos, tais como, farmacêutico, alimentício e de cuidados pessoais.

A polaridade é a principal característica a ser considerada nos surfactantes quando se escolhe determinada aplicação. Segundo Daltin (2011), os tensoativos de caráter anfótero, que possuem cargas polares positiva e negativa em sua estrutura molecular, apareceram no mercado na década de 80 em formulações de xampus de baixa irritabilidade (infantis) ou como tensoativos adjuvantes em formulações de cosméticos e detergentes.

A cocoamido propil betaína (CAPB) é compatível com os surfactantes aniônicos, catiônicos, não iônicos e com os demais surfactantes de caráter anfótero, e por esta razão é aplicada em uma ampla gama de formulações destinadas a cuidados pessoais e higiene doméstica desde a década de 60. Ela também apresenta a capacidade de estabilizar micelas de tensoativos aniônicos – como o lauril éter sulfato de sódio – que reduz a concentração micelar crítica (CMC) para a mistura e diminui a irritabilidade dérmica e ocular.

A produção de betaínas em 2004 atingia as quantidades de 59000 toneladas/ano na Europa, 18000 toneladas/ano nos Estados Unidos e 10000 toneladas/ano na Ásia, de acordo com o *Human and Environmental Risk Assesment on Ingredients of Household Cleaning Products* (HERA, 2005).

No Brasil, estes volumes de produção atingiram em 2012 a marca de 20000 toneladas/ano, de acordo com o Potencial de Diversificação da Indústria Química Brasileira – Relatório 4 – Tensoativos, do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES, 2011).

A CAPB é reconhecida como removedora de sujeira oleosa ou particulada, boa estabilizante de espuma, tendo estabilidade em ampla faixa de pH e apresentando menor irritabilidade dérmica e ocular do que os surfactantes aniônicos, conforme relatado nas literaturas técnicas dos fabricantes (HERA, 2005).

De acordo com Daltin (2011), os surfactantes são utilizados em grande volume e alta frequência em contato com a pele, tanto na higiene corporal quanto na doméstica, conforme produtos de consumo ilustrados na FIG.1. Essa particularidade leva à necessidade de preocupação toxicológica dos surfactantes utilizados em formulações de xampus, condicionadores, sabonetes, desinfetantes e detergentes.



FIGURA 1 - Produtos de consumo que empregam a CAPB na formulação Fonte: elaborada pelo autor

As impurezas monocloroacetato de sódio (MCAS) e dicloroacetato de sódio (DCAS), presentes na CAPB, possuem efeito tóxico quando ingeridas ou aspiradas e efeito irritante em contato com a pele, conforme relatado nas fichas de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) dos fabricantes das matérias primas MCAA e MCAS e na literatura (Crabb *et al.*, 1981 ; Quick *et al.*, 1992).

Pelas razões relatadas nos parágrafos anteriores, são requeridos controles rigorosos com limites máximos permitidos de 20 mg/kg, dependendo do tipo de aplicação do anfótero, da região, do segmento e dos aspectos regulatórios. Nos níveis de ocorrência de impurezas, há métodos correntemente utilizados pela indústria empregando técnicas cromatográficas a gás, líquidas e iônicas na matriz Cocoamido Propil Betaína (CAPB), conforme descrito e referenciado na revisão da literatura.

Dentre os modos de detecção disponíveis acoplados à cromatografia a gás, o detector por captura de elétrons (ECD) é correntemente empregado na indústria química. Posto que este detector contém a fonte radioativa de ⁶³Ni, isto acarreta alguns inconvenientes: as empresas são obrigadas a providenciar a licença para uso destes equipamentos junto à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e com isto devem contar com o suporte de técnicos qualificados em proteção radiológica.

O detector ECD é seletivo aos compostos com elementos eletronegativos, tais como os halogenetos orgânicos (Collins *et al.*, 2006) e por esta razão é menos universal do que os seus pares por ionização de chama (FID) e por espectrometria de massas (MS), e por conseguinte, o seu uso fica restrito a poucas classes de analitos.

A partir deste contexto, tornou-se relevante desenvolver alternativas em cromatografia a gás para determinar ácidos cloroacéticos em surfactantes de caráter anfótero por intermédio dos modos de detecção ionização de chama (FID) e espectrometria de massas (MS), tendo em vista a maior disponibilidade destes equipamentos na indústria química em geral e em virtude da resposta mais universal às diversas classes de compostos químicos (Collins *et al.*, 2006).

Por meio dos requisitos metrológicos analíticos compara-se o desempenho das metodologias e de posse destas informações, o usuário pode tomar decisões seguras adotando determinado método que contemple a disponibilidade de tecnologia e equipamentos, o seu respectivo tempo de resposta e a sua robustez para o regime de controle de qualidade (Taverniers *et al.*, 2004).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é desenvolver, validar e comparar as metodologias analíticas para a determinação de monocloroacetato de sódio (MCAS) e dicloroacetato de sódio (DCAS) em cocoamido propil betaína (CAPB), utilizando as técnicas cromatográficas a gás com os modos de detecção por ionização de chama (GC/FID), por captura de elétrons (GC/ECD) e por espectrometria de massas (GC/MS).

Este objetivo é atingido por intermédio da execução das seguintes etapas:

- Definir os procedimentos para a derivação dos analitos MCAS e DCAS e para a extração dos derivados da matriz CAPB;
- Desenvolver as condições da cromatografia a gás para a quantificação de MCAS e DCAS por meio dos modos de detecção GC/FID e GC/MS e aperfeiçoar as condições da detecção GC/ECD;
- Elaborar as curvas de calibração com os padrões de MCAS e DCAS;
- Validar as metodologias propostas para as etapas da preparação da amostra e da determinação cromatográfica;
- Aplicar a metodologia na determinação de MCAS e DCAS em amostra de surfactante de caráter anfótero;
- Comparar o desempenho das metodologias validadas e aplicadas em amostra de surfactante anfótero.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas décadas, segundo Mc Kenna (1997), houve a conformação de uma conjuntura onde as empresas retornaram ao implemento de práticas para assegurar a própria sobrevivência em contextos diversos, tais como: acirramento da concorrência, mercado segmentado, diferenças menos nítidas entre as indústrias, redução do ciclo de vida dos produtos, novas formas de realizar negócios e maior exigência dos clientes.

Conforme relatado por Cavalcanti (2001), anteriormente a riqueza era atribuída ao capital, terra e força de trabalho, ao passo que no início deste novo milênio, mais de 55 % da riqueza mundialmente produzida é resultante do conhecimento e bens intangíveis (patentes, *royalties, softwares* e serviços de consultoria). Conforme o autor, o conhecimento promove mudanças no modelo de produção através de atributos como, pessoal polivalente e respostas em tempo real.

3.1 A matriz CAPB e as impurezas MCAS e DCAS

Em termos gerais, um surfactante contém ao menos um grupo não polar e um grupo polar (ou iônico).

De acordo com o proposto por Daltin (2011), a classificação dos surfactantes conforme o grupo funcional polar é definida da seguinte forma:

- Catiônicos, carregados positivamente e hoje apresentando disponibilidade no mercado brasileiro somente dos sais de amônio quaternário;
- Aniônicos, carregados negativamente, constituindo a classe de surfactantes mais utilizada pela indústria em geral, pois nela se encontram os principais surfactantes dos sabões, sabonetes, xampus e detergentes; esta classe é representada pelos surfactantes com grupos sulfonados, sulfatados e carboxilatos;
- Não iônicos, sem sítios ativos carregados, constituem a segunda classe de surfactantes mais utilizada no mercado e são representados pelos compostos etoxilados e propoxilados;

 Anfóteros, com sítios ativos positivos e negativos em uma mesma estrutura, são normalmente compatíveis com todas as outras classes de surfactantes e tipicamente são representados pelos anfóteros betaínicos ou betaínas.

As betaínas são constituídas de um grupo carboxilato ou sulfonato e de um grupo nitrogênio quaternário. As propriedades como solubilidade, detergência, poder espumante e poder umectante dos tensoativos desta classe estão preponderantemente condicionados ao pH do meio e ao comprimento da cadeia que os constitui. O grupo polar positivo é mais pronunciado em pH menor que 7 ao passo que o grupo polar negativo é mais pronunciado em pH maior que 7 (Farn, 2006).

De acordo com o proposto por Farn (2006) e conforme o esquema de reação ilustrado pela FIG. 2, a matriz objeto do presente estudo cocoamido propil betaína (CAPB) é obtida pela condensação entre o ácido graxo de coco (AGC) e a dimetilaminopropilamina (DMAPA), formando inicialmente o intermediário cocoamido amina, que na etapa seguinte reage com o monocloroacetato de sódio (MCAS) formando a cocoamido propil betaína (CAPB).



Cocamidopropyl betaine

FIGURA 2 - Síntese da CAPB a partir dos insumos AGC, DMAPA e MCAS. Fonte: adaptado de HERA, 2005

A síntese é conduzida em solução aquosa e em meio alcalino.

Na primeira etapa o AGC reage com a DMAPA (composto I ilustrado na FIG. 2) a 160°C para formar a dimetilaminopropil cocoamida (usualmente denominada amidoamina, composto II ilustrado na FIG. 2).

Na segunda etapa ocorre a adição do ácido monoclocroacético MCAA que em meio alcalino é convertido ao MCAS (composto III ilustrado na FIG. 2), reagindo com a amidoamina para formar a CAPB, que é obtida como uma solução aquosa em concentração 30 % (HERA, 2005).

Há formação de água na primeira etapa, o cloreto de sódio está presente na segunda etapa devido aos contraíons das espécies iônicas ilustradas na FIG. 2 e forma-se glicolato de sódio pela hidrólise do MCAS em condições alcalinas.

Na TAB. 1 são apresentados os constituintes da CAPB destacando-se as fórmulas químicas e a categorização na aplicação. Os compostos com função aplicativa são o ingrediente ativo cocoamido propil betaína e o cloreto de sódio formado durante a síntese (Katarzyna *et al*, 2015). As impurezas são as matérias primas residuais monocloroacetato de sódio (MCAS), dicloroacetato de sódio (DCAS) e dimetilamino propilamina (DMAPA), bem como, o intermediário residual cocoamido propilamina e o subproduto glicolato de sódio. Ácidos graxos de coco residuais não estão representados na TAB. 1 devido à presença em níveis de traços e por não haver dados relativos à hidrólise da ligação amida da CAPB que aumentem estes níveis.

As espécies químicas de interesse do presente estudo são as impurezas MCAS e DCAS que para serem quantificadas por cromatografia a gás necessitam ser derivadas a ésteres e separadas dos demais constiuintes da matriz CAPB.

Substância	Fórmulas Estrutural	Classe
Cocoamido,N-[(3- dimetilamino) propil], betaína	$R = C_8 a C_{18}$	Ativo
Cocoamido, N-[(3- dimetilamino) propil] (amido-amina)	$R = C_8 a C_{18}$	Intermediário residual
Cloreto de sódio	Na⁺ Cl⁻	Sub-produto
Monocloroacetato de sódio (MCAS)	Cl O Na ⁺	Matéria prima residual
Dicloroacetato de sódio (DCAS)	CI O Na ⁺	Matéria prima residual
Glicolato de sódio	Na ⁺ OH	Sub-produto
Dimetilamino propilamina (DMAPA)	N N N NH ₂	Matéria prima residual

TABELA 1 - Constituintes da cocoamido propil betaína (CAPB)

Fonte: elaborada pelo autor

3.2 O controle de qualidade

Durante o controle de qualidade analítico de um processo industrial, os principais componentes das amostras em exame são conhecidos e as metodologias para a determinação destes componentes estão estabelecidas (Ciola, 1985).

As principais técnicas de química analítica instrumental empregadas no controle de qualidade são a cromatografia, a eletroquímica e a espectroscopia, cada uma delas com suas particularidades e caracterizadas pelas espécies químicas que permitem a detecção e a quantificação (Vaz, 2010).

Segundo Collins *et al.* (2006), a cromatografia a gás é uma técnica amplamente empregada, devido ao baixo custo, fácil aquisição de proficiência, elevado poder de resolução – possibilitando a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra – e por meio da qual são conseguidos baixos limites de detecção.

A eficácia da técnica cromatográfica a gás é função das propriedades dos analitos em questão, quais sejam, estrutura química dos compostos orgânicos, volatilidade, estabilidade térmica (Collins *et al.*, 2006) e de certas condições analíticas, tais como, a solubilidade das substâncias de interesse em solventes apropriados e a facilidade de separação do restante da matriz (Ciola, 1985).

Segundo Causon (1997), o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade ou pesquisa de um produto envolve a otimização de vários parâmetros, do preparo da amostra, da separação cromatográfica, da detecção e da quantificação.

O processo de determinação dos analitos MCAS e DCAS em CAPB é dividido em duas etapas básicas:

- A preparação da amostra para a injeção no cromatógrafo, que tem por finalidade obter substâncias voláteis, termicamente estáveis e ao menos parcialmente separadas dos demais constituintes de matrizes complexas, segundo modelo proposto por Collins *et al.* (2006);
- A determinação cromatográfica, cuja operação é compreendida por duas condições, que são a separação das espécies de interesse presentes no extrato do restante da matriz e as medições quantitativas (Grob, 1995).

11

A credibilidade de um método analítico durante o uso rotineiro também deve ser assegurada e a validação fornece a evidência documentada de que os métodos são capazes de realizar os procedimentos para os quais foram estabelecidos (Ribani *et al.*, 2004).

3.3 A preparação da amostra: derivação e extração

A cromatografia a gás é empregada na determinação de substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando as substâncias de interesse não apresentam estas características devem ser formados derivados que atendam a estes requisitos (Collins *et al.*, 2006).

