



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA

CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

THAYNARA COUTINHO BARBOSA

**VALIDAÇÕES DE METODOLOGIAS EM CLAE PARA ANÁLISE DE
AZOXYSTROBIN E TEBUCONAZOLE EM PRODUTO AGROQUÍMICO E NOS
EFLUENTES GERADOS**

**FORTALEZA
2019**

THAYNARA COUTINHO BARBOSA

VALIDAÇÕES DE METODOLOGIAS EM CLAE PARA ANÁLISE DE AZOXYSTROBIN E TEBUCONAZOLE EM PRODUTO AGROQUÍMICO E NOS EFLUENTES GERADOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Orientador Pedagógico: Prof.º Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Orientador Profissional: MSc. Edilane de Sousa Gomes Rios.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B213v Barbosa, Thaynara Coutinho.
VALIDAÇÕES DE METODOLOGIAS EM CLAE PARA ANÁLISE DE AZOXYSTROBIN E
TEBUCONAZOLE EM PRODUTO AGROQUÍMICO E NOS EFLUENTES GERADOS / Thaynara
Coutinho Barbosa. – 2019.
88 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.
Coorientação: Profa. Ma. Edilane de Sousa Gomes Rios .

1. Cromatografia. 2. Agroquímicos. 3. Contaminação cruzada. I. Título.

CDD 540

THAYNARA COUTINHO BARBOSA

VALIDAÇÕES DE METODOLOGIAS EM CLAE PARA ANÁLISE DE AZOXYSTROBIN E TEBUCONAZOLE EM PRODUTO AGROQUÍMICO E NOS EFLUENTES GERADOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento. (Orientador pedagógico)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Edilane de Sousa Gomes Rios (Orientador profissional)

Prof^a Dr. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A todos aqueles que amo
e guardo no peito.

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente a Deus, por sua presença e por me manter firme em situações difíceis durante a minha vida. Obrigada por sempre me mostrar o melhor caminho e por colocar pessoas maravilhosas na minha vida.

Sou muito grata a todos meus familiares, em especial minha mãe, Maria das Graças, e meu pai, José Airton. Obrigada por me darem exemplo de determinação e força. Obrigada por todo o esforço feito para me dar sempre a melhor educação e as melhores condições vida. Sou grata por estarem sempre ao meu lado nessa longa trajetória da vida, me dando conselhos, me cobrando quando necessário e me suportando quando preciso.

Sou grata a todo o time do Laboratório de Desenvolvimento da empresa a qual faço parte por me acolherem na jornada profissional e por todos os ensinamentos, paciência e companheirismo. Em especial gostaria de agradecer ao Rodrigo Adamy por sempre acreditar no meu potencial e a Edilane Gomes por ter desenvolvido meu senso crítico na área analítica, me ensinado a ser uma profissional mais forte e, principalmente, pelo apoio e amizade durante esse período.

Gostaria de agradecer ao Matheus Barros por ter entrado na minha vida e ter se mostrado um grande companheiro durante esses anos. Obrigada por todo suporte emocional e por sempre acreditar em mim. Ter você ao meu lado trouxe uma enorme felicidade na minha vida.

A todos os meus amigos da graduação de química, Mateus Cajado, Robson Moreira, Letícia Xavier, Luiza Vitória, Vitória Dibo, Maria Luiza e Willyane Oliveira. Obrigada pela amizade, pelos choros e risadas compartilhadas durante esses 5 anos. Eu desejo a vocês todo o sucesso do mundo.

A todos os amigos que conquistei na vida. Em especial a Carla Aguiar, Mariana Lavigni e Thais Rodrigues por todos os momentos de colégio e de vida. Agradeço também a Gabrielle Régis e a Jennifer Cavalcante por terem entrado na minha vida e estado presente em momentos bons e ruins na minha vida pessoal e profissional. Eu tenho muito orgulho e certeza que levarei vocês pelo resto da minha vida.

Sou grata a todos os professores e mestres que tive antes e durante essa trajetória na Universidade Federal do Ceará. Obrigada a todos por dedicarem suas vidas a compartilhar o conhecimento. Em especial sou grata ao Professor Francisco Belmino por me mostrar que a Química Industrial era o meu caminho e por ser um exemplo de profissional apaixonado pelo ensino.

