



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E EXATAS - ICTE
Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica – PMPIT

Wanderson de Oliveira Santos

**Análise de contaminação cruzada em herbicida a base de
atrazina por cromatografia gasosa**

Uberaba
2018

Wanderson de Oliveira Santos

**Análise de contaminação cruzada em herbicida a base de atrazina por
cromatografia gasosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica – PMPIT, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass.

Coorientador: Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass.

Uberaba
2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S239a Santos, Wanderson de Oliveira
Análise de contaminação cruzada em herbicida a base atrazina por cromatografia gasosa / Wanderson de Oliveira Santos. -- 2018.
57 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica)
-- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Coorientador: Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass

1. Cromatografia gasosa. 2. Contaminação. 3. Estudos de validação. 4. Atrazina. I. Malpass, Ana Claudia Granato. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 543.544.3

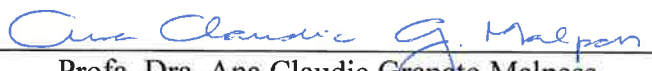
WANDERSON DE OLIVEIRA SANTOS

ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM HERBICIDA A BASE DE
ATRAZINA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, como requisito para
obtenção do título de mestre.

Uberaba, 08 de outubro de 2018

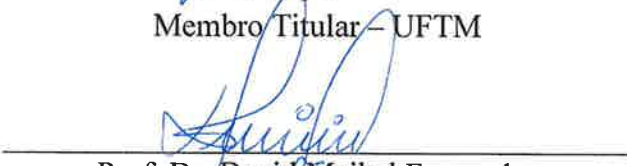
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Orientadora – PMPIT – UFTM



Prof. Dr. Deusmaque Carneiro Ferreira
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. David Maikel Fernandes
Membro titular – UNIUBE

À mulher da minha vida Fabiana pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

E aos meus filhos Letícia e Lorenzo fontes de toda minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores, Dra. Ana Claudia Granato Malpass e Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de pessoas que transpiram sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu Dom no ensino, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Agradeço à minha esposa Fabiana por sempre estar ao meu lado, seja na alegria ou na tristeza, na saúde ou na doença em todos os nos momentos de minha vida.

Agradeço à Deus por me presentear com a vida de Letícia e Lorenzo, meus filhos, crianças que transbordam alegria e vivem intensamente as curiosas descobertas da infância.

Agradeço à Ouro Fino Química pela compreensão e apoio na realização desse projeto, em especial, aos membros do Laboratório de Controle de Qualidade, que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma. O meu reconhecimento e gratidão.

Agradeço ao servidor Enio Umberto Alves dos Santos, secretário do PMPIT por toda ajuda.

À FAPEMIG.

RESUMO

A contaminação cruzada é um tema recente no ramo agroquímico, principalmente, quando comparado ao setor alimentício e farmacêutico cujo tema é tratado com um maior conhecimento de causa. Com a busca para demonstrar através da cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chamas a possibilidade de produtos comerciais com formulação a base de atrazina estarem contaminados com ativos que não fazem parte de sua formulação, caracterizando a contaminação cruzada. Para isso, foi desenvolvido e validado metodologia analítica capaz de qualificar e quantificar possíveis contaminantes de ametrina, metribuzin e tebutiuron, em produtos formulados a base de atrazina durante as campanhas de 2016, 2017 e até fevereiro de 2018. A técnica apresentou bons resultados e respostas analíticas satisfatórias. A validação do método apresentou um LOQ e LOD de $0,040\text{mgmL}^{-1}$ e $0,012\text{mgmL}^{-1}$, respectivamente, para os três ativos em questão. A linearidade foi de 0,999 e a recuperação variou entre 80,20% a 119,23% dentre os ativos de interesse estando de acordo com os critérios de aceitação da ABNT NBR 14029:2016. Como concordância para sucessivas medições o método apresentou uma boa repetibilidade, variando de 97,0457% a 99,2988% para a ametrina, de 97,8322% a 100,8780% para o metribuzin e 97,1652% a 100,6556% para o tebutiuron. Após o crivo da validação pode-se quantificar com segurança os ativos ametrina, metribuzin e tebutiuron não pertencentes à formulação a base de atrazina, os resultados obtidos foi que para o ativo ametrina todos os lotes analisados encontram-se contaminados, porém com valores abaixo de $0,125\text{mgmL}^{-1}$ estabelecido como máximo valor aceito, para o ativo metribuzin lote 011/18 encontra-se contaminado com o valor de $0,165\text{mgmL}^{-1}$, sendo este valor acima do máximo aceito, e para o ativo tebutiuron não foram encontrados nenhum resultado acima do LOD do método para este ativo.

Palavras chave: validação de método, contaminação cruzada, princípio ativo

ABSTRACT

Cross-contamination is a recent topic in the agrochemical sector, especially when compared to the food and pharmaceutical sector whose theme is treated with a greater knowledge of the cause. With the search to demonstrate through the high resolution gas chromatography with flame ionization detector the possibility of commercial products with formulation based on atrazine are contaminated with actives that are not part of its formulation, characterizing the cross contamination. For this, it was developed and validated an analytical methodology capable of qualifying and quantifying possible ametrine, metribuzin and tebuthiuron contaminants in atrazine formulated products during the 2016, 2017 and February 2018 campaigns. The technique showed good results and satisfactory analytical responses. The validation of the method presented a LOQ and LOD of 0.040mgmL^{-1} and 0.012mgmL^{-1} , respectively, for the three assets in question. The linearity was 0.999 and the recovery ranged from 80.20% to 119.23% among the assets of interest being in accordance with the acceptance criteria of ABNT NBR 14029:2016. As concordance for successive measurements, the method showed good repeatability, ranging from 97.0457% to 99.2988% for ametrine, from 97.8322% to 100.8780% for metribuzin and 97.11652% to 100.6556% for tebuthiuron. After the validation screening, it is safe to quantify the active ametrina, metribuzin and tebuthiuron not belonging to the atrazine-base formulation, the results obtained was that for the active ametrine all the analysed batches are contaminated, however with values below $0,125\text{mgmL}^{-1}$ established as the maximum value accepted, for the active metribuzin lot 011/18 is contaminated with the value of 0.165mgmL^{-1} , being this value above the maximum accepted, and for the active tebuthiuron no result was found above of the LOD method for this asset.

Keywords: method validation, cross-contamination, active principle

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	— Cromatograma da separação de uma amostra com dois constituintes.....	19
Figura 2	— Sistema cromatográfico básico.....	20
Figura 3	— Comparação de resolução: (a) coluna empacotada e (b) capilar	21
Figura 4	— Injetor vaporizador.....	24
Figura 5	— Detector de condutividade térmica.....	29
Figura 6	— Detector de ionização em chamas.....	31
Figura 7	— Detector de captura de elétrons.....	32
Figura 8	— Cromatógrafo gasoso - modelo GC-QP 2010 – Shimadzu.....	35
Figura 9	— Auto sampler - modelo AOC-20S - Shimadzu.....	35
Figura 10	— Coluna capilar - DB5-XLB (60m x 0,250mm x 0,25µm).....	36
Figura 11	— Estrutura dos herbicidas estudados.....	43
Figura 12	— Cromatograma do sinal/ruído do tebutiuron, metribuzin e ametrina..	44
Figura 13	— Curva de calibração ametrina.....	48
Figura 14	— Curva de calibração metribuzin.....	48
Figura 15	— Curva de calibração tebutiuron.....	49
Figura 16	— Sobreposição do cromatograma da amostra isenta (branco) versus cromatograma da amostra contendo os três ativos de interesse.....	50
Figura 17	— Cromatograma do resultado da amostra de formulação à base de atrazina isenta de contaminantes.....	51

LISTA DE TABELA

Tabela 1	— Melhores gases de arraste para cada detector.....	22
Tabela 2	— Tipos de colunas capilares.....	25
Tabela 3	— Resultado da repetibilidade da ametrina.....	44
Tabela 4	— Resultado da repetibilidade do metribuzin.....	46
Tabela 5	— Resultado da repetibilidade do tebutiuron.....	46
Tabela 6	— Equação da reta e coeficiente de correlação obtidos ao aplicar o método de regressão linear, para os pesticidas em estudo.....	47
Tabela 7	— Concentração teórica das fortificações de ametrina, metribuzin e tebutiuron.....	52
Tabela 8	— Concentração real encontrada nas fortificações de ametrina, metribuzin e tebutiuron.....	52
Tabela 9	— Concentração da fortificação dos ativos em relação à massa da amostra da formulação de atrazina.....	53
Tabela 10	— Resultado da contaminação cruzada.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	microlitro
μm	Micrômetro
^3H	Trítio, isótopo do elemento químico hidrogênio
^{63}Ni	Isótopo do elemento químico Níquel
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CG	Cromatografia Gasosa
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CG-MS	Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Detector de Massas
CO	Monóxido de Carbono
CO_2	Dióxido de Carbono
DCE	Detector de Captura de Elétrons
DCE	Detector de Condutividade Eletrolítica
DCT	Detector de Condutividade Térmica
DFC	Detector de Fotométrico de Chama
DFI	Detector por Fotoionização
DIC	Detector de Ionização em Chamas
DMC	Detector Microcoulombimétrico
DNF	Detector de Nitrogênio-Fósforo
eV	Elétron-volt
g	grama
H_2	Hidrogênio
H_2O	Água
H_2S	Ácido Sulfídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Impacto de Elétrons
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO/IEC 17025	Norma técnica internacional sobre competência de laboratórios de ensaio e calibração
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
m/z	Relação massa-carga do íon
Make-up	(em cromatografia, gás de arraste)
mg mL^{-1}	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	Milímetro
MS	Detector de Massas
N_2	Nitrogênio
N_7	Azoto

NO _x	Óxidos de Nitrogênio
PA	Para Análise
PLOT	Tubo Aberto com Camada Porosa (do inglês, <i>Porous Layer Open Tubular</i>)
RBC	Rede Brasileira de Calibração
RC	Celulose Regenerada (do inglês, <i>Regenerated Cellulose</i>)
S/R	Sinal Ruído
SCOT	Tubo Aberto com Suporte Revestido (do inglês, <i>Support Coated Open Tubular</i>)
SIDRA	Sistema IBGE de Recuperação Automática
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
Tcal	Limite de contaminante
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WCOT	Tubo Aberto com Parede Revestida (do inglês, <i>Wall Coated Open Tubular</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1.	SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	20
3.2.	RESOLUÇÃO.....	20
3.3.	TEORIA DOS PRATOS.....	22
3.4.	GÁS DE ARRASTE.....	22
3.5.	INJETORES.....	23
3.5.1.	Injeção split.....	23
3.5.2.	Injeção splitless.....	23
3.6.	COLUNAS.....	24
3.6.1	Fases estacionárias.....	26
3.6.2.	Limites de temperatura.....	26
3.6.3.	Efeitos do comprimento, diâmetro da coluna e espessura e espessura do filme.....	27
3.6.3.1.	<i>Comprimento.....</i>	27
3.6.3.2.	<i>Diâmetro da coluna.....</i>	27
3.6.3.3.	<i>Espessura do filme.....</i>	27
3.7.	DETECTORES.....	28
3.7.1.	Detector de Condutividade Térmica (DCT)	28
3.7.2.	Detector de Ionização em Chamas (DIC)	29
3.7.3.	Detector de Captura de Elétrons (DCE)	31
3.7.4.	Detector de Massas (MS)	32
4.	METODOLOGIA.....	33
4.1.	MATERIAIS.....	34
4.2.	EQUIPAMENTO.....	34
4.3.	PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO CROMATÓGRAFO GASOSO.....	36
4.4.	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA..	37
4.4.1.	Preparo de solução padrão estoque.....	37
4.4.2.	Sinal/Ruído.....	37
4.4.3.	Limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD).....	38
4.4.4.	Repetibilidade.....	38
4.4.5.	Curva de calibração.....	39
4.4.6.	Linearidade.....	40
4.4.7.	Determinação da massa da amostra da formulação à base de atrazina a ser pesada para análise de recuperação, análise do isento e a análise do contaminante.....	40
4.4.8.	Análise da amostra de formulação à base de atrazina, isento do analito de interesse (branco).....	41

4.4.9.	Recuperação.....	41
4.4.10.	Análise do herbicida com formulação à base de atrazina produzido durante as campanhas dos anos de 2016, 2017 até fevereiro de 2018.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO

Contaminação cruzada é a introdução de determinada matéria-prima, produto intermediário, produto a granel ou produto acabado com outra matéria-prima, durante o processo de produção que não faça parte da engenharia (formulação) do produto. Grande parte dos setores industriais estão sujeitos a essa contaminação. Os segmentos industriais mais vulneráveis à contaminação cruzada são: as indústrias de alimentos, as farmacêuticas e as de defensivos agrícolas, cabendo a cada uma, a responsabilidade da criação de normas e procedimentos que evitem ou minimizem as possíveis contaminações (DA SILVA, 2011).

Atualmente, é unânime a preocupação das indústrias químicas do ramo de defensivos agrícolas quando o assunto é a contaminação cruzada, pois, esse tipo de contaminação pode causar grandes prejuízos aos clientes e à reputação das empresas. Para Santos (2012, p. 14):

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, divulgados durante o 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília, em abril de 2012, enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Na última safra, que envolve o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos, sendo 833 mil produzidas no país, e 246 mil importadas. Outra constatação refere-se à existência de uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas responderam por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos por 29%. Na safra de 2011, no Brasil, foram plantados 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde a cerca de 853 milhões de litros (produtos formulados) de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas.

As indústrias químicas do ramo de defensivos agrícolas necessitam de análises em seus produtos acabados, que visam a detecção de contaminação cruzada. O setor de proteção de culturas emprega equipamentos multifuncionais na síntese, formulação e embalagem de produtos. Sem um controle cuidadoso a contaminação com impurezas residuais – como ingredientes ativos previamente presentes nos equipamentos, por exemplo – pode ocorrer e possivelmente causar

efeitos adversos em culturas sensíveis e tratadas ou em espécies não alvo, podendo criar problemas normativos, isto é, não conformidades.