O grupo funcional carboxilato presente nas espécies MCAS e DCAS apresenta elevada polaridade. De acordo com Farajzadeh *et al.* (2014), as fases estacionárias polares utilizadas para a análise direta destes compostos apresentam baixa estabilidade térmica.

Ainda segundo Farajzadeh *et al.* (2014), a análise empregando fase estacionária não polar resulta em sorção não linear, produzindo picos não simétricos, com prejuízos na quantificação e na reprodutibilidade dos tempos de retenção.

Pelas razões referidas nos parágrafos anteriores e para obter substâncias voláteis e termicamente estáveis, conforme proposto por Collins *et al.*(2006), recorrese à derivação das espécies químicas de interesse.

Particularmente na GC/MS, além de melhorar a volatilidade e a simetria do pico cromatográfico, segundo Grob (1995), a derivação beneficia também a seletividade e o limite de detecção na quantificação por espectrometria de massas.

Conforme descrito por Kitson *et al.* (1996), os derivatizantes contendo o grupo trimetil silil (TMS) são clássicos para ácidos carboxílicos e os autores relatam os compostos TMSDEA, MSTFA e BSTFA. Contudo, no presente estudo optou-se por considerar os derivatizantes mais convencionais para o controle de qualidade analítico industrial, como os relatados nos próximos parágrafos.

A preparação das amostras e padrões contendo o MCAS e DCAS contemplou a derivação dos analitos em compostos mais voláteis por meio da esterificação em meio ácido com etanol (Sarrion *et al*, 1999). Estão igualmente relatadas na literatura as alternativas de esterificação com metanol (Parsons, 2009; EPA, 2003) e propanol (Bakeas, 2003).

A esterificação consistiu da conversão dos ácidos carboxílicos MCAS e DCAS nos ésteres etílicos correspondentes, conforme demonstram as equações 1 e 2, pelo deslocamento do hidrogênio ativo do ácido carboxílico por um grupo alquila, de modo que os derivados formados têm menor polaridade e maior estabilidade térmica (Farajzadeh, 2014):

$$CICH_2CO_2H + CH_3CH_2OH \longrightarrow CICH_2CO_2CH_2CH_3 + H_2O$$
(1)

 $Cl_2CHCO_2H + CH_3CH_2OH \longrightarrow Cl_2CHCO_2CH_2CH_3 + H_2O$ (2)

Na maioria das análises há necessidade da purificação da amostra pela separação das espécies de interesse do restante da matriz, para evitar a contaminação da coluna, minimizar a interferência e aumentar o sinal dos analitos durante a determinação cromatográfica (Collins *et al.*, 2006).

Os processos de separação das substâncias de interesse do restante da matriz fazem uso das diferenças físico-químicas dos compostos e podem contemplar as seguintes operações: solubilização, precipitação, decantação, filtração, centrifugação, extração, separação de fases e destilação, de acordo com Atkins e Jones (2010).

A utilização da extração líquido-líquido combinada à derivação apresenta interesse por aumentar a recuperação do analito e melhorar a sua separação, detecção e quantificação, conforme Farajzadeh *et al.* (2014).

A extração líquido-líquido baseia-se na transferência de um analito da fase aquosa para um solvente pouco solúvel em água. Segundo Farajzadeh *et al.* (2014), a extração líquido-líquido apresenta as vantagens da simplicidade e aplicação a amplo espectro de compostos, contudo Rezaee *et al.* (2006) relata que alguns inconvenientes podem ocorrer, como a formação de emulsão, o uso de grandes volumes de solvente orgânico tóxico e a geração de grandes quantidades de efluente analítico, podendo tornar a técnica cara, demorada e prejudicial ao meio ambiente. A etapa de extração na determinação de ácidos cloroacéticos e de cloroacetatos foi relatada em alguns trabalhos científicos, tais como:

- Extração com éter terc-butil etílico na determinação destas espécies em água potável, com a posterior conversão nas espécies metiladas por metanol em meio ácido e quantificação por GC/ECD, conforme proposto por Wang et al. (2006) tendo como base EPA (2003);
- Microextração em fase sólida com carboxeno-polidimetilsiloxano na determinação de ácidos haloacéticos em água, após a derivação com dimetil sulfato aos seus ésteres metílicos, de acordo com Sá et al. (2012);
- Microextração após a derivação de grupos funcionais polares hidroxila, amino e carboxilato por intermédio da acilação, sililação e esterificação, segundo Farajzadeh et al. (2014).

Uma das alternativas na preparação de amostras para a injeção cromatográfica consiste em empregar a extração com o solvente orgânico pouco polar, tirando partido das solubilidades diferentes dos ésteres formados e dos demais constituintes da matriz (Atkins e Jones, 2010).

Neste estudo foi empregado o n-hexano por se tratar de um solvente de emprego convencional no controle de qualidade industrial.

3.4 A técnica cromatográfica: GC/FID, GC/ECD e GC/MS

Nesta seção estudou-se a definição e otimização dos procedimentos para a determinação de MCAS e DCAS em CAPB pelas técnicas GC/FID, GC/ECD e GC/MS.

A determinação cromatográfica de ácidos cloroacéticos e de cloroacetatos de sódio está relatada na literatura por intermédio das seguintes técnicas:

- Cromatografia de íons com detecção condutimétrica ou por ultravioleta, Nair *et al.* (1994);
- Cromatografia líquida de alta eficiência empregando a detecção por fotodiôdo após derivatização com 1-naftilamina, Ghassempour *et al.* (2006);
- Cromatografia líquida de alta eficiência utilizando a detecção por ultravioleta, Soleimani *et al.* (2013);

• Eletroforese capilar, Martinez et al. (1998).

As determinações de MCAS e DCAS em CAPB através da cromatografia de íons, da cromatografia líquida e da eletroforese capilar não foram objetos do presente estudo, cujo escopo delimitou-se à técnica de cromatografia a gás.

A aplicação da cromatografia a gás tem como finalidade a separação e análise dos componentes da amostra e a posterior quantificação. Ela é considerada uma técnica de amplo emprego para compostos voláteis, termicamente estáveis e de polaridade baixa e média (Lanças, 2008).

A análise qualitativa identifica os componentes da amostra e o parâmetro utilizado é o tempo de retenção, que vem a ser o tempo transcorrido desde a injeção até o máximo do pico referente ao analito. A análise quantitativa relaciona a área de cada pico no cromatograma às concentrações dos componentes presentes na mistura, de acordo com Skoog *et al* (2008).

A determinação de MCAS e DCAS por cromatografia a gás fez uso do método da padronização externa. De acordo com Ribani *et al.* (2004), este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. As concentrações de cada padrão foram relacionadas às áreas obtidas e resultaram nos gráficos e nas equações da curva analítica. Por meio das áreas obtidas no cromatograma da amostra em exame foram calculadas as concentrações das substâncias de interesse.

Após a introdução no sistema cromatográfico, a amostra é vaporizada e injetada com divisão de fluxo (*split*), onde uma válvula assegura que apenas uma fração da amostra seja eluída para a coluna pelo fluxo de um gás adequado denominado fase móvel ou gás de arraste, segundo Collins *et al.* (2006). A injeção sem divisão de fluxo (*splitless*) é aplicada em determinações onde se requer introdução de maior quantidade de amostra no sistema cromatográfico.

O fluxo de gás juntamente com a amostra vaporizada passa por um tubo aquecido contendo a fase estacionária, que é uma coluna cromatográfica onde ocorre a separação dos constituintes da amostra. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente (cromatografia gás-sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (cromatografia gás-líquido com coluna empacotada ou recheada) ou sobre a própria parede do tubo (cromatografia gasosa de alta resolução), conforme proposto por Ciola (1985).

De acordo com Grob (1995), a coluna pode ser considerada o item central da cromatografia a gás e dentre as fases estacionárias capilares mais comuns encontram-se as do tipo polisiloxano. No presente estudo foram empregadas as colunas DB-1 e DB-5, que estão detalhadas em materiais e métodos.

As características da cromatografia a gás que devem ser exploradas segundo Grob (1995) e que a tornaram relevante ao controle de qualidade, são as seguintes:

- Resolução: a técnica permite a separação de componentes com pontos de ebulição próximos, principalmente, por meio da seleção da fase estacionária;
- Sensibilidade: detectores convencionais como o de ionização de chama (FID) e por condutividade térmica (TCD) detectam frações em partes por milhão e detectores mais específicos como o de captura de elétrons (ECD) detectam em partes por bilhão;
- Tempo de Análise: a separação dos componentes de uma amostra pode levar de segundos a minutos, de acordo com as condições operacionais de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária;
- Conveniência: por ser um procedimento relativamente direto, é possível treinar pessoal não especializado para separações de rotina;
- Custo: comparados a instrumentos analíticos atuais, os cromatógrafos a gás apresentam-se vantajosos nos valores de aquisição e de manutenção;
- Versatilidade: a cromatografia a gás adapta-se facilmente desde a análise de gases permanentes a líquidos de elevado ponto de ebulição;
- Poder de separação: a baixa viscosidade da fase móvel permite o emprego de colunas longas com alto poder de separação;
- Sortimento de sistemas de detecção: os detectores da cromatografia a gás são simples, sensíveis e possuem rápidas taxas de resposta;
- Tratamento de dados: estes mesmos detectores comunicam-se com ampla variedade de módulos de armazenamento e tratamento de dados;
- Automação: a cromatografia a gás pode ser usada para monitorar vários processos químicos onde as amostras são coletadas *on line* e injetadas em uma coluna para separação e detecção.

A cromatografia a gás com o detector de ionização de chama (GC/FID) é uma técnica por meio da qual o gás de arraste proveniente da coluna passa por uma pequena chama alimentada por gás hidrogênio e ar, onde eletrodos posicionados próximos à chama do detector FID estabelecem uma diferença de potencial, conforme ilustrado pela FIG. 3. Quando apenas o gás de arraste passa pela chama gera pequena corrente entre os eletrodos. Ao passarem os compostos orgânicos da amostra formam-se radicais que sofrem ionização no campo elétrico, aumentando consideravelmente a corrente que é amplificada e registrada (Skoog *et al.,* 2008).



FIGURA 3 – Esquema do detector FID ilustrando a formação de íons por meio da queima de composto orgânico em chama de H₂ e O₂ Fonte: adaptada de Shimadzu do Brasil

O FID é sensível a compostos orgânicos e não é sensível às impurezas comuns dos gases de arraste, tais como, H_2O e CO_2 e estas propriedades o tornaram de uso mais geral e útil para a análise da maioria das amostras orgânicas. Devido a adequação de seu volume e da chama às técnicas de baixa vazão que empregam colunas capilares, o FID fornece resposta proporcional à massa da substância por unidade de tempo, com simetria de pico e baixo ruído (Grob, 1995).

A determinação MCAS e DCAS em CAPB pelo emprego de derivação e detecção no modo FID, utilizou como ponto de partida o modelo proposto por

Hoogenboom e Rammel (1987), que determinou monofluoracetato de sódio pela sua conversão a éster benzílico.

O modo de detecção FID não dispõe da especificidade proporcionada pelo GC/MS segundo Grande e Aquino (1990), nem a sensibilidade do GC/ECD (Skoog *et al,* 2008), todavia é o menos complexo e o mais largamente empregado em controle de qualidade industrial pela sua universalidade, não demandando a fonte radioativa presente no detector ECD, ou uma tecnologia mais sofisticada como a espectrometria de massas.

A cromatografia a gás com o detector por captura de elétrons (GC/ECD) consiste de uma fonte de material radioativo de ⁶³Ni que gera elétrons livres por meio de colisões com as moléculas do gás de arraste, conforme ilustra a FIG. 4, produzindo a corrente elétrica que é amplificada e resulta na linha de base. As moléculas orgânicas eluídas da coluna cromatográfica passam pelo detector e capturam elétrons, causando a diminuição da corrente proporcional à concentração destas espécies eletrofílicas (Grob, 1995).



FIGURA 4 – Esquema do detector ECD, ilustrando o anodo com a fonte ß emissora de ⁶³Ni (1), a saída de gases (2), o catodo (3), a cavidade onde há supressão da corrente pela espécie eletrofílica (4) e a coluna cromatográfica (5) Fonte: adaptada de Shimadzu do Brasil

O ECD é seletivo devido à sensibilidade para moléculas eletronegativas como halogenetos orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos e é pouco sensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas (Skoog *et al*, 2008). De modo análogo ao proposto por Wang e Wong (2005) – que procedeu à esterificação com metanol associada a técnica *headspace* com detecção ECD – e ao proposto por Bakeas *et al.* (2003) – que procedeu à derivação aos seus respectivos propil ésteres com detecção ECD - a determinação de MCAS e DCAS em CAPB foi conduzida neste trabalho por meio da esterificação com etanol e detecção ECD.

O espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a gás (GC/MS) é um detector de alta seletividade e sensibilidade. Conforme definição IUPAC, a espectrometria de massas trata do estudo de sistemas pela formação de íons em fase gasosa, com e sem fragmentação, que são caracterizados por suas relações massa-carga e abundâncias relativas.

Segundo Karasek e Clement (1988), a espectrometria de massas pode ser dividida em três processos separados – a ionização, a separação de massas e o registro de íons formados – e diferentes métodos de ionização podem ser combinados com diferentes técnicas de separação de massas. Os principais componentes dos espectrômetros de massas são os seguintes: a fonte de íons, o analisador de massas e o detector de íons, de acordo com o ilustrado na FIG. 5.



