



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELISANGELA ROSA RIBEIRO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUAS RESIDUAIS DE INDÚSTRIA
AGROQUÍMICA POR CLAE-UV/DAD.**

Londrina
2022

ELISANGELA ROSA RIBEIRO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUAS RESIDUAIS DE INDÚSTRIA
AGROQUÍMICA POR CLAE-UV/DAD.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Maria Luiza Zeraik

Londrina
2022

E43v Ribeiro, Elisangela Rosa .
Validação de método para análise de agrotóxicos em águas residuais de indústria agroquímica por CLAE-UV/DAD / Elisangela Rosa Ribeiro. - Londrina, 2022.
67 f. : il.

Orientador: Maria Luiza Zeraik.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Agrotóxicos - Tese. 2. Cromatografia em fase líquida - Tese. 3. Validação de método - Tese. I. Zeraik, Maria Luiza . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

ELISANGELA ROSA RIBEIRO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AGRTÓXICOS EM
ÁGUAS RESIDUAIS DE INDÚSTRIA AGROQUÍMICA POR CLAE-
UV/DAD.**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Londrina - UEL, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Química Analítica

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina
UEL

Prof^a. Dr^a. Diana Nara Ribeiro de Sousa
Universidade Estadual de Londrina
UEL

Prof. Dr^a. Julliana Izabelle Simionato Stipp
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UTFPR

Londrina, 02 de junho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Zeraik, pela orientação e conhecimentos compartilhados durante o desenvolvimento deste estudo.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Diana Nara Ribeiro de Souza e a Prof^a. Dr^a. Julliana Izabelle Simionato Stipp, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação e ao Prof. Dr. Alesandro Bail também pela contribuição ao trabalho desenvolvido.

Ao Departamento de Química da UEL.

Aos colegas da ADAMA BRASIL que contribuíram com conhecimentos, disposição e por serem tão solícitos.

RIBEIRO, Elisangela Rosa. **Validação de método para análise de agrotóxicos em águas residuais de indústria agroquímica empregando CLAE-UV/DAD**. 2022. 67 folhas. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Nas empresas de proteção de cultivos e produtoras de agroquímicos, há muitas vezes o revezamento na utilização de equipamentos nas etapas de síntese, formulação e embalagem de produtos. Com isso se torna necessário o controle de contaminantes residuais durante o processo produtivo. Neste projeto visamos desenvolver um método analítico para a determinação dos agrotóxicos clomazone, diuron e hezaxinona em amostras de águas provenientes da limpeza dos formuladores e linhas após a produção do produto contendo esses três princípios ativos. Devido às baixas concentrações dos ativos presentes nas amostras, o método desenvolvido deve ter um limite de detecção e quantificação em níveis de traços, além da necessidade de ser um método rápido, devido ao grande número de análises realizadas por dia no controle de qualidade da empresa. A análise dos ativos por cromatografia líquida proporcionou uma análise quantitativa dos compostos, com um método inédito na literatura, possibilitando uma alta sensibilidade, seletividade e detectabilidade dos três agrotóxicos na mesma análise. Os coeficientes de correlação das curvas analíticas foram $< 0,999$, e a faixa de trabalho foi de $0,050$ a $1,690 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto clomazone, de $0,050$ a $6,720 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto diuron e de $0,060$ a $7,350 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto hexazinona. O limite de detecção e quantificação se demonstraram aplicáveis utilizando a relação sinal/ruído obtido. Os valores de recuperação obtidos foram de $85,67 \%$ a $116,76 \%$, contemplando a faixa estabelecida pelas normas da ABNT. O método também se mostrou preciso com os desvios-padrão relativos abaixo de 5% . Em suma, o método desenvolvido e validado por CLAE-UV/DAD mostrou-se rápido e eficiente para análise simultânea dos agrotóxicos clomazone, diuron e hexazinona em amostras de águas residuais.

Palavras-chave: agrotóxicos; cromatografia em fase líquida; validação de método.

RIBEIRO, Elisangela Rosa. **Method validation for analysis of clomazone, pesticides in wastewater from agrochemical industry using HPLC**. 2022. 67p. Dissertation (Master in Analytical Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

In crop protection companies and agrochemical producers, there is often a rotation in the use of equipment in the stages of synthesis, formulation and packaging of products. This makes it necessary to control residual contaminants during the production process. In this project we aim to develop an analytical method for the determination of the pesticides clomazone, diuron and hexazinone in water samples from the cleaning of formulators and lines after the production of the product containing these three active principles. Due to the low concentrations of actives present in the samples, the method developed must have a detection and quantification limit at trace levels, in addition to the need to be a fast method, due to the large number of analyzes performed per day in the company's quality control. The analysis of the actives by liquid chromatography provided a quantitative analysis of the compounds, with an unprecedented method in the literature, allowing a high sensitivity, selectivity and detectability of the three pesticides in the same analysis. The correlation coefficients of the analytical curves were < 0.999 , and the working range was from 0.050 to 1.690 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the clomazone compound, from 0.050 to 6.720 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the diuron compound and from 0.060 to 7.350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the hexazinone compound. The detection limit and quantification proved to be applicable using the signal/noise ratio obtained. The recovery values obtained were from 85.67% to 116.76%, considering the range established by ABNT standards. The method also proved to be accurate with relative standard deviations below 5%. In summary, the method developed and validated by HPLC-UV/DAD proved to be fast and efficient for the simultaneous analysis of the pesticides clomazone, diuron and hexazinone in wastewater samples.

Keywords: pesticides; liquid phase chromatography; method validation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Tendências na evolução dos problemas da qualidade da água a partir da segunda metade do século XIX mostrando o aumento da complexidade dos processos ao longo do tempo e os problemas metodológicos envolvidos. 18
- Figura 2** – Fórmula estrutural de a) clomazone b) diuron c) hexazinona.....23
- Figura 3** – Componentes básicos de um cromatógrafo líquido de alta eficiência, composto por fase móvel, bomba, injetor, coluna cromatográfica, detector, computador para aquisição dos dados e resíduos.25
- Figura 4** – Instrumento de cromatografia líquida Infinity II 1260 LC composto por desgaseificador alto desempenho de até 5 mL min⁻¹ para baixo fluxo, entrega de solvente binário a pressões de até 600 bar e taxas de fluxo de até 5 mL min⁻¹, detector de arranjos de diodo HS, detecção espectral UV de alta sensibilidade de 190 a 640 nm com amostragem de 120 Hz e amostrador automático.....33
- Figura 5** – Amostra representativa do produto herbicida de nome comercial Eldorado® após formulação teste em planta piloto, contendo os três agrotóxicos clomazone, diuron, hexazinona.....40
- Figura 6** – Moinho de esferas da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.....40
- Figura 7** – Formulador da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.....41
- Figura 8** – Envasadora da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.....41
- Figura 9** – Esquema de planta de produção com sinalização dos pontos de coleta de amostras de água de descontaminação44
- Figura 10** –Cromatograma dos padrões de clomazone, diuron e hexazinona nas concentrações de 10,0 µg mL⁻¹ em metanol 100 % nas condições estabelecidas45
- Figura 11** –Espectro de UV dos compostos clomazone (a), diuron (b), hexazinona (c) obtidos por análise em CLAE-UV/DAD dos padrões nas concentrações de 400,0 µg mL⁻¹ em MeOH 100 %.46
- Figura 12** –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de água

da torneira por CLAE-UV.....	48
Figura 13 –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de água ultrapura por CLAE-UV.....	48
Figura 14 –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de metanol por CLAE-UV.....	48
Figura 15 –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de clomazone por CLAE-UV na concentração de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.....	49
Figura 16 –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de diuron por CLAE-UV na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.....	49
Figura 17 –Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de hexazinona por CLAE-UV na concentração de 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.....	50
Figura 18 –Gráfico de linearidade da curva analítica de (a) clomazone, (b) diuron e (c) hexazinona com resposta em mAU e quantidade do composto em $\mu\text{g L}^{-1}$	52
Figura 19 –Cromatograma de amostra fortificada com os padrões de clomazone, diuron e hexazinona nas concentrações de 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e condições estabelecidas por CLAE-UV.....	57
Figura 20 –Cromatograma de amostra de descontaminação em água.....	58
Figura 21 –Distribuição na curva analítica do método e da amostra de descontaminação proveniente da primeira lavagem da planta piloto parapara os compostos (a) clomazone, (b) diuron e (c) hexazinona com resposta em mAU e quantidade do composto em $\mu\text{g L}^{-1}$	59

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Descrição dos pontos de coleta de amostras de água provenientes da descontaminação e seus respectivos locais de amostragem para análise no laboratório de controle de qualidade	43
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de validação segundo os protocolos do INMETRO, ANVISA e ABNT.....	32
Tabela 2 – Concentrações das soluções dos padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	34
Tabela 3 – Concentração dos níveis de cada padrão na curva analítica ($\mu\text{g mL}^{-1}$). ..	37
Tabela 4 – Concentrações das amostras fortificadas a partir de cada solução padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	38
Tabela 5 – Tabela com valores toleráveis de recuperação para concentração nominal de trabalho.....	38
Tabela 6 – Condições cromatográficas para a determinação e quantificação dos compostos de interesse por CLAE-UV.....	47
Tabela 7 – Limite de detecção e limite de quantificação do método, desvio padrão relativo (DPR), e desvio padrão pela equação de Horwitz.....	50
Tabela 8 – Parâmetros das curvas analíticas obtidos por calibração externa para os padrões empregando CLAE-UV.....	51
Tabela 9 – Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto clomazone e exatidão dos valores.....	53
Tabela 10 – Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto diuron e exatidão dos valores.....	54
Tabela 11 – Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto hexazinona e exatidão dos valores.....	55
Tabela 12 – Recuperações obtidas a partir das fortificações de nível 1 e nível 2 de cada composto do estudo.....	56
Tabela 13 – Teste de Recuperação dos compostos clomazone, diuron e hexazinona.....	57
Tabela 14 – Resultados obtidos para as amostras de limpeza da planta piloto em $\mu\text{g mL}^{-1}$	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
UV	Ultravioleta
DAD	Detector de arranjo de diodos
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia em fase gasosa
EM	Espectrometria de massas
Fe	Fase estacionária
Fm	Fase móvel
VIS	Visível
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
DLLME	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
Si	Silício
ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
THF	Tetraidrofurano
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
RD	Resolução da diretoria

NBR	Normas brasileiras
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
EUA	Estados Unidos da América
DPR	Desvio padrão relativo
CV	Coefficiente de variação
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
S/R	Sinal/Ruído
Nm	Nanômetro
Hz	Hertz
RBC	Rede Brasileira de Calibração
FM	Fase móvel
MOI	Moinho
FML	Formulador
ECH	Enchedeira
PC	Ponto de coleta
TQE	Tanque
BH	Banho
R	Coefficiente de correlação
Rec	Recuperação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivo geral	16
1.2	Objetivos Específicos	16
2	Revisão bibliográfica	17
2.1	Disponibilidade de Água	17
2.2	Indústria e o uso de água	19
2.3	Reuso industrial de água	20
2.4	Agrotóxicos	21
2.5	agrotóxicos selecionados	21
2.6	Métodos Analíticos para a determinação de agrotóxicos em água	23
2.7	Validação de Método Analítico	27
3	METODOLOGIA	33
3.1	Instrumentação, materiais e vidrarias	33
3.2	Preparo das soluções	34
3.3	Condições cromatográficas	35
3.4	Análise Quantitativa	35
3.5	Validação	35
3.5.1	Seletividade	35
3.5.2	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	36
3.5.3	Linearidade e curva analítica	37
3.5.4	Recuperação	37
3.5.5	Precisão	39
3.6	Aplicação do método desenvolvido	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Otimização das condições cromatográficas	45
4.2	Validação do método	47
4.2.1	Seletividade	47
4.2.2	Limite de Detecção e Limite de quantificação	50
4.2.3	Linearidade e curva analítica	51
4.2.4	Recuperação	55
4.2.5	Precisão	56
4.3	Aplicação do método desenvolvido	57
5	CONCLUSÃO	60
	Referência	61

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas para combater organismos indesejados (insetos, larvas, fungos e carrapatos) e para controle do crescimento de vegetação, entre outras funções. (BRASIL, 2002; INCA, 2021). Outros termos têm sido utilizados para se referir a agrotóxicos, como venenos, remédios, defensivos ou praguicidas (INCA, 2021).

Esses podem ser classificados a partir de suas finalidades. Inseticidas possuem a ação de combater insetos, os fungicidas combatem os fungos que possam atacar as plantações, os herbicidas combatem as plantas daninha e os acaricidas combatem os ácaros (ANVISA, 2021a).

Há décadas os agrotóxicos são utilizados em diversas culturas buscando aumentar o rendimento e melhorar a qualidade do plantio. As áreas plantadas são pulverizadas com produtos para proteger as culturas contra pragas e ervas daninhas, e com isso gera-se um ganho econômico (VERMA e JASWAL, 2014).

Embora a produção e aplicação de agrotóxicos aumente a produtividade agrícola, o seu uso intensivo frequentemente gera um efeito negativo, danos ao meio ambiente e a saúde humana, muito grande. Impactos sobre seres humanos vão desde simples náuseas, dores de cabeça e irritações na pele até problemas crônicos, como diabetes, malformações congênitas e vários tipos de câncer. Impactos ambientais também são vários, incluindo contaminação da água, plantas e solo, diminuição no número de organismos vivos e aumento da resistência de pestes (AE, 2013). Isto torna essencial a regulamentação da produção, comércio, uso e disposição de agrotóxicos, a qual deve equilibrar ao menos três fatores: performance agrônômica (economia), saúde pública e meio ambiente.