“Inteligência é a capacidade de se adequar à mudança”
Stephen Howking.

RESUMO

O crescente aumento populacional levou a necessidade de uma alta produção de alimentos no mundo. Dessa forma, para obter uma maior produtividade das terras cultiváveis, o uso de agroquímicos difundiu-se no mundo inteiro. Tendo o Brasil se tornado um dos maiores exportadores e produtores de alimentos no mundo, o uso destes produtos aumentou consideravelmente em pouco tempo e, com isso, a necessidade cada vez mais de métodos de análises para assegurar a qualidade dos produtos. A contaminação cruzada entre produtos agroquímicos oferece um dos maiores riscos na qualidade e eficiência em campo. A contaminação é algo que deve ser evitada em toda cadeia produtiva de agroquímicos, para isso são realizadas avaliações de risco e determinados níveis de concentração aceitáveis de um ingrediente ativo de um produto para o produto seguinte. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a técnica mais difundida para assegurar a qualidade de produtos agroquímicos. Dessa forma, métodos analíticos rápidos, sensíveis, precisos e exatos devem ser desenvolvidos para a determinação desses ingredientes ativos. Este estudo tem a finalidade de validar dois métodos de análises, em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector por Arranjo de Diodos, dos ingredientes ativos Azoxystrobin e Tebuconazole no produto agroquímico e nas amostras geradas na descontaminação da plantas produtivas, avaliando os parâmetros exigidos conforme a norma ABNT NBR 14029:2016, os quais são: seletividade, linearidade, exatidão e precisão. Os métodos propostos demonstraram ser específicos e seletivos para os ingredientes ativos e demonstraram linearidade na faixa de trabalho de 96–144 g L⁻¹ para Azoxystrobin e 128–192 g L⁻¹ para Tebuconazole no produto agroquímico e também de 1 - 9 ppm para Azoxystrobin e 5 – 250 ppm para Tebuconazole para os produtos das descontaminações. Os métodos propostos obtiveram níveis aceitáveis de recuperação e precisão para Azoxystrobin e Tebuconazole, demonstrando que os métodos são exatos e precisos conforme exige a norma.

Palavras-chaves: Cromatografia, Agroquímicos, Contaminação cruzada.

ABSTRACT

The ever-growing population has forced an equal growth on food production through the world. In this way, to obtain higher productivity rate on cultivated land, the use of agrochemicals spread worldwide. Having Brazil become the largest exporter of food products in the world, the use of this kind of products has increase drastically in a short time and, with that, the necessity of analytical methods to ensure the quality of these products. The cross contamination between agrochemicals products offers one of the biggest risks with quality and efficiency on the field. The cross contamination is something that must be avoid throughout all the supply chain of these products, for that, risk assessments are made and determine certain acceptable limits of contamination of an active ingredient (AI) from one product to the next one. High Performance Liquid Chromatography is the most widespread technique to ensure quality for agrochemicals. Thus, fast analytical methods, sensitive, precise and exact should be developed to determine the level of these IA. This study has the purpose to validate two analytical methods, on High Performance Liquid Chromatography coupled to a Diode Array detector, for the IA Azoxystrobin and Tebuconazole on the agrochemical product and in the samples generated during the decontamination of the production site, evaluating the required parameters according to ABNT NBR 14029:2016, which are: selectivity, linearity, accuracy and precision. The proposed methods demonstrate to be specific and selective for the AI and showed linearity in the working range of 96–144 g L⁻¹ to Azoxystrobin and 128–192 g L⁻¹ to Tebuconazole on the product and the range of 1 - 9 ppm to Azoxystrobin and 5 – 250 ppm to Tebuconazole for the decontamination products. The proposed methods achieved acceptable levels of recovery and precision to Azoxystrobin and Tebuconazole, demonstrating that the methods are accurate and exacts as required by the standard.