FIGURA 5 – Esquema do modo de detecção MS onde ocorre a formação de íons de compostos orgânicos na fonte de íons, que são separados pela razão m/z no analisador de massas e quantificados por abundância no detector Fonte: adaptada de Shimadzu do Brasil

A amostra é introduzida e vaporizada no sistema de injeção operado sob vácuo de tipicamente 10⁻⁶ Torr e temperatura superior a 300°C. Na fonte de íons a

amostra contendo as moléculas do analito sofre impacto por feixe de elétrons de alta energia (70 eV), produzindo o cátion representado por M⁺ e denominado íon molecular (Grob, 1995).

O íon molecular M⁺ é produzido em diferentes estados de energia. A energia interna é dissipada por reações de fragmentação e os fragmentos de menores massas são ionizados e também convertidos a íons. O íon M⁺ permite determinar diretamente o peso molecular do composto ou número inteiro mais próximo deste e os demais íons com razões massa-carga (m/z), fornecem informações importantes para a elucidação da estrutura (Skoog *et al.*, 2008).

No detector o feixe de íons é convertido em sinal elétrico e os dados que caracterizam os íons moleculares resultam do controle da função de varredura.

Os dados podem ser adquiridos empregando dois modos. No modo de monitoramento contínuo do espectro total (*full scan*), há varreduras repetitivas de valores m/z em função do tempo, gerando um cromatograma de corrente iônica total (total ionic current, TIC), que consiste em somar as correntes geradas pela totalidade dos íons fragmentados à medida que passam através do detector (McMaster, 2008).

No modo de varredura por monitoramento de íons selecionados (*selected ion monitoring*, SIM), as massas a monitorar são selecionadas antes da varredura. O perfil cromatográfico é obtido somente com base no sinal gerado para fragmentos específicos, por serem característicos de um determinado analito, beneficiando a razão sinal/ruído e a seletividade da determinação (McMaster, 2008).

Conforme proposto por Karasek e Clement (1988), o ganho em sensibilidade no modo de varredura SIM, quando comparado ao modo *full scan,* é proporcional à redução de tempo em que a radiofrequência sintoniza os poucos íons selecionados. O ganho em seletividade é intrínseco ao não monitoramento dos demais íons pelo MS. Contudo, os mesmos autores advertem para o risco da perda de detecção dos analitos pelo modo SIM diante de uma escolha pobre de íons a serem monitorados.

O espectro de massas é composto por um gráfico de barras de abundâncias relativas de íons com base no íon mais abundante (pico base). De acordo com o proposto por Karasek e Clement (1988), o espectro de massas contém informações estruturais dos analitos e a sua interpretação detalhada é conduzida conforme as seguintes etapas:

Procurar o íon molecular M⁺;

- Observar o aspecto geral do espectro: ele fornece pistas estruturais, tais como, padrões de fragmentos que decrescem com a massa molar como nos alcanos e a elevada abundância do íon molecular nos aromáticos;
- Analisar o espectro por conjuntos de picos de padrões isotópicos característicos: as abundâncias isotópicas fornecem pistas dos tipos e número de átomos que compõem a fórmula empírica do composto;
- Procurar pela perda de pequenos fragmentos neutros do íon molecular que indicam a presença de grupos funcionais ou unidades de cadeia: são exemplos os fragmentos CH₃⁺, CH₃CH₂⁺, OH⁺ e NH₂⁺;
- Procurar pelos fragmentos característicos de baixa massa, tais como os que fazem parte da conhecida série de m/z 43, 57, 71 e 85 de alcanos lineares;
- Comparar aos espectros de referência da biblioteca NIST;
- Verificar a interpretação contra o espectro do composto puro nas mesmas condições instrumentais.

A determinação de MCAS e DCAS em CAPB por meio da derivação com etanol em meio ácido sulfúrico a etil ésteres, foi conduzida pelo emprego da extração líquido-líquido e por meio da detecção por espectrometria de massas, de modo análogo ao descrito por Sarrion et al. (1999).

Com base no que foi proposto por Grob (1995), a otimização da determinação de MCAS e DCAS por cromatografia a gás, neste estudo, envolveu os requisitos comuns às técnicas de separação e teve por finalidade conseguir:

- Limite de quantificação inferior ao máximo especificado para a impureza;
- Tempo de análise apropriado às necessidades de controle de qualidade;
- Linearidade de resposta do detector na faixa de interesse;
- Custo otimizado por análise;
- Compatibilidade com a instrumentação corrente;
- Emprego de colunas e consumíveis convencionais;
- Robustez do método frente às oscilações instrumentais e operacionais;
- Degradação e manuseio de amostra que não afetem o desempenho do método.

Conforme proposto por Lanças (2008), as tendências em cromatografia a gás apontam para a miniaturização das técnicas de preparo da amostra (microextração em fase sólida ou líquida) e das colunas cromatográficas, diminuição da quantidade de amostra, o acoplamento a técnicas espectroscópicas e a integração *on line* entre preparo da amostra, *clean-up* e separação cromatográfica (SPE-GC/MS).

Outras tendências, segundo Pedroso (2011), são a cromatografia a gás rápida e a cromatografia a gás bidimensional, onde o sistema de detecção tem de ser rápido o suficiente para monitorar o efluente da coluna cromatográfica, sendo indicados para estas técnicas os detectores por ionização de chama e o espectrômetro de massas com analisadores por tempo de voo.

3.5 A validação e a incerteza da medição

A demonstração da confiabilidade de medições químicas por meio da comparabilidade, incerteza e rastreabilidade, segundo Bulska *et al.*(2003), está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, posto que importantes decisões são baseadas em dados analíticos.

Para demonstrar que um método analítico produz resultados confiáveis, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, que é a comprovação por meio de testes e apresentação de evidências objetivas de que o método desenvolvido é adequado ao uso pretendido (INMETRO, 2011).

Motivações legais, regulatórias, técnicas e comerciais também justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação, sendo fundamental demonstrar por critérios objetivos, que as metodologias de ensaio conduzem a resultados adequados à qualidade pretendida (Ribani *et al.*, 2004; Leite, 2008).

A validação analítica deve ser representativa e conduzida de modo que a variação das amostras em exame – em natureza e concentração – seja adequada ao uso pretendido da metodologia. Resultados não confiáveis podem conduzir a erros ou decisões desastrosas e seus consequentes custos (Bievre, 2005).

Um método para um composto majoritário requer uma abordagem diferente de um método desenvolvido para a análise de traços, segundo Ribani *et al.* (2004). Para analisar impurezas em baixas concentrações, por exemplo, não há necessidade de validar a linearidade do método sobre toda a faixa dinâmica do equipamento. A intenção de uso do método inclui os diferentes tipos de equipamentos, a frequência e os lugares em que o método será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para instrumento e laboratório específicos, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios na validação.

Para comprovar a competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a uma acreditação por um órgão de âmbito nacional ou internacional, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), no Brasil.

Os documentos disponíveis para a validação de métodos analíticos são a resolução RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e a orientação DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011).

A ANVISA e o INMETRO são responsáveis por acompanhar e acreditar a competência de laboratórios de ensaios e dispõem de documentos específicos para esta finalidade. As diferentes terminologias e algumas características de desempenho de um método analítico são apoiadas pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012).

Na TAB. 2 são apresentadas as definições adotadas pela ANVISA e pelo INMETRO em seus respectivos documentos para os principais parâmetros de desempenho que fazem parte da validação analítica.

Segundo Goulart (2012) em seu estudo para a quantificação de alcalóides em amostras de cocaína por cromatografia a gás, os parâmetros de validação utilizados por institutos como a farmacopéia americana (USP), a rede europeia para a qualidade em química analítica (EURACHEM), o conselho internacional de harmonização (ICH) e a ANVISA, foram a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, intervalo e robustez.

	INMETRO	ANVISA	
Seletividade	Habilidade do método identificar	Capacidade de medir um composto	
	e dosar o analito na presença	em presença de outros, tais como,	
	de interferentes.	impurezas, produtos de degradação	
		e componentes da matriz.	
Linearidade	Dependência entre a resposta	Capacidade de demonstrar que os	
	medida e a concentração do	resultados são proporcionais à	
	analito é proporcional e linear.	concentração do analito, em um	
		intervalo especificado.	
Repetibilidade	Dispersão de resultados obtida	Concordância entre os resultados	
	com os mesmos procedimento,	em curto período de tempo com o	
	instrumento, analista e local	mesmo analista e a mesma	
	mediante repetições no menor	instrumentação.	
	tempo.		
Exatidão	Avaliada numericamente pela	Proximidade dos resultados do	
	tendência, que é expressa como	método em estudo em relação ao	
	recuperação analítica (valor	valor verdadeiro.	
	observado/valor esperado).		
Limite de	Concentração mínima de um	Menor concentração do analito que	
Detecção	analito que pode ser detectada,	pode ser detectada e não	
	distinguindo de branco ou ruído.	necessariamente quantificada, sob	
		as condições estabelecidas.	
Limite de	Menor concentração do analito	Menor concentração do analito que	
Quantificação	determinada com tendência e	pode ser determinada com precisão	
	precisão satisfatórias.	e exatidão aceitáveis.	
Robustez	Mede a influência de variações	Capacidade em resistir a pequenas	
	no procedimento nos	e deliberadas variações dos	
	resultados.	parâmetros analíticos.	

TABELA 2 - Definições dos parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA

Fonte: adaptada de Araújo Neto e Barros (2013)

Por se tratar de um estudo cujas determinações envolvem uma impureza com teor inferior a 0,01 % empregando curva de calibração, foram utilizados os seguintes

parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho e robustez, de acordo com o proposto pela *International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* ICH (2005), organização que congrega autoridades reguladoras e a indústria farmacêutica da Europa, Japão, Estados Unidos e Canadá e que harmoniza globalmente critérios de validação para o segmento farmacêutico.

3.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui em medir um composto na presença de outros, distinguindo de forma inequívoca uma ou mais substâncias de interesse de outros componentes na matriz analisada (Leite, 2008). Trata-se de um parâmetro de desempenho preliminar ao desenvolver uma metodologia analítica e quando não assegurado, pode comprometer os demais parâmetros, como linearidade, precisão e exatidão (Ribani *et al.*, 2004).

Um método analítico é dito seletivo quando, a despeito de produzir repostas para vários compostos químicos com características comuns, tem a capacidade de distinguir a resposta de um composto da resposta de outros (INMETRO, 2011).

Em cromatografia, a seletividade deve garantir que determinado pico represente exclusivamente o composto em estudo (Ribani *et al.*, 2004, Leite, 2008). Quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, a seletividade pode ser avaliada pela adição de padrão à matriz por intermédio da:

- Observação do cromatograma gerado pela matriz fortificada pelo padrão;
- Homogeneidade das variâncias em amostras com matriz e sem matriz, por meio do teste Fisher-Snedecor (F) que é calculado segundo a equação 3 e comparado a um valor tabelado:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$
(3)

onde:

 s_1^2 e s_2^2 são as variâncias das injeções em setuplicata dos ensaios com e sem matriz, respectivamente;
- Comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas sem a presença da matriz e por adição da substância de interesse à matriz;
- Comparação das médias obtidas em amostras com matriz e sem matriz, por meio do teste t-Student (t) que é calculado de acordo com a equação 4 e comparado a um valor tabelado:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$
(4)

onde:

x₁ e x₂ são as médias das respostas dos analitos nas amostras com e sem matriz, respectivamente;

n₁ e n₂ representam o número de replicatas para os ensaios com e sem matriz, respectivamente;

s₁² e s₂² são as variâncias das injeções em setuplicata dos ensaios com e sem matriz, respectivamente.

Neste estudo foram aplicadas a observação dos cromatogramas obtidos pelos modos de detecção ECD, FID e MS e a homogeneidade das variâncias.

3.5.2 Linearidade

A linearidade mede a capacidade do método produzir resultados proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, conforme Goulart (2012).

Na maior parte dos casos, a relação entre o sinal e a concentração da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para as concentrações conhecidas dessa espécie. Os modelos matemáticos obtidos pelo método da regressão linear definem a função conhecida por curva analítica, que é a equação da reta expressa por meio da equação 5 e o coeficiente de determinação (R²), que expressa o ajuste da curva obtida pela

avaliação da dispersão dos pontos experimentais. A ANVISA (2003) recomenda R² superior a 0,98 e o INMETRO (2011) R² superior a 0,81.

$$y = ax + b \tag{5}$$

onde:

y é a resposta medida (área do pico cromatográfico);

x é a concentração do analito;

a é o coeficiente angular (inclinação da curva);

b é o coeficiente linear (interseção da curva com o eixo y).

Uma curva analítica pode ser construída por diluição da solução mãe ou ponto a ponto (Leite, 2008). O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011) recomenda no mínimo cinco níveis de concentração com um número de replicatas similar ao empregado na rotina do laboratório.

A verificação da linearidade deve ser realizada em cada ponto da curva analítica por meio do desvio padrão dos resíduos, assegurando a consistência dos dados experimentais com a regressão linear. Aplica-se o teste t-Student (t) onde o valor calculado por meio da equação 6 deve ser menor que o valor tabelado.

$$t = \frac{res}{\frac{s_r}{\sqrt{n}}}$$
(6)

onde:

res é o resíduo, ou seja, a diferença entre o valor medido e o valor teórico; sr é a estimativa do desvio padrão dos resíduos; n representa o número de replicatas.

3.5.3 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra ou em amostras semelhantes ou em padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003; ICH, 1997). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, conforme Ribani *et al.* (2004), em validação de métodos o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), como mostra a equação 7.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_{i} - x_{m})^{2}}{n - 1}}$$
(7)

onde:

xi é o valor individual de uma medição;

x_m é a média aritmética de um pequeno número de medições;

n representa o número de medições.