A maioria desses compostos são solúveis em água e uma grande quantidade de agrotóxicos aplicados é perdida, e livres nos ambientes podem ser absorvidas por organismos e se espalharem no solo, águas e contaminar diretamente os alimentos e animais marinhos (BERNARDES e SOUZA, 2015). Algo que já se vem discutindo é a grande preocupação quanto a detecção frequente desses compostos em águas. Há, portanto, uma maior demanda no controle da qualidade de águas potáveis, tratamentos de águas residuais e reutilização dessas águas.

Na busca de equilibrar o desempenho econômica das agroindústrias, a saúde pública e o meio ambiente, deve haver uma rigorosa regulamentação quanto

ao uso e produção de agrotóxicos. Isto torna essencial a utilização de boas práticas nos processos de produção.

São vários os métodos para determinação de agrotóxicos em água, em destaque estão os cromatográficos que utilizam os equipamentos com diferentes tipos de detectores seletivos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia gasosa (CG) são as técnicas mais utilizadas para a determinação de agrotóxicos. Para analitos que possuem alta ou média volatilidade e que são tecnicamente estáveis a técnica de CG acoplada à espectrometria de massas (EM) é a mais utilizada. Em contrapartida, para os compostos menos voláteis e termicamente instáveis, mais difíceis de serem identificados por CG, necessitando tratamento amostrais adicionais (WATANABE et al., 2014).

A CLAE é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que interagem entre si, a fase estacionária (fe) e a fase móvel líquida (fm). Na prática, a fase estacionária é o “suporte” contido no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente (ANDRADE et al., 2006). Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, devido ao fato de terem maior ou menor afinidade com a fase móvel. O grau de migração é determinado pela magnitude das interações da fase estacionária e da amostra com a fase móvel (ANDRADE et al., 2006; CASS e DEGANI, 2001).

Na cromatografia líquida de alta eficiência os detectores têm a função de monitorar o efluente da coluna e fornecer a medida detectada do soluto. O seu funcionamento é de acordo com diferentes princípios, mas todos geram um sinal elétrico que é proporcional a alguma propriedade do analito. A resposta do detector pode ser relacionada com a quantidade de analito (AMORIM, 2019).

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvida para CLAE, A detecção por Ultravioleta e visível (UV-VIS) é geralmente aplicada em compostos cujas moléculas apresentam características para a absorção na região de UV-VIS (SKOOG, 2006; SCOTT, 2003).

Detector de Arranjo de Diodos (DAD) faz parte do grupo de detectores de fótons e constitui a base dos instrumentos multicanais para absorção UV-VIS (SCOTT, 2003).

O detector DAD permite determinar os espectros das substâncias presentes da amostra no eluente com diferentes comprimentos de onda durante a

análise cromatográfica (SCOTT, 2003).

O presente trabalho apresenta um método cromatográfico para determinar três moléculas (clomazone, diuron e hexazinona) presentes em águas residuais provenientes da lavagem dos equipamentos usados na fabricação de um agrotóxico produzido na indústria Adama Brasil®, onde esse estudo foi desenvolvido e aplicado. Neste trabalho são apresentados os resultados dos parâmetros analíticos obtidos do processo de desenvolvimento e validação de método, segundo os critérios da ABNT (2017).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho compreende desenvolver e validar um método analítico único para a determinação simultânea das moléculas de diuron, clomazone e hexazinona em amostras de águas residuais de indústria agroquímica por cromatografia líquida.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar e desenvolver o método empregando análises por cromatografia líquida para determinação das moléculas de agrotóxicos em matriz de água.
- Determinar e quantificar clomazone, diuron e hexazinona em águas residuais do processo de produção de agrotóxicos, empregando análises por CLAE-UV/DAD.
- Demonstrar a aplicabilidade do método validado na determinação dos compostos em amostras de água residual de indústria agroquímica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DISPONIBILIDADE DE ÁGUA

O Brasil é o maior depositário natural de águas doces do planeta, detém 11,6% de toda a água doce superficial do mundo, sendo que 70% da água disponível está localizada na região Amazônica, onde se encontra a menor densidade populacional. A região Nordeste, que é a mais pobre e a mais árida, concentra 30% da população brasileira e possui apenas 5 % da água doce. As regiões Sul e Sudeste, onde estão concentradas cerca de 60 % da população dispõem de 12,5 % da água doce (AUGUSTO et al., 2012).

O aumento da população humana e da urbanização, e a necessidade cada vez mais premente de aumentar a produção de alimentos para abastecer bilhões de pessoas, causam pressões na produção e consumo de águas continentais superficiais e subterrâneas. Por outro lado, há permanente e persistente degradação da qualidade das águas, deterioração causada por emissões de poluentes para o ar, solo por efluentes industriais e uso de fertilizantes e agrotóxicos (TUNDISI et al., 2014).

A água doce no mundo é renovável, no sentido de existir um ciclo de fluidez das águas na Terra. A água que evapora dos mares e oceanos de forma cíclica, acaba por fazer o caminho de volta para os oceanos, por meio dos rios, cursos d'água, dos lagos e aquíferos subterrâneos. Essa renovação da água no sistema hidrológico fechado da Terra denomina-se ciclo hidrológico (OKAFOR, 2011).

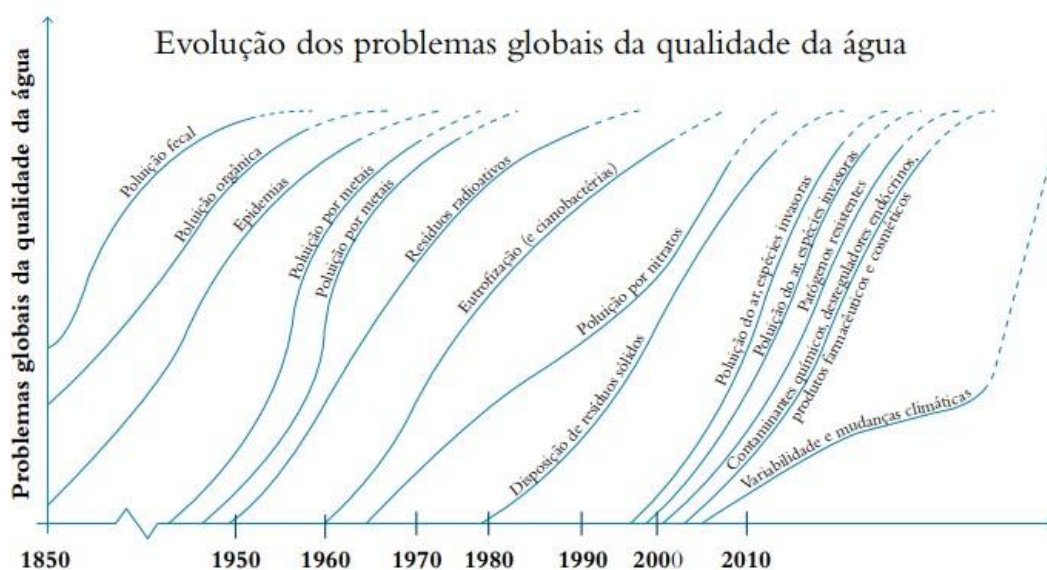
Nesse ciclo a água interage em todos os seus estados físicos formando as reservas superficiais e subterrâneas sendo o que ocorre com as águas superficiais é refletido nas águas subterrâneas e vice-versa (FARIAS, 2015). Essa fluidez da água demonstra que embora as preocupações estejam voltadas para a poluição das águas superficiais de rios e lagos, a contaminação de águas subterrâneas agrava o problema como um todo.

Com o crescimento das populações e incremento das atividades econômicas, muitos países estão atingindo rapidamente condições de escassez de água ou se defrontando com limites para o desenvolvimento econômico. A demanda por água está aumentando rapidamente com 69 % exigidos para a irrigação, menos

de 21 % para a indústria e apenas 10 % para consumo doméstico (AUGUSTO et al., 2012).

A presença de contaminantes, sejam eles bactérias patogênicas, parasitas, vírus, contaminantes orgânicos ou inorgânicos são prejudiciais à saúde humana. Desta forma ações de gestão dos recursos hídricos são de grande importância para não tornar o acesso à água potável um problema maior para as gerações futuras (AUGUSTO et al., 2012).

Figura 1. Tendências na evolução dos problemas da qualidade da água a partir da segunda metade do século XIX mostrando o aumento da complexidade dos processos ao longo do tempo e os problemas metodológicos envolvidos.



Fonte: TUNDISI, 2014.

A análise recente (TUNDISI et al., 2014) da evolução dos problemas referentes à deterioração das águas mostra um quadro preocupante nos últimos 150 anos (Figura 1). Observa-se que, de contaminação fecal e orgânica, passou-se para situação muito mais complexa, na qual metais pesados, substâncias orgânicas e toxinas de origem diversa (inclusive de organismos aquáticos) acumularam-se em águas superficiais e subterrâneas.

2.2 INDÚSTRIA E O USO DE ÁGUA

Desde a revolução industrial, a economia mundial cresce com uma dinâmica de exploração imediatista de recursos naturais, seja na indústria de construção civil, química, de alimentos, automotiva ou em outros segmentos. A maioria deles demanda grandes volumes de água para abastecer seus processos produtivos.

Alguns ramos de atividade, como por exemplo, medicamentos, agroquímicos ou eletrônicos, requerem água de alta qualidade, e conseqüentemente, exigem investimentos e tecnologia para seu tratamento, e em determinadas situações a composição do tratamento adicional (além do tratamento empregado em águas de abastecimento público) faz-se necessário para que os requisitos de qualidade sejam atingidos.

Segundo Tsutiya (2006), o uso da água em uma planta industrial pode ser classificado em 5 categorias principais:

- Consumo humano (banheiros, banho e alimentação, incluindo lavagem de utensílios, por exemplo), sendo que o consumo humano depende essencialmente do número de empregados e do regime de trabalho;
- Consumo doméstico (água utilizada em limpeza geral e manutenção da água do estabelecimento, por exemplo);
- Água incorporada ao produto (produtos de higiene e alimentos, por exemplo);
- Água utilizada no processo de produção e utilidades (geração de vapor e sistemas de resfriamento);
- Água perdida ou para usos não rotineiros (é assim denominada a água para sistemas de proteção contra incêndios, lavagem de reservatórios, água perdida por vazamentos e para usos não identificados) (FARD, 2021).

O consumo de água na indústria pode sofrer alterações de acordo com o desenvolvimento e avanço tecnológico, gerando reduções ou mesmo o aumento das taxas de consumo de água (PADILLA, 2020).

O desenvolvimento e uso dos recursos hídricos já ultrapassaram o nível de alarme em muitas partes do mundo, resultando em questões ambientais como: rios com pouca ou nenhuma vazão (Liang et al., 2010); degradação do ecossistema (Palmer e Ruhi, 2019); declínio do lençol freático (Bierkens e Wada,

2019); e encolhimento do lago/pântano (Zhou et al., 2019). Esses problemas demonstram que o uso insustentável da água se tornou um problema que dificulta o desenvolvimento sustentável de muitas economias globalmente.

A segurança hídrica, alimentar e energética são elementos centrais da Agenda 2030 das Nações Unidas para o Desenvolvimento Sustentável. Nos últimos anos, os impactos ambientais ecológicos causados pelo comércio de produtos têm atraído muita atenção.

2.3 REUSO INDUSTRIAL DE ÁGUA

O controle e conscientização no uso dos recursos hídricos podem gerar a redução do consumo e reciclagem da água. A diminuição do consumo relaciona-se ao uso eficiente da água, ou à simples economia, por meio da eliminação de vazamentos e perdas e da redução da quantidade do consumo em atividades domiciliares, industriais e agrícolas (TELLES et al., 2010).

O reuso pode ser definida como o uso de água previamente utilizada para uma determinada função, mesmo que sua qualidade tenha sido alterada durante o primeiro uso; o reaproveitamento é feito antes que essa água seja despejada na rede de coleta de esgoto (TELLES et al., 2010; SILVA et al., 2003).

Em determinadas situações, a água para ser reaproveitada exige um grau elevado de qualidade. Este requisito pode encarecer o tratamento, levando a custos que não compensam o benefício gerado pelo reuso da água. A importância de se analisar individualmente as possibilidades de reuso de água decorre especialmente deste fator.

O reuso de água na indústria, muitas vezes está associado a iniciativas isoladas, sendo a maioria no setor privado. Na planta industrial a água é aplicada para diversas finalidades, como matéria-prima, sistema de refrigeração, limpeza e lavagem de pátios e jardins, consumo humano e higiene pessoal, entre outras aplicações.

O crescimento econômico acelerado associado à ausência de alternativas sustentáveis, bem como a exploração de recursos naturais fizeram com que este assunto adquirisse interesse público e, conseqüentemente, desencadeou iniciativas políticas e econômicas (PADILLA, 2020).

A implantação de um programa de reuso de água na indústria requer o conhecimento do processo produtivo, demandas internas e principais usos de água, tendo em vista a identificação de potenciais reuso de água em processos industriais para diminuir seu consumo.

A expansão que vem ocorrendo nas indústrias agroquímicas causada pelo aumento no consumo de agrotóxicos reforça a necessidade de implementação de reuso de água nos processos produtivos devido à alta toxicidade dos resíduos produzidos por estas indústrias.

2.4 AGROTÓXICOS

Desde a criação dos agrotóxicos seu uso fundamental é na agricultura, buscando melhoramentos e ganho de produtividade. Seu uso ajuda no controle de pragas e doenças nas mais variadas culturas, porém o uso descontrolado e crescente pode acarretar a contaminação do solo, da água e dos alimentos.