Key words: Chromatography, Agrochemicals, Cross contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Porcentagem das classes toxicológica dos agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para uso na agricultura brasileira.	24
Figura 2 - Classificação de acordo com as categorias listadas no Regulamento de Pesticidas (PR) Aviso 96-8, 31 de outubro de 1996 (US EPA PRN 96-8).	27
Figura 3– Esquema de formulação SE.....	32
Figura 4 – Processo de formulação e geração de efluente da formulação	32
Figura 5 – Fórmula estrutural do Azoxystrobin	33
Figura 6 - Uso agrícola nas culturas autorizadas para Azoxytrobin e respectivos LMR.....	33
Figura 7 - Fórmula estrutural Tebuconazole	34
Figura 8 - Uso agrícola nas culturas autorizadas para Tebuconazole e respectivos LMR.....	34
Figura 9 - Esquema de um cromatógrafo a líquido.	36
Figura 10 – Funcionamento do detector DAD	39
Figura 11 - Cromatograma do branco dos reagentes da validação de método para o produto formulado	60
Figura 12 - Cromatograma do branco da amostra da validação de método para o produto formulado	61
Figura 13 - Comparação entre injeção do padrão e do branco da amostra na validação do produto formulado	61
Figura 14 - - Curva de calibração do Azoxystrobin para o produto formulado	62
Figura 15 - Curva de calibração do Tebuconazole para o produto formulado	62
Figura 16 - Cromatograma da recuperação inferior 80 % da validação do produto formulado	64
Figura 17 - Cromatograma da recuperação nominal 100 % da validação do produto formulado	64
Figura 18 - Cromatograma da recuperação superior 120% da validação do produto formulado	64
Figura 19 - Cromatograma do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto formulado	66
Figura 20 - Cromatograma do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto formulado	68

Figura 21 - Cromatograma do branco dos reagentes (acetonitrila) na validação da descontaminação – 210 nm.	70
Figura 22 - Cromatograma do branco da amostra do tanque SE (água) na validação da descontaminação – 210nm.	70
Figura 23 - Cromatograma do branco da amostra do tanque EC (solvente orgânico) na validação da descontaminação – 225 nm.	70
Figura 24 - Sobreposição dos pontos da curva de calibração do Azoxystrobin na validação da descontaminação (210nm).....	71
Figura 25 - Curva de calibração do Azoxystrobin para a validação da descontaminação – 210 nm	72
Figura 26 - Curva de calibração do Tebuconazole de 5 a 500 ppm.....	72
Figura 27 - Curva de calibração do Tebuconazole de 5 ppm a 100 ppm – 210nm	73
Figura 28 - Sobreposição dos pontos da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação - 210nm.....	73
Figura 29 - Curva de calibração do Tebuconazole de 5 ppm a 100 ppm – 225 nm	74
Figura 30 - Cromatograma da repetitividade da validação para o produto da descontaminação do tanque SE.....	77
Figura 31 - Cromatograma da repetitividade da validação para o produto da descontaminação do tanque EC	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área plantada, média de uso por hectare e total de agrotóxicos por tipo de lavoura no Brasil, 2015.....	20
Tabela 2 - Limites aceitados de I.A. pela Portaria N°45, Artigo 11°	21
Tabela 3 - Recuperação aceitas de acordo com a ABNT NBR 14029:2016.....	41
Tabela 4 - Valores críticos (Gc).....	46
Tabela 5 - Relação dos tanques com os limites dos Ingredientes Ativos e solventes de descontaminação	48
Tabela 6 - Diluição do padrão do Ingrediente Ativo Azoxystrobin para a validação do produto formulado	51
Tabela 7 - Diluição do padrão do Ingrediente Ativo Tebuconazole.....	51
Tabela 8 - Volumes da recuperação do Azoxystrobin na validação do produto final	53
Tabela 9 - Volumes da recuperação do Tebuconazole para a validação do produto formulado.	53
Tabela 10 - Diluição do padrão Azoxystrobin para a curva de calibração da descontaminação	55
Tabela 11 - Diluição do padrão Tebuconazole para a curva de calibração da descontaminação	56
Tabela 12 - Volumes da recuperação do Azoxystrobin para a descontaminação.....	57
Tabela 13 - Volumes da recuperação do Tebuconazole para a descontaminação do tanque EC.	58
Tabela 14 - Sequência de injeção da validação da descontaminação no cromatógrafo.....	59
Tabela 15 - Resultados da adequação de sistema	60
Tabela 16 - Dados da curva de calibração do Azoxystrobin na validação do produto formulado	62
Tabela 17- Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação do produto final	63
Tabela 18 - Dados da exatidão na validação do produto formulado	63
Tabela 19 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação do produto formulado	65
Tabela 20 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto final para o ativo Azoxystrobin.....	66