Os clientes esperam que os fabricantes forneçam produtos que protejam as culturas contra pragas e ervas daninhas, uma vez que, qualquer incidente de contaminação pode não apenas causar efeitos biológicos indesejados (p.ex. fitotoxicidade), como também prejudicar a reputação e a imagem de todo o setor. Os produtos químicos de proteção de culturas a seguir se enquadram no escopo da contaminação cruzada, sejam como ingredientes ativos, produtos formulados, ou intermediários de processo usados na síntese desses produtos:

- Herbicidas (para usos agrícolas ou não agrícolas, independentemente do método de aplicação);
- Fungicidas, reguladores de crescimento de plantas, ativadores de plantas, inseticidas, acaricidas, feromônios, moluscicidas, nematocidas, fumigantes, inibidores de nitrificação (estes produtos podem ser aplicados como uma pulverização foliar, formulação granular, tratamentos de sementes ou como qualquer forma de tratamento de solo);
- Raticidas (aplicados como iscas);
- Adjuvantes para limpadores de tanques de pulverizações agrícolas, óleos agrícolas e fertilizantes foliares;

A prevenção de contaminação é importante em:

- Produtos de saúde pública para controle não agrícola de insetos (p. ex. tratamento de mosquiteiros) em que seres humanos possam estar expostos a um contaminante;
- Produtos para saúde animal específicos para o controle de ectoparasitas e fabricados de acordo com os padrões farmacêuticos (BPF), em que animais possam estar expostos a um contaminante;

O nível de limpeza exigido para uma troca de produto é a indicação primária do risco envolvido na troca, ou seja, quanto mais baixo o nível de limpeza, maior o risco de um incidente de contaminação, caso o processo de limpeza falhe. Além disso, mais mão-de-obra, tempo de parada, custos elevados de limpeza e maiores necessidades de disposição de resíduos são necessários para se alcançar os níveis

mais baixos de limpeza exigidos. Para otimizar a sequência da produção, recomenda-se elaborar uma matriz de limpeza com base em níveis de impureza residual.

Neste contexto, análises por cromatografia gasosa podem qualificar e quantificar os princípios ativos que não fazem parte da formulação original, comprovando a contaminação cruzada e evitando que esses produtos sejam expedidos da empresa.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi determinar a contaminação por tebutiuron, metribuzin e ametrina em produto comercial a base de atrazina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Propor uma metodologia analítica para quantificar os princípios ativos que não fazem parte da formulação original do produto a base de atrazina utilizando-se a cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID);

✓ Determinar qualitativa e quantitativamente o princípio ativo tebutiuron, metribuzin e ametrina em nível de traços por meio de cromatografia gasosa de alta resolução, em produto acabado com formulação a base do princípio ativo atrazina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

No início do século 20, por volta de 1905 é que Ramsey utilizou pela primeira vez técnicas cromatográficas para separar misturas de gases e vapores (COLLINS, 2011). No ano seguinte, o botânico russo Michael Tswett utilizou a cromatografia de eluição na separação da clorofila de extratos vegetais, através de uma coluna de vidro, recheada de carbonato de cálcio, tendo como fase móvel o éter de petróleo. Dessa forma, Tswett obteve diversas cores correspondentes ao caroteno, clorofila e xantofila. Assim, teve origem a palavra cromatografia que significa “escrever em cores”; atualmente o método usado por Tswett seria chamado de cromatografia líquido-sólido (COLLINS, 2011).

Em 1931, ocorreu o auge da cromatografia de eluição (ou de adsorção), quando Kuhn e Lederer conseguiram separar os alfa e beta carotenos. A partir daí a cromatografia de adsorção contribuiu para o desenvolvimento dos estudos sobre a química dos carotenoides, flavinas e outros corantes vegetais (COLLINS, 2011).

Em 1941, Martin e Synge, em busca de uma solução ao problema de determinar aminoácidos em pequenas quantidades, introduziram a cromatografia de partição, a qual os levou a receber o prêmio Nobel de Química em 1952. Martin e Synge utilizaram em seus trabalhos colunas de silicagel. A técnica evoluiu rapidamente, podendo ser considerada precursora da cromatografia em papel e da líquido-líquido em coluna (MARTIN; SYNGE, 1941).

Em 1952, Martin e James introduziram a cromatografia a gás até hoje considerada uma das técnicas mais úteis para análises de gases e compostos orgânicos voláteis ou derivados com igual característica (OLIVEIRA, 2011). Embora, o primeiro experimento de cromatografia ter sido uma forma de cromatografia líquida, foi a partir de 1968 que houve um avanço na técnica, devido à utilização de altas pressões de operação e de sistemas de detecção contínua.

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica que permite separações, identificações e medidas quantitativas de componentes de uma mistura praticamente impossíveis de serem efetuadas pelos meios convencionais (MUHLEN et al., 2006).

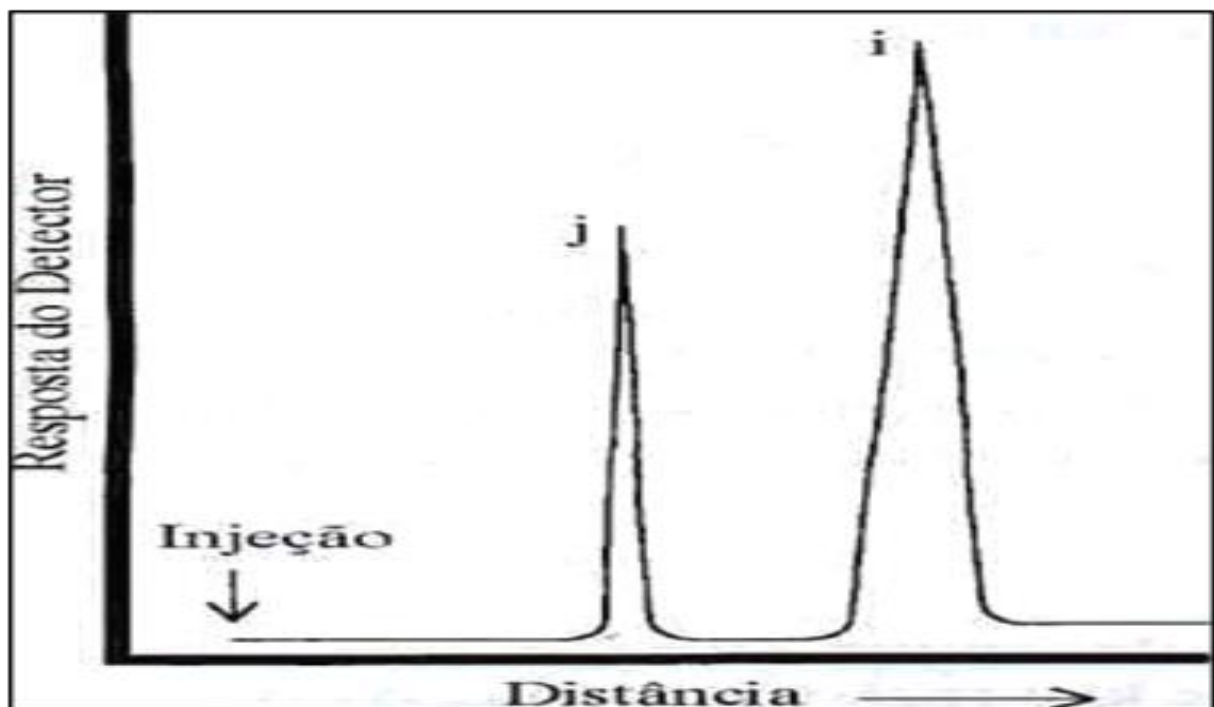
Tais separações baseiam-se na diferente distribuição seletiva dos componentes de uma amostra entre duas fases imiscíveis. A fase móvel, um gás; e a outra fixa, constituída por um sólido ou líquido não-volátil. Quando a fase móvel flui através da coluna transportando a amostra há a separação dos componentes, sendo

os mesmos determinados por detectores adequados que geram um sinal para o registrador (COLLINS, 2006).

A cromatografia gasosa pode ser classificada como cromatografia gás-sólido e cromatografia gás-líquido, essa classificação está em conformidade com o tipo de fase estacionária. No caso da cromatografia gás-líquido, o líquido é colocado como pequena película sobre um sólido inerte e a base para a separação é a partição da amostra nesta película que constitui a fase estacionária. Quando se introduz uma amostra com dois componentes i e j, por exemplo, na corrente de um gás de arraste, essa é levada até a coluna. Se as moléculas i tiverem maior tendência que as moléculas j de se dissolverem na fase estacionária da coluna, têm-se velocidades de migração diferentes para os componentes i e j. O componente i será mais retido pela coluna. Ao chegar no detector, este emite um sinal indicando a presença de uma substância diferente do gás de arraste. Este sinal será transmitido ao registrador que dará a informação sob forma de cromatograma (WELTER, 2011).

Na Figura 1 está representado o cromatograma correspondente à separação de mistura contendo dois componentes i e j, fornecido pelo registrador.

Figura 1 - Cromatograma da separação de uma amostra com dois constituintes

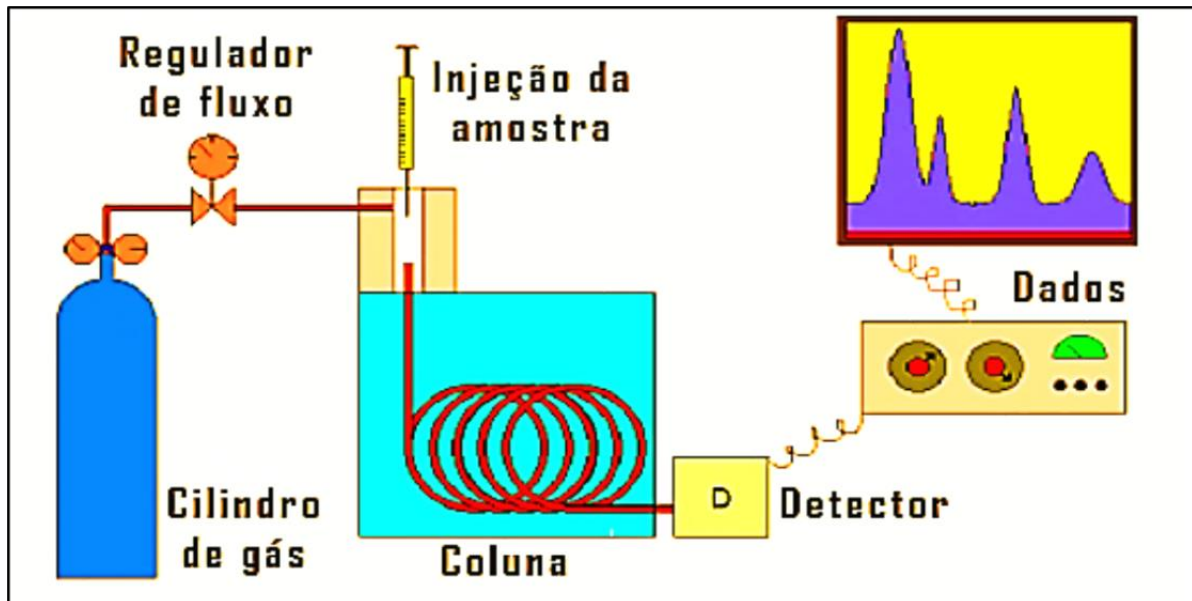


Fonte: AQUINO NETO, 2003

3.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Um sistema cromatográfico básico como indicado na Figura 2 é constituído de cilindro com gás de arraste, controladores de pressão e vazão, injetor, forno com coluna, detector e registrador.

Figura 2 - Sistema cromatográfico básico.



Fonte: Biomedicina Brasil, 2017

3.2 RESOLUÇÃO

A Resolução de uma coluna é sua capacidade de separação de dois analitos, que pode ser medida quantitativamente. No desenvolvimento de um método em cromatografia gasosa a determinação da resolução necessária para a separação é fator crítico (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A resolução cromatográfica R é determinada pela equação (1),

$$R = \frac{2(tr_i + tr_j)}{Wb_i + Wb_j} \quad (1)$$

onde tr é o tempo de retenção dos componentes i e j , e Wb a largura do pico na linha de base. O tr representa o tempo transcorrido desde o momento de injeção da

amostra até a altura máxima do pico correspondente a um dado componente (LANÇAS, 1993).

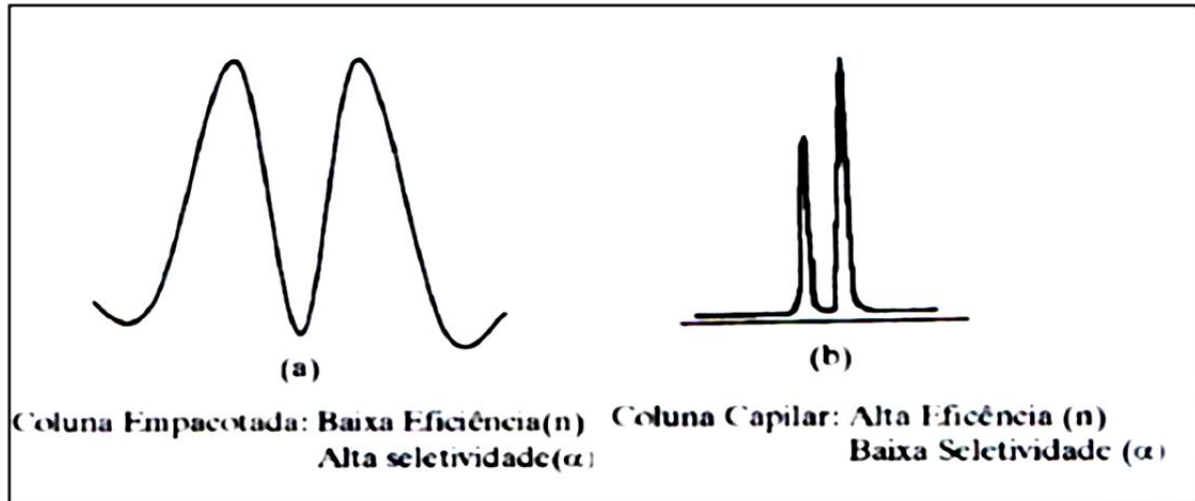
A resolução é uma combinação complexa de parâmetros como eficiência, seletividade e retenção, de acordo com a equação (2)

$$R = \sqrt{n/4} \cdot \left[\alpha - \frac{1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{k+1} \right] \quad (2)$$

onde n é a eficiência da coluna expressa pelo número de pratos teóricos; α , o fator de seletividade e k , a razão de partição do soluto. Esta razão representa a medida do tempo de permanência do soluto na fase estacionária em relação ao mesmo tempo na fase móvel (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A separação numa coluna capilar possui maior eficiência em relação às colunas empacotadas, conforme pode ser observado na Figura 3 (a) e (b), onde a seletividade é o fator que mais contribui para a resolução. Assim sendo, necessita-se de uma ampla variedade de fases estacionárias (LANÇAS, 1993).

Figura 3 - Comparação de resolução: (a) coluna empacotada e (b) capilar.



Fonte: LANÇAS, 1993

3.3 TEORIA DOS PRATOS

Para que se tenha o equilíbrio entre o soluto e as fases estacionária e móvel é necessária uma altura de coluna determinada. Durante a passagem da substância pela coluna, este equilíbrio é rompido pelo efeito de transporte e deve ser restabelecido consecutivamente. Considerando este processo em vários estágios de equilíbrio dividimos a coluna em um número de seções iguais entre si e, em cada uma destas seções, o equilíbrio vapor-líquido deve ser restabelecido. A cada uma destas seções dá-se o nome de "Prato Teórico" (SKOOG, 2002; HOLLER, 2002; NIEMAN, 2002; LANÇAS, 1993).