O aumento populacional vem tornando cada vez mais necessário ampliar as áreas plantadas e com isso a intensificação do uso da terra para fins agrícolas tem despertado grande preocupação devido, principalmente, aos impactos que vem causando ao ambiente (RIBEIRO, 2013).

Agrotóxicos são definidos como produtos de agentes de processos físicos, químicos ou biológico, com uso no beneficiamento de atividades agrícolas, na pastagem, florestas e em ambientes urbanos com o intuito de modificar a composição da flora ou fauna (RIBEIRO, 2013).

2.5 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Os três agrotóxicos alvos deste estudo são herbicidas, que entre os defensivos agrícolas ou agrotóxicos são produtos utilizados no controle de plantas invasoras. O clomazone, 2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona, Figura 2a, é um herbicida do grupo químico das isoxazolidinonas, amplamente utilizado no Brasil no controle de plantas daninhas mono e eudicotiledôneas (ANVISA, 2021a).

O registro da molécula de clomazone no Brasil está relacionado ao uso em cultura de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, fumo e mandioca (VERMA; JASWAL, 2014). As isoxazolidinonas possuem ação inibidora da síntese do caroteno de amplo espectro para o controle em pré e pós-emergência (NORA, 2015).

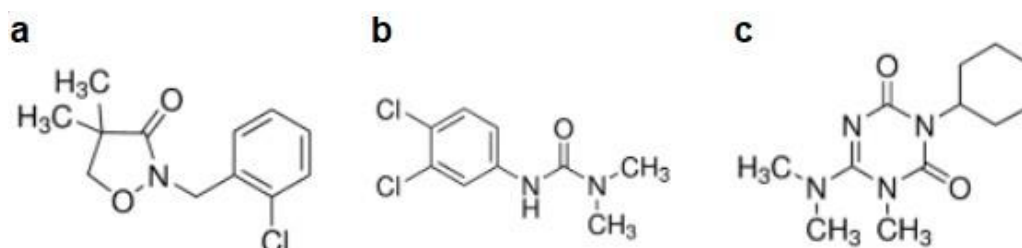
O diuron, 3-(3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilureia, Figura 2b, é um herbicida de aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, eucalipto, seringueira, soja e uva, pertence ao grupo químico ureia e possui ação de inibir a fotossíntese (ANVISA, 2021a; NORA, 2015). Além de ser largamente utilizado na agricultura, o diuron é utilizado no controle de plantas em áreas urbanas e como um produto anti-fotossintetizante em tintas para evitar o acúmulo de organismos marinhos nos cascos de barcos. É comum a combinação de diuron com outros herbicidas.

A ação do diuron nos organismos alvos interrompe o fluxo normal dos elétrons que permite a geração do potencial de membrana e o armazenamento de energia química pelas células. A toxicidade do diuron em organismos não-alvos se dá pela semelhança entre os sítios de inibição da proteína D1 do fotossistema II e do complexo bc1 presente na cadeia respiratória dos eucariotos (BRUSSLAN e HASELKORN, 1989; RANGO; COLSON, 1988).

A hexazinona pertence ao grupo das triazinonas, 3-ciclohexil-6-(dimetilamino)-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H) -diona, (Figura 2c), sua utilização é de herbicida pré e pós-emergente muito utilizada no cultivo de cana-de-açúcar (ANVISA,2021a). Sua molécula possui alta solubilidade em água.

Por possuir alta solubilidade em água, não são raros os registros do herbicida hexazinona no meio ambiente, como em águas superficiais ou subterrâneas (BAINBRIDGE et al., 2009; ANVISA, 2021b).

Figura 2. Fórmula estrutural de a) clomazone b) diuron c) hexazinona.



Fonte: Anvisa, 2021a.

O diuron apresenta baixa solubilidade em água 42 mg L^{-1} , já a solubilidade em água do hexazinona é de 32 mg L^{-1} , muito inferior à do clomazone que é de 1100 mg L^{-1} (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

O crescente uso de agrotóxicos vem afetando o equilíbrio do meio ambiente, e a preocupação em monitorar e controlar os resíduos desses compostos em diversas matrizes como em água, alimentos no solo e no ar. Muitas pesquisas têm voltado suas atenções em desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de agrotóxicos em água.

Para análise de agrotóxicos em água existem duas etapas importantes: a pré-concentração dos analitos e a determinação destes com um método cromatográfico e detector apropriado (RIVERSOS, 2012; LANÇAS, 2009).

Dentre as técnicas de extração normalmente utilizadas para isolar e concentrar analitos, destacam-se: a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), a micro extração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra magnética (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), sendo a SPE a técnica mais utilizada para tal etapa.

A extração em fase sólida (SPE) é atualmente a técnica mais

empregada para amostras líquidas, como matrizes de água (PRATES et al., 2011; CALDAS et al., 2011; SILVA et al., 2011). Os métodos que envolvem LLE, requer grandes volumes de solventes orgânicos, são bastante trabalhosos, difíceis de automação e apresentam alto custo.

A SPME foi introduzida em 1990, nesta técnica, uma fibra de sílica fundida é coberta com a fase estacionária, geralmente feita de polidimetilsiloxano (PDMS), que é exposta na amostra aquosa por um determinado tempo, para que o equilíbrio seja alcançado e posteriormente o analito é dessorvido pela fase móvel ou por aquecimento direto no injetor do cromatógrafo a gás. A técnica SBSE foi introduzida em 1999 e baseia-se na extração sortiva sobre uma camada polimérica, que reveste uma barra de agitação magnética, ou seja, tem como base o mesmo princípio da SPME, com a diferença de utilizar maior volume de fase extratora.

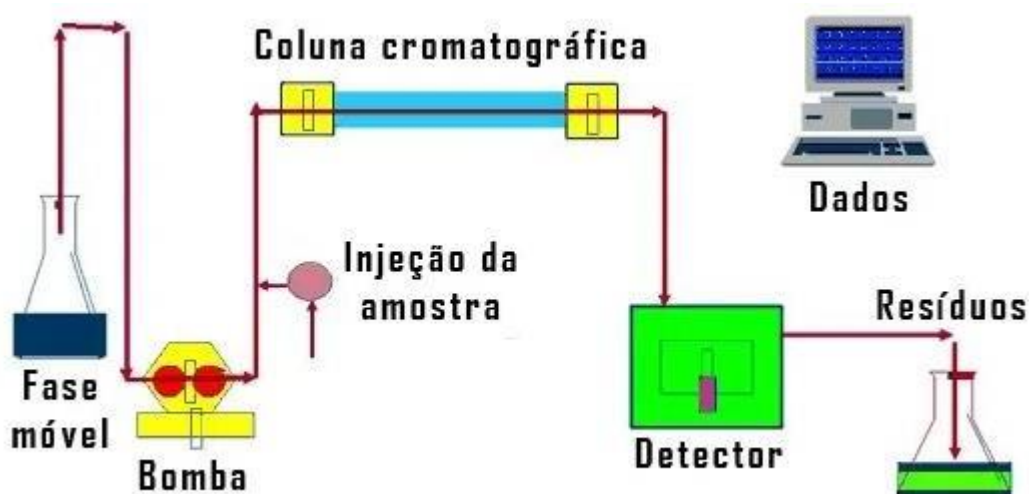
A DLLME foi desenvolvida em 2006 como avanço das técnicas de microextração em fase líquida, cujo método baseia-se no sistema ternário de solventes, que é uma miniaturização da LLE e utiliza microlitros de solvente extrator. E a SPE, que é uma técnica muito empregada para pré-concentração de agrotóxicos, onde muitas publicações utilizaram esta técnica em análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes aquosas (SILVA et al., 2011).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método de separação de compostos químicos em solução, para realização desta separação necessitamos no processo cromatográfico da partição dos componentes de nossa amostra entre a fm e a fe (ANDRADE et al., 2006).

A CLAE passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI et al., 2009).

A representação esquemática de um equipamento de CLAE (Figura 3) é composto por um reservatório de solvente, uma bomba de alta pressão, injetor da amostra, coluna cromatográfica, detector e registrador de dados, que são divididos em módulos, que podem ser controlados individualmente ou por computador (CASS e DEGANI, 2001).

Figura 3. Componentes básicos de um cromatógrafo líquido de alta eficiência, composto por fase móvel, bomba, injetor, coluna cromatográfica, detector, computador para aquisição dos dados e resíduos.



Fonte: GRUBERT, L. C., 2018.

A bomba de alta pressão empregada em CLAE tem a função de enviar um fluxo constante e reprodutível de fase móvel para a coluna e apresenta características totalmente especiais.

As principais são: devem operar a pressões de 0,01 a 35,0 MPa (0,1 a 350 bar), com a mesma precisão e exatidão de operações a pressão quase ambiente; intervalo de vazões entre 0,01 e 5 mL min⁻¹ para aplicações analíticas, entre 0,05 e 200 µL min⁻¹ para uso com colunas micropore e capilar, e até 100 mL min⁻¹ para aplicações preparativas. Repetitividade e constância da vazão de 1%.

Elas não devem ser corroídas pelas fases móveis empregadas. A bomba deve proporcionar ao sistema uma vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (CIOLA, 2003; COLLINS et al., 2006).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua

regeneração após cada separação (CASS e DEGANI, 2001).

A classificação da cromatografia líquida de acordo com as modificações químicas realizadas na fase estacionária (sílica gel) levou a uma grande variedade de tipos.

A separação em cromatografia líquida pode ser encontrada explorando a variedade de processos existentes, dos quais os mais importantes são: cromatografia no modo normal, no modo reverso, de compostos iônicos, de troca iônica, cromatografia de exclusão e cromatografia quiral (CASS e DEGANI, 2001).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo reverso constitui a modalidade cromatográfica na qual a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. Salienta-se ainda que tal processo é o mais utilizado nos laboratórios de pesquisas industriais e acadêmicas, além do seu amplo emprego em análises de rotina (OLSEN, 2001).

Os detectores mais empregados em CLAE são os espectrofotômetros no UV/VIS. Eles determinam a diferença de absorbância na região do ultravioleta ou no visível, sendo, assim, um detector seletivo para moléculas que possuem cromóforos. Os detectores por arranjo de fotodiodos fornecem espectros de varredura do analito no UV-VIS (CASS e DEGANI, 2001).

O DAD é composto por uma fonte de emissão de luz (lâmpada de deutério ou xenônio), que é colimada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A luz total que passa através da célula contendo a amostra incide sobre uma grade holográfica (SkOOG, 2006; SCOTT, 2003).

Essa grade difrata a radiação, separando seus diferentes comprimentos de onda, onde cada um deles incide sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica cuja magnitude está relacionada com a intensidade de emissão. Esta corrente é então transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda através de um circuito, resultando no espectro de absorção da substância (SkOOG, 2006; SCOTT, 2003).

Os diodos são compostos por silício (Si) cristalino, que é um semicondutor, um material cuja condutividade elétrica é menor que a de um metal, porém maior que a de um material isolante (SkOOG, 2006; SCOTT, 2003).

Com um ou dois arranjos de diodos colocados ao longo da extensão do plano focal de um monocromador, todos os comprimentos de onda podem ser monitorados simultaneamente, tornando assim possível a espectroscopia de alta

velocidade (SkOOG, 2006).

A grande utilização desta modalidade cromatográfica dá-se à existência de uma grande variedade de fases estacionárias disponíveis comercialmente, que permitem ao usuário alcançar a seletividade desejada (CASS e DEGANI, 2001).

Ressalta-se ainda que a fase móvel é em grande parte composta por água, um solvente não tóxico e barato. O princípio da retenção no modo reverso é a hidrofobia. A separação no modo reverso se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa (CASS e DEGANI, 2001).

Dentro da CLAE no modo reverso, a maioria das fases utilizadas atualmente são baseados em silanos C8 ou C18 quimicamente ligados à superfície de sílica. Como fase móvel são utilizados solventes com caráter polar, geralmente uma mistura de água e solventes orgânicos miscíveis com a água (BOTTOLI et al., 2002).

A força da fase móvel na cromatografia no modo reverso depende do tipo de solvente orgânico escolhido (solvente B) e sua porcentagem em água (solvente A). Os solventes orgânicos comumente usados são: acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF) (CASS e DEGANI, 2001).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Para a comprovação de que um novo método analítico produza informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, o mesmo deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação.

No Brasil dois órgãos regulamentam a validação de métodos analíticos, que são: a ANVISA, através da Resolução da diretoria (RD) N° 166, de 24 de julho de 2017 e o INMETRO através do documento DOQ-CGCRE-008 revisão 9 de junho de 2020. Ambos os órgãos traduzem as guias da Eurachem, que é uma rede de organizações nacionais europeias, que tem como objetivo o estabelecimento da rastreabilidade internacional dos resultados de medições químicas, bem como promover as boas práticas laboratoriais (CARBO et al., 2008; EURACHEM, 1998; LEITE, 2002; ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), uma entidade

privada sem fins lucrativos que é responsável pela normatização técnica no Brasil segue também as guias da Eurachem e as regulamentações do INMETRO. A norma da ABNT NBR 14029 de 2016 estabelece o procedimento para validação de métodos para determinação do teor de ingrediente ativo em produto técnico, teor de ingrediente ativo em formulação e teor de impureza em produtos agrotóxicos e afins.