Outra expressão da precisão é o desvio padrão relativo (DPR), cuja expressão está demonstrada na equação 8.

DPR(%) =
$$\frac{s}{x_m}$$
.100 (8)

onde:

s é a estimativa do desvio padrão;

x_m é a média aritmética de um pequeno número de medições.

Segundo o INMETRO (2011), a aceitabilidade das características de precisão de um método analítico pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) a partir da expressão de Horwitz, ilustrada pela equação 9.

$$DPR(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$
(9)

onde:

C é a concentração percentual do analito em estudo.

Por meio da equação 9 é possível concluir que um método que quantifica compostos entre 1 e 100 % tem DPR aceitável de 1 a 2 % e um método com

analito em nível de partes por milhão (1 a 100 mg/kg) apresenta DPR aceitável entre 4 e 8 %.

De acordo com a ANVISA (2003), para impurezas o DPR não deve exceder 15 %, exceto próximo ao limite de quantificação que pode alcançar 20 %.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade (série de corridas nas mesmas condições operacionais), precisão intermediária (série de corridas com alteração em uma das variáveis, como período de execução, equipamento, analista) e a reprodutibilidade entre laboratórios (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003; ICH, 1997; Ribani *et al.*, 2004).

No presente estudo empregou-se o limite de repetitividade (r), que indicou a dispersão dos resultados dentro das mesmas condições operacionais e foi calculado de acordo com a equação 10.

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot s \tag{10}$$

onde:

t é o fator Student para n-1 graus de liberdade e 95% de confiança; s é a estimativa do desvio padrão de sete replicatas de cada concentração da curva analítica.

O interesse prático do limite de repetitividade (r) consiste em disciplinar as diferenças de respostas obtidas entre repetições, definindo se determinadas replicatas devem compor o cálculo da média ou devem ser descartadas.

3.5.4 Exatidão

Este parâmetro representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003).

Quando não estão disponíveis um material de referência certificado (MRC) ou uma segunda metodologia bem caracterizada e quando não é possível a participação em comparações interlaboratoriais, sugere-se a avaliação da exatidão por meio do emprego da adição de padrão e o cálculo do percentual quantificado em relação à quantidade adicionada (recuperação).

Segundo a ANVISA (2003), devem ser conduzidas nove determinações dentro do intervalo linear do método, consistindo de três réplicas de três concentrações. Também de acordo com o INMETRO (2011), as amostras podem ser fortificadas com o analito em três concentrações da faixa de uso do método.

Conforme proposto por Ribani *et al* (2004), taxas de recuperação de 70 a 120 % são aceitas para concentrações inferiores a 0,01 %.

3.5.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2011; ICH, 2005; ANVISA, 2003).

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004). Os dois primeiros procedimentos estão relacionados ao método de integração e de recursos que demonstram o ruído da linha de base e o método por intermédio da curva analítica relaciona a resposta com a matriz.

Neste trabalho adotou-se o método da curva analítica devido ao interesse em conjugar a resposta das técnicas instrumentais para a matriz CAPB.

O limite de detecção (LD) foi calculado conforme demonstra a equação 11.

$$LD = t.s \tag{11}$$

onde:

t é o fator Student para n-1 graus de liberdade e 95% de confiança;

s é a estimativa do desvio padrão de sete replicatas de menor concentração da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Tal como o LD, o LQ também é expresso como uma concentração e a mesma estratégia pode ser adotada: o LQ pode ser calculado a partir de parâmetros da curva analítica, utilizando a média da resposta e o desvio padrão da resposta, como demonstra a equação 12.

$$LQ = x \cdot 5 \cdot s \tag{12}$$

onde:

x é a média da resposta para sete replicatas da menor concentração da curva analítica;

s é a estimativa do desvio padrão para sete replicatas da menor concentração da curva analítica.

Por se tratar de metodologia por cromatografia a gás, LD e LQ foram calculados por intermédio da curva analítica, porque estatisticamente melhor se aplica à técnica e com a expectativa de que a curva analítica contenha a concentração correspondente ao LQ (Ribani et al., 2004).

3.5.6 Robustez

A robustez avalia quanto um método resiste frente a pequenas e deliberadas variações da metodologia proposta (INMETRO, 2011; Ribani *et al.*, 2004).

No presente estudo, foram consideradas as influências no desempenho das metodologias de variações individuais, tais como, as condições da esterificação e da extração e as variáveis de operação do cromatógrafo.

3.5.7 Incerteza da Medição Cromatográfica

A recente preocupação da ciência da medição química é representada pelo cálculo estatístico da incerteza associada aos resultados obtidos experimentalmente, conforme relato de Chui *et al.* (2001). Estes autores elegem como principais fontes de variabilidade analítica a amostragem, a preparação da amostra, os títulos dos padrões e suas preparações, a extração ou digestão e interferências que vão desde os efeitos de matriz até calibração dos instrumentos.

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2008), a incerteza de uma medição é um parâmetro associado ao resultado, que caracteriza a dispersão de valores em torno da média.

As fontes de incertezas devem ser reconhecidas e identificadas para que possam ser quantificadas de forma a possibilitar a influência na medição final (Leite, 2008). A análise do conjunto dessas incertezas conduzirá à estimativa da incerteza combinada.

A incerteza total é a soma das incertezas geradas no processo de medição, expressas como um desvio padrão, conforme proposto por Chui *et al.* (2001). Através da combinação das variâncias calcula-se a incerteza padrão combinada e estabelecido um grau de confiança, determina-se a incerteza combinada expandida, por meio do critério do intervalo de confiança, utilizando o fator de abrangência (k). Na maioria dos casos, usa-se o valor de k = 2 correspondente ao estabelecimento do nível de confiança de aproximadamente 95 %.

De acordo com o proposto no Guia Prático RM 68 da Rede Metrológica RS (2013), no presente estudo foram conduzidos os seguintes passos para avaliar a incerteza de medição:

- Definiram-se os modelos matemáticos;
- Estabeleceram-se os componentes da incerteza;
- Estimaram-se as distribuições de probabilidade;
- Calcularam-se as incertezas-padrão;
- Obtiveram-se as incertezas combinadas e expandidas para expressar os resultados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os reagentes, os padrões analíticos, as amostras examinadas e os equipamentos utilizados na seção *Materiais*, e as etapas necessárias ao desenvolvimento das metodologias na seção *Métodos*.

A atividade experimental foi desenvolvida nos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN.

As metodologias foram desenvolvidas para determinar os teores de MCAS DCAS em CAPB, após a esterificação dos analitos de interesse com etanol em meio ácido e a posterior extração com hexano.

A separação, a identificação e a quantificação foram conduzidas por meio da cromatografia a gás acoplada aos detectores ionização de chama (FID), captura de elétrons (ECD) e espectrometria de massas (MS), com o emprego de curva de calibração. O fluxograma de execução das determinações é apresentado na FIG. 6.



FIGURA 6 - Fluxograma da determinação de MCAS e DCAS por GC FID/ECD/MS

4.1 Materiais

A amostra do surfactante de caráter anfótero CAPB foi obtida de um dos produtores disponíveis no mercado nacional, que segue protocolos definidos para amostragens de produtos acabados ou em processo. Esta amostra apresenta características físico-químicas uniformes reportadas em certificado analítico, tais como, aspecto, pH e ingrediente ativo e foi mantida em condições ambientais típicas de um laboratório químico.

Na etapa de derivação foram utilizados os seguintes critérios para a seleção do reagente derivatizante: promover reação quantitativa, não causar alteração estrutural ou funcional na matriz e produzir derivados estáveis frente ao tempo de reação e quantificação, conforme proposto por Ferreira (2011).

Dentre os derivatizantes convencionais relatados na literatura - alcoóis metílico, etílico e n-propílico – realizaram-se os ensaios com álcool etílico 96 % e álcool etílico absoluto, bem como, foram avaliados a temperatura e o tempo de reação para padronizar as melhores condições de conversão aos ésteres.

Com respeito a etapa da extração, os critérios utilizados para a escolha do solvente foram: a facilidade de separação da fase aquosa, o desempenho do solvente para extrair os ésteres formados e a conveniência quanto à disponibilidade e aplicabilidade na cromatografia a gás.

Realizaram-se ensaios com n-hexano que atendeu aos requisitos do parágrafo anterior e permitiu também padronizar o tempo e o meio de agitação para obter a melhor recuperação dos analitos na injeção cromatográfica.

Os materiais químicos utilizados no presente estudo foram:

- Coco Amido Propil Betaína (CAPB), produto técnico obtido de fabricante nacional, número CAS 61789-40-0, lote 757401, teor 30 %;
- Acido Monocloroacético P.A. Fluka Sigma-Aldrich, número CAS 79-11-8, lote 1371917, teor 100 %;
- Acido Dicloroacético P.A. Merck, número CAS 79-43-6, lote S6149141, teor 99,3 %;
- Álcool Etílico Absoluto P.A. ACS, Alphatec, número CAS 64-17-5, teor 99,7 %;
- Ácido Sulfúrico P.A. ACS, Alphatec, número CAS 7664-93-9, teor 95-99 %;

- Mistura de Hexanos Grau HPLC EMD, CAS 110-54-3, teor mín. 98,5 %;
- Cloreto de Sódio P.A. Merck, número CAS 7647-14-5, teor 99,9 %;
- Água desmineralizada pelo processo de osmose reversa.

Os equipamentos e acessórios utilizados no presente estudo foram:

- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010, equipado com detector por captura de elétrons (Eletrons Capture Detector - ECD) e com detector por ionização de chama (Flame Ionization Detector – FID), microprocessador de dados equipado com o programa GC Solution;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 Plus, acoplado ao detector de espectrometria de massas Shimadzu QP2010 SE, microprocessador de dados equipado com o programa GC/MS Solution;
- OpenChrom: software de código aberto para visualização e tratamento de dados em cromatografia e espectrometria, a partir dos arquivos nativos dos programas de diversos fornecedores, como Agilent, Shimadzu, Thermo Fisher e Perkin Elmer;
- Balança Analítica Shimadzu AX200, resolução 0,0001 g;
- Agitador magnético Quimis com aquecimento;
- Forno do cromatógrafo a gás Perkin Elmer GC Autosystem, adaptado como estufa para a reação de esterificação, programado para estabilizar a 100°C por 20 minutos;
- Vidraria e consumíveis para cromatografia convencionais para laboratórios analíticos: béqueres, balões volumétricos, pipetas, frascos de vidro de 22 mL para uso em *headspace*, *vials* de 2 mL, septos, microsseringa Hamilton de 10 μL e lacres metálicos;
- Colunas capilares DB1 ou DB5, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,32 mm e espessura de filme 0,25 µm, conforme características demonstradas na TAB. 3.

Características	Coluna DB-1	Coluna DB-5
Composição química	100% dimetilsiloxano	95% dimetilsiloxano 5% difenilpolisiloxano
Estrutura	$ \begin{array}{c c} & CH_{3} \\ & & $	$ \begin{bmatrix} CH_{3} \\ \\ O-Si \\ \\ CH_{3} \\ 95\% \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_{6}H_{5} \\ \\ O-Si \\ \\ C_{6}H_{5} \\ 5\% \end{bmatrix} $
Polaridade	Não polar	Não polar
Resistência ao "sangramento"	Elevada	Muito elevada
Aplicação	Geral, inerte e seletiva a ampla gama de compostos ativos	Geral, inerte e seletiva a ampla gama de compostos ativos e total compatibilidade com GC/MS
Fases similares	HP-1, Rtx-1, CP-Sil 5	HP-5, Rtx-5, CP-Sil 8

TABELA 3 - Características das colunas capilares DB-1 e DB-5

Fonte: elaborada pelo autor

4.2 Métodos

A quantificação dos analitos foi realizada segundo o procedimento analítico de padronização externa, pela construção das curvas analíticas com cinco concentrações de padrões e por intermédio da regressão linear as equações foram estabelecidas, permitindo determinar a concentração da amostra a partir da normalização de área.

4.2.1 Preparo das soluções

As soluções empregadas no presente estudo foram as seguintes:

- Cloreto de Sódio 10%: Pesar 10 g de cloreto de sódio com precisão 0,1 g em balão de 100 mL, completar com água e dissolver;
- Solução estoque da curva de calibração: Pesar 0,09 g de Ácido Monocloroacético e 0,09 g de ácido Dicloroacético com precisão mínima de 0,001 g em balão de 100 mL, completar com água e dissolver;
- Padrões de trabalho da curva de calibração: Pipetar alíquotas da solução estoque e diluir com Etanol Absoluto P.A. em balão volumétrico, conforme ilustra a TAB. 4.

Padrão	Volume da alíquota (mL)	Volume do Balão (mL)	Concentração aproximada dos analitos (mg/kg)
1	1,0	250,0	3
2	1,0	100,0	8
3	1,0	50,0	16
4	3,0	100,0	24
5	3,0	50,0	48

TABELA 4 - Volume de alí	juotas e balões para o j	preparo da curva de ca	alibração
--------------------------	--------------------------	------------------------	-----------

Fonte: elaborada pelo autor

4.2.2 Preparo da curva de calibração e da amostra em exame

As soluções de trabalho – padrões analíticos – e as amostras foram preparadas conforme as etapas descritas a seguir:

- Adicionar aos frascos de vidro para headspace 3 mL de cada solução padrão ou 1 mL da amostra de CAPB e 2 mL de Álcool Etílico Absoluto P.A. utilizando pipetas volumétricas;
- Adicionar a cada frasco 0,2 mL de Ácido Sulfúrico P.A. com pipeta graduada

- Lacrar os frascos e introduzir as amostras no forno programado para a temperatura de 100°C e para o tempo de 20 minutos;
- Retirar os frascos da estufa e após estabilização à temperatura ambiente, adicionar 5 mL da solução de Cloreto de Sódio 10% com pipeta graduada e 5 mL de Hexano P.A. com pipeta volumétrica;
- Introduzir as barras de agitação magnética, lacrar os frascos e agitar por 5 minutos
- Aguardar a plena separação das fases e transferir a fase superior em meio Hexano – para o vial de 2 mL;
- Proceder com a injeção cromatográfica.