O poder de separação de uma coluna dependerá, dentre outros fatores, da troca entre a amostra e a fase líquida, isto é, quanto mais etapas de equilíbrio existam, maior será o poder de separação. O valor do número de pratos teórico é obtido a partir do cromatograma, pela equação (3):

$$N = 16 \left(\frac{tr}{Wb} \right)^2 \quad (3)$$

onde tr é o tempo de retenção e Wb a largura do pico na linha de base.

3.4 GÁS DE ARRASTE

A principal função do gás de arraste é conduzir a amostra através da coluna até o detector. É necessário que o gás de arraste possua pureza e não deve reagir quimicamente com a amostra (McNAIR; MILLER, 2009). Qualquer impureza no gás de arraste pode produzir um sinal no detector, logo, recomenda-se o uso de um filtro na linha no gás de arraste, pois, existe sempre a possibilidade de o mesmo conter umidade ou contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos que podem dar lugar ao aparecimento de picos desconhecidos.

Tabela 1. Melhores gases de arraste para cada detector.

Detector	Gás de arraste
Condutividade Térmica	Hélio ou Hidrogênio
Ionização de Chama	Hélio, Nitrogênio ou Argônio
Captura de Elétrons	Nitrogênio muito seco

Fonte: McNAIR; MILLER, 2009

A vazão do gás de arraste é um parâmetro importante que depende do diâmetro e do comprimento da coluna cromatográfica. Ela deve ser controlada e mantida constante durante a análise. Para isso, emprega-se um "medidor de vazão" conectado à saída da coluna sendo necessário, ao se mudarem as condições de operação, aguardar certo tempo para obter estabilização da vazão. O ajuste da vazão é feito através de um medidor de vazão por bolhas (bolhometro). Mantendo-se constantes a temperatura e a diminuição de pressão na coluna (SKOOG, 2002).

3.5 INJETORES

Permite a introdução de amostras líquidas, gasosas ou sólidas no sistema cromatográfico. No sistema de injeção existem considerações práticas em relação aos parâmetros mais importantes que são quantidade de amostra, a temperatura do sistema de injeção e a velocidade de injeção (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os injetores podem ser classificados em *split*, *splitless* e *on column*. Sendo os dois primeiros os mais comuns.

3.5.1 Injeção *split*

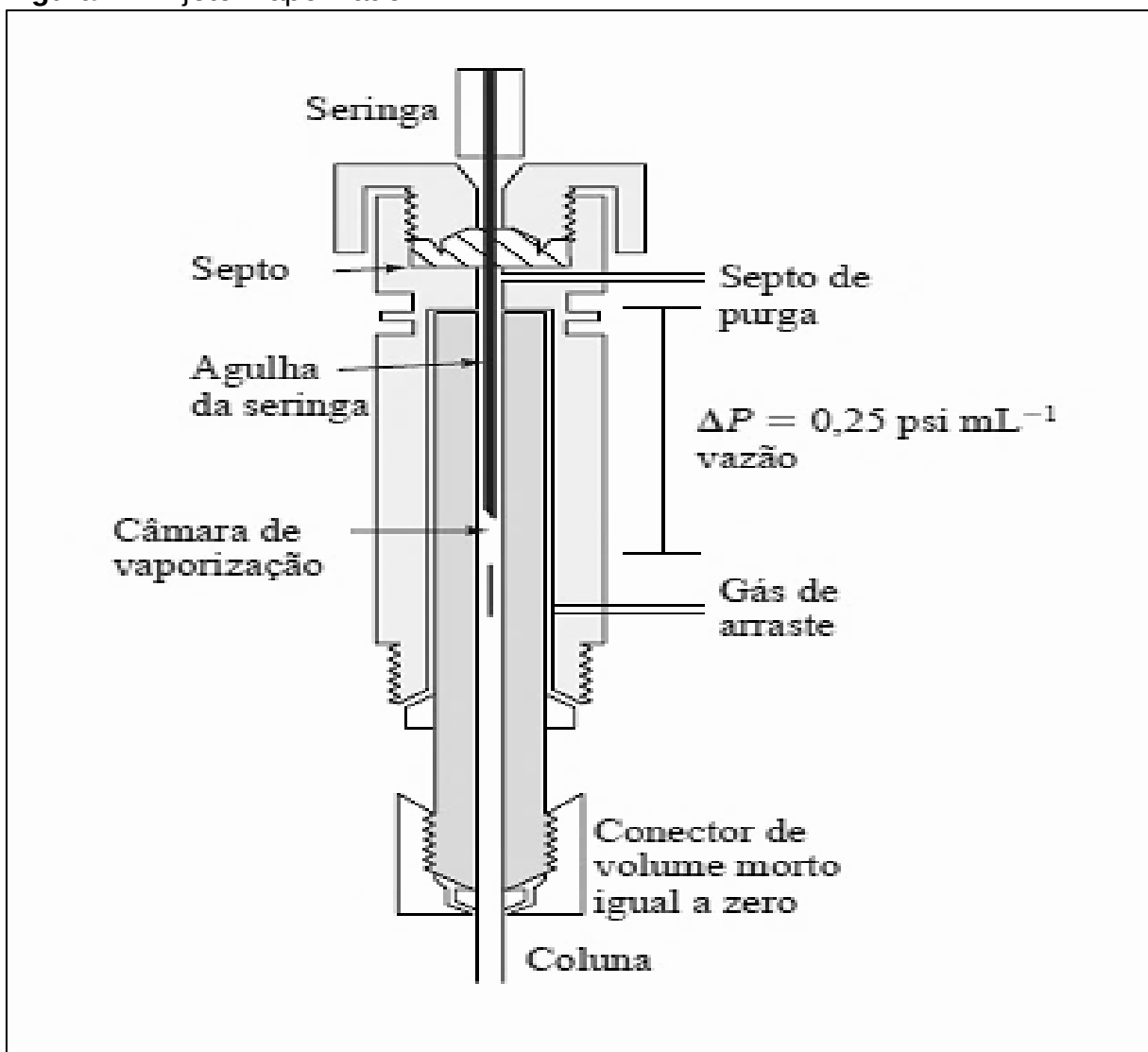
A injeção *split* é a mais simples. É inserida na porta de injeção, através de uma microseringa, cerca de 1 µL de amostra que é instantaneamente vaporizada e apenas uma fração, cerca de 1 a 2% do vapor entra na coluna capilar. A desvantagem da injeção *split* é a limitação no que concerne a análise de traços e também a discriminação de amostra de alto peso molecular (McNAIR; MILLER, 2009).

3.5.2 Injeção *splitless*

A injeção *splitless* ocorre no mesmo injetor da injeção *split*. Entretanto, para a análise de traços, a injeção *splitless* é a mais recomendada pela maior quantidade de amostra que é injetada na coluna, isto porque é necessário que a sensibilidade seja adequada. No modo *splitless* é desnecessária a divisão da amostra. Uma quantidade relativamente grande de amostra diluída (0,5-6 µL) é injetada na coluna capilar (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Nesse modo de injeção a amostra líquida é introduzida no injetor através de uma microseringa, que perfura o septo inerte ficando agulha dentro do *liner* de vidro (é necessário que dentro do liner tenha lá de vidro para conter possíveis impurezas da amostra). Assim que a amostra líquida é introduzida no injetor, ela é imediatamente vaporizada e levada para a coluna, como representado na Figura 4.

Figura 4 – Injetor vaporizador



Fonte: SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002

3.6 COLUNAS

As colunas são uma das partes mais importantes dos equipamentos cromatográficos, pois é nela que ocorre a separação dos analitos presentes na

amostra. Dentre vários fatores a serem considerados na escolha de uma coluna, o fundamental é a assertividade na escolha da fase estacionária da coluna, visto que é nela que ocorrerá toda interação e seletividade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As colunas podem ser classificadas em: empacotada ou capilar.

Atualmente, na prática as colunas empacotadas são pouco usadas, ficando o trabalho cromatográfico, em quase sua totalidade, a cargo das colunas capilares (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000; SILVA et al., 2003).

O mecanismo de separação envolvido é a adsorção gás-sólido. Estas colunas são usadas para análises de hidrocarbonetos leves, gases inertes e gases sulfurosos (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000).

No final da década de 70, devido à expansão comercial, o desenvolvimento na fabricação de colunas capilares e de equipamentos é que a técnica da cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) tornou-se indispensável em uma gama de áreas voltadas a Ciência, especialmente no tocante à pesquisa (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000).

As classificações das colunas capilares ocorrem em: WCOT (*“Wall Coated Open Tubular”*) – onde a fase estacionária está sob a forma de filme líquido, na parede interna do tubo, SCOT (*“Support Coated Open Tubular”*) a fase estacionária é quimicamente ligada a um suporte finamente dividido e PLOT (*“Porous Layer Open Tubular”*) – a fase estacionária é um sólido finamente dividido (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2005; DIAS, 2005).

Na Tabela 2, estão apresentados, resumidamente, características das colunas capilares relacionadas com o material de fabricação, o diâmetro interno e o comprimento.

Tabela 2 - Tipos de colunas capilares

Coluna	Material	Diâmetro	Comprimento
SCOT	Vidro	0,1 mm - 0,5 mm	1 m - 90 m
WCOT	Vidro	0,1 mm - 0,3 mm	10m - 100 m
PLOT	Metal	0,3 mm - 0,5 mm	15 m - 30 m

Fonte: SILVA et al., 2005

3.6.1 Fases estacionárias

A espessura, uniformidade e a natureza química da fase estacionária são extremamente importantes na determinação da natureza e do grau de interação dos componentes da amostra. O parâmetro mais importante quando se escolhe uma coluna é a definição da própria fase estacionária (LANÇAS, 1993). Se a polaridade da fase estacionária e do composto forem similares, o tempo de retenção aumenta porque o composto interage mais fortemente com a fase estacionária. Como resultado, os compostos polares têm longos tempos de retenção em fases estacionárias polares e tempos de retenção mais curtos em colunas não-polares ou apolares, utilizando a mesma temperatura.

Nas antigas colunas capilares a fase estacionária era apenas o recobrimento das paredes internas do tubo, não havendo ligação entre a fase, servindo apenas de suporte para o filme, logo a parede do tubo era facilmente destruída por solventes, calor e contaminantes. Com o advento das fases ligadas e reticuladas houve um aumento substancial da estabilidade e do tempo de vida das colunas capilares. A fase estacionária é ligada à superfície interna do tubo de sílica fundida através de ligações covalentes. A reticulação é a ligação dos radicais do polímero (LANÇAS, 1993).

A polaridade é definida conforme a natureza química da fase estacionária dependendo da amostra injetada, sendo o tempo de retenção o grau de interação entre a fase estacionária e o analito da amostra.

3.6.2 Limites de temperatura

Trabalhos no limite máximo de temperatura provocam degradação acelerada da fase estacionária. A temperatura menor é chamada de limite isotérmico e representa a temperatura na qual a coluna pode ser mantida por períodos de tempo indefinidos. A temperatura maior é chamada de limite de programação de temperatura. Nele, a coluna não deverá ser usada, por períodos prolongados. Exceder o limite máximo de temperatura por pequenos períodos de tempo (< 30min) pode não acarretar dano imediato da fase; entretanto, é importante lembrar que a taxa de degradação da coluna aumenta com o aumento da temperatura (McNAIR; MILLER, 2009). Os danos imediatos e substanciais ocorrem quando a coluna é

exposta a temperaturas elevadas sem que haja passagem do gás de arraste. Nesse caso, mesmo a 100 °C, haverá dano considerável à fase, especialmente, as mais polares (McNAIR; MILLER, 2009).

3.6.3 Efeitos do comprimento, diâmetro da coluna e espessura do filme

3.6.3.1 *Comprimento*

Na prática, diminuindo-se 1 metro de uma coluna de 30 metros, a resolução diminuirá em apenas 1,7%. Colunas curtas são utilizadas para amostras contendo número relativamente pequeno de compostos, principalmente, se suas estruturas ou polaridades não forem muito similares. Essas colunas são úteis para análises preliminares (SILVA, 2005). As colunas de 60 metros são necessárias apenas para amostras extremamente complexas e aplicações especiais.

3.6.3.2 *Diâmetro da coluna*

O diâmetro interno impacta diretamente sobre a eficiência, o tempo de retenção e a capacidade de separação da coluna. Para duas colunas com equivalência nas fases, na espessura do filme, no comprimento e na qualidade, a coluna de menor diâmetro proporcionará melhor resolução dos picos, sendo assim mais eficiente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

3.6.3.3 *Espessura do filme*

Quanto maior for a espessura do filme, maior será a retenção do soluto dentro da coluna. As colunas com filme espesso são usadas para solutos muito voláteis. A maioria das análises pode ser feita utilizando-se colunas com filmes de espessura "padrão". A espessura-padrão para colunas de diâmetros internos 0,25 e 0,32 mm é de 0,25 μm .

3.7 DETECTORES

São os responsáveis pela quantidade mínima de substância a ser detectada, enquanto que cabe a coluna a função de estabelecer a quantidade máxima a ser detectada (LANÇAS, 1993). Devem ser operados com temperatura de 50°C acima da temperatura final da coluna para evitar condensação da amostra. Os principais detectores são: Detector de condutividade térmica (DCT), o detector de ionização em chama (DIC), o detector de captura de elétrons (DCE), o detector de nitrogênio-fósforo (DNF), o detector fotométrico de chama (DFC), o detector de condutividade eletrolítica (DCE), o detector microcoulombimétrico (DMC), o detector por fotoionização (DFI) e o detector de massas (MS). Dentre esses os mais importantes serão descritos a seguir.