Os estudos de validação constituem uma ferramenta essencial das boas práticas de fabricação em sistemas de gestão da qualidade de laboratórios de diversas áreas analíticas. Tais estudos são estruturados tendo como referência guias e documentos orientados nacional e internacionalmente (BERNARDES; SOUZA, 2011).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da conferência internacional de harmonização, da sigla em inglês ICH (*International Conference on Harmonization*), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI et al., 2004).

A literatura traz diversos parâmetros empregados para validar um método analítico (BRITO et al., 2003; CASSIANO et al., 2009; LANÇAS, 2009; RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008), onde os principais são definidos abaixo:

a) Seletividade: a capacidade de detectar os analitos de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (ANVISA, 2017).

b) Linearidade: refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A linearidade em métodos quantitativos é determinada pela medição de amostras, em várias concentrações de analito abrangendo a faixa reivindicada do método (ANVISA, 2017). Ou seja, o quanto os dados se ajustam a equação linear (Equação 1):

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y corresponde ao sinal analítico;

x concentração do analito de interesse;

a corresponde ao coeficiente angular (Inclinação);

b corresponde ao coeficiente linear (intersecção).

c) Intervalo de trabalho: é a faixa compreendida entre o menor e o maior valor de concentração que possa ser determinado com precisão e exatidão usando a linearidade do método.

d) Precisão: representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ) e o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

e) Exatidão: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004).

A exatidão de um método pode ser determinada também pela comparação dos resultados obtidos pelo método sob avaliação e os resultados obtidos por um método de referência por meio da avaliação do grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método que está sendo testado em relação ao de referência.

Pode ser determinada também pela análise de um material de referência, com concentrações conhecidas dos compostos em análise. E, por último, pode ser determinada por ensaios de recuperação, em que amostras são fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos de interesse e determinadas pelo método sob análise através da Equação 2:

$$\text{Exatidão } e = \frac{x_i}{x_v} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

X_i é valor obtido;

X_v é valor considerado verdadeiro.

f) Limite de detecção (LD): corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método analítico sob avaliação, mas não necessariamente quantificada.

O LD pode ser determinado de três maneiras: método visual, que é a análise de amostras fortificadas com o analito em concentrações decrescentes com definição do limite por inspeção visual onde a menor concentração do analito possa ser diferenciada do ruído do sistema com segurança; método sinal-ruído, que pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco (RIBEIRO et al., 2008).

Em geral, é considerado aceitável uma relação sinal-ruído que gera um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema (ABNT, 2016), expresso através da Equação 3:

$$LD = \frac{3x (C_{std})}{\frac{S}{(R)} x C_s} x 100 \quad (3)$$

Onde:

LD é o limite de detecção do método expresso como concentração (% m/m);

C_{std} é a concentração da solução de calibração mais diluída;

(S/R) é a razão entre a altura do sinal e a altura do ruído para o analito no cromatograma da solução de calibração mais diluída;

C_s é a concentração nominal teórica da amostra.

g) Limite de quantificação (LQ): corresponde à menor concentração do analito que pode ser quantificada utilizando um determinado procedimento experimental. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado, utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica, expressa pela Equação 4:

$$LQ = \frac{C_{std}}{C_s} x 100 \quad (4)$$

Onde:

LQ é o limite de quantificação do método para o analito, expresso como concentração (% m/m);

C_{std} é a concentração da solução padrão (solução LQ) ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_s é a concentração nominal teórica da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se um método será usado para análise qualitativa em nível de traços, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que o método será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para ser utilizado em instrumento e laboratório específicos, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente for necessário.

A Tabela 1 apresenta os 3 protocolos (INMETRO, ANVISA e ABNT) mais utilizados nos processos de validação de métodos nas indústrias agroquímicas do Brasil, bem como a comparação das suas figuras de mérito. Este trabalho foi desenvolvido segundo as normas do protocolo da ABNT (2017).

Tabela 1. Parâmetros de validação segundo os protocolos do INMETRO, ANVISA e ABNT.

INMETRO	ANVISA	ABNT
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade	Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração	-
Linearidade	Linearidade	Linearidade
-	Curva de calibração	-
Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de quantificação
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	
Exatidão e tendências	Exatidão	Recuperação
Precisão	Precisão	Precisão
Repetibilidade	Repetibilidade (precisão inter-corrída)	Repetibilidade
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrída)	-
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)	-
Robustez	Robustez	-
Incerteza da medição	-	-

Fonte: ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; ABNT, 2017.

3 METODOLOGIA

3.1 INSTRUMENTAÇÃO, MATERIAIS E VIDRARIAS

As análises foram realizadas utilizando o equipamento de CLAE Agilent 1260 Infinity II (Figura 4) equipado com bomba binária 1260 Infinity II, detector de matriz de diodos 1260 Infinity II HS, detecção espectral UV de alta sensibilidade de 190 a 640 nm, módulo de manipulação de colunas 1260 Infinity II, injetor manual 1260 Infinity II, amostrador automático, coluna C₈ de aço inox com 4,6 mm de diâmetro interno, 150 mm de comprimento e 5 µm de tamanho de partícula, da marca Agilent (Zorbax Eclipse C₈). A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software OpenLab® CDS.

Figura 4. Instrumento de cromatografia líquida Infinity II 1260 LC composto por degaseificador alto desempenho de até 5 mL min⁻¹ para baixo fluxo, entrega de solvente binário a pressões de até 600 bar e taxas de fluxo de até 5 mL min⁻¹, detector de arranjos de diodo HS, detecção espectral UV de alta sensibilidade de 190 a 640 nm com amostragem de 120 Hz e amostrador automático.



Fonte: Próprio autor.

A balança utilizada nas pesagens foi a balança analítica Sartorius (São Paulo, Brasil) modelo ED224S, com resolução de 0,0001 mg. As balanças foram verificadas com padrões de massas Toledo (São Paulo, Brasil) certificados pela RBC (Rede Brasileira de Calibração).

Para a filtração das amostras foram utilizados filtros PVDF (Whatman) de 0,45 μm e seringas descartáveis do tipo Slip Descarpack de 05 mL sem agulha.

No preparo das soluções utilizou-se vidrarias volumétricas calibradas e certificadas RBC de volume nominal de 10 e 25 mL. Foram utilizadas micropipetas de volume variável de 200, 1000 e 5000 μL da marca Brand.

O solvente empregado para eluição dos analitos foi metanol (MeOH) da marca J. T. Baker e o sistema de purificação utilizado para obtenção de água ultrapura foi o Milli-Q Direct 16 ultrapurificação de água de 16 L h^{-1} com filtros millipore e lâmpada de UV (185-254 nm).

Os padrões de clomazone (98,3 %), diuron (98,9 %), e hexazinona (98,8%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoques dos padrões de clomazone, diuron e hexazinona foram preparadas separadamente em balões de 25,0 mL a partir das pesagens de 10,8 mg de clomazone (9,3 %), 8,5 mg de diuron (98,9 %) e de 9,3 mg de hexazinona (98,8 %) em metanol 100 %, foram pipetados 0,2 mL de solução estoque de clomazone e diuron e 0,22 mL de solução estoque de hexazinona em balões de 25,0 mL, estas soluções foram denominadas de soluções diluídas. A Tabela 2 a seguir apresenta as concentrações para cada padrão nas duas soluções

Tabela 2 – Concentrações das soluções dos padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Padrão	solução estoque	solução diluída
Clomazone	424,7	3,398
Diuron	336,3	2,690
Hexazinona	367,5	3,234

Fonte: Próprio autor.

3.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para otimizar a separação cromatográfica e identificação do tempo de retenção dos agrotóxicos estudados, foi preparada uma solução de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %, de cada analito e testada a separação em modo isocrático de gradiente.

A fase móvel (FM) de composição metanol: água foi testada nas proporções: 30:70, 40:60 e 50:50 e 55:45, em uma vazão de 1 mL min^{-1} e coluna em temperatura ambiente (25 °C).

Com as condições cromatográficas de separação já definidas, foi realizada a identificação do comprimento de onda ideal para cada composto, injetando separadamente cada padrão nas concentrações de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %, com volume de injeção de 2,0 μL e coluna em temperatura ambiente (25 °C) por CLAE-UV/DAD com varredura de 190 a 400 nm.

3.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

A quantificação dos agrotóxicos foi efetuada utilizando-se o método de calibração externa por CLAE-UV/DAD, segundo a norma da ABNT (2017) que se baseia na norma da EURACHEM (2014) e INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011).

3.5 VALIDAÇÃO

3.5.1 Seletividade

O ensaio para averiguar se o método possui a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, examinar se há alguma interferência no sinal analítico de interesse, a seletividade, foi realizada por meio de leituras individuais por CLAE-UV dos padrões nas concentrações de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %, seguidos das solventes MeOH e água Milli-Q e água da torneira (matriz da amostra de descontaminação) (ABNT NBR, 2017).

3.5.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e de quantificação foram determinados a partir da relação sinal/ruído. Para o LD foram considerados 5 injeções da menor concentração do analito que foi detectado pelo equipamento e que apresentou a relação sinal/ruído maior do que 3.

Para o preparo da solução de clomazone foram pipetados 80,0 µL da solução estoque diluída, Tabela 2 do item 3.2, em balão volumétrico de 10,0 mL, a diluição da solução de diuron foi preparada a partir de 100 µL da solução estoque diluída em balão volumétrico de 10,0 mL e a diluição de hexazinona para a determinação do LD foi preparada a partir de 100 µL da solução estoque diluída em balão volumétrico de 10,0 mL, ambas diluições em MeOH 100 %. Resultando em soluções nas concentrações de 0,027 µg mL⁻¹ para clomazone e diuron e 0,032 µg mL⁻¹ para hexazinona.

Para o LQ foram consideradas 5 injeções da solução de calibração de menor concentração com a relação sinal/ruído maior de que 10, onde o desvio padrão relativo (DPR) entre as cinco medidas seja menor do que o DPR calculado pela equação estendida de Horwitz (ABNT, 2016) Equação 5.

$$\%DPR_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)} \times 0,67 \quad (5)$$

Onde:

C é a concentração do analito (% m/m) dividido por 100.

As Concentração das soluções dos padrões para a determinação do LD foram de 0,05 µg mL⁻¹ para clomazone e diuron e 0,06 µg mL⁻¹ para hexazinona ambas preparadas a partir das respectivas soluções diluídas dos padrões em MeOH 100 %.

As mesmas diluições preparadas para determinar o LQ foram utilizadas como a solução mais diluída no ensaio de linearidade e curva analítica.

3.5.3 Linearidade e curva analítica

A faixa linear de trabalho foi avaliada pela proporcionalidade entre a concentração do analito e sua resposta analítica. A partir das soluções estoques cada padrão analítico foram diluídos em MeOH 100 %, preparando 7 pontos (níveis) como descritos na Tabela 3, cada nível foi injetado 2 vezes, para o preparo da linearidade cada nível dos padrões foi preparado no mesmo balão para diminuir o número de análises.

Tabela 3. Concentração dos níveis de cada padrão na curva analítica ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Padrão	nível 1	nível 2	nível 3	nível 4	nível 5	nível 6	nível 7
Clomazone	0,05	0,17	0,34	0,51	0,68	1,02	1,69
Diuron	0,05	0,13	0,27	0,54	0,81	3,36	6,72
Hexazinona	0,06	0,16	0,32	0,48	0,90	3,67	7,35

Fonte: Próprio autor.

A norma do INMETRO NBR 14029 não menciona a necessidade de curva analítica, porém para este método foi optado para obter uma curva de trabalho utilizando 5 pontos dentro da linearidade, mantendo os extremos da curva, o LQ e o último ponto, considerando a rotina do laboratório de controle de qualidade da empresa Adama[®] para o qual o método está sendo desenvolvido.

3.5.4 Recuperação

Amostras de água de torneira (matriz da amostra), do laboratório de controle de qualidade da empresa foram utilizadas para o preparo das amostras fortificadas. Foram pesados 1500 mg de água da torneira em balões de 10,0 mL e adicionados soluções dos padrões dos analitos e o volume foi aferido com MeOH 100% em dois níveis diferentes de fortificação (N1 e N2). Cinco análises foram realizadas para cada nível.

As concentrações das amostras fortificadas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações das amostras fortificadas a partir de cada solução padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Padrão	Fortificada Nível 1	Fortificada Nível 2
Clomazone	0,20	0,50
Diuron	0,15	0,50
Hexazinona	0,25	0,50

Fonte: Próprio autor.

A fortificada N1 foi calculada para que sua concentração seja intermediária aos níveis um e dois da linearidade, já a fortificada N2 foi calculada para uma concentração intermediária aos níveis dois e três da linearidade. Que segundo a norma da ABNT (ABNT NBR, 14029, 2017), através da adição de padrão analítico do analito de interesse à amostra, em no mínimo dois níveis de fortificação o método expressa quanto os valores obtidos encontram-se próximo do valor real, sendo determinada como a precisão do método.

Tabela 5. Tabela com valores toleráveis de recuperação para concentração nominal de trabalho.

Concentração nominal das impurezas (% m/m)	Recuperação tolerável (%)
> 1	90 – 110
0,1 – 1	80 – 120
< 0,1	75 – 125

Fonte: Adaptada de ABNT NBR, 2017.

A Tabela 5 é também aplicável quando a concentração de analitos está em baixas concentrações.

3.5.5 Precisão

Para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, de uma mesma amostra, foi utilizado os critérios da ABNT (ABNT NBR, 14029, 2017).

A precisão foi determinada por meio do ensaio de repetibilidade. A repetibilidade do instrumento foi avaliada pela injeção de 5 soluções independentes, preparadas com adição dos padrões analíticos. As análises ocorreram no mesmo dia, no mesmo equipamento e foram injetadas sete soluções preparadas de acordo com a fortificação nível 2 descrita no item 3.5.4 e Tabela 4.