4.2.3 Condições de operação do cromatógrafo a gás

As condições cromatográficas para os detectores FID e ECD foram estudadas para os modos de injeção com e sem divisão de fluxo - *split* e *splitless* - na delimitação do volume de injeção, para a temperatura do injetor e para as polaridades das colunas capilares DB1 e DB5. Segundo Jennings *et al* (1997), o compromisso entre todas estas variáveis afeta o desempenho cromatográfico para a separação do solvente e constituintes da amostra.

Os estudos com o detector MS foram direcionados para a comparação entre os modos de leitura por varredura contínua de íons (*full scan*) e o modo por varredura de íons selecionados (*Selected Ion Monitoring*, SIM), reduzindo o número de fragmentos a serem monitorados, conforme proposto por Amaral *et al* (2011).

A programação de temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi aperfeiçoada para posicionar os picos de interesse em regiões de isoterma e a temperatura do injetor foi elevada para obter ganho em simetria, conforme proposto por Ciola (1985).

Os cromatógrafos GC/FID e GC/ECD foram operados nas seguintes condições: temperatura do injetor a 260°C, volume de injeção de 1,0 µL, modo de injeção com divisão de fluxo *split* de 1:20, programação do forno da coluna com isoterma em 50°C durante 2 minutos, aquecimento de 10°C/min., isoterma em 120°C durante 2 minutos, aquecimento de 30°C/min. e isoterma em 250°C durante 1

minuto, fluxo do gás de arraste Helio ou Hidrogênio de 1 mL/min. e temperatura do detector a 300°C.

Os tempos de retenção obtidos foram de 5,2 \pm 0,2 min. para o monocloroacetato de etila e de 6,5 \pm 0,3 min. para o dicloroacetato de etila.

O GC/MS foi operado nas seguintes condições: temperatura do injetor a 275°C, volume de injeção de 1,0 μ L, modo de injeção com divisão de fluxo *split* de 1:10, programação do forno da coluna com isoterma em 50°C durante 4 minutos, aquecimento de 10°C/min., isoterma em 60°C durante 1 minuto, aquecimento de 7°C/min., isoterma em 120°C durante 1 minuto, aquecimento de 30°C/min., isoterma em 280°C por 1 minuto, fluxo do gás de arraste Helio de 1mL/min., varredura de íons no modo SIM monitorando os fragmentos com m/z 49, 51, 79, 83 e 85 e temperatura do detector a 300°C.

Os tempos de retenção obtidos foram de 5,5 \pm 0,2 min. para o monocloroacetato de etila e de 7,6 \pm 0,2 min. para o dicloroacetato de etila.

De acordo com o proposto por Chan *et al* (2010), o desempenho do sistema GC deve ser monitorado para assegurar que os dados produzidos pelas análises GC sejam confiáveis.

O mesmo autor propõe critérios para a qualificação operacional do sistema GC, que a despeito de não terem sido conduzidos no presente estudo, são recomendáveis para um regime de rotina. Os critérios relatados foram:

- Racional de testes: a verificação de desempenho do GC emprega testes modulares e holísticos. Os testes modulares são medições diretas de componentes do sistema GC realizadas por instrumentos calibrados, tais como, termômetros, medidores de fluxo e manômetros. Os testes holísticos compreendem determinações em materiais analiticamente bem caracterizados feitas pelo GC em seu modo típico de operação.
- Avaliação de risco: combina a probabilidade de ocorrência de falha em algum componente com a severidade de seu impacto. Considera ainda a facilidade de detecção da falha operacional.
- Precisão térmica: cujo modo de falha acarreta temperatura não reprodutível em componentes como injetor, forno e detector.

- Exatidão térmica: a sua falta pode se manifestar inclusive por meio de funcionamento do forno com temperatura reprodutível, mas com vício que prejudica a acuracidade.
- Precisão da injeção: a sua falha desdobra em quantidades variáveis de introdução da amostra.
- Linearidade da injeção; falha neste fundamento aponta que alterações no volume de introdução da amostra não refletem em alteração proporcional da quantidade de amostra detectada.

4.2.4 Validação das metodologias

A validação dos métodos valeu-se das figuras de mérito típicas das técnicas de separação para a determinação de impurezas em concentração inferior a 0,1%, que empregam curva de calibração: seletividade, linearidade, intervalo de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, de acordo com o proposto em ICH (2005), Goulart (2012) e Ribani *et al.* (2004) e conforme a série de experimentos apresentada na TAB. 5.

Parâmetro	Ensaios
Seletividade	Curvas analíticas com 5 concentrações de padrões com e sem a presença da matriz, determinações em triplicata
Linearidade	Curvas analíticas com 5 concentrações de padrões, determinações em heptuplicata
Precisão	Dispersão de resultados nas 2 matrizes disponíveis, determinações em heptuplicata
Exatidão	Recuperação da adição de padrões em 3 níveis de concentração, determinações em triplicata
Limites de detecção e quantificação	Curva analítica, menor concentração, determinações em heptuplicata
Robustez	Variações em condições otimizadas, determinações em duplicata

TABELA 5 - Parâmetros e ensaios relativos à validação das metodologias

A estimativa da incerteza teve como base a identificação e a quantificação das fontes de incerteza associadas às metodologias. Foi estabelecido o modelo matemático para a preparação da amostra e a determinação cromatográfica, foram definidos os componentes da incerteza e as distribuições de probabilidade, foram estimadas as incertezas-padrão e obtidas as incertezas combinada e expandida.

Os métodos podem ser aplicados a outras matrizes de surfactantes de caráter anfótero e betaínicas que apresentem boa resposta à etapa de extração, bem como, a outros ácidos haloacéticos que apresentem recuperação compatível a apresentada neste trabalho para as etapas de derivação e extração (Kowalska e Dudziak, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo foram apresentadas a otimização, a validação e a comparação das metodologias desenvolvidas e as interpretações em torno dos resultados obtidos em cada uma destas etapas.

5.1 Preparação da amostra: derivação e extração

A conversão dos padrões de ácidos cloroacéticos em ésteres foi inicialmente realizada com álcool etílico 96 % a temperatura de 85°C durante 20 minutos. A ausência de picos cromatográficos característicos dos padrões de MCAS e DCAS evidenciou que a conversão foi incompleta e a necessidade do emprego de álcoois anidros e temperaturas de aproximadamente 100°C, conforme Milinski (2007).

As soluções-padrão contendo MCAS a 72 mg/kg e DCAS a 66 mg/kg foram preparadas em quadruplicata para avaliar a reprodutibilidade da preparação da amostra. Realizaram-se injeções no GC/MS e no GC/FID e por ambas as técnicas o perfil cromatográfico não foi reprodutível. Este fato comprovou que os procedimentos de esterificação e extração não estavam padronizados e requeriam ajustes de condições.

Seguiram-se ensaios com etanol absoluto com tempo de esterificação de 20 minutos, onde foram observados extremos de temperatura da estufa de até 115°C e, como consequência, o escurecimento das amostras e a ausência de resposta no detector ECD, sinalizando para a degradação dos compostos esterificados.

Em duas estufas convencionais de forno resistivo com controlador elétrico onde foram realizadas as esterificações houve oscilações de temperatura medida por termopar externo de até 10 % em relação ao valor nominal, que afetou a reprodutibilidade desta etapa da análise, demonstrando a importância do controle.

A correção deste problema deu-se pela adaptação de um forno no laboratório com controlador eletrônico de temperatura, que assegurou o ajuste de temperatura de $100,0 \pm 0,5^{\circ}$ C.

A adaptação consistiu da remoção da coluna de um cromatógrafo Perkin Elmer que teve o seu uso descontinuado, conforme ilustrado pela FIG. 7, mantendose o recurso de programação de tempo e temperatura para assegurar a estabilidade destas condições.



FIGURA 7 - Forno do cromatógrafo adaptado para proceder à etapa de esterificação Fonte: elaborada pelo autor

O ensaio de esterificação com butanol em substituição ao etanol teve por finalidade obter ganho em resposta pelo aumento do número de carbonos proporcionado por composto homólogo de maior estrutura. Contudo, o incremento na resposta do detector MS não foi pronunciado e houve prejuízos, tanto na separação entre as fases polar (água:álcool) e apolar (hexano), quanto na resolução.

O cromatograma A da FIG. 8 ilustra a esterificação com etanol e demonstra os picos relativos ao MCAS e DCAS bem separados em 5,5 e 7,5 minutos, respectivamente. Por sua vez, a esterificação com butanol ilustrada pelo cromatograma B da FIG. 8 demonstra que os picos relativos ao MCAS e DCAS foram unificados no tempo de retenção 6,7 minutos. Isto deveu-se ao aumento do número de carbonos na estrutura do éster, que diminuiu a capacidade de separação da coluna entre as estruturas com um átomo de cloro (MCAS) e com dois átomos de cloro (DCAS).



FIGURA 8 - Perfis cromatográficos no GC/MS para MCAS com 24 mg/kg e DCAS com 22 mg/kg esterificados com etanol (A) e butanol (B) Fonte: elaborada pelo autor

No presente trabalho, o emprego do etanol como esterificante em substituição ao metanol foi justificado pela toxicidade do metanol e pelo ganho em sensibilidade nos modos de detecção FID e MS, proporcionado pela presença de um carbono a mais na estrutura esterificada com etanol.

A extração líquido-líquido com hexano empregou inicialmente a agitação manual de 100, 200 e 400 ciclos para emulsionar as fases aquosa e orgânica. Como consequência houve baixa resposta para as espécies de interesse no GC/MS.

Adotou-se a agitação com a barra magnética por cinco minutos, por meio da qual foi observado o ganho em resposta e esta condição foi padronizada e o resultado está ilustrado pelo cromatograma da FIG. 9.



FIGURA 9 - Perfil cromatográfico no GC/MS para MCAS com 8,4 mg/kg e DCAS com 9,2 mg/kg extraídos por meio da agitação com barra magnética após esterificação Fonte: elaborada pelo autor

5.2 Determinação cromatográfica

Esta fase do estudo teve por finalidade a obtenção de resposta, resolução, simetria e sensibilidade para os analitos MCAS e DCAS nos modos de detecção MS, ECD e FID.

5.2.1 Otimização da determinação por GC/MS

Os ensaios no GC/MS Shimadzu QP2010-SE iniciaram com a leitura no modo de varredura contínua (*full scan*) na faixa de razão massa/carga de 29 a 200. O perfil cromatográfico apresentado na FIG. 10 e a investigação dos fragmentos formados impediram a identificação das espécies MCAS e DCAS e apontaram a necessidade de alterações nas condições de operação do cromatógrafo a gás e do espectrômetro de massas.



FIGURA 10 - Perfil cromatográfico no GC/MS para MCAS 72 mg/kg e DCAS 66 mg/kg com varreduras de m/z 29-200 Fonte: elaborada pelo autor

Pelo modelo estabelecido para explicar a ausência de resposta específica aos analitos presentes, entendeu-se que interferências promovidas pelas reações dos íons formados a partir dos analitos com moléculas neutras da matriz, do solvente e dos gases no espectrômetro de massas, impediram a discriminação dos fragmentos de interesse pela varredura contínua.

Procedeu-se aos seguintes ensaios para otimizar a determinação via GC/MS:

Utilização da varredura por íons selecionados (Selected Ion Monitoring, SIM): este modo reduziu a quantidade de fragmentos a ser monitorada, de acordo com o proposto por Amaral et al (2011). Com base no espectrograma típico da biblioteca NIST fragmentos е nos característicos propostos por Kitson et al. (1996), foram escolhidas no modo SIM as razões massa/carga de maior intensidade: m/z 42, 49, 77, 79 e 94 para o MCAS e m/z 48, 76, 77, 83 e 85 para o DCAS. A seguir, são ilustrados os cromatogramas em cujas condições obteve-se identificação dos analitos resposta proporcional à concentração, MCAS no tempo de retenção 5,5 minutos na FIG. 11A e DCAS no tempo de retenção 7,5 minutos na FIG. 11B.



FIGURA 11 - Perfis cromatográficos no GC/MS modo SIM para MCAS 18 mg/kg (A) e DCAS 15 mg/kg (B) Fonte: elaborada pelo autor

 A alteração da programação de temperatura do forno teve por finalidade posicionar os picos em região de isoterma e obter um padrão de simetria com picos de menor cauda posterior, conforme ilustrado na FIG. 12 para o MCAS.



FIGURA 12 - Perfil cromatográfico no GC/MS modo SIM ilustrando o pico obtido na região da isoterma a 70°C para MCAS com concentração 48 mg/kg Fonte: elaborada pelo autor

 A injeção com divisão de fluxo (*split*) nas proporções 1:10, 1:20 e 1:40, proporcionou o ganho em resposta com a preservação da simetria, conforme ilustrado na FIG. 13 pela condição *split* 1:10.



FIGURA 13 - GC/MS modo SIM *split* 1:10 para MCAS com concentração 18 mg/kg Fonte: elaborada pelo autor

 Alteração na programação de aquecimento na região dos picos de interesse e aumento na temperatura do injetor de 250°C para 275°C: conseguida melhoria em resolução e simetria, como demonstrado na FIG. 14 e conforme correções propostas por Ciola (1985).