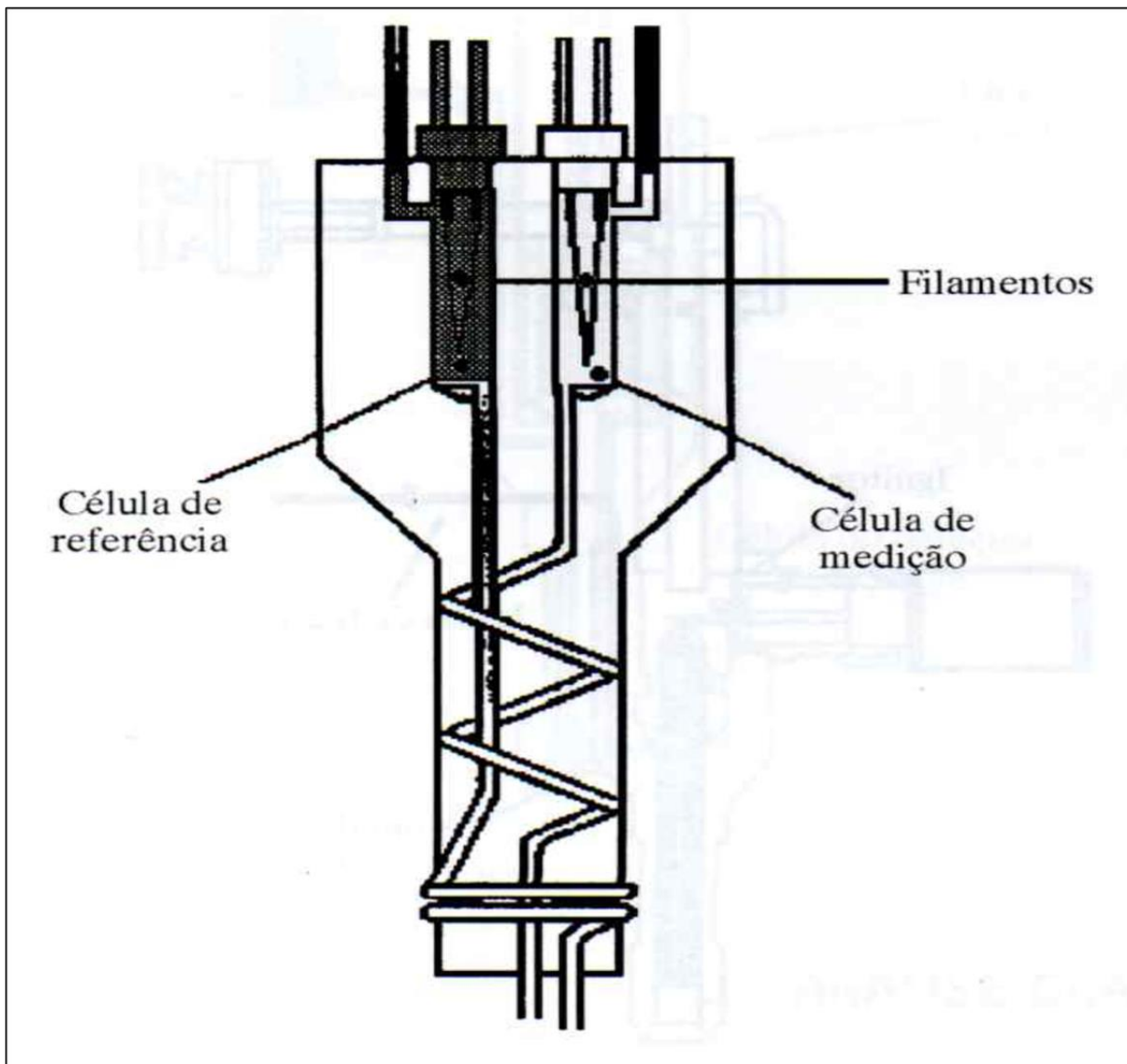
3.7.1 Detector de condutividade térmica (DCT)

Tem seu funcionamento baseado no princípio de que a velocidade de perda de calor por um corpo depende sobremaneira dos gases presentes em sua vizinhança (LANÇAS, 1993). Portanto, usa-se a velocidade de perda de calor na medida da composição de um gás. O DCT emprega um filamento de tungstênio aquecido por corrente constante. Com a passagem contínua do gás de arraste sobre o filamento, o calor é dissipado com velocidade constante. Quando o gás de arraste misturado com as moléculas da amostra passa sobre o filamento, a velocidade de perda de calor diminui e a resistência do filamento aumenta. A variação da resistência é facilmente medida por uma ponte de *Wheatstone* obtendo-se um sinal que é enviado ao registrador. Como a variação da resistência é devido à presença da amostra, o registro será proporcional à quantidade de substância que atravessa o detector. O DCT é muitas vezes chamado de detector universal já que tem resposta para praticamente todas as substâncias com exceção do gás de arraste, que normalmente é o hélio e o hidrogênio.

As análises feitas com estes detectores são não-destrutivas, pois a amostra misturada com o gás de arraste não perde sua característica ao passar sobre o filamento aquecido. Têm menos sensibilidade do que o detector de ionização de chama e são empregados na análise de CO, CO₂, H₂O, N₂, etc.

Na Figura 5 está representado o esquema de um detector de condutividade térmica.

Figura 5 – Detector de condutividade térmica



Fonte: LANÇAS, 1993

3.7.2 Detector de ionização em chama (DIC)

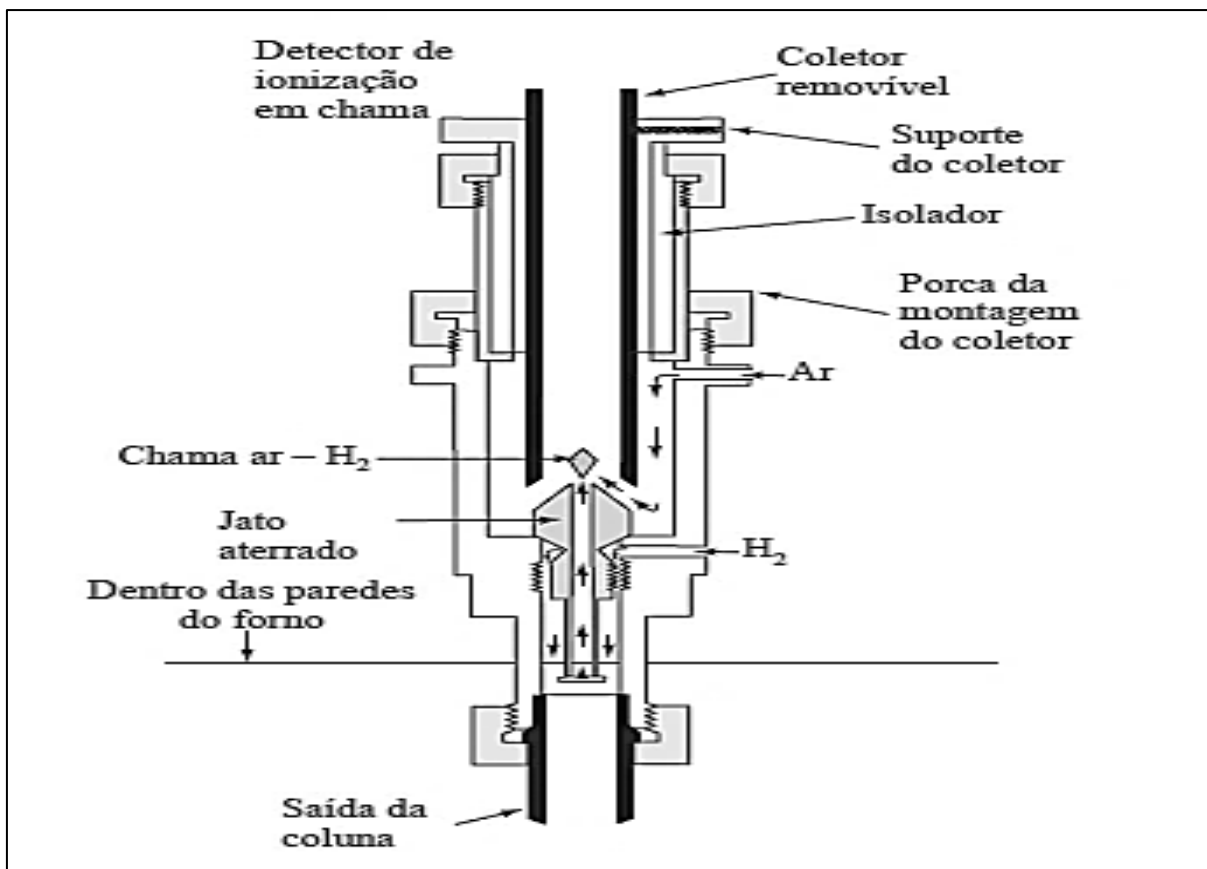
O detector de ionização em chama (DIC) é o mais empregado em aplicações da cromatografia gasosa em geral. Este detector é muito sensível às moléculas orgânicas, mas relativamente insensível a algumas pequenas moléculas, como, N_2 , NO_x , H_2S , CO , CO_2 , H_2O .

O DIC tem seu funcionamento baseado na combustão dos compostos na chama, essa combustão causa uma diferença de potencial estabelecido pelo gás de arraste puro e o gás de arraste com o efluente. Quando apenas o gás de arraste puro passa pela chama de hidrogênio, uma corrente muito pequena é estabelecida. Logo, quando existirem na amostra vaporizada compostos orgânicos, a chama queimará estes compostos formando dióxido de carbono, água e partículas carregadas de carga (íons e elétrons). A corrente resultante deste fluxo de partículas carregadas é que servirá como base para a quantificação das amostras eluídas na coluna (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Logo acima da chama há um eletrodo coletor de íons e elétrons, cuja função é coletar os íons gerados durante a ionização da amostra na chama de hidrogênio, o qual provocará um maior fluxo de corrente que é amplificada e registrada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Essas propriedades tornam o DIC muito útil para a análise de amostras orgânicas, incluindo aquelas contaminadas com água e com óxidos de nitrogênio e enxofre. O DIC exibe uma sensibilidade alta, uma larga faixa linear de resposta e um baixo ruído. Geralmente é robusto e fácil de se usar. Uma desvantagem desse detector é que ele destrói a amostra durante a etapa de combustão (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000).

O esquema de um detector de ionização em chama está representado na Figura 6.

Figura 6 – Detector de ionização em chama



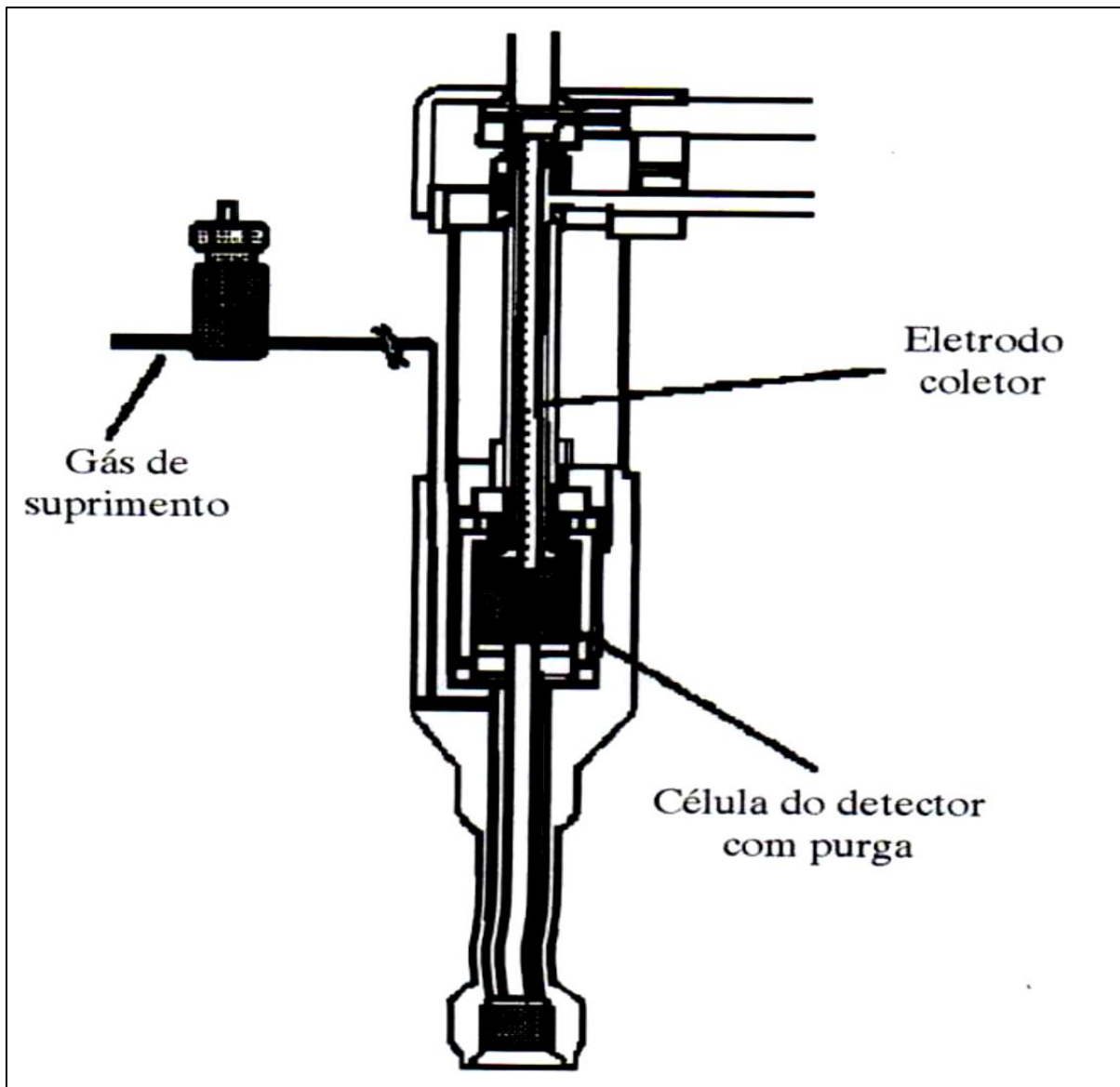
Fonte: SKOOG; HOLLER; NIEMAM, 2002

3.7.3 Detector de captura de elétrons (DCE)

Este detector tem seu funcionamento baseado na captura de elétrons da amostra. Esses elétrons são gerados pela ionização do gás de arraste por uma fonte radioativa (^{63}Ni ou ^3H). Isso ocorre quando há a supressão de um fluxo de elétrons lentos (termais), causada pela sua absorção por espécies eletrofílicas. Um fluxo contínuo de elétrons lentos é estabelecido entre um ânodo (fonte radioativa emissora) e um cátodo. Na passagem de uma substância eletrofílica alguns elétrons são absorvidos, resultando em uma supressão de corrente elétrica e gerando um sinal proporcional à sua concentração.

O DCE é seletivo, possuindo grande sensibilidade para moléculas eletronegativas como halogenetos orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. É praticamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas. Na Figura 7 está representado, esquematicamente, um detector de captura de elétrons.

Figura 7 – Detector por captura de elétrons



Fonte: LANÇAS, 1993

3.7.4 Detector de massas (MS)

Na espectrometria de massas ocorre o favorecimento da técnica quando a amostra é convertida em íons em fase gasosa em vez de átomos em fase gasosa.

No caso de um CG, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de cromatografia gasosa e a baixa pressão do sistema do espectrômetro de massas. Uma bomba de vácuo é necessária para manter a pressão baixa. No espectrômetro de massas, as

moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza a amostra (LANÇAS, 1993).