3.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido visa as análises necessárias para descontaminação dos equipamentos e tubulações utilizados na produção em escala industrial do produto herbicida contendo como princípio ativo os analitos estudados nas concentrações de 280,00 g L⁻¹ de clomazone, 250,00 g L⁻¹ de diuron e 70,00 g L⁻¹ de hexazinona.

O herbicida de nome comercial Eldorado[®] é produzido a partir da formulação preparada com matéria-prima de cada ativo (síntese dos 3 agrotóxicos clomazone, diuron, hexazinona), matérias-primas adjuvantes, sendo a base água. A Figura 5 apresenta uma amostra representativa do produto Eldorado[®].

Este estudo foi desenvolvido em paralelo com a produção do herbicida em planta piloto localizada no próprio laboratório da empresa, como etapa de teste de produção.

O processo de produção seguido em pequena escala na planta piloto, pode ser resumidamente descrito pela incorporação das matérias-primas dos produtos ativos com água que ocorre no moinho (MOI) de esferas, Figura 6. Após a moagem, o volume é transferido por tubulações utilizando bombas automáticas de pressão para o formulador (FML), Figura 7, onde as demais matérias-primas são incorporadas ao produto. Ao final do processo, o produto formulado é transferido para uma envasadora ou enchedeira (ECH) onde o produto é proporcionado nos volumes para venda (Figura 8).

Figura 5. Amostra representativa do produto herbicida de nome comercial Eldorado® após formulação teste em planta piloto, contendo os três agrotóxicos clomazone, diuron, hexazinona.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6. Moinho de esferas da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.



Fonte: Próprio autor.

Figura 7. Formulador da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.



Fonte: Próprio autor.

Figura 8. Envasadora da planta piloto onde foi produzido o teste do produto herbicida.



Fonte: Próprio autor.

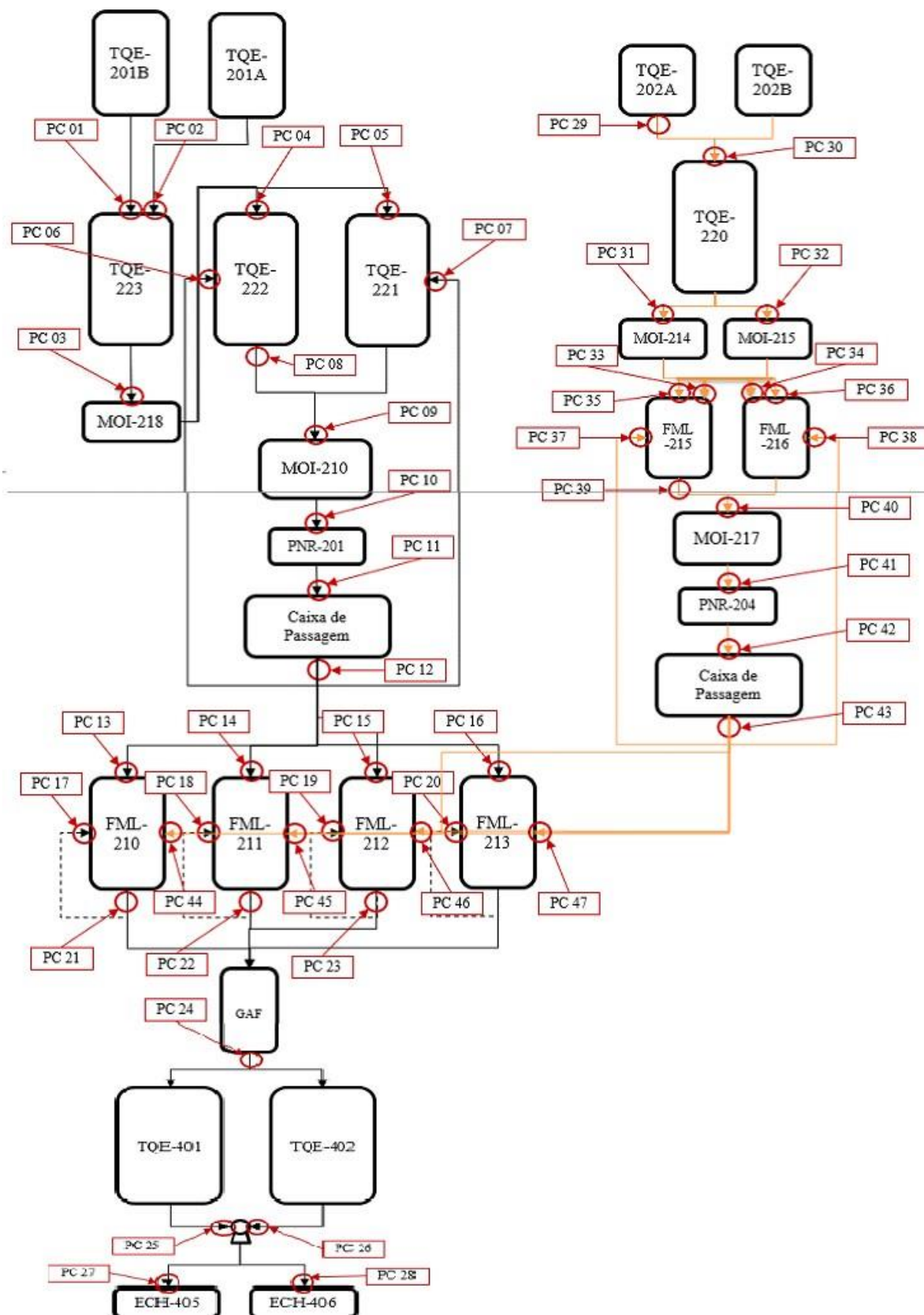
Após a produção, todo o equipamento é lavado com água da torneira utilizando mangueiras com pressão, e após cada ciclo de limpeza são levadas amostras para análise no laboratório de controle de qualidade, as amostras são filtradas utilizando filtro PVDF de 0,45 μm . Os pontos de coleta das amostras são pré-definidos e depende de cada planta industrial utilizada na produção, como representado pelo Quadro 1, e Figuras de 6 a 9. Para as amostras de descontaminação da planta piloto cada ciclo de limpeza foi realizado passando a água por todos os equipamentos e tubulações para então serem realizadas as análises quantitativas dos agrotóxicos nesta água residual.

Quadro 1. Descrição dos pontos de coleta de amostras de água provenientes da descontaminação e seus respectivos locais de amostragem para análise no laboratório de controle de qualidade.

Ponto de Coleta (PC)	Local	Local de amostragem
01	TQE-201B	Coletar amostra na entrada do TQE-223
02	TQE-201 ^a	Coletar amostra na entrada do TQE-223
03	FML-223	Coletar amostra na entrada do MOI-218
04	MOI-218	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-221
05	MOI-218	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-222
06	FML-222	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-222
07	FML-221	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-221
08	FML-222	Coletar amostra no fundo do FML-222
09	FML-222	Coletar amostra na entrada do MOI-210
10	MOI-210	Coletar amostra na entrada da Peneira Vibratória (PNR-201)
11	PNR-201	Coletar amostra na entrada da Caixa de Passagem (TQE-202)
12	Caixa de Passagem	Coletar amostra no dreno de saída da Caixa de Passagem (TQE-202)
13	BH-204	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-210
14	BH-204	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-211
15	BH-204	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-212
16	BH-204	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-213
17	FML-210	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-210
18	FML-211	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-211
19	FML-212	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-212
20	FML-213	Coletar amostra na tubulação de recirculo do FML-213
21	FML-210	Coletar amostra no dreno de fundo do FML-210
22	FML-211	Coletar amostra no dreno de fundo do FML-211
23	FML-212	Coletar amostra no dreno de fundo do FML-212
24	FML-213	Coletar amostra no dreno dos filtros GAF
25	TQE-401	Coletar amostra na sucção da BBH-400 (tubulação do TQE-401)
26	TQE-402	Coletar amostra na sucção da BBH-400 (tubulação do TQE-402)
27	Linha Envase ECH-405	Coletar amostra no mangote da ECH-405
28	Linha Envase ECH-406	Coletar amostra no mangote da ECH-406
29	TQE-202 ^a	Coletar amostra no fundo do TQE-202 ^a
30	TQE-202B	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-220
31	FML-220	Coletar amostra na entrada do MOI-214
32	FML-220	Coletar amostra na entrada do MOI-215
33	MOI-214	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-215
34	MOI-214	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-216
35	MOI-215	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-215
36	MOI-215	Coletar amostra na tubulação de entrada do FML-216

Fonte: Próprio autor.

Figura 9. Esquema de planta de produção com sinalização dos pontos de coleta de amostras de água de descontaminação.



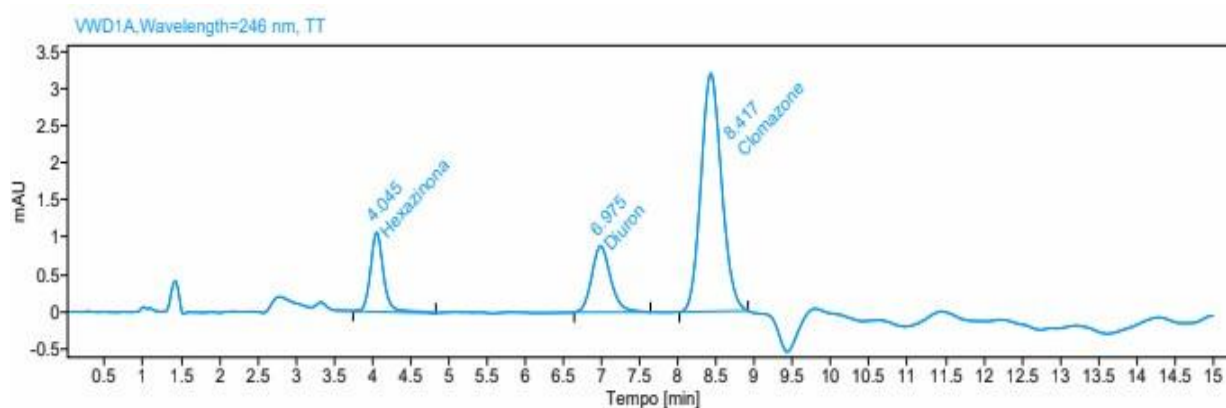
Fonte: Setor de engenharia de produção da empresa Adama®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Após a variação de diferentes condições dos parâmetros cromatográficos em CLAE-UV/DAD, o modo de eluição isocrático na proporção de 55:45 MeOH: água apresentou a melhor separação dos agrotóxicos, como apresentadas na Figura 10 e descrito na Tabela 5.

Figura 10. Cromatograma dos padrões de clomazone, diuron e hexazinona nas concentrações de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol 100 % nas condições estabelecidas.



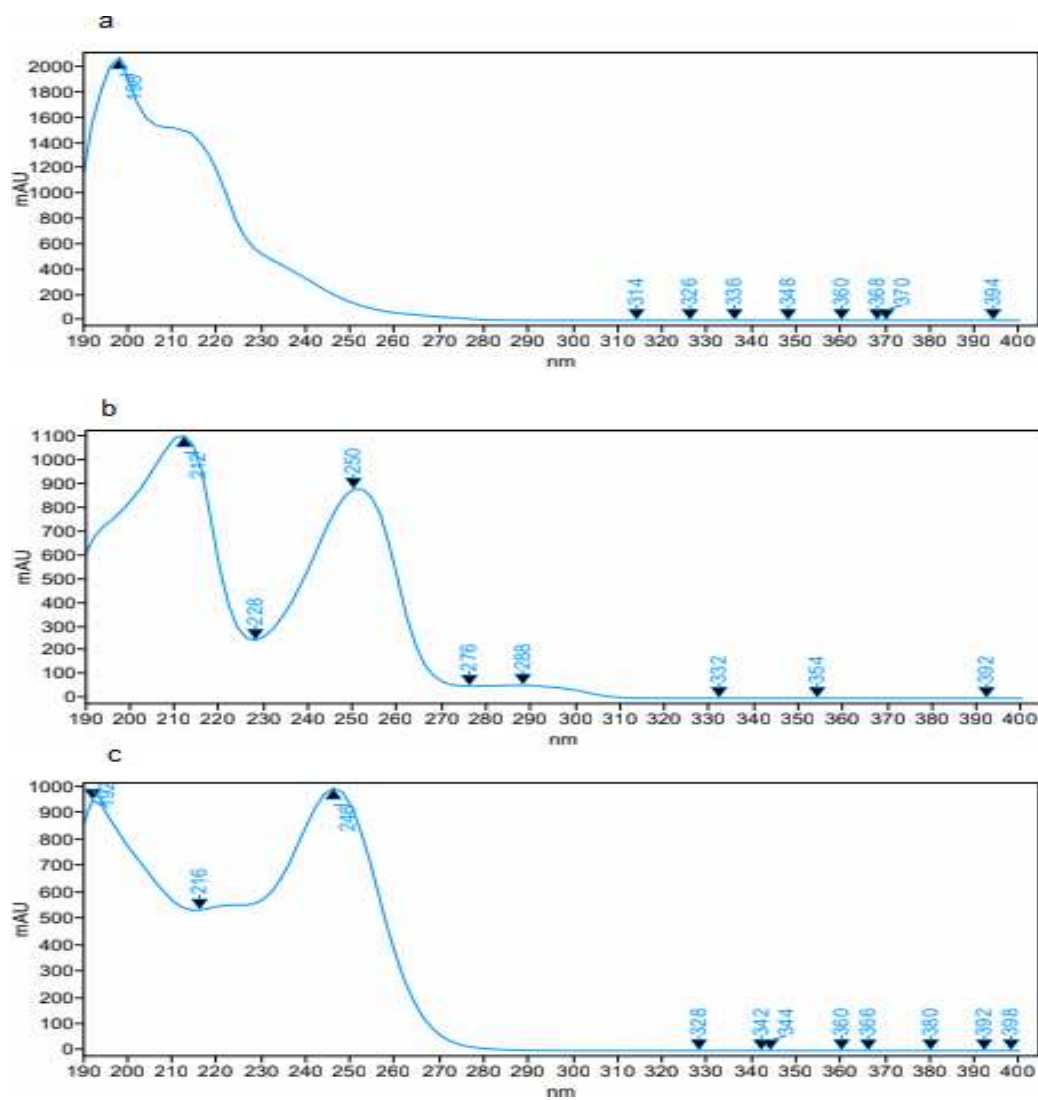
Fonte: Próprio autor.