FIGURA 14 - Perfil cromatográfico no GC/MS modo SIM para MCAS com concetração 18 mg/kg com aumento na temperatura do injetor Fonte: elaborada pelo autor

As otimizações em modo de varredura, injeção com divisão de fluxo, programação da temperatura do forno e temperatura do injetor, conferiram ganhos em resolução, resposta, simetria e estimou-se também em sensibilidade.

Contudo, no modo de varredura SIM, a quantidade de fragmentos a monitorar foi otimizada em prol da identificação e da proporcionalidade de resposta para os analitos de interesse. O excesso ou a redução a poucos fragmentos a serem monitorados pelo espectrômetro de massas acarretam prejuízo à resposta e, pelos testes empregando diferentes quantidades, concluiu-se pelo uso de três razões massa/carga para cada espécie química, obtendo-se o cromatograma da FIG. 15.



FIGURA 15 - GC/MS modo SIM com três m/z específicos e a resposta nos tempos de retenção 5,5 minutos (MCAS 16,8 mg/kg) e 7,5 minutos (DCAS 18,4 mg/kg) Feito: elaborada pelo autor

As condições discutidas nos parágrafos anteriores permitiram a construção de curvas de calibração e a condução dos ensaios para a etapa de validação da metodologia, cujos parâmetros de desempenho foram relatados na seção 5.3.

5.2.2 Otimização da determinação por GC/ECD

As soluções correspondentes às curvas de calibração construídas por GC/MS foram injetadas no GC/ECD e produziram resolução adequada e resposta intensa para MCAS e DCAS nos tempos de retenção indicados na FIG. 16, que ilustra o cromatograma obtido para um dos padrões da curva de calibração.



FIGURA 16 - Perfil cromatográfico no modo de detecção ECD para MCAS 16,8 mg/kg e DCAS 18,4 mg/kg com tempos de retenção 5,0 e 6,3 minutos, respectivamente

Fonte: elaborada pelo autor

Este resultado comprovou a padronização da etapa de preparação da metodologia e sinalizou para a adoção de estratégia de otimização da operação do FID com critérios similares aos utilizados para GC/MS relativos à temperatura do injetor, ao volume e modo de injeção, ao tipo de coluna e à pressão da fase móvel.

Com base nas condições de operação do GC/ECD foram construídas curvas de calibração para verificar o desempenho da metodologia para MCAS e DCAS e foram obtidos coeficientes de determinação (R²) superiores a 0,99 e, isto permitiu a condução dos ensaios de validação relatados na seção 5.3.

5.2.3 Otimização da determinação por GC/FID

Os ensaios iniciais no modo de detecção FID foram conduzidos no Cromatógrafo a Gás Shimadzu GC-17A e com a coluna capilar DB-1. Não houve qualquer identificação dos tempos de retenção relativos aos picos cromatográficos de MCAS e DCAS que conferissem resposta proporcional às concentrações de 40 mg/kg e 400 mg/kg.

Foram idealizados os seguintes ensaios que tiveram por finalidade obter resposta na determinação via GC/FID, com base na otimização da análise cromatográfica e nas correções dos defeitos de operação elegidas por Ciola (1985):

- Alteração da divisão de fluxo (*split*) 1:10 para injeção sem divisão de fluxo (*splitless*): esta condição acarretou a saturação da amostra dos padrões de MCAS com 87 mg/kg e DCAS com 80 mg/kg no *liner* do injetor com a consequente sobrecarga na coluna;
- Aumento do volume de injeção de 1 µL para 2 µL e 3 µL: não houve resposta, nem tampouco definição do tempo de retenção dos analitos de interesse;
- Troca da coluna capilar DB1 para DB5: o cromatograma GC/FID obtido com a coluna DB5 não trouxe ganho em resposta, porque apesar da versatilidade da coluna DB5 aos modos de detecção FID e MS, a polaridade similar a DB1 produziu resposta similar;
- Programação de aquecimento do forno e temperatura do detector mais severos: taxas de 10°C/min. até 120°C e 40°C/min. até 330°C e detector a 360°C, não foi obtido nenhum perfil cromatográfico que permitisse a identificação das espécies de interesse.

Os ensaios de otimização acima relatados não proporcionaram resposta ou resolução que permitissem a definição dos picos cromatográficos dos analitos de interesse.

Decidiu-se reaproximar as condições do FID às condições estudadas para o MS e ECD, no tocante à temperatura do injetor, divisão de fluxo, programação do forno, temperatura do detector, fluxo do gás de arraste e emprego de *make up* obtendo-se o cromatograma ilustrado na FIG. 17.



FIGURA 17 - Perfil cromatográfico no modo de detecção FID para MCAS 16,8 mg/kg e DCAS 18,4 mg/kg com tempos de retenção 5,0 e 6,3 minutos respectivamente Fonte: elaborada pelo autor

A identificação e quantificação dos analitos MCAS e DCAS permitiram a construção de curvas de calibração e, uma vez definidas as condições de operação do GC/FID, foram conduzidos os ensaios para a validação da metodologia, cujos parâmetros de desempenho estão relatados em 5.3.

5.3 Validação das metodologias

As metodologias foram avaliadas tendo como base alguns dos parâmetros de desempenho que constam da ferramenta desenvolvida por Furusawa (2007), por meio dos ensaios com padrões e matriz CAPB, utilizando as áreas dos picos cromatográficos.

5.3.1 Seletividade

A seletividade foi inicialmente avaliada por meio da separação dos picos dos analitos presentes na matriz. A FIG. 18 ilustra o ensaio que apresentou a resolução obtida por meio da metodologia por GC/ECD.



FIGURA 18 - Cromatograma da matriz CAPB por GC/ECD evidenciando os analitos MCAS e DCAS nos tempos de retenção de 5,1 e 6,3 minutos, respectivamente Fonte: elaborada pelo autor

A FIG. 19 ilustra a resolução obtida por meio da metodologia por GC/FID com a separação e identificação inequívoca dos compostos MCAS e DCAS.



FIGURA 19 - Cromatograma da matriz CAPB por GC/FID evidenciando os analitos MCAS e DCAS nos tempos de retenção 5,0 e 6,3 minutos, respectivamente Fonte: elaborada pelo autor

A FIG. 20 ilustra o ensaio que demonstrou a resolução obtida por meio da metodologia por GC/MS, em que foram obtidas as separações dos picos de MCAS e DCAS do restante da matriz.



FIGURA 20 - Cromatograma da matriz CAPB por GC/MS no modo SIM evidenciando as resoluções dos compostos MCAS e DCAS, que foram identificados nos tempos de retenção de 5,5 e 6,6 minutos Fonte: elaborada pelo autor

Os cromatogramas apresentaram tipicamente os analitos MCAS e DCAS com a separação completa das demais espécies químicas presentes na matriz de CAPB. Não foram observados picos interferentes nos tempos de retenção dos compostos estudados e foi comprovado qualitativamente que as metodologias são seletivas.

A seletividade também foi avaliada pelo cálculo da distribuição de Fisher-Snedocor, que mede a razão entre duas variâncias independentes, de acordo com a equação 3 apresentada na seção 3.5.1. O teste F-Snedocor foi aplicado para padrões dos analitos com e sem a presença da matriz, obtendo-se os resultados apresentados na TAB. 6.

TABELA 6 - Resultados da seletividade pela aplicação do teste F para GC/ECD, GC/FID e GC/MS por adição de padrões MCAS e DCAS à matriz CAPB, considerando $F_{tabelado} = 4,28$

Concentração (mg/kg)	F _{calculado} para MCAS		F _{calculado} para DCAS		DCAS	
	ECD	FID	MS	ECD	FID	MS
4	1,59	3,01	1,33	3,97	3,33	2,77
9	1,38	2,61	1,39	1,20	1,95	6,46
18	3,97	1,48	6,01	5,94	2,27	5,59
26	6,58	5,13	3,89	2,28	1,55	11,39
52	1,47	7,44	1,42	2,81	8,50	3,77

Fonte: elaborada pelo autor

Pelas três técnicas há resultados de F_{calculado} superior ao valor de F_{tabelado}. Não foi definitivo considerar a hipótese nula e observou-se que o efeito de matriz esteve presente.

Embora as metodologias foram qualitativamente seletivas para os analitos estudados, em um regime de controle de qualidade recomenda-se construir curvas de calibração na presença da matriz CAPB.

O efeito de matriz esteve presente nos três modos de detecção. Uma coluna cromatográfica com maior polaridade beneficiaria quantitativamente este quesito conforme CIOLA (1985).

5.3.2 Linearidade

Esta figura de mérito foi avaliada por intermédio dos coeficientes de determinação R² obtidos a partir da regressão linear entre a concentração do analito

MCAS e as áreas dos picos obtidos por GC/ECD, GC/FID e GC/MS, conforme ilustrado pelos gráficos da FIG. 21.



FIGURA 21 - Representação da linearidade do MCAS para a faixa de trabalho de 3 a 50 mg/kg por GC/ECD, GC/FID e GC/MS Fonte: elaborada pelo autor

A linearidade foi avaliada de modo análogo para o DCAS por meio da GC/ECD, GC/FID e GC/MS, conforme ilustram os gráficos da FIG. 22.



FIGURA 22 - Representação da linearidade do DCAS para a faixa de trabalho de 4 a 55 mg/kg obtida por GC/ECD, GC/FID e GC/MS Fonte: elaborada pelo autor

56

Observou-se que para as espécies químicas MCAS e DCAS foram obtidos R^2 próximos a 0,99 para as faixas de trabalho estudadas por intermédio das três técnicas. As 3 metodologias são lineares no intervalo estudado, porque produziram $R^2 > 0,81$ (LEITE, 2008; INMETRO, 2011) ou $R^2 > 0,98$ (ANVISA, 2003).

Como complemento à linearidade, detalhou-se o estudo da faixa de trabalho para cada analito, pela análise do desvio padrão dos resíduos com a aplicação do teste t (*Student*), calculado segundo a equação 6 na seção 3.5.2, cujos valores estão apresentados nas TAB. 7 e 8.

TABELA 7 - Resultados de $t_{calculado}$ na análise do desvio padrão dos resíduos para MCAS, considerando $t_{tabelado} = 2,776$

Padrão (mg/kg)	t _{calculado} MCAS por ECD	t _{calculado} MCAS por FID	t _{calculado} MCAS por MS
4	0,323	1,868	2,701
9	2,768	1,241	3,509
18	2,110	2,113	0,596
26	2,402	2,736	0,017
52	1,421	1,739	0,196

Fonte: elaborada pelo autor

Padrão (mg/kg)	t _{calculado} DCAS por ECD	t _{calculado} DCAS por FID	t _{calculado} DCAS por MS
4	0,427	1,054	3,006
9	2,382	0,914	1,565
18	1,166	0,317	2,764
26	3,213	3,912	0,685
52	1,569	1,627	0,638

TABELA 8 - Resultados de $t_{calculado}$ na análise do desvio padrão dos resíduos para DCAS, considerando $t_{tabelado} = 2,776$

Fonte: elaborada pelo autor

Os analitos MCAS e DCAS apresentaram $t_{calculado}$ inferior ao $t_{tabelado}$ em quase todos os pontos das curvas analíticas obtidas pelas três técnicas sem a presença da matriz, porquanto foi comprovado que a resposta é linear ao longo da faixa de trabalho estudada, com ajuste adequado da regressão linear aos pontos experimentais.

5.3.3 Precisão

A dispersão dos resultados produzidos pelas metodologias foi avaliada pelo limite de repetitividade, de acordo com a equação 10 na seção 3.5.3.

Os resultados apresentados na TAB. 9 disciplinam as diferenças máximas permitidas entre repetições para os níveis de concentração reportados.

	r _{calculado} para MCAS			r _{calculado} para DCAS		CAS
Concentração do padrão (mg/kg)	GC/ECD	GC/FID	GC/MS	GC/ECD	GC/FID	GC/MS
4	70128	1147	7448	251076	11021	647
9	76057	9449	2204	613161	21036	5032
18	520060	14484	16666	681592	9499	7279
26	789624	49523	43134	2440034	44041	9566
52	1989918	130374	136734	3864361	24254	359532

TABELA 9 - Repetitividade (r) para as áreas dos picos dos compostos MCAS e DCAS estudados sem a presença de matriz CAPB

Fonte: elaborada pelo autor

Em determinações de rotina, amostras que apresentam diferenças entre replicatas superiores aos reportados na TAB. 9, indicam que a metodologia não está precisa, a causa-raiz deve ser apurada e a determinação repetida.

Não se procedeu à comparação entre as técnicas pela repetitividade das áreas, visto que elas possuem níveis de resposta diferentes: o modo de detecção ECD é mais sensível do que os modos MS e FID, assim sendo, a GC/ECD comporta maiores diferenças entre as áreas de replicatas, sem prejuízo à repetitividade da concentração.

O desvio padrão relativo (DPR) reportado em conjunto à recuperação na TAB. 10 também não destacou nenhuma técnica em relação às demais.

5.3.4 Exatidão

A exatidão foi ensaiada por meio da fortificação da matriz CAPB com os analitos de interesse em dois níveis de concentração e foi aferida por meio do percentual de cada analito que foi recuperado em relação à quantidade nominal adicionada à amostra.

As determinações foram realizadas em triplicata e a TAB. 10 apresenta a média, o desvio padrão relativo (DPR) e a recuperação para o analito MCAS.

Modo de detecção	Nível	DPR	Recuperação
	(mg/kg)	(%)	(%)
ECD	14,5	24	62
	39,7	17	85
FID	21,3	33	103
	40,2	19	113
MS	14,0	38	94
	39,2	12	92

TABELA 10 - Resultados da recuperação de MCAS em amostras de CAPB

Fonte: elaborada pelo autor

Para o MCAS as metodologias apresentaram DPR de 17 a 38 % e recuperação de 62 a 113 % e isto evidenciou a necessidade de melhorar a padronização das etapas de preparação da amostra e das condições cromatográficas.