O método de ionização mais empregado em CG-MS é a ionização por impacto de elétrons - IE. Na IE, o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron (M^{+}). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera a fragmentação dos analitos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

As fontes de ionização para a espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes, assim como acontece em espectrometria atômica. As moléculas não-carregadas e os fragmentos são normalmente extraídos da fonte de íons através da bomba de vácuo empregada para produzir o ambiente de baixa pressão. Em seguida, o analisador seleciona os íons de acordo com seus valores m/z (massa/carga). Os íons separados são então detectados e um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* m/z é produzido pelo sistema de dados.

4. METODOLOGIA

As análises foram realizadas no centro tecnológico da Ouro Fino Química, um laboratório certificado pelo INMETRO com a acreditação ISO/IEC 17025.

Durante as campanhas anuais nos anos de 2016, 2017 e 2018 foram coletadas no início de cada campanha, direto da linha de envase, amostras do herbicida com formulação a base de atrazina do produto produzido e comercializado pela mesma empresa localizada na cidade de Uberaba/MG. Essas amostras foram preparadas e analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas.

4.1. MATERIAIS

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados:

- Acetona grau P.A. (marca: Merck);
- Ametrina padrão secundário a 97,00%;
- Atrazina padrão secundário a 98,65%;
- Tebutiuron padrão secundário a 98,17%;
- Metribuzin padrão secundário a 96,70%;
- Balão volumétrico calibrado RBC de 100mL (marca: Pyrex);
- Balão volumétrico calibrado RBC de 10mL (marca: Pyrex);
- Micropipeta de volume variado calibrado RBC (marca Eppendorf);
- Filtro – RC 0,45µm (marca: Watmann);
- Balança analítica Metler Toledo calibrado RBC (com resolução de 0,0001 g ou superior);
- Ultrassom (marca: Tecnal);
- Densímetro digital (marca: Anton Paar)
- Homogeneizador de amostra vórtex (marca: IKA);
- Pipetador de três vias (marca: Prolab);
- Espátula tipo micro colher (marca: Metalic);
- Vials de 2mL (marca: Agilent);
- Coluna capilar – DB5-XLB (60mx0,250mmx0,25µm) (marca: Agilent);
- Gás Nitrogênio 6.0 (marca: Air Liquid – Pureza: 99,9999%);
- Gás Hidrogênio 6.0 (marca: Air Liquid – Pureza: 99,9999%);
- Gás Sintético 6.0 (marca: Air Liquid – Pureza: 99,9999%).

4.2. EQUIPAMENTO

Para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado um cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chamas (modelo: GC-QP2010 – Shimadzu) com injetor automático (modelo: OAC-20C - Shimadzu) e rack com 250 posições de *vials*. Todos os módulos foram calibrados e qualificados por empresa credenciada a

atender as exigências do laboratório credenciado ISO/IEC 17025. Na Figura 8 pode-se observar o equipamento que foi utilizado. Na Figura 9, observa-se o amostrador automático do equipamento e na Figura 10 a coluna capilar que foi utilizada neste trabalho.

Figura 8 – Cromatógrafo Gasoso – modelo GC-QP2010 – Shimadzu



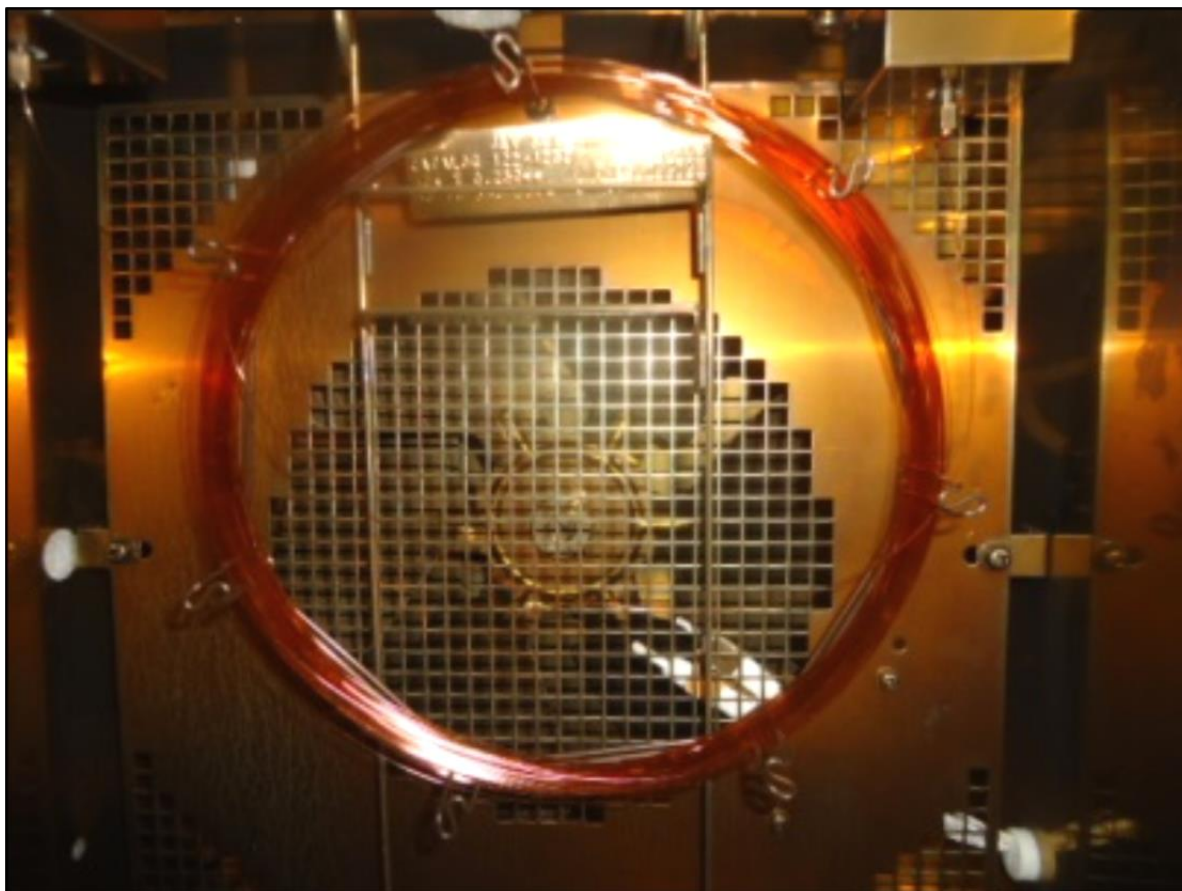
Fonte: Do autor, 2018

Figura 9 – Auto Sampler – modelo AOC-20S - Shimadzu



Fonte: Do autor, 2018

Figura 10 – Coluna capilar – DB5-XLB (60mx0,250mmx0,25µm) – Agilent



Fonte: Do autor, 2018

4.3. PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DO CROMATÓGRAFO GASOSO

- Injetor: 280°C
- Detector: 280°C
- Coluna: Temperatura programada

Taxa (°C/min.)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min.)
-	100,00	6,00
40,00	140,00	6,00
10,00	280,00	10,00

- Injeção automática 1µL no modo splitless 1:10
- Fluxo na coluna (H₂): 1,6 mL/minuto
- Fluxo de make-up (N₂): 29,0 mL/minuto
- Fluxo de hidrogênio (H₂): 40,0 mL/minuto
- Fluxo de ar sintético: 400,0 mL/minuto
- Fluxo na purga de septo: 3,0 mL/minuto

- Tempo de retenção tebutiuron: 19,26 minutos
- Tempo de retenção metribuzin: 24,96 minutos
- Tempo de retenção ametrina: 25,29 minutos
- Tempo de análise: 30,00 minutos

4.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Para iniciar o desenvolvimento e a validação da metodologia analítica foi considerado como limite máximo de contaminante de ametrina, metribuzin e tebutiuron em formulação a base de atrazina, o valor de 0,125 mgmL⁻¹. Essa concentração é definida em estudos agronômicos da empresa.

4.4.1. Preparo de solução padrão estoque

Pesou-se, em um mesmo balão volumétrico de 100 mL, 10,3 mg de padrão de ametrina a 97,00%, 11,0 mg de padrão de atrazina a 98,60%, 10,3 mg de padrão de metribuzin a 96,70% e 10,2 mg de padrão de tebutiuron a 98,17%. O balão volumétrico de 100 mL foi avolumado com acetona grau PA, homogeneizado em agitador vórtex e levado ao ultrassom por 10 minutos até a completa dissolução dos padrões (Solução estoque – Concentrações: Ametrina = 0,0999 mg mL⁻¹; Atrazina = 0,1085 mgmL⁻¹; Metribuzin = 0,0996 mgmL⁻¹; Tebutiuron = 0,1001 mgmL⁻¹).

4.4.2. Sinal/Ruído

Para obtenção do limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) do método, foi necessário conhecer o valor do Sinal/Ruído para o método em questão.

O Sinal/Ruído foi calculado pela divisão da altura do sinal do pico de interesse dividido pela altura do ruído da linha de base na corrida cromatográfica, pela equação (4):

$$S/R = \frac{H(\text{pico interesse})}{R(\text{ruído})} \quad (4)$$

na qual o Sinal/Ruído a ser considerado é quando o valor encontrado é de aproximadamente 10.

S/R = Sinal Ruído e H = Altura.

Para encontrar o sinal ruído próximo do valor de 10, foi transferido para um balão volumétrico de 100mL, com o auxílio de uma micropipeta de volume variável, 4000µL da solução padrão estoque, obtendo-se as seguintes concentrações de cada princípio ativo - **Solução de Ametrina = 0,0040mgmL⁻¹; Solução de Atrazina = 0,0043mgmL⁻¹; Solução de Metribuzin = 0,0039mgmL⁻¹; Solução de Tebutiuron = 0,0040mgmL⁻¹.**

4.4.3. Limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD)

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida, utilizando uma determinada metodologia analítica (LEITE, 1996). Esse foi calculado pela equação (5):

$$LOQ = 10 \times S/R \quad (5)$$

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando uma determinada metodologia analítica. Esse foi calculado pela equação (6):

$$LOD = 3 \times S/R \quad (6)$$

4.4.4. Repetibilidade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição, por exemplo, mesmo analista, mesma temperatura, pressão, entre outras (LEITE, 1996). No parâmetro repetibilidade foram preparadas cinco soluções independentes com concentrações conhecidas do princípio ativo ametrina, metribuzin e tebutiuron e cada um foi injetado duas vezes no sistema cromatográfico.

4.4.5. Curva de calibração

A partir do limite de quantificação (LOQ) de $0,0400\text{mgmL}^{-1}$ para a ametrina, de $0,0391\text{mgmL}^{-1}$ para o metribuzin e de $0,0401\text{mgmL}^{-1}$ para o tebutiuron é que se definiu a curva de calibração para os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina a partir do LOQ do método.

No padrão 1 que é o de menor concentração da curva de calibração foram transferidos, utilizando micropipeta de volume variado calibrada RBC, o volume de $4000\mu\text{L}$ do padrão estoque contendo os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina para balão volumétrico de 10mL calibrado RBC e avolumado com acetona P.A.. **Solução de Ametrina = $0,0400\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Metribuzin = $0,0391\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Tebutiuron = $0,0401\text{mgmL}^{-1}$.**

No padrão 2 foi preparado com uma concentração de 40% a mais do padrão 1. Para tanto, foi transferido utilizando micropipeta de volume variado calibrada RBC, o volume de $5600\mu\text{L}$ do padrão estoque contendo os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina para balão volumétrico de 10mL calibrado RBC e avolumado com acetona P.A.. **Solução de Ametrina = $0,0560\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Metribuzin = $0,0547\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Tebutiuron = $0,0561\text{mgmL}^{-1}$.**

No padrão 3 foi preparado com uma concentração de 60% a mais do padrão 1. Para isso, foi transferido utilizando micropipeta de volume variado calibrada RBC, o volume de $6410\mu\text{L}$ do padrão estoque contendo os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina para balão volumétrico de 10mL calibrado RBC e avolumado com acetona P.A.. **Solução de Ametrina = $0,0640\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Metribuzin = $0,0626\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Tebutiuron = $0,0642\text{mgmL}^{-1}$.**

No padrão 4 foi preparado com uma concentração de 80% a mais do padrão 1. Para tanto, foi transferido utilizando micropipeta de volume variado calibrada RBC, o volume de $7200\mu\text{L}$ do padrão estoque contendo os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina para balão volumétrico de 10mL calibrado RBC e avolumado com acetona P.A.. **Solução de Ametrina = $0,0719\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Metribuzin = $0,0703\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Tebutiuron = $0,0721\text{mgmL}^{-1}$.**

No padrão 5 foi preparado com uma concentração de 100% a mais do padrão 1. Para isso, foi transferido utilizando micropipeta de volume variado calibrada RBC, o volume de $8000\mu\text{L}$ do padrão estoque contendo os padrões de tebutiuron, metribuzin e ametrina para balão volumétrico de 10mL calibrado RBC e avolumado

com acetona grau P.A.. **Solução de Ametrina = $0,0799\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Metribuzin = $0,0781\text{mgmL}^{-1}$; Solução de Tebutiuron = $0,0801\text{mgmL}^{-1}$.**

4.4.6. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração (LEITE, 1996). A linearidade é determinada através de gráficos de calibração seguindo o tratamento estatístico. Para a determinação da linearidade foi utilizado o método do padrão externo, obtida pela análise de 5 padrões analíticos com concentrações diferentes, obtendo-se uma faixa linear para cada composto. Cada concentração considerada na construção da curva analítica foi analisada em monocata e em seguida aplicado o método de regressão linear.

4.4.7. Determinação da massa da amostra da formulação à base de atrazina a ser pesada para a análise da recuperação, a análise do isento e a análise do contaminante

Para o cálculo da massa da amostra da formulação à base de atrazina a ser pesada foi levado em consideração a densidade da amostra de atrazina, a média do LOQ entre os princípios ativos ametrina, metribuzin e tebutiuron que foi de $0,0397\text{mgmL}^{-1}$, o limite máximo de contaminante na amostra estabelecido no estudo de campo agrônômico da empresa que foi de $0,125\text{mgmL}^{-1}$ e o volume do balão volumétrico na qual foi pesado a amostra de atrazina foi de 10mL .

A densidade foi determinada introduzindo-se a amostra da formulação à base de atrazina através do tubo U do densímetro digital, até o seu completo preenchimento, verificando possíveis bolhas dentro do equipamento, após a estabilização do densímetro o resultado da densidade foi de $1,117\text{gmL}^{-1}$ **(a)**.