A varredura espectral de 190 a 400 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e assim uma melhor resposta de sinal cromatográfico.

Considerando o espectro UV para o padrão clomazone em MeOH 100 % obtido com o auxílio do detector de arranjo de diodos a banda em 210 nm, Figura 11a, foi selecionada como melhor comprimento de onda para análise da molécula.

Na Figura 11b o composto diuron apresenta duas bandas de maior intensidade em 212 nm e em 250 nm, em 250nm há uma melhor resposta de sinal cromatográfico, sendo este determinado para análise da molécula do agrotóxico diuron. Para o composto hexazinona a banda em 246 nm é a de maior intensidade (Figura11c), e esse comprimento de onda foi selecionado.

Figura 11. Espectro de UV dos compostos clomazone (a), diuron (b), hexazinona (c) obtidos por análise em CLAE-UV/DAD dos padrões nas concentrações de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.



Fonte: Próprio autor.

Após a otimização das condições cromatográficas, obteve-se a melhor separação dos compostos em estudo apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Condições cromatográficas para a determinação e quantificação dos compostos de interesse por CLAE-UV.

Fase móvel	
água ultrapura	45 % (v/v)
Metanol	55 % (v/v)
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
modo de eluição	Isocrático
Temperatura:	
Coluna	25 °C
Comprimento de onda:	
diuron	250 nm
hexazinona	246 nm
Volume de injeção:	10,0 µL
Tempo de retenção:	
Clomazone	8,5 min
diuron	7 min
hexazinona	4 min
Tempo de corrida:	15 min

Fonte: Próprio autor.

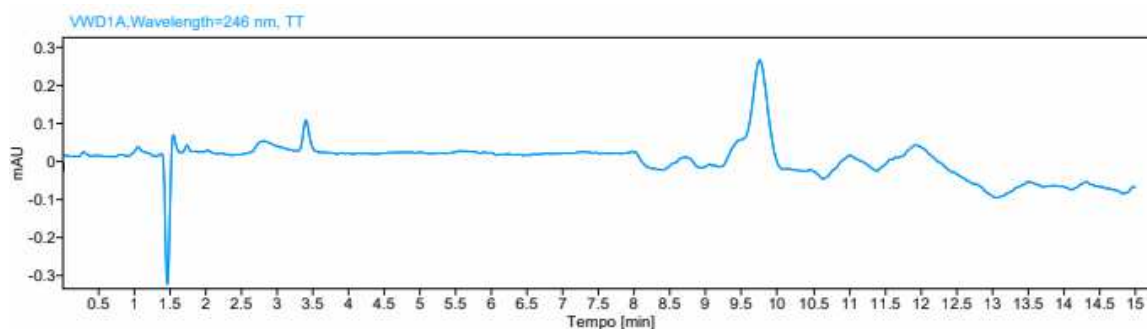
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.2.1 Seletividade

No teste de seletividade o método mostrou-se apropriado para a determinação dos compostos em estudo. Não foi identificado nenhum interferente no tempo de retenção dos compostos de interesse nas análises das soluções consideradas brancos (amostra e solvente). Desta forma o método proposto não possui interferentes no sinal analítico segundo os critérios normativos (ABNT NBR 14029, 2017).

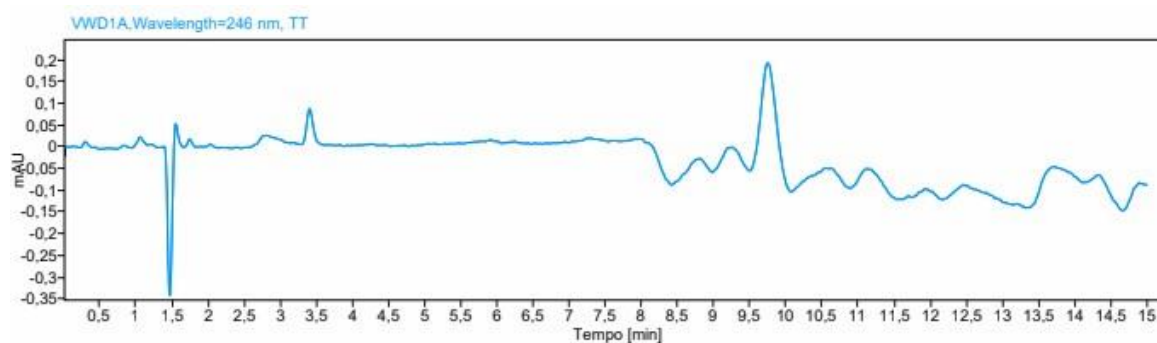
A seguir nas Figuras de 12 a 17 são mostrados os sinais para cada amostra do estudo de seletividade sendo respectivamente: branco amostra (água da torneira), branco solvente (MeOH e água ultrapura), solução padrão de clomazone, solução padrão de diuron e solução padrão de hexazinona.

Figura 12. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de água da torneira por CLAE-UV.



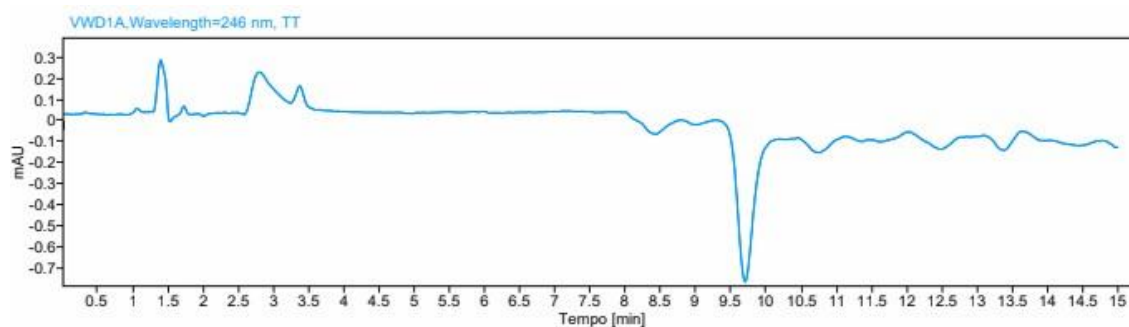
Fonte: Próprio autor.

Figura 13. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de água ultrapura por CLAE-UV.



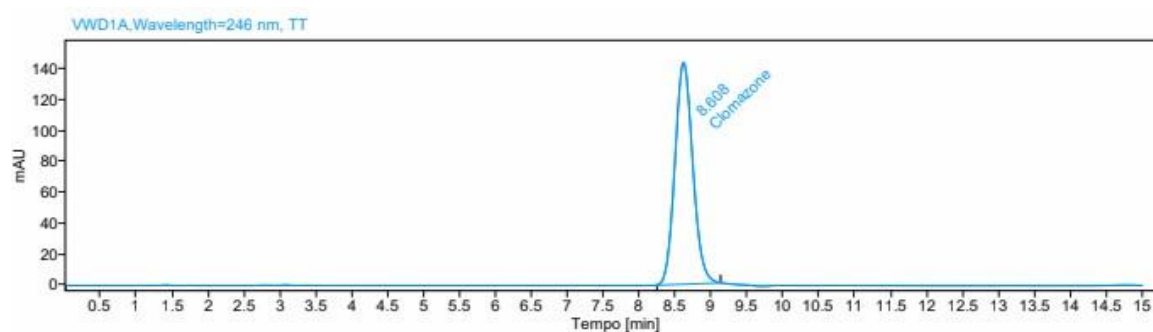
Fonte: Próprio autor.

Figura 14. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de metanol por CLAE-UV.



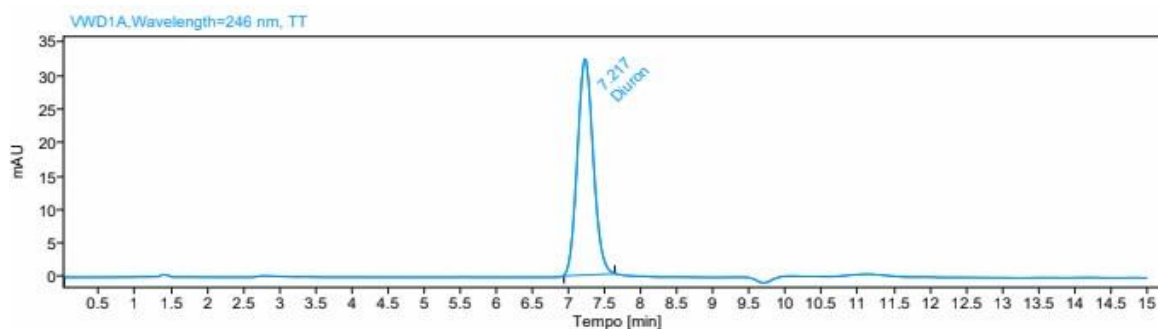
Fonte: Próprio autor.

Figura 15. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de clomazone por CLAE-UV na concentração de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.



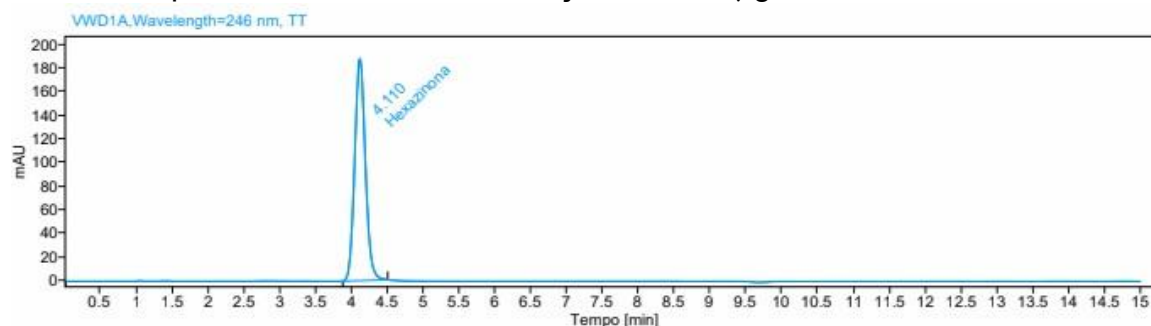
Fonte: Próprio autor.

Figura 16. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de diuron por CLAE-UV na concentração de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17. Cromatograma obtido no teste de seletividade em amostra de padrão de hexazinona por CLAE-UV na concentração de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH 100 %.



Fonte: Próprio autor.

Observando os cromatogramas apresentados das Figuras 10 a 17 pode-se avaliar que não há interferência de sinal com intensidade relevante que possa interferir na quantificação dos compostos de interesse. Demonstrando que o método pode ser empregue para as análises destes ingredientes ativos na matriz estudada (água de torneira).

4.2.2 Limite de Detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos conforme descrito no item 3.5.2 e teve como critério o ajuste feito a permitir a obtenção da relação sinal ruído da linha de base (ABNT NBR 14029, 2017). O limite de descontaminação será utilizado como critério para liberação das amostras de descontaminação, ou seja, amostras com concentrações de ingrediente ativo inferiores ao LQ serão consideradas liberadas, e assim finalizado o ciclo de lavagem.

Tabela 7. Limite de detecção e limite de quantificação do método, desvio padrão relativo (DPR), e desvio padrão pela equação de Horwitz.

Composto	Média S/R	DPR S/R	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média conc.	DPR %	DPR Horwitz %	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
clomazone	6,7	0,19	$8,5 \cdot 10^{-8}$	0,05	8,53	13,88	$3,3 \cdot 10^{-5}$
diuron	3,3	0,15	$1,6 \cdot 10^{-5}$	0,05	1,67	13,88	$3,3 \cdot 10^{-5}$
hexazinona	4,1	0,07	$1,6 \cdot 10^{-5}$	0,06	1,53	12,31	$4,0 \cdot 10^{-5}$

Fonte: Próprio autor.

O limite de quantificação do método foi calculado considerando a pesagem de 1500 mg de água da torneira, amostra de descontaminação, em balão de 10,0 mL. Assim o valor de limite de quantificação é maior que o ponto mais diluído da linearidade.

4.2.3 Linearidade e curva analítica

A linearidade da curva foi verificada pelo coeficiente de correlação (valores de r). Quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de que há um ajuste ideal dos dados para o coeficiente de correlação. Segundo os parâmetros seguidos no estudo, ABNT NBR 14029, 2017, o coeficiente de correlação deve ser (r) $\geq 0,99$.

A partir das curvas analíticas construídas foram obtidas as equações das retas e avaliadas quanto a proporcionalidade entre a concentração dos analitos e suas respostas analíticas. Os coeficientes de correlação (r) e o intervalo linear se encontram descritos na Tabela 8.