A TAB. 11 apresenta os mesmos parâmetros da tabela anterior, média, desvio padrão relativo (DPR) e recuperação, para o analito DCAS.

Modo de	Nível	Média	DPR	Recuperação
detecção	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
ECD	24,3	21,9	17	76
	45,0	45,5	19	102
FID	25,5	23,7	18	71
	46,2	42,3	21	86
MS	24,2	21,7	20	75
	44,9	43,4	14	95

Fonte: elaborada pelo autor

Para o DCAS resultaram DPR de 14 a 20 % e recuperação de 71 a 102 %, indicando precisão e exatidão superiores ao MCAS.

As taxas de recuperação de 62 a 113 % para MCAS e 71 a 102 % para DCAS, afetadas por elevados desvios, apontaram a necesidade de aperfeiçoar a marcha analítica para não ocorrer prejuízo na quantificação dos analitos, ainda que atendam em grande parte a faixa de 70 a 120 % preconizada por Ribani et al. (2004) para concentrações inferiores 0,01 %.

Contudo, considerando os estudos análogos de Hoogenboom e Rammel (1987), Grande e Aquino (1990), Sarrion *et al.* (1999), Bakeas *et al.* (2003) e
Wang *et al.* (2005), que também envolveram baixas concentrações de analito, esperava-se taxa de recuperação mínima de 90 %.

5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada.

O seu cálculo teve como base o método da curva analítica (INMETRO, 2011) e foi realizado segundo a equação 11 da seção 3.5.5.

Na TAB. 12 são apresentados os limites de detecção (LD) para os compostos de interesse obtidos para as três metodologias em estudo.

TABELA 12 - LD calculado	o para MCAS e E	DCAS por GC/ECD,	GC/FID e GC/MS
--------------------------	-----------------	------------------	----------------

LD para MCAS em mg/kg			LD para DCAS em mg/kg		
GC/ECD	GC/FID	GC/MS	GC/ECD	GC/FID	GC/MS
1,0	1,1	0,5	0,7	2,2	0,5

Fonte: elaborada pelo autor

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com segurança.

O seu cálculo também teve como base o método da curva analítica (INMETRO, 2011) e foi realizado segundo a equação 12 da seção 3.5.5.

Na TAB. 13 são apresentados os limites de quantificação (LQ) para os compostos de interesse pelas três metodologias em estudo.

LQ para MCAS em mg/kg		LQ para DCAS em mg/kg			
GC/ECD	GC/FID	GC/MS	GC/ECD	GC/FID	GC/MS
7,8	5,7	5,8	2,8	9,4	3,7

TABELA 13 - LQ calculado para MCAS e DCAS por GC/ECD, GC/FID e GC/MS

Fonte: elaborada pelo autor

As três técnicas apresentaram LQ elevados, contudo inferiores à metade do limite mínimo especificado para os analitos de 20 mg/kg para algumas das aplicações de CAPB em cosméticos e detergentes.

5.3.6 Robustez

Esta figura de mérito não foi quantitativamente avaliada no presente estudo.

Realizou-se uma avaliação qualitativa sobre os resultados por meio de experimentos com diferentes temperaturas e tempo de estufa na etapa de esterificação, no modo de agitação para a etapa de extração e na variação da programação da temperatura do injetor e da coluna para a cromatografia, sendo preditiva ao longo do trabalho a relevância em controlar estas condições.

A partir dos resultados obtidos para precisão e exatidão, decidiu-se por não aplicar os critérios quantitativos para a robustez, uma vez que as metodologias estavam afetadas por desvios da ordem de 20 % e taxas de recuperação da ordem de 70 %, que impedem o exato juízo sobre quais alterações afetam o desempenho do método.

5.3.7 Incerteza da medição cromatográfica

A incerteza de uma medição caracteriza a dispersão de valores em torno da média. A incerteza expandida representa o intervalo em torno do resultado que abrange o máximo de valores do mensurando.

O modelo matemático definido para a preparação da solução estoque dos padrões de ácidos cloroacéticos foi o expresso pela equação 13.

$$C = \frac{1000 . m . P}{V}$$
(13)

onde:

C é a concentração de MCAA ou DCAA na solução estoque em mg/kg;

m é a massa da pesagem de MCAA ou DCAA em mg;

P é a pureza centesimal do padrão, adimensional;

V é o volume da solução em L.

Nota: considerada densidade da solução 1 kg/L

As diluições da solução estoque para preparar as cinco soluções-padrão foi conduzida mediante fórmula expressa pela equação 14.

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2}$$
(14)

onde:

C2 é a concentração da solução padrão diluída;

C1 é a concentração da solução estoque;

V1 é o volume da alíquota da solução estoque;

V2 é o volume do balão em que se prepara a solução padrão diluída.

A determinação cromatográfica empregou o cálculo da concentração da substância de interesse na amostra em exame a partir dos parâmetros da curva de calibração de acordo com a equação 15.

$$[MCAS]ou [DCAS] = \frac{(A-Int) \cdot F}{Inc}$$
(15)

onde:

[MCAS] ou [DCAS] são as concentrações das espécies de interesse;

A é a área do pico cromatográfico;

Int é a intercepção da curva analítica ou coeficiente linear;

Inc é a inclinação da curva analítica ou coeficiente angular.

Os componentes que contribuem para a incerteza total foram identificados por meio do Diagrama de Ishikawa ilustrado na FIG. 23, que estrutura hierarquicamente as contribuições que foram agrupadas pelo conceito dos 6M (material, máquina, mão de obra, método, medição e meio ambiente).



FIGURA 23 - Diagrama de Ishikawa que identifica as contribuições à incerteza da medição na preparação da amostra e determinação cromatográfica Fonte: elaborada pelo autor

As distribuições de probabilidade para a pureza dos padrões de ácidos cloroacéticos, incerteza da balança e variação do volume com a temperatura foram retangulares com divisores raiz de três. A distribuição de probabilidade da incerteza da vidraria foi triangular com divisor raiz de seis. As distribuições de probabilidade do acerto de volume da solução, da repetibilidade da área do pico cromatográfico e do desvio padrão da recuperação que incidiu sobre a intercepção e a inclinação foram normais com divisores constituídos pela raiz do número de repetições.

As incertezas-padrão foram calculadas a partir dos desvios-padrão do fabricante, da repetição ou da validação afetados pelos divisores das distribuições de probabilidade.

As incertezas-padrão combinadas foram calculadas pelo método simulado proposto no guia EURACHEM (2002), em que são apuradas as contribuições de cada incerteza padrão ao resultado final e pondera-se a incerteza combinada pela raiz quadrada da soma dos quadrados destas contribuições.

As incertezas expandidas para as determinações de MCAS e DCAS em CAPB por GC/ECD, GC/FID e GC/MS foram obtidas pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência K igual a dois, que depende da probabilidade do conjunto de valores verdadeiros de um mensurando estar contido no intervalo especificado pela incerteza expandida. Os resultados para as incertezas expandidas estão reportados na TAB. 16 junto às médias e desvios padrão.

Procedeu-se também ao balanço das contribuições para a incerteza combinada conforme ilustrado pelas FIG. 24 e 25, que exemplificam a preparação dos padrões de DCAA e a quantificação de DCAS em CAPB por GC/ECD.



FIGURA 24 - Balanço das incertezas-padrão para preparar cinco concentrações de ácido dicloroacético DCAA, demonstrando a contribuição da incerteza da pureza do padrão u(P), da repetitividade do volume do balão e pipeta u(V2), incerteza da balança u(m), incerteza da volume do balão u(V1) e da influência da temperatura na variação do volume u(V3) para a incerteza combinada uc

Fonte: elaborada pelo autor



FIGURA 25 - Balanço das incertezas-padrão para a determinação de DCAS por GC/ECD, demonstrando a contribuição da área do pico u(A), do desvio no ensaio de recuperação expresso pela intercepção e inclinação u(Int) e u(Inc) e da preparação dos padrões u(Prep) para a incerteza combinada uc Fonte: elaborada pelo autor

5.4 Determinação em amostras comerciais

A similaridade entre as metodologias foi estudada através da comparação das médias para ensaios não pareados, que produzem resultados de modo independente.

Para aferir a equivalência entre as determinações de MCAS em CAPB por GC/ECD, GC/FID e GC/MS foi parametrizado o teste t para amostras independentes e a TAB. 14 demonstra os resultados obtidos.

MCAS	GC/ECD vs GC/FID		GC/ECD vs GC/MS	
Média	7,7	9,5	7,7	5,4
Desvio Padrão	3,2	4,4	3,2	1,0
Variância	10,1	19,5	10,1	1,0
F_2/F_1	1,92	-	0,10	-
GL_1	1,45	2,78	1,45	0,15
GL _{efetivo}	5,5	6 (arred.)*	0,016	1 (arred.)*
t _{tabelado}	2,45	-	12,71	-
SD	2,055	-	1,264	-
t _{efetivo}	0,87	-	1,83	-

TABELA 14 - Teste t para equivalência das técnicas GC/ECD, GC/FID e GC/MS para a determinação de MCAS em CAPB

* Arred.: o grau de liberdade efetivo (GLefetivo) é arredondado para a unidade acima Fonte: elaborada pelo autor

As metodologias produziram resultados similares para determinar MCAS em CAPB por GC/ECD, GC/FID e GC/MS, uma vez que as comparações resultaram em $t_{efetivo}$ inferior a $t_{tabelado}$.

Para aferir a equivalência entre as determinações de DCAS em CAPB por GC/ECD, GC/FID e GC/MS foi parametrizado o teste t para amostras independentes e a TAB. 15 demonstra os resultados obtidos.

DCAS	GC/ECD vs GC/FID		GC/ECD vs GC/MS	
Média	14,5	19,2	14,5	14,0
Desvio Padrão	3,4	7,3	3,4	4,9
Variância	11,6	52,6	11,6	23,6
F_2/F_1	4,54	-	2,04	-
GL_1	1,66	7,52	1,66	3,37
GL _{efetivo}	6,9	7 (arred.)*	6,5	7 (arred.)*
t _{tabelado}	2,37	-	2,37	-
SD	3,029	-	2,243	-
t _{efetivo}	1,53	-	0,24	-

TABELA 15 - Teste t para equivalência das técnicas GC/ECD, GC/FID e GC/MS para a determinação de DCAS em CAPB

* Arred.: o grau de liberdade efetivo (GLefetivo) é arredondado para a unidade acima Fonte: elaborada pelo autor

As metodologias produziram resultados similares para determinar DCAS em CAPB por GC/ECD, GC/FID e GC/MS, uma vez que as comparações resultaram em t_{efetivo} inferior a t_{tabelado}.

Os desvios-padrão elevados contribuiram para a similaridade entre as metodologias, porque ao afetarem a média produziram regiões de coincidência entre os conjuntos de resultados possíveis e beneficiaram os critérios de comparação reduzindo os graus de liberdade e aumentando **t**_{tabelado}.

Os ensaios não pareados também tiveram por finalidade a obtenção de desvios-padrão relativos inferiores a 20% e os resultados estão apresentados na TAB. 16.

As incertezas expandidas também foram reportadas na TAB. 16 para a expressão do resultado em conjunto com a média.

TABELA 16 - Resultados da determinação de MCAS e DCAS em amostra comercial de CAPB reportando a média e o desvio padrão para sete replicatas por cada técnica e a incerteza expandida calculada pelo método simulado EURACHEM

Composto e modo de detecção	Média	Desvio padrão	Incerteza expandida	
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	
MCAS por ECD	7,7	3,2	4,8	
MCAS por FID	9,5	4,4	2,5	
MCAS por MS	5,4	1,0	1,1	
DCAS por ECD	14,5	3,4	5,1	
DCAS por FID	19,2	7,2	5,0	
DCAS por MS	14,0	4,8	1,8	

Fonte: elaborada pelo autor

Os desvios-padrão relativos e incertezas expandidas relativas superiores a 20 % da média indicaram a necessidade de aperfeiçoar as metodologias, por intermédio do aumento de replicatas, ou da disponibilidade de injeção automática, ou pelo emprego de padrão interno.

De modo geral, para aperfeiçoar as metodologias em precisão e exatidão, recomendam-se os controles de tempo e temperatura durante a esterificação, o emprego do meio de agitação magnético com tempo controlado na extração e dispor de condições reprodutíveis de injeção, aquecimento e modos de detecção.

Especificamente, constituem estratégias essenciais para ganhos em precisão e exatidão, construir curvas de calibração com base na matriz do surfactante no

momento da análise, aumentar o número de replicatas, dispor de injeção automática e empregar a padronização interna.

Os aspectos relevantes do presente trabalho estão apresentados a seguir:

- As condições cromatográficas foram ajustadas para os modos de detecção ECD, FID e MS, permitindo a separação, identificação e quantificação de MCAS e DCAS em CAPB;
- A técnica GC/FID é a de maior conveniência para a indústria pela praticidade operacional, menor custo do equipamento em relação às demais e menor complexidade para a aquisição de proficiência pelo corpo técnico e o presente estudo evidenciou que ela substitui as demais sem qualquer prejuízo de desempenho;
- A monitoração de MCAS e DCAS no processo produtivo de CAPB, com vistas a atender aos requisitos especificados nos segmentos cosméticos e detergentes, requer atingir limites de quantificação inferiores a 5 mg/kg com as técnicas cromatográficas a gás. Isto permitirá às organizações elegerem a melhor técnica para as suas inspeções, de acordo com os recursos disponíveis no controle de qualidade;
- O estudo apresentou propósitos conjugados entre uma entidade com finalidade acadêmica e o setor industrial, sendo que Clayden *et al* (1995) destacam na seção Organic Chemistry and Industry, o sistema sinérgico representado pela parceria da Química Orgânica com o segmento industrial.