Primeiro calculou-se o volume, em mL, da amostra correspondente à contaminação de limite de $0,125\text{mgmL}^{-1}$, através do seguinte cálculo:

$$V_{\text{amostra}} = \frac{0,0397\text{mgmL}^{-1} \times 10\text{mL}}{0,125\text{mgmL}^{-1}} = \mathbf{3,176\text{mL} \text{ (b)}}$$

Em seguida, usando a equação da densidade foi calculada a massa da amostra da formulação à base de atrazina a ser pesada.

onde $(a) = 1,117 \text{ g mL}^{-1}$ e $(b) = 3,176 \text{ mL}$

$$(a) d_{amostra} = \frac{m_{amostra}}{(b) V_{amostra}}$$

$$m_{amostra} = d_{amostra} \times V_{amostra}$$

$$m_{amostra} = 1,117 \text{ g mL}^{-1} \times 3,176 \text{ mL}$$

$$m_{amostra} = 3,548 \text{ g}$$

4.4.8. Análise da amostra de formulação à base de atrazina, isento do analito de interesse (branco)

Essa análise foi realizada, pesando em balão volumétrico de 10mL, utilizando balança analítica, uma massa de 3,5727g conforme item 4.4.7. Da amostra isenta do analito de interesse (branco), avolumado com acetona grau PA e deixado em ultrassom por 10 minutos para completa dissolução da amostra. Em seguida, a amostra foi filtrada em *vial*, usando filtro RC de 0,45µm e levada ao sistema cromatográfico para ser analisada.

4.4.9. Recuperação

É o teste analítico que expressa quanto os valores obtidos encontram-se próximo do valor real, sendo determinada como a recuperação do analito. Quando o ingrediente ativo de interesse se encontra em outro produto formulado, faz-se necessário o preparo da recuperação fortificando um branco de amostra no mínimo em três níveis de concentração (CHASIN; CHASIN; SALVADOR, 1994; LANÇAS, 2004).

Após o cálculo da massa da amostra da formulação de atrazina a ser pesada ter sido calculada no item 4.4.7, foram pesados, de maneira independente, em balões volumétricos de 10mL, utilizando balança analítica as três massas de amostras de formulação à base de atrazina com massas próximas daquelas previamente estabelecidas no item 4.4.7. Nestes mesmos balões volumétricos de

10mL foram micropipetados os volumes de 1400µL, 2256µL e 2820µL de cada solução padrão estoque do item 4.4.1 de cada um dos três ativos de interesse, avolumado com acetona grau PA e deixado em ultrassom por 10 minutos para completa dissolução da amostra. Em seguida, as amostras foram filtradas em *vials*, usando filtro RC de 0,45µm e levadas ao sistema cromatográfico para serem analisadas.

4.4.10. Análise do herbicida com formulação a base de atrazina produzido durante as campanhas dos anos de 2016, 2017 até fevereiro de 2018

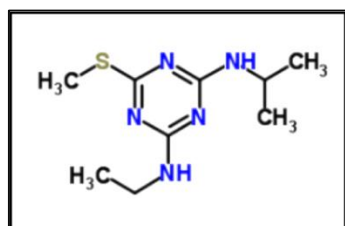
A análise foi realizada, pesando de forma independente, em balão volumétrico de 10mL, utilizando balança analítica, uma massa de 3,6029g para o lote 101/16, uma massa de 3,6018g para o lote 001/17, uma massa de 3,5998g para o lote 067/17, uma massa de 3,6035g para o lote de 100/17, uma massa de 3,5889g para o lote 148/17, uma massa de 3,5494g para o lote 001/18 e uma massa de 3,5364g para o lote 011/18, conforme item 4.4.7., das amostras coletadas na linha de envase do produto formulado à base de atrazina. Em seguida, os balões foram avolumados com acetona grau PA, homogeneizado em vórtex e deixado em ultrassom por 10 minutos para completa dissolução da amostra. Em seguida, a amostra foi filtrada em *vial*, usando filtro RC de 0,45µm e levada ao sistema cromatográfico para ser analisada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

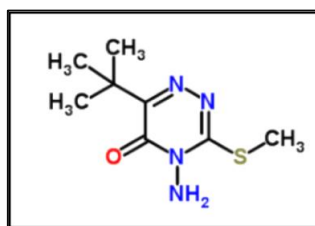
Para esse estudo foram selecionados três herbicidas bastante utilizados e de alto grau de toxicidade: a ametrina, o metribuzin e o tebutiuron (Figura 11). A ametrina é um herbicida seletivo de ação sistêmica do grupo químico das triazinas, usado em pré e pós-emergência inicial, para o controle das plantas infestantes de folhas largas e estreitas nas culturas de café e cana-de-açúcar. Em contato com o solo degrada por ação microbiana. O metribuzin também é um herbicida seletivo, de ação sistêmica, apresentado sob a forma de suspensão concentrada, utilizado para o controle de plantas infectantes de folhas largas (culturas da batata, café, cana-de-açúcar, mandioca e soja), em aplicação pré-emergência (cultura do trigo), em aplicação pós-emergência (cultura do tomate), bem como, nas aplicações em pré e

pós-emergência e das plantas daninhas. Já o tebutiuron é indicado para controle de plantas infestantes em pré-emergência na cultura da cana-de-açúcar, nos tipos cana planta ou soca, podendo ser aplicado antes ou após a emergência da cultura. Em contato com a planta, o tebutiuron promove a inibição da fotossíntese.

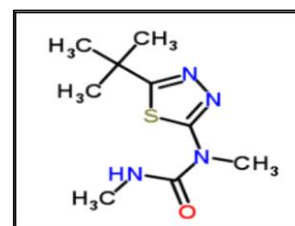
Figura 11 – Estrutura dos herbicidas estudados



ametrina



metribuzin

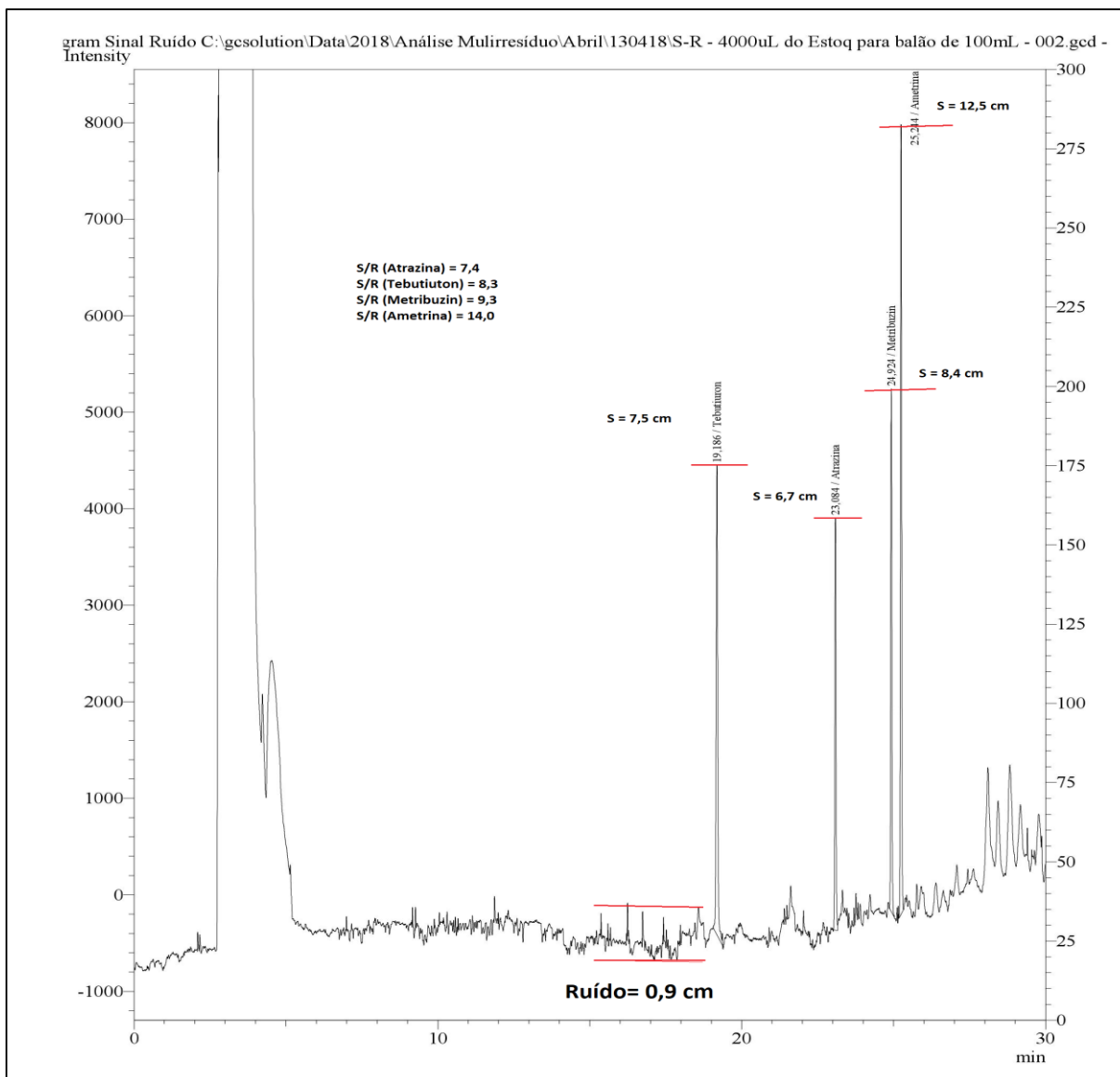


tebutiuron

Fonte: NIST, 2018

Para a validação da metodologia analítica de detecção dos herbicidas ametrina, metribuzin e tebutiuron em amostras de atrazina proposta nesse trabalho foram necessárias as análises de sinal/ruído, LOQ e LOD, repetibilidade e linearidade das soluções padrão desses herbicidas. O cromatograma da Figura 12 apresenta a análise do sinal/ruído dos herbicidas estudados.

Figura 12 – Cromatograma do Sinal/Ruído do tebutiuron, metribuzin e ametrina



Fonte: Do autor, 2018

A partir do cromatograma da Figura 12 foram calculados os sinais-ruídos dos herbicidas em estudo. Este método pode ser aplicado em procedimentos analíticos que demonstrem o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal ruído é feita a comparação entre a medição dos sinais das amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz destas amostras. Dessa forma, é estabelecida uma concentração mínima qual a substância pode ser facilmente detectada e quantificada, tendo sido obtidos os seguintes valores: S/R (Ametrina) = 14,0; S/R (Atrazina) = 6,7; S/R (Metribuzin) = 9,3; S/R (Tebutiuron) = 8,3.

O limite de quantificação (LOQ) e o limite de detecção (LOD) foram calculados para os herbicidas estudados a partir das equações 5 e 6 e obtiveram-se

os valores: LOQ de $0,0400 \text{ mgmL}^{-1}$ para a ametrina, de $0,0391 \text{ mgmL}^{-1}$ para o metribuzin e de $0,0401 \text{ mgmL}^{-1}$ para o tebutiuron e os LOD $0,012 \text{ mgmL}^{-1}$ para a ametrina, de $0,0117 \text{ mgmL}^{-1}$ para o metribuzin e de $0,012 \text{ mgmL}^{-1}$ para o tebutiuron. Zapparoli (2009) reporta valores de LOD de $3,19 \mu\text{gL}^{-1}$ e LOQ de $6,24 \mu\text{gL}^{-1}$ de tebutiuron mostrando maior sensibilidade. Entretanto a técnica utilizada para a detecção de tebutiuron foi a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, que permite uma sensibilidade superior. Cappellini (2008) descreve valores de LOD de $0,02 \text{ mgL}^{-1}$ e LOQ de $0,07 \text{ mgL}^{-1}$ de ametrina. A técnica utilizada para a detecção de ametrina foi a cromatografia líquida com detector DAD que também permite uma maior sensibilidade quando comparado ao detector FID do cromatógrafo gasoso.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Para avaliar o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, foi estudada a repetibilidade das separações cromatográficas dos herbicidas estudados. As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os dados obtidos para os três herbicidas estudados.

Tabela 3 – Resultado da repetibilidade da ametrina

Ametrina			
	Concentração conhecida (mgmL^{-1})	Concentração encontrada (mgmL^{-1})	Concentração encontrada em (% m/m)
Rep.1	0,05562	0,05462	98,2021
	0,05562	0,05523	99,2988
Rep.2	0,05626	0,05579	99,1646
	0,05626	0,05538	98,4358
Rep.3	0,06014	0,05900	98,1044
	0,06014	0,05861	97,4559
Rep.4	0,05917	0,05818	98,3269
	0,05917	0,05825	98,4452
Rep.5	0,06499	0,06371	98,0305
	0,06499	0,06307	97,0457
Média	*	0,05818	98,2510

Mínimo	*	0,05462	97,0457
Máximo	*	0,06371	99,2988
%DPR	*	5,44351	0,6926
DPR	*	0,00317	0,6805

Fonte: Do autor, 2018

Tabela 4 – Resultado da repetibilidade do metribuzin

Metribuzin			
	Concentração conhecida (mgmL ⁻¹)	Concentração encontrada (mgmL ⁻¹)	Concentração encontrada em (% m/m)
Rep.1	0,04835	0,04740	98,0352
	0,04835	0,04822	99,7311
Rep.2	0,05125	0,05014	97,8322
	0,05125	0,05027	98,0859
Rep.3	0,05028	0,05026	99,9602
	0,05028	0,05003	99,5028
Rep.4	0,05125	0,05170	100,8780
	0,05125	0,05083	99,1805
Rep.5	0,05609	0,05555	99,0373
	0,05609	0,05534	98,6629
Média	*	0,05097	99,0906
Mínimo	*	0,04740	97,8322
Máximo	*	0,05555	100,8780
%DPR	*	5,21094	0,9768
DPR	*	0,00266	0,9679

Fonte: Do autor, 2018

Tabela 5 – Resultado da repetibilidade do tebutiuron

Tebutiuron			
	Concentração conhecida (mgmL ⁻¹)	Concentração encontrada (mgmL ⁻¹)	Concentração encontrada em (% m/m)
Rep.1	0,05998	0,05974	99,5937
	0,05998	0,05876	97,9599
Rep.2	0,05998	0,05902	98,3934
	0,05998	0,05952	99,2270
Rep.3	0,06087	0,05914	97,1652
	0,06087	0,05967	98,0360
Rep.4	0,05890	0,05859	99,4703
	0,05890	0,05824	98,8761
Rep.5	0,05792	0,05727	98,8773
	0,05792	0,0583	100,6556

Média	*	0,05883	98,8254
Mínimo	*	0,05727	97,1652
Máximo	*	0,05974	100,6556
%DPR	*	1,30045	1,0027
DPR	*	0,00076	0,9909

Fonte: Do autor, 2018

A partir das Tabelas 3, 4 e 5 é possível observar grande repetibilidade da metodologia desenvolvida, com média de 98 % para ametrina, 99% para metribuzin e de aproximadamente 99% para tebutiuron. Os resultados demonstram que a metodologia proposta é adequada para a detecção dos herbicidas em estudo, comparando com a literatura. Não foram obtidos dados de repetibilidade para a detecção dos herbicidas estudados. Destaca-se assim a confiança nos resultados que forem obtidos para a análise de contaminação com esses herbicidas em amostras comerciais.