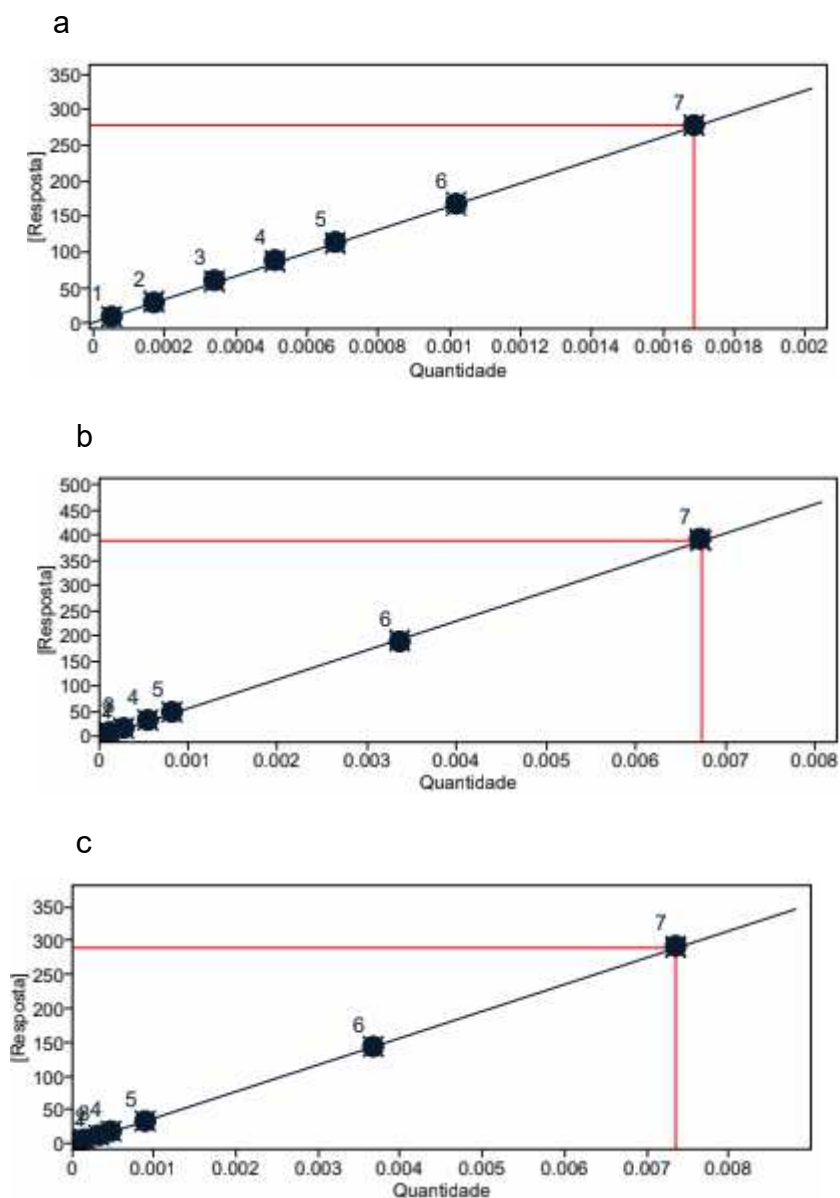
Tabela 8. Parâmetros das curvas analíticas obtidos por calibração externa para os padrões empregando CLAE-UV.

Composto	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação do modelo linear	Coefficiente de correlação (r)
Clomazone	0,050 – 1,690	$y = 163065,4 x - 2,40023$	0,9999
Diuron	0,050 – 6,720	$y = 58049,5 x + 0,16209$	0,9998
Hexazinona	0,060 – 7,350	$y = 39622,8 x + -0,58280$	0,9999

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 18a-c são apresentados os gráficos de linearidade de resposta analítica pela equação da reta e nas Tabelas de 9 a 11 contém os valores de área e concentração encontrados em todos os pontos para cada composto.

Figura 18. Gráfico de linearidade da curva analítica de (a) clomazone, (b) diuron e (c) hexazinona com resposta em mAU e quantidade do composto em $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9. Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto clomazone e exatidão dos valores.

Solução	Área	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
1	9,3648	0,0500	-	-
	10,0598	0,0500	-	-
2	31,3998	0,1700	0,1699	99,9
	28,5579	0,1700	0,1616	95,1
3	57,8856	0,3400	0,3395	99,9
	60,0362	0,3400	0,3465	101,9
4	88,3986	0,5100	0,5109	100,2
	85,7608	0,5100	0,5030	98,6
5	113,5664	0,6800	0,6787	99,8
	111,8009	0,6800	0,6673	98,1
6	169,3967	1,0200	0,9928	97,3
	164,7869	1,0200	1,002	98,2
7	279,1403	1,6900	1,6950	100,3
	277,9921	1,6900	1,690	100

Fonte: Próprio autor.

Tabela 10. Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto diuron e exatidão dos valores.

Solução	Área	Concentração teórica	Concentração real	Exatidão
		($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)
1	3,8529	0,0500	-	-
	3,3784	0,5300	-	-
2	8,6078	0,1300	0,1300	100
	8,4592	0,1300	0,1288	99,1
3	15,3323	0,2700	0,2671	98,9
	15,3241	0,2700	0,2670	98,9
4	31,9398	0,5400	0,5452	101
	32,3249	0,5400	0,5490	101,7
5	48,3116	0,8100	0,8143	100,5
	47,9159	0,8100	0,8100	100
6	191,3941	3,3600	3,356	99,9
	189,9757	3,3600	3,343	99,5
7	393,3698	6,7200	6,759	100,6
	391,3392	6,7200	6,739	100,3

Fonte: Próprio autor.

Tabela 11. Valores de área e concentração obtidos na curva analítica para o composto hexazinona e exatidão dos valores.

Solução	Área	Concentração		Exatidão (%)
		teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
1	2,3885	0,0500	-	-
	2,5033	0,0500	-	-
2	5,9856	0,1300	0,1300	100
	6,5314	0,1300	0,1288	99,1
3	11,9920	0,2700	0,2671	98,9
	12,6735	0,2700	0,2670	98,9
4	19,1489	0,5400	0,5452	101
	18,2115	0,5400	0,5489	101,6
5	34,5201	0,8100	0,8143	100,5
	34,0536	0,8100	0,8100	100
6	143,7249	3,300	3,3550	101,7
	142,3598	3,300	3,3430	101,3
7	292,7036	6,7200	6,7590	100,6
	290,4842	6,7200	6,7387	100,3

Fonte: Próprio autor.

4.2.4 Recuperação

O método obteve uma recuperação adequada entre a quantidade do componente analisado e a quantidade teórica esperada para o ensaio de fortificação nos níveis 1 e 2 em matriz de água da torneira.

Os testes de recuperação são expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios (neste caso 7 ensaios). Os resultados

obtidos estão apresentados na Tabela 12 e estiveram entre 86,0 e 117 % para os três compostos estudados, demonstrando que o método poderá ser aplicado satisfatoriamente na determinação destas moléculas em água. Todos os compostos apresentaram valores de recuperação aceitáveis, dentro do estipulado pela norma da ABNT (ABNT NBR 14029, 2017), que descreve valores de recuperação de 75 a 125 % para concentração nominal de impurezas < 0,1 %.

Tabela 12. Recuperações obtidas a partir das fortificações de nível 1 e nível 2 de cada composto do estudo.

Composto	Nível 1		Nível 2		Média N1/N2 (%)
	Rec. (%)	DPR (%)	Rec. (%)	DPR (%)	
clomazone	90,62	1,01	105,78	1,12	85,67
diuron	109,44	1,23	93,73	1,26	116,76
hexazinona	95,01	1,31	101,38	0,97	93,72

Fonte: Próprio autor.

4.2.5 Precisão

Como descrito no item 3.5.5 a precisão foi avaliada no teste de repetitividade e demonstrou concordância entre os resultados das medições sucessivas do mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições, não foi evidenciado nenhuma dispersão entre os 5 resultados, apresentados na Tabela 13.

Todos os compostos do estudo apresentaram repetitividade e precisão dentro do recomendado pela ABNT que cita que o desvio padrão relativo deve ser menor que o desvio padrão relativo calculado pela equação de Horwitz (ABNT NBR 14029, 2017).

Tabela 13. Teste de Recuperação dos compostos clomazone, diuron e hexazinona.

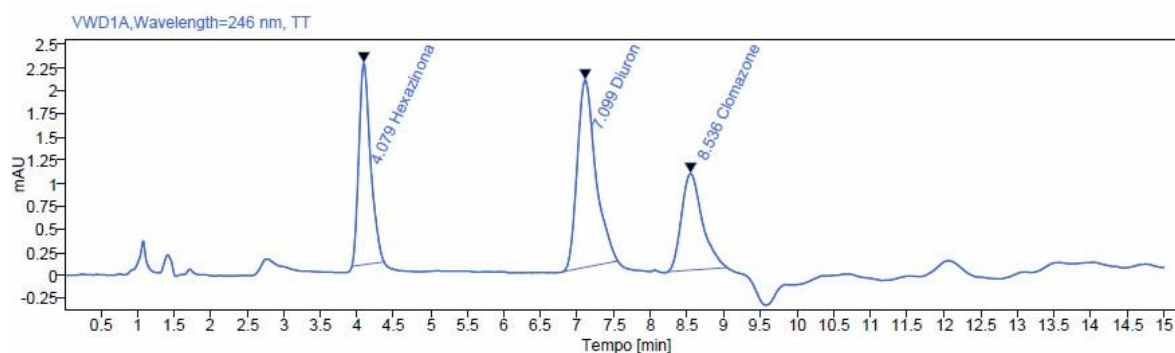
Padrão	Fortificada Nível 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
clomazone	0,5	0,46	0,94
diuron	0,5	0,42	1,32
hexazinona	0,5	0,53	1,03

Fonte: Próprio autor.

O DPR de Horwitz calculado para o teste de precisão foi de 1,49%.

O cromatograma da amostra de recuperação é apresentado na Figura 19 e foi preparado como descrito no item 3.5.5 para a fortificada nível 2.

Figura 19. Cromatograma de amostra fortificada com os padrões de clomazone, diuron e hexazinona nas concentrações de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e condições estabelecidas por CLAE-UV.



Fonte: Próprio autor.

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Após o desenvolvimento do método de quantificação de agrotóxicos em água, o método foi utilizado para análise de amostras provenientes da lavagem da planta piloto (Figuras 5,6 e 7) onde foi produzido o herbicida contendo os compostos em estudo. A Tabela 14 apresenta os resultados de amostras de descontaminação da planta piloto.

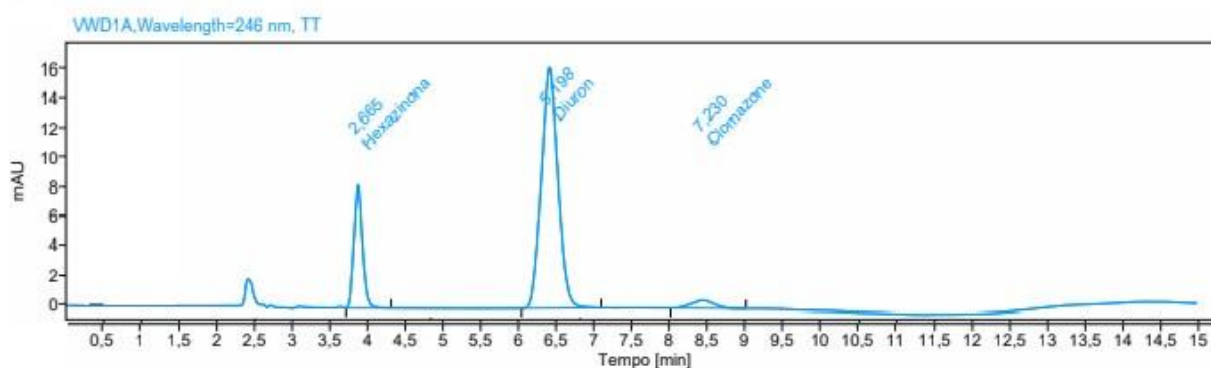
Tabela 14. Resultados obtidos para as amostras de limpeza da planta piloto em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostra	clomazone	diuron	hexazinona
1	0,38	4,92	1,95
2	0,11	3,50	0,23
3	0,03	1,16	0,05
4	< LD	0,02	< LD
5	< LD	< LD	< LD

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 20 é apresentado o cromatograma proveniente da análise da amostra de água de descontaminação por CLAE/UV e na Tabela 14 é possível observar as concentrações dos compostos proveniente da primeira lavagem dos equipamentos da planta piloto estão com as concentrações dos 3 agrotóxicos dentro da faixa linear de trabalho, certificando que o método é aplicável para as amostras de descontaminação analisadas.