6 CONCLUSÕES

Os procedimentos de derivação dos analitos MCAS e DCAS com etanol e de extração destes analitos da matriz CAPB com hexano foram definidos e permitiram a determinação cromatográfica empregando as detecções FID, ECD e MS.

A técnica GC/ECD foi aperfeiçoada e o desenvolvimento das técnicas GC/FID e GC/MS constituíram-se em alternativas para a determinação de MCAS e DCAS em CAPB, permitindo ao controle de qualidade industrial decidir acerca da técnica apropriada conforme os recursos disponíveis nos laboratórios.

As figuras de mérito estudadas na validação não permitiram colocar em evidência uma técnica em relação às outras, demonstrando que as vantagens e as deficiências se assemelham para a GC/ECD, GC/FID e GC/MS e comprovando a importância da preparação da amostra. Outrossim, a validação indicou a necessidade em melhorar o desempenho das três técnicas em seletividade, precisão e exatidão.

As metodologias desenvolvidas mostraram-se lineares na faixa de trabalho estudada de 4 a 50 mg/kg. Os fatores de determinação superiores a 0,99 e os baixos desvios dos resíduos comprovam o ajuste da regressão linear aos pontos experimentais.

As metodologias produziram resultados similares em amostra comercial, embora as elevadas incertezas de medição tenham ampliado o universo de resultados prováveis para as três técnicas.

Diante de tudo quanto foi visto no presente estudo, os modos de detecção FID, ECD e MS apresentaram desempenhos equivalentes. O FID apresenta as vantagens da aplicação mais universal, menor custo, proficiência menos complexa e da dispensa de demandas pelo emprego de fonte radioativa em sua operação.

72

TRABALHOS FUTUROS

Algumas possibilidades que em perspectiva futura contribuiriam para aprofundar o tema da determinação de cloroacetatos em surfactantes de caráter anfótero são:

- Extração em fase sólida na etapa de preparação da amostra, pela associação dos modos de operação de enriquecimento e de isolamento do analito (*clean up*), conforme proposto por Lanças (2008);
- Emprego da fase estacionária constituída por polietilenoglicol, que tem por finalidade obter ganhos em limite de quantificação, precisão e exatidão;
- Uso de injetores automáticos (no presente trabalho foi utilizado somente na GC/MS) e de padronização interna, para melhorar a precisão e a exatidão;
- Emprego da cromatografia a gás ultrarrápida e de alta resolução em alta temperatura, que proporcionam ganhos no tempo de execução de análise;
- Aplicação de um sistema dual detection constituído por FID e ECD com a finalidade de obter o máximo de informações de matrizes complexas como os anfóteros betaínicos e de quantificar outros compostos de interesse por intermédio da mesma metodologia cromatográfica.

APÊNDICE – Resumo do artigo publicado e apresentado na 2015 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2015 – realizada em São Paulo entre 4 e 9 de outubro de 2015

2015 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2015 São Paulo, SP, Brazil, October 4-9, 2015 Associação Brasileira de Energia Nuclear - ABEN ISBN: 978-85-99141-06-9

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF SODIUM MONOCHLOROACETATE AND SODIUM DICHLOROACETATE IN COCOAMIDO PROPYL BETAINE BY GAS CHROMATOGRAPHY: FID, ECD AND MS

Cláudio Leão¹, Marcelo Miyada Redígolo¹, Priscila Oliveira Amaral¹ and Oscar Vega Bustillos¹

> ¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP) Centro de Química e Meio Ambiente Av. Professor Lineu Prestes 2242 05508-000 São Paulo, SP claudio.leao@usp.br

ABSTRACT

Cocoamide Propyl Betaine is a feedstock for consumer products of cosmetic and household segments. Sodium monochloroacetate and sodium dichloroacetate impurities are toxic, irritating and harmful to the environment and lower concentrations - parts per million level - are required in process control of producers and regulatory affairs. Regarding analytical test method, two conditions should be met: quantification limit, precision and accuracy should be appropriate; different techniques for gas chromatography - ECD, FID and MS - should be available, since for manufacturer is not so easy to keep electron capture detector by radioactive source Ni 63 due to government control and need of qualified radiological protection. The samples are obtained at manufacturers; for the analyte separation, treatment methodologies are employed by liquid-liquid extraction and solid phase extraction. Alternative detectors used in this study are: Flame Ionization and Mass Spectrometer with Electron Ionization. The validation process will be applied to methodology to ensure a selective, robust, accurate and reproducible analytical determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P. O.; OLIVEIRA, J. P. R.; BUSTILLOS, J. O. V. Diferentes técnicas de varredura de íons no espectrômetro de massas aplicadas à análise de organoclorados via GC/MS. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, Oct 24-28, 2011, Belo Horizonte, Brazil.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, BRASIL. **Resolução RE Nº 899,** de 29/05/2003. Brasília: ANVISA, 2003. (RE-899).

ARAÚJO NETO, L. G.; BARROS, K. V. G. Validação analítica quantitativa: Comparação entre parâmetros de desempenho da ANVISA e do INMETRO. In: VIII AMOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO DA PUC GOIÁS, 2013, Goiânia, Brasil.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.** 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

BAKEAS, E. B.; ECONOMOU, A. G.; SISKOS, P. A.; FRANK, H. Determination of chloroacetates in atmospheric particulate matter. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 2336-2339, 2003.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL BNDES, BRASIL. **Potencial de diversificação da indústria química: relatório 4, tensoativos**. Brasília: 2011.

BIEVRE, P. Learning lessons from ancient Egypt. Accreditation and Quality Assurance, n. 10, p. 325-326, 2005.

BULSKA, E.; TAYLOR, P. Do we need education in metrology in Chemistry ? Analytical and Bioanalytical Chemistry, n. 377, p. 588-589, 2003.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography, B**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

CAVALCANTI, C.(Org.). **Desenvolvimento e natureza: estudos para uma sociedade sustentável.** 1. ed. Recife: INPSO/FUNDAJ, 2001.

CHAN, C. C.; LAM, H.; ZHANG, X. M. **Practical approaches to method validation and essential instrument qualification**. 1. ed. Hoboken (US): John Wiley & Sons, 2010.

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

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a gás. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1985.

CLAYDEN, J.; GREEYS N.; WARREN S.; WOTHERS P. **Organic chemistry**. 1. ed. São Paulo: McGraw Hill, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1. ed. Campinas: UNICAMP, 2006.

CRABB, D. W.; YOUNT, E. A.; HARRIS, R. A. The metabolic effects of dichloroacetate. **Metabolism**, v. 30, n. 10, p. 1024-1039, 1981.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Determination of haloacetic acids and dalopon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detector. Washington: EPA, 2003. (EPA 815-B-03-002, method 552.3 rev.1).

EURACHEM. **Determinando a incerteza na medição analítica.** 2. ed. Versão brasileira, 2002.

FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 55, p. 14-23, 2014.

FARN, R. J. Chemistry and technology of surfactants. 1. ed. Oxford: Blackwell, 2006.

FERREIRA, C. Caracterização por GC-MS de glícidos: derivatização assistida por microondas. 2011. 82p. Dissertação - Universidade de Coimbra.

FURUSAWA, H. A. Validação de ensaios químicos. **IPEN-CNEN/SP**, São Paulo, 2007 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).

GHASSEMPOUR, A.; CHALAVI, S.; ABDOLLAHPOUR, A.; MIRKHANI, S. A. Determination of mono- and dichloroacetic acids in betaine media by liquid chromatography. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1396–1400, 2006.

GOULART, S. S. Otimização e validação de método cromatográfico para quantificação de componentes majoritários em amostras de cocaína. 2012. 180p. Dissertação - Instituto de Química da Universidade de Brasília.

GRANDE, S. M. B., AQUINO, F. R. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 191-199, 1990.

GROB, R. L. Modern **Practice of gas chromatography**. 4. ed. Hoboken (US): John Wiley & Sons, 2004.

HAWLEY, G. G. **The condensed chemical dictionary**. 15. ed. Gurgaon: Galgotia Booksources, 2007.

HERA: HUMAN AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESMENT ON INGREDIENTS HOUSEHOLD CLEANING PRODUCTS. **Cocoamidopropyl betaine (CAPB).** Brussels, 2005. Disponível em:

http://www.heraproject.com/files/45-hh-e101023f-d12f-6a30-eb0770e9bf8e4d0.pdf. Acesso em: 3 maio 2016

HOOGENBOOM, J. J., RAMMELL, C. G. Determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in tissues and baits as its benzyl ester by reaction-capillary gas chromatography. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 11, n. 4, p. 140-143, 1987.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Switzerland, 2005. (ICH, 2005).

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2011. (DOQ-CGCRE-008).

JENNINGS, W.; MITTLEFEHLDT, E.; STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KARASEK, F. W.; CLEMENT, R. E. **Basic gas chromatography – mass spectrometry**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988.

KATARZYNA, S., WIECZOREK, D., MICHOCKA, K. Effect of sodium chloride on the surface and wetting properties of aqueous solutions of cocamidopropyl betaine. **Journal of Surfactants and Detergents,** n. 18, p. 321-328, 2015.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; McEWEN, C. N. **Gas chromatography and mass spectrometry.** 1. ed. San Diego: Academic Press, 1996.

KOWALSKA, M., DUDZIAK M. GC-MS determination of halogen derivatives of acetic acid. **The Journal Architecture.Civil.Enginnering.Environment ACEE**, n. 3, p. 117-120, 2011.

LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação. **Scientia Chromatographica**, v.0, n.0, p. 17 – 44, 2008.

LEITE, F. Validação em análise química. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008.

MARTINEZ, D.; BORRULL, F.; CALULL, M. Comparative study of a solid phase extraction system coupled to capillary electrophoresis in the determination of haloacetic compounds in tap water. **Journal of Chromatography, A**, n. 827, p. 105 – 112, 1998.

MCKENNA, R. Marketing de relacionamento: estratégias bem sucedidas para a era do Cliente. 25 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1997.

MCMASTER, M. C. **GC/MS: a practical user's guide. 2 ed.** Hoboken (US): John Wiley & Sons, 2008

MILINSKI, M. C. Análise comparativa entre métodos de esterificação de ácidos graxos em óleo vegetal. 2007. 92p. Tese de Doutorado – Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

NAIR, L. M.; SAARI-NORDHAUS, R.; ANDERSON, J. M. Determination of haloacetic acids by ion chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v. 671, n. 1-2, p. 309 – 313, 1994.

PARSONS, S. A., GOSLAN E. H. Evaluation of haloacetic acids (HAA) concentrations in treated drinking Waters. **Cranfield University**, **UK**, 2006.

PEDROSO, M. P. Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v.3, n.2, p. 145 – 154, 2011.

PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 370-379, 2000.

PINTO, J. S. S., LANÇAS F. M. Hidrólise do óleo de azadirachta em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução a coplada a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

QUICK, M. P., PORTER, S., BENNETT, A. C., FLEETWOOD, A. J. Sodium monochloroacetate poisoning of greenfiches. **Forensic Science International**, n. 54, p. 1-8, 1992.

REDE METROLÓGICA RS. **RM 68 - Incerteza de Medição: Guia prático do avalidor de laboratórios.** Porto Alegre:, 2005. (RM 68).

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M.; Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography, A**, Iran, n. 1116, p. 1-9, 2006.

RIBANI, M., MELO, M. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27. n. 5, p. 771-780, 2004.

SÁ, C. S., BOAVENTURA, R. A., PEREIRA I. B. Analysis of haloacetic acids in water and air (aerosols) from indoor swimming pools using HS-SPME/GC/ECD. Journal of Environmental Science and Health, Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, v.47, n. 2, p. 176-183, 2012.

SARRION, M. N., SANTOS, F. J., GALCERAN, M. T. Solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-ion trap mass spectrometry for the analysis of haloacetic acids in water. **Journal of Chromatography, A**, v. 29, n.859, p. 159-171, 1999.

SCHRAMM, L. L., STASIUK, E. N., MARAGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annual Reports on the Progress of Chemistry, C**, v. 99, p. 3–48, 2003.

SKOOG, HOLLER & NIEMAN. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SOLEIMANI, M., KHANI, A., MOAZZEN, E., EBRAHJMZADEH, H., SAMIEI, A., MASOOMI, L. A Sensitive method for determination glycolic acid, mono- and dichloroacetic acids in betaine media using amino-functionalized SBA-15 as a sorbent and HPLC assay. **Chromatographia**, v.76, n. 1, p. 33-40, 2013.

SPARKMAN D. O.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. Gas chromatography and mass spectrometry. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2011.

TAVERNIERS, I., BOCKSTAELE, E. V., LOOSE, M. D. Trends in quality in the analytical laboratory: traceability and measurement uncertainty of analytical results. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, N. 7, p. 480–490, 2004.

VAZ, S. Análise química instrumental e sua aplicação em controle de qualidade de biocombustíveis. Brasília, DF. **EMBRAPA**, 2010.

VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA. **Conceitos fundamentais e gerais e termos associados.** Rio de Janeiro: INMETRO, 2012. (VIM 2012).

WANG K., DENG R., WANG, T. Analysis of haloacetic acids in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v.24, n. 1, p. 26-29, 2006.

WANG, Y. H., WONG, P. K. Determination of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in drinking water by acidic methanol esterification and headspace gas chromatography. **Water Research**, v.39, n. 9, p. 1844-1848, 2005.