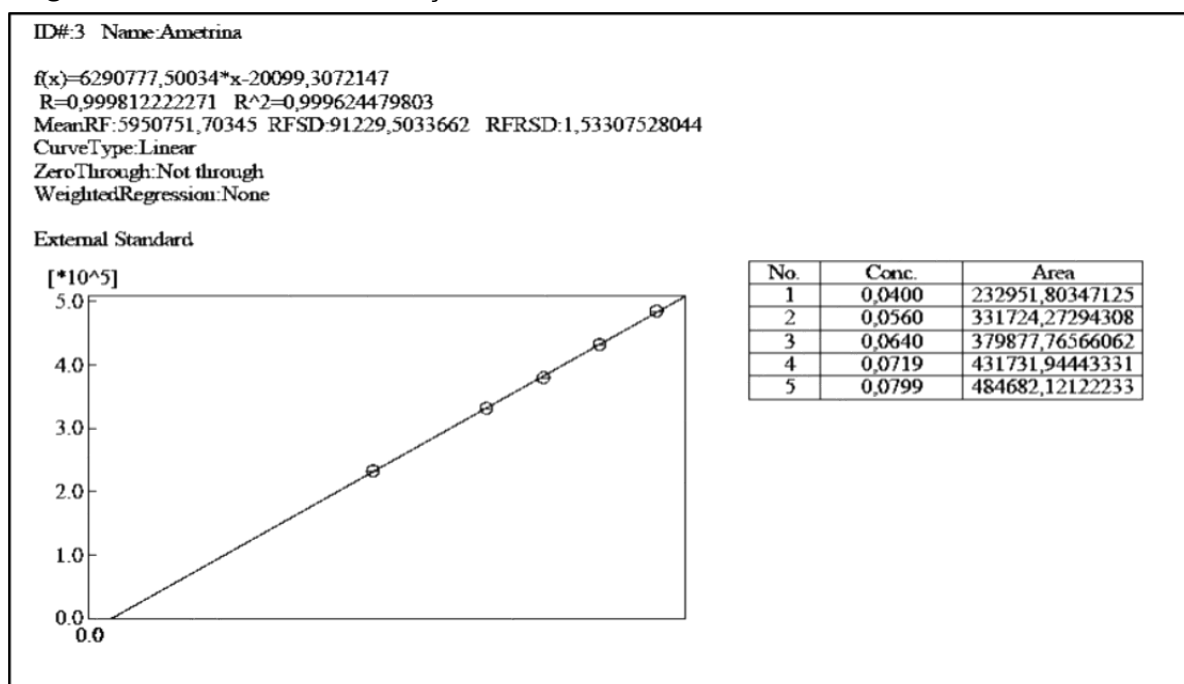
Na sequência, foi analisada a linearidade da metodologia proposta com base no método do padrão externo. Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram superiores a 0,999, o que indica que o detector responde linearmente às concentrações analisadas. Assim, é possível concluir que esse é um método linear na faixa de concentração estudada, como pode se observar na Tabela 6 e nas Figuras 13, 14 e 15.

Tabela 6 - Equação da reta e coeficiente da correlação obtidos ao aplicar o método de regressão linear, para os pesticidas em estudo

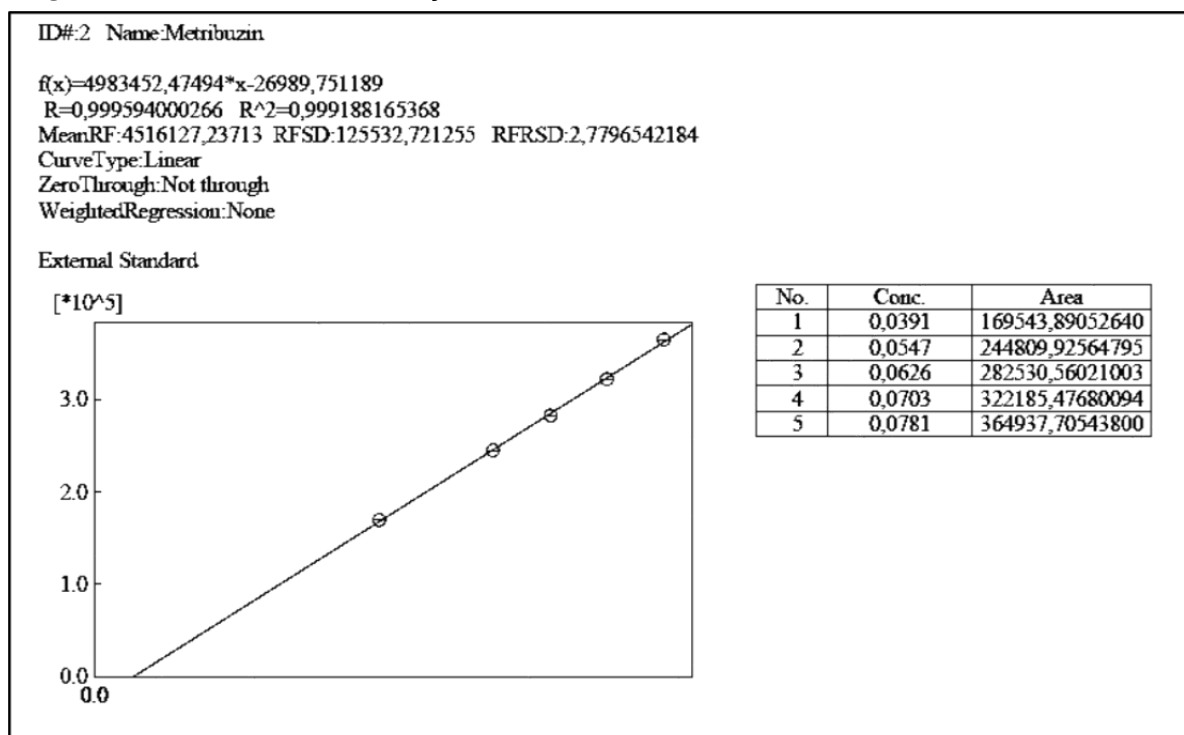
Pesticidas	Concentração (mgmL⁻¹)	Equação da reta (y = ax+b)*	Coeficiente de correlação (r)
Ametrina	0,0400 – 0,0799	y = 6290777x - 20099	0,99981
Metribuzin	0,0391 – 0,0781	y = 4983452x - 26990	0,99959
Tebutiuron	0,0401 – 0,0801	y = 4639738x - 13323	0,99971

*y = ax+b (y = área do pico; x = concentração em mg.mL⁻¹)

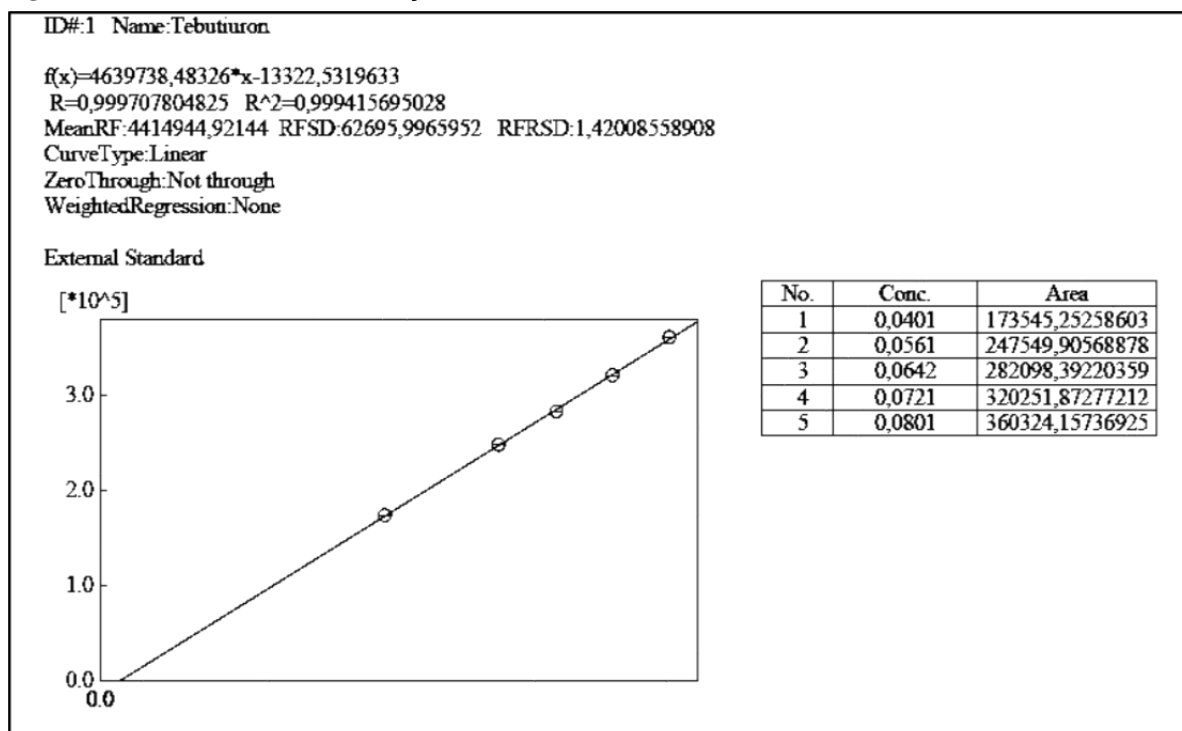
Fonte: Do autor, 2018

Figura 13 – Curva de calibração ametrina

Fonte: Do autor, 2018

Figura 14 – Curva de calibração metribuzin

Fonte: Do autor, 2018

Figura 15 – Curva de calibração tebutiuron

Fonte: Do autor, 2018

SILVA (2010) descreve que um dos fatores mais importantes da técnica da cromatografia gasosa quando comparada com a cromatografia líquida está no custo da análise, uma vez que uma análise via cromatografia gasosa é 95,5% mais barata do que a mesma análise via cromatografia líquida. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a metodologia proposta apresenta vantagens em relação a outras metodologias para a análise dos herbicidas em estudo, como:

- Custo – A metodologia proposta apresenta custo inferior em relação à metodologia que utilizam cromatografia líquida;
- Tempo – A metodologia proposta realiza as análises em menos tempo;
- Simplicidade da técnica – A cromatografia gasosa apresenta-se como uma técnica mais simples em relação à cromatografia líquida.

Assim sendo, a metodologia proposta, será útil em vários setores melhorando o controle de qualidade de produtos agrícolas. E ainda, pode ser utilizado para a detecção de outros contaminantes.

Tendo sido validada a metodologia de análise dos herbicidas ametrina, metribuzin e tebutiuron, foi realizada a análise de amostras de uma formulação à base de atrazina. Inicialmente, foi analisada uma amostra considerada controle. Como se pode observar na Figura 16, a amostra à base de atrazina está isenta dos ativos ametrina, metribuzin e tebutiuron, logo a concentração e a área destes são iguais a zero, conforme Figura 17.

Figura 16 – Sobreposição do cromatograma da amostra isenta (branco) versus cromatograma da amostra contendo os três ativos de interesse