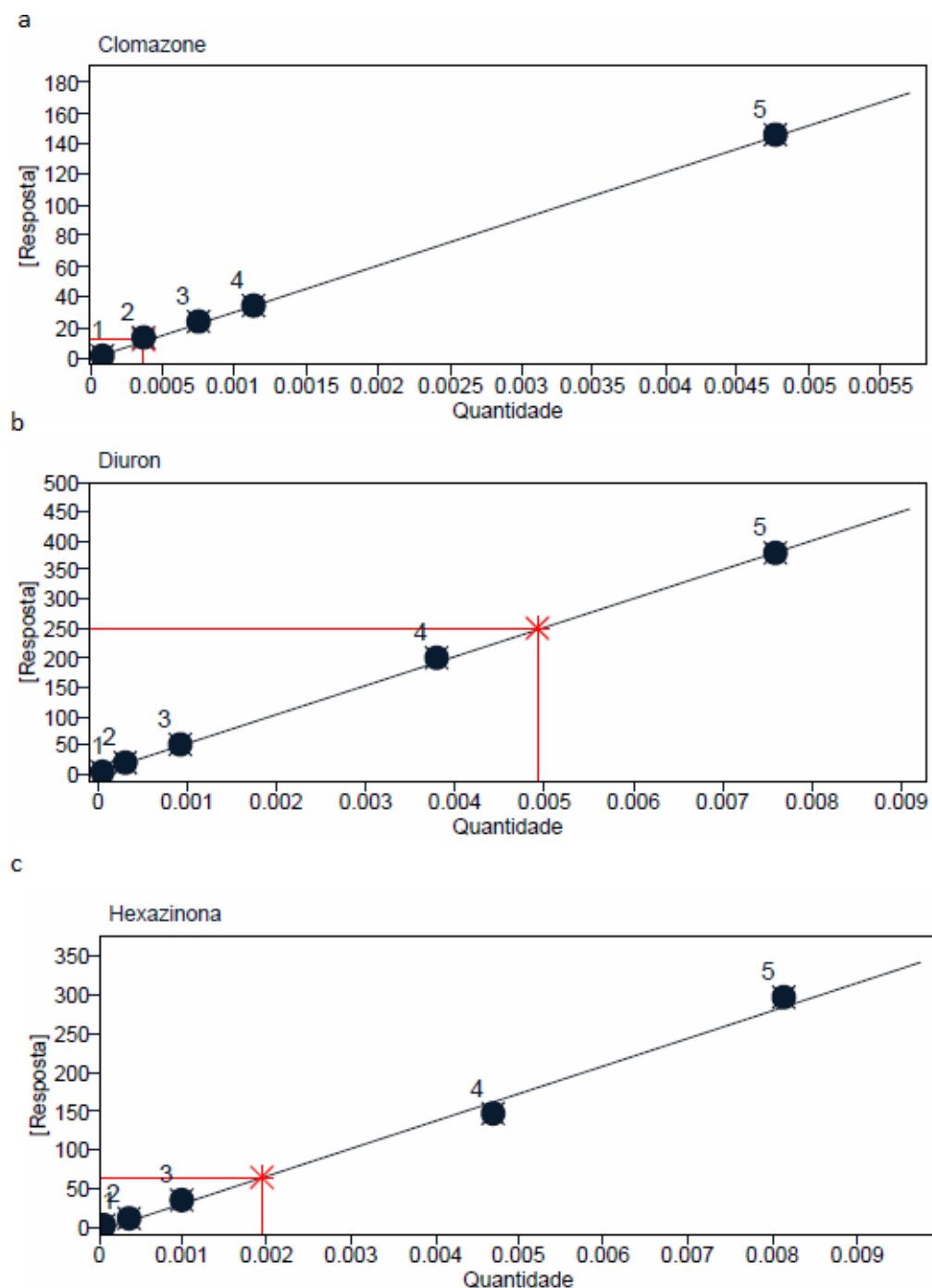
Figura 20. Cromatograma de amostra de descontaminação em água.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 21 a marcação em vermelho aponta em qual região da curva analítica foi o resultado da concentração dos três agrotóxicos presentes na primeira amostragem de água contaminada proveniente da lavagem da planta piloto.

Figura 21. Distribuição na curva analítica do método e da amostra de descontaminação proveniente da primeira lavagem da planta piloto parapara os compostos (a) clomazone, (b) diuron e (c) hexazinona com resposta em mAU e quantidade do composto em $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

5 CONCLUSÃO

A seleção dos analitos para este estudo partiu da necessidade de identificar e quantificar os herbicidas, a fim de evitar a contaminação cruzada no processo produtivo e controlar a água utilizada nos processos de descontaminação após a produção de um produto com ação herbicida que contém clomazone, diuron e hexazinona como princípios ativos.

Com o método desenvolvido por CLAE-UV/DAD foi possível analisar amostras de água residuais contendo os agrotóxicos clomazone, diuron e hexazinona. Ambos os compostos foram determinados e quantificados na mesma análise em baixas concentrações.

A validação do método se mostrou confiável para determinação dos compostos por CLAE-UV/DAD, segundo as normas da ABNT, possibilitando a identificação e quantificação dos três compostos em uma mesma amostra, sem comprometimento de sobreposição de picos ou componentes co-eluídos. No teste de seletividade não houve interferentes podendo declarar que o método é específico e seletivo. O coeficiente de correlação para ambos os compostos foram $> 0,999$, podendo ser aplicado dentro dos limites de 0,050 a 1,690 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa de trabalho da curva analítica) para o composto clomazone, dentro dos limites de 0,050 a 6,720 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto diuron e podendo ser aplicado dentro dos limites de 0,060 a 7,350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto hexazinona.

O limite de detecção e quantificação se demonstraram aplicáveis utilizando a relação sinal/ruído obtido. A recuperação do método foi de 85,67 % para clomazone, 116,76 % para diuron e 93,72 % para hexazinona, estando dentro da faixa aceitável pela norma de 75 a 125 %. Para o teste de precisão foi obtido um desvio-padrão relativo de 0,94 % para clomazone, 1,32 % para diuron e 1,03 % para hexazinona, portanto o método apresentado mostrou-se exato e preciso.

Assim, o método desenvolvido e validado por CLAE-UV/DAD mostrou-se eficiente e com rapidez para análise simultânea dos agrotóxicos clomazone, diuron e hexazinona, contemplando todos os critérios e valores estipulados recomendados pelas normas da ABNT.

REFERÊNCIAS

AE – Associação brasileira de saúde coletiva; Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz; Inca – Instituto Nacional de Câncer. **Uma verdade cientificamente comprovada: os agrotóxicos fazem mal à saúde das pessoas e ao meio ambiente.** Abrasco; Fiocruz; Inca, 6 set. 2013.

AMORIM, A. F. V. **Métodos Cromatográficos.** Editora UAB/UECE, 1ª edição, 2019.
ANDRADE, L. S.; LAURINDO, E. A.; OLIVEIRA, R. V.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, Q. B. **Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photoelectrochemical treatment.** Journal of the Brazilian Chemical Society, vol.17 no.2 São Paulo, Mar./Apr. 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Classificação e Rotulagem de Agrotóxicos,** 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao>. Acessado em: 14 novembro 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação.** nº 156, de 15 de agosto de 2017. Brasília, DF, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Agrotóxicos e toxicologia,** notícias da Anvisa: Reavaliação de agrotóxicos: 10 anos de proteção a população. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias.htm> > Acessado em 20 de novembro de 2021b.

Associação Brasileira de Normas Técnicas - **ABNT NBR14029:2016, Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos.** 3ªed. Versão corrigida 2017.

AUGUSTO, L. G. S.; GURGEL, D. G. I.; CÂMARA NETO, F. H.; MELO, H. C.; COSTA, M. A. **O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano.** Revista Ciência e saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, Jun. 2012. Disponível em <https://www.scielo.br/j/csc/a/BLQQZStHk3KMFZdj9zwQKL/abstract/?lang=pt>.Acess

o em: 25 de abril de 2022.

BAINBRIDGE, K. T.; BRODIE, J. E.; FAITHFUL, J. W.; SYDES, D. A.; LEWIS, S. E. **Identifying the land-based sources of suspended sediments, nutrients and pesticides discharged to the Great Barrier Reef from the Tully-Murray Basin, Queensland, Australia.** Marine and Freshwater Research, Collingwood, v. 60, 2009. p. 1081-1090.

BERNARDES, A. C. M.; SOUZA, S. V. C. de. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos propostos pela ANVISA (RE no 899 de 2003) com o documento orientado do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC International. ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, v. 51, 2011. p. 66-77.

BERNARDES, M. F. F., SOUZA, M.; PEREIRA, L. C.; DORTA D. J. **Impact of Pesticides on Environmental and Human Health.** In Tech, Londres, 2015. p. 195-233.

BIERKENS, M.F. WADA, Y. **Non-renewable groundwater use and groundwater depletion: A review** Environ. Res. Lett., 14 (6), 2019.

BOTTOLI, C. B. G.; CHAUDHRY, Z. F.; FONSECA, D. A.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. **Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for High-performance Liquid Chromatography.** Journal Chromatography A, 948: 121, 2002.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, [...] e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 5, 8 jan. 2002, p. 1-12.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003, p. 129-146.

BRUSSLAN, J.; HASELKORN, R. **Resistance to the photosystem II herbicide diurom is dominant to sensitivity in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942.** The EMBO Journal, v. 8, 1989, p. 1237-1245.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas, **Química Nova**, 34:9, 1604-1617, 2011.

CARBO, L.; SOUZA, V.; DORES, E. F. G. C.; RIBEIRO, M. L.; **Determination of pesticides multiresidues in Shallow Groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 19:6, 1111:1117, 2008.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação.** São Carlos: Edufscar, 2001, p. 53.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009, p. 1021-1030.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia Líquido de alto desempenho: HPLC,** São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP, 452p. 2006.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics.** 1998.

FARIAS, P. J. L. **Água: bem jurídico econômico ou ecológico?** Brasília: Jurídica, p. 532, 2015.

GRUBERT, L. C. 2018. **Freitag Laboratórios.** Acessado em:

<https://freitag.com.br/blog/o-que-e-a-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia>.

Disponível em: 23 de abril de 2022.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 09 de jun/2020, Brasília, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2021.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, p. 46, 2009.

LANÇAS, F. M.; **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomos, 2009.

LIANG, S. GE, S. WAN, L. ZHANG, J. **Can climate change cause the Yellow River to dry up?** Water Resour. Res., 46 (2), 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666683921000213#bib0040>.

Acessado em: 25 de abril de 2022.

NORA, Daiane Dalla. **Grupos químicos e modos de ação dos herbicidas**. 2015. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/grupos-quimicos-e-modos-de-acao-dos-herbicidas-1/>>. Data de acesso: 21 de novembro de 2021.

OKAFOR, N. **Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems**. 1. Ed., Springer: South Carolina, p. 324, 2011.

OLSEN, B. A. **Hydrophilic interaction Chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities**. Journal of Chromatography A, 913: 113, 2001.

PADILLA, W. **Tecnologías apropiadas y sus estrategias en la perspectiva social, económica y ambiental, el fertirriego como herramienta alternativa en iberoamérica.** Grupo Clínica Agrícola y Univ.Tecnológica Equinoccial, Ecuador, 2020.

Palmer, M.; A. Ruhi. **Linkages between flow regime, biota, and ecosystem processes: Implications for river restoration** Science, 365 (6459) (2019).

PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; POPPI, N.; **Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas.** Química Nova, 34:7, 1260-1264, 2011.

RANGO, J. P.; COLSON, A. M. **Molecular basis for resistance for Antimycin and Diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinolcytochrome c reductase in Saccharomyces cerevisiae.** The Journal of Biological Chemistry, v. 239, p. 12564-12570, 1988.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. C. A. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 36, n. 2, 2013, p. 284-290.

RIBEIRO, F. A. de L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, 2008, p. 164-171.

RIVERSOS, A. C. G. **Análise de Pesticidas por Espectrometria de Massas Acoplada a Cromatografia Gasosa (CG-EM).** Goiânia, Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 15, 2012, p. 2008-2018.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas.** Londrina: IAPAR, 2005. 592p. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50545/1/salvador.pdf> . Acessado em: 23 de abril de 2022.

SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography**. Chrom-Ed Book Series-library4science, LLC, 2003.

SILVA, A. K. FLORES, L. C. GALDEANO, M. M. VAL, P. T. **Reuso de água e suas implicações jurídicas**. 1.ed. São Paulo.SP: Navegar. 2003.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO; BUNDT, A. D. C. PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, 34:5, 2011, p. 748-752.

Skoog, D. A, West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

TELLES, D. A. COSTA, R. H. NUVOLARI, A. TEIXEIRA, E. P. RIBEIRO, F. M. NASCIMENTO, J. E. STANGE, K. BASSOI, L. J. SOUZA, M. O. PAULA, P. N. BRESAOLA JR, R. CARRARA, S. M. **Reuso de água: conceitos, teorias e práticas**. 2.ed. São Paulo.SP: Blucher. 2010.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. e COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, vol.25, no.4, São Paulo, 2002.

TSUTIYA, M. T. **Abastecimento de água**. 3.ed. São Paulo.SP: Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2006.

TUNDISI, J.G., MATSUMURA-TUNDISI, T., CIMINELLI, V.S. & BARBOSA, F.A. **Water availability, water quality, water governance: the future ahead. Hydrological Sciences and Water Security: past, present and future**. Extended abstract of the 11th Kovacs Colloquium. UNESCO Publication, Paris, France, 2014.

VERMA, J. P.; JASWAL, D. K. **Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. Rer. Environ. Sci. Biotechonol.** V.13, 2014, p. 429-466.

WATANABE, E.; KOBARA, Y.; BABA, K.; EUN, H. **Aqueous acetonitrile extraction for pesticide analysis in agricultural products with HPLC-DAD.** Food Chem., v. 154, 2014, p. 7-12.

ZHOU, Y. JMA, J.Y. ZHANG, Y. LI, L. FENG, Y. ZHANG, K. SHI, J.D. BROOKES, E. Jeppesen. **Influence of the three Gorges Reservoir on the shrinkage of China's two largest freshwater lakes.** Glob. Planet. Change, 177 (2019).