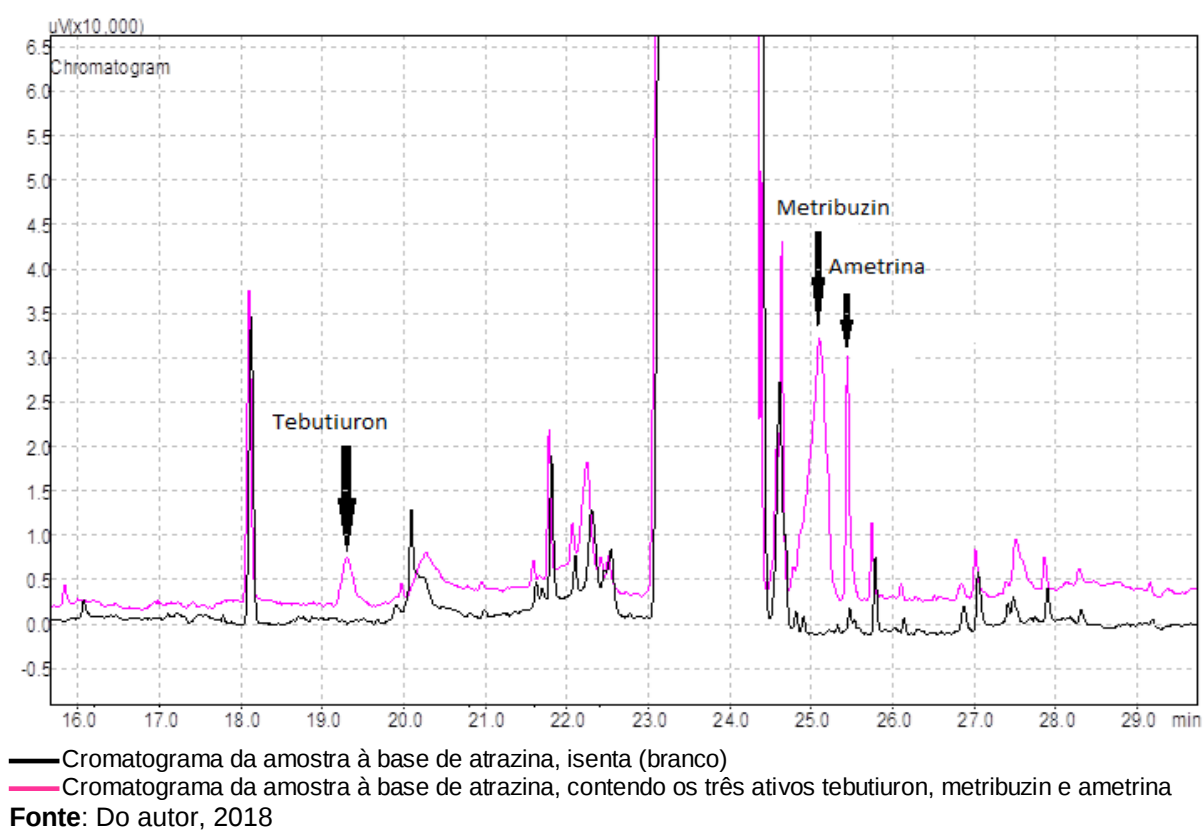
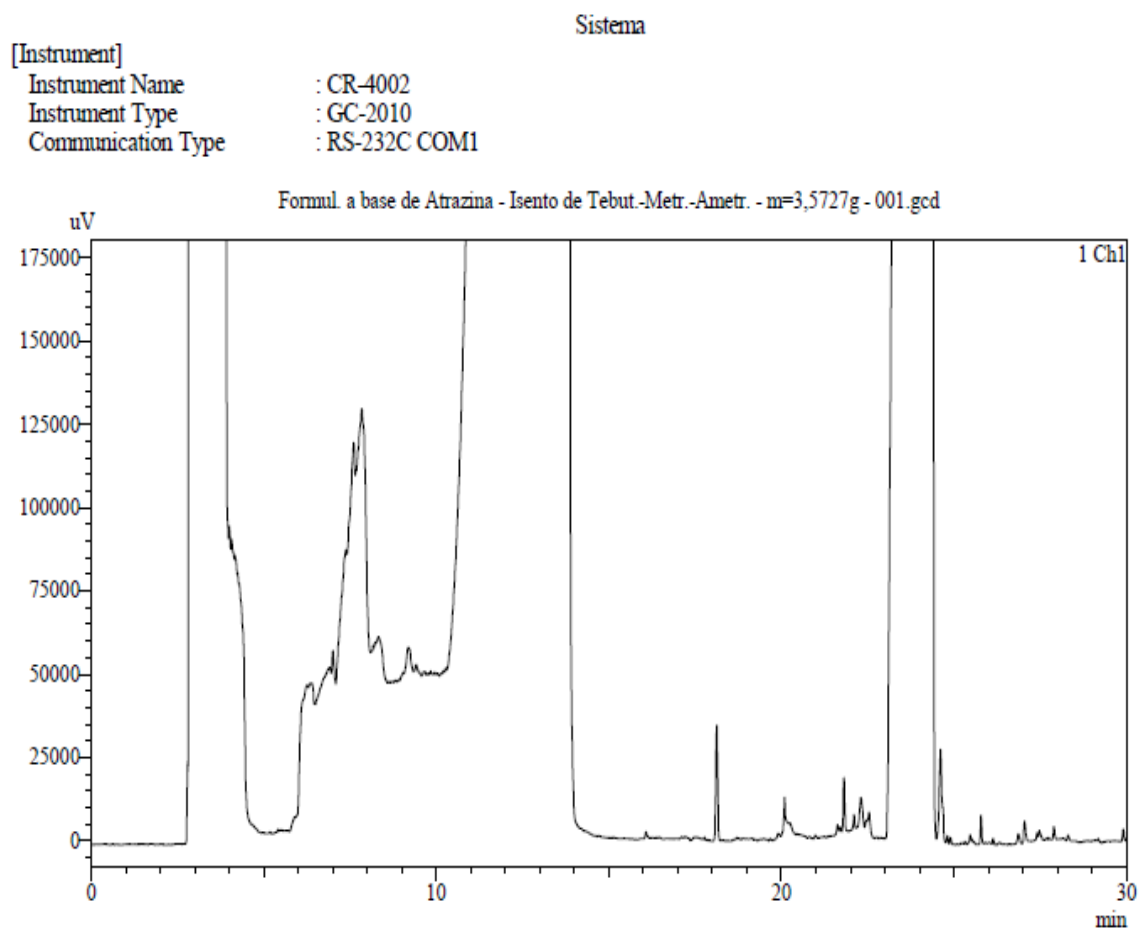


Figura 17 – Cromatograma do resultado da amostra de formulação à base de atrazina isenta (controle) de contaminante



Formul. a base de Atrazina - Isento de Tebut.-Metr.-Ametr. - m=3,5727g - 001.gcd

<< Channel 1 >>

ID#1 Compound Name: Tebutiuron

Title	Ret. Time (min)	Area	Conc (mg/mL)
Formul. a base de Atrazina - Isento de Tebut.-Metr.-Ametr. - m=3,5727g -	0.000	0.00	0.00000
Average	0.000	0.00	0.00000
%RSD	0.000	0.000	0.000
Maximum	0.000	0.00	0.00000
Minimum	0.000	0.00	0.00000
Standard Deviation	0.000	0.00	0.00000

ID#2 Compound Name: Metribuzin

Title	Ret. Time (min)	Area	Conc (mg/mL)
Formul. a base de Atrazina - Isento de Tebut.-Metr.-Ametr. - m=3,5727g -	0.000	0.00	0.00000
Average	0.000	0.00	0.00000
%RSD	0.000	0.000	0.000
Maximum	0.000	0.00	0.00000
Minimum	0.000	0.00	0.00000
Standard Deviation	0.000	0.00	0.00000

ID#3 Compound Name: Ametrina

Title	Ret. Time (min)	Area	Conc (mg/mL)
Formul. a base de Atrazina - Isento de Tebut.-Metr.-Ametr. - m=3,5727g -	0.000	0.00	0.00000
Average	0.000	0.00	0.00000
%RSD	0.000	0.000	0.000
Maximum	0.000	0.00	0.00000
Minimum	0.000	0.00	0.00000
Standard Deviation	0.000	0.00	0.00000

Fonte: Do Autor, 2018

A partir das Figuras 16 e 17, observa-se que a amostra controle de atrazina realmente está isenta dos herbicidas estudados.

Em seguida, foi feita a fortificação das amostras e posterior análise de recuperação. Com isso, as concentrações teóricas da fortificação para cada volume adicionado no teste de recuperação em relação a massa da amostra da formulação de atrazina podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração teórica das fortificações de ametrina, metribuzin e tebutiuron

	Volume micropipetado das soluções estoque								
	1400µL			2256µL			2820µL		
	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron
Concentração teórica em relação a massa da amostra à base de Atrazina (mgmL ⁻¹)	0,0390	0,0380	0,0395	0,0631	0,0617	0,0643	0,0792	0,0774	0,0793

Fonte: Do autor, 2018

Após as três corridas cromatográficas, os resultados reais da fortificação foram calculados pela equação 7 e com base na equação da reta da Tabela 9 de cada ativo de interesse, os resultados podem ser observados na Tabela 8.

$$\text{Concentração do ativo em } \text{mgmL}^{-1} = \left[\frac{[(\text{Área da amostra} - \text{Área do branco}) \times \left(\frac{\text{Massa da amostra}}{\text{Massa do branco}} \right)] - b}{a} \right] \times \left[\frac{\text{Volume do balão}}{\text{Massa da amostra}} \right] \quad (7)$$

Onde: a = coeficiente angular da reta do ativo de interesse ($\text{tg}\theta = \frac{\Delta y}{\Delta x}$);

b = coeficiente linear da reta do ativo de interesse (é o ponto onde a reta corta o eixo y).

Tabela 8 – Concentração real encontrada nas fortificações de ametrina, metribuzin e tebutiuron

	Volume micropipetado das soluções estoque								
	1400 μL			2256 μL			2820 μL		
	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron
Concentração real em relação a massa da amostra à base de Atrazina (mgmL^{-1})	0,0465	0,0434	0,0397	0,0727	0,0639	0,0586	0,0853	0,0714	0,0636

Fonte: Do autor, 2018

Com isso, os valores de recuperação para os princípios ativos ametrina, metribuzin e tebutiuron em relação a massa da amostra da formulação de atrazina pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Recuperação da fortificação dos ativos em relação à massa da amostra da formulação de atrazina.

	Volume micropipetado das soluções estoque								
	1400 μL			2256 μL			2820 μL		
	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron	Ametrina	Metribuzin	Tebutiuron
Recuperação (%)	119,23	114,21	100,51	115,21	103,57	91,14	107,7	92,25	80,2

Fonte: Do autor, 2018

Pelos critérios de aceitação da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 14029:2016 os resultados encontrados na recuperação (Tabela 9) estão de acordo com os valores recomendados para concentrações nominais de ingredientes ativo menores que 100mgmL^{-1} , na qual a variação pode ser de 80-120% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016). Isso mostra que as análises foram realizadas criteriosamente, levando à excelentes resultados.

Com os resultados da recuperação dos ativos em concordância passou-se a estudar uma série de amostras reais, de diferentes lotes, comercializadas por uma empresa em Uberaba-MG. Assim, as amostras foram analisadas nas condições

cromatográficas propostas na metodologia desenvolvida nesse estudo e analisadas durante 30 minutos de corrida cromatográfica. Os resultados obtidos foram calculados pela equação 7 e com base na equação da reta da Tabela 6, de cada ativo de interesse, estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultado da contaminação cruzada

Resultados da contaminação cruzada							
Lote	Massa da amostra (g)	Área Ametrina	Ametrina (mgmL ⁻¹)	Área Metribuzin	Metribuzin (mgmL ⁻¹)	Área Tebutiuron	Tebutiuron (mgmL ⁻¹)
101/16	3,6029	137393,25	0,0695	0	< LOD	0	< LOD
001/17	3,6018	134308,97	0,0681	0	< LOD	0	< LOD
067/17	3,5998	134837,52	0,0684	0	< LOD	0	< LOD
100/17	3,6035	134476,11	0,0682	0	< LOD	0	< LOD
148/17	3,5889	130869,39	0,0669	0	< LOD	0	< LOD
001/18	3,5494	5745,85	0,0116	0	< LOD	0	< LOD
011/18	3,5364	3629,79	0,0107	264417,98	0,1654	0	< LOD

Fonte: Do autor, 2018

TCal Ametrina = 0,125 mgmL⁻¹ TCal Metribuzin = 0,125 mgmL⁻¹ TCal Tebutiuron = 0,125 mgmL⁻¹

LOQ Ametrina = 0,040 mgmL⁻¹ LOQ Metribuzin = 0,039 mgmL⁻¹ LOQ Tebutiuron = 0,040 mgmL⁻¹

LOD Ametrina = 0,012 mgmL⁻¹ LOD Metribuzin = 0,012 mgmL⁻¹ LOD Tebutiuron = 0,012 mgmL⁻¹

Com relação aos resultados da Tabela 10, observa-se que o lote 011/18 do produto formulado à base atrazina encontra-se com a concentração de metribuzin acima do limite de contaminação estabelecido em estudos agronômicos da empresa, que é de 0,125mgmL⁻¹. Para o princípio ativo ametrina todos os lotes do produto formulado à base de atrazina analisados encontram-se contaminados com ametrina, porém com a concentração abaixo do limite estabelecido em estudos agronômicos da empresa. Já para o princípio ativo tebutiuron todos os lotes do produto formulado à base de atrazina analisados, em nenhum lote foi encontrado o princípio ativo tebutiuron, o que indica que não houve nenhuma contaminação cruzada por este ativo.

Desta forma, observa-se que, exceto o lote 011/18 que excede em aproximadamente 75% na concentração de metribuzin, os demais encontram-se todos dentro do limite de contaminação da empresa ou estão isentos de contaminantes.

Isso mostra o comprometimento da empresa pela qualidade dos produtos que comercializa.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a metodologia analítica para análise de ametrina, metribuzin e tebutiuron em produto formulado à base de atrazina por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (FID) mostrou-se útil, versátil de baixo custo e confiável para a detecção dos herbicidas ametrina, metribuzin e tebutiuron. A metodologia apresenta excelentes valores de sinal/ruído, LOQ e LOD, repetibilidade e linearidade para as análises dos herbicidas estudados.

Em relação aos resultados encontrados dos princípios ativos ametrina, metribuzin e tebutiuron em produto formulado à base de atrazina, pode-se concluir que o lote 011/18 do produto formulado à base de atrazina encontra-se com a concentração de metribuzin acima do limite de contaminação estabelecido em estudos agronômicos da empresa.

Considerando-se o princípio ativo ametrina todos os lotes do produto formulado à base de atrazina analisados encontram-se contaminados, porém com a concentração de ametrina encontra-se abaixo do limite estabelecido em estudos agronômicos da empresa.

Já para o princípio ativo tebutiuron todos os lotes do produto formulado à base de atrazina analisados, encontram-se isentos do princípio ativo, o que indica que não houve nenhuma contaminação cruzada por este ativo.

Dessa forma, os resultados obtidos mostram que, exceto pelo lote 011/18, a empresa mostra comprometimento pela qualidade dos produtos que comercializa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14029: Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016.

Biomedicina Brasil. Disponível em:

<<http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>>. Acesso em: 15 dez 2017.

CAPPELINI, L. T. D. **Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil em amostras de água do Ribeirão Feijão – São Carlos – SP**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.

CHASIN, A. A.; CHASIN, M.; SALVADOR, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 30, n.2, p. 49 – 53, 1994.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COLLINS, C. H, BRAGA, G. B., BONATO, P. S., **Fundamentos de cromatográficos**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006, p. 219.

COLLINS, C. H, BRAGA, G. B., BONATO, P. S., **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

COLLINS, C. H. Precursores da cromatografia gás-sólido. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 4, p. 281-288, 2011.

COLLINS, C. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 07-20, 2009.

DA SILVA, C. R. G. Z. A Gestão Ambiental em Exercícios de Artilharia: o Gerenciamento e a Minimização dos Impactos Ambientais Decorrentes de Exercícios de Artilharia. **Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia-Seget**, 2011.

DIAS, J. M. S. **Implementação e validação de um método cromatográfico para a detecção e quantificação de furano em feijão enlatado**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 46p.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. 64p.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**, v. 35, n. 12, p. 1358, 1941.

McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**, 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 239p.

MUHLEN, C. V. et al. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Química nova**. São Paulo. Vol. 29, n. 4 (jul./ago. 2006), p. 765-775, 2006.

NIST – Livro de química na web. Disponível em:
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=34014-18-1>

OLIVEIRA, J. P. R. **Estudo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) em regiões industriais da Grande São Paulo-via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e captura de elétrons (GC-ECD)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 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. 371, 2000.

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

SANTOS, G. R. **Características, sistema de registros de produtos e concorrência no mercado de agrotóxicos no Brasil**. 2012, p. 14.

SILVA, C. M. **Minimização da geração de resíduos líquidos através da mudança de metodologia cromatográfica para determinação de deslizantes em polipropileno**. 2010.

SILVA, D. D. et al. Avaliação da seletividade de uma nova coluna capilar em cromatografia gasosa–teste de Grob e índice de retenção. **Revista Analytica**, n. 17, p. 40-47, 2005.

SILVA, D. D. et al. Quantificação do linalol no óleo essencial da Aniba duckei korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Química Nova**, p. 461-465, 2003.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios da Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos, Regina Helena Porto Francisco. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

WELTER, S. Q. **Extração e quantificação de cafeína em energéticos através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ZAPPAROLI, A. R. **Método simplificado de extração e quantificação do herbicida tebuthiuron em solo sob diferentes sistemas de cultivo de cana-de-açúcar**. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Agronômica da UNESP – Campus de Botucatu, 2009.