Tabela 21 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto final para o ativo Tebuconazole	66
Tabela 22 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação do produto final	67
Tabela 23 - Dados do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto final para o ativo Azoxystrobin.....	68
Tabela 24 - Dados do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto final para o ativo Tebuconazole	68
Tabela 25 - Resumo da validação do produto formulado	69
Tabela 26 - Dados da curva de calibração do Azoxystrobin na validação da descontaminação	72
Tabela 27 - Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação – 210 nm.....	73
Tabela 28 - Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação – 225 nm.....	74
Tabela 29 - Resultados da recuperação da amostra do tanque SE.....	75
Tabela 30 - Resultados da recuperação da amostra do tanque EC.	76
Tabela 31 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação da descontaminação produto do tanque SE	76
Tabela 32 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Azoxystrobin	77
Tabela 33 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Tebuconazole.....	78
Tabela 34 - Teste G para valores dispersos no ensaio de precisão intermediária na validação da descontaminação produto do tanque SE	78
Tabela 35 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Azoxystrobin	79
Tabela 36 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Tebuconazole.....	79
Tabela 37 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação da descontaminação produto do tanque EC	80
Tabela 38 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque EC para o ativo Tebuconazole	81

Tabela 39 - Teste G para valores dispersos no ensaio de precisão intermediária na validação da descontaminação produto do tanque EC	81
Tabela 40 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque EC para o ativo Tebuconazole	82
Tabela 41 - Resumo da validação do método da descontaminação do produto	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agroquímicos	23
Quadro 2 - Principais Tipos de Formulações de Agroquímicos.....	25
Quadro 3 - Parâmetros de validação de acordo com a ABNT NBR 14029	39
Quadro 4 - Critérios de aceitação	46
Quadro 5 -Condições cromatográficas para a validação do produto formulado	49
Quadro 6 - Sequência de injeção da validação do produto formulado no cromatógrafo	54
Quadro 7 - Condições cromatográficas para a validação da descontaminação	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACL	<i>Acceptable Contamination Levels</i>
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
MAPA	Ministério DA Agricultura, Pecuária e Abastecimento
IBAMA	O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
WP	Pó Molhável
EC	Concentrado Emulsionável
SC	Suspensão Concentrada
DP	Pó Seco
GR	Granulados
UBV	Ultra Baixo Volume
IA	Ingrediente Ativo
LMR	Limite Máximo de Resíduo
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
ONU	Organização das Nações Unidas
OMS	Organização Mundial da Saúde
DL50	Dose Letal Mediana
PR	Regulamento de Pesticidas
EPA	<i>European Environment Agency</i>
UNA	Uso Não Alimentício
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
UV-Vis	UltraVioleta-Visível
DAD	Detector de Araste de Diodo
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
DPR	Desvio-Padrão Relativo
S/R	Sinal/Ruído
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Importância dos Defensivos Agrícolas.....	19
1.2	Legislações e Órgãos Regulamentadores	21
1.3	Defensivos Agrícolas: Definições, Classificações e Formulações.	22
1.3.1	Definições.....	22
1.3.2	Classificações	23
1.3.3	Formulações	24
1.4	Prevenção à Contaminação	25
1.4.1	Níveis de Limpeza	26
1.4.2	Cálculo da ACL de fungicidas	28
1.4.3	Análise de impurezas residuais	31
1.5	Amostra em análise	31
1.5.1	Tipo de formulação	31
1.5.2	Ingrediente ativo: Azoxystrobin	33
1.5.3	Ingrediente ativo: Tebuconazole	34
1.5.4	Níveis de limpeza	35
1.6	Cromatografia	35
1.6.1	Introdução.....	35
1.6.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	36
1.7	Validação de Método Analítico	39
1.7.1	Seletividade	40
1.7.2	Linearidade.....	40
1.7.3	Exatidão.....	41
1.7.4	Limite de Detecção (LD)	42
1.7.5	Limite de Quantificação (LQ)	42
1.7.6	Precisão	43
1.7.7	Cálculos.....	44
1.7.8	Critério de aceitação	46
2	OBJETIVOS.....	47
2.1	Objetivo geral.....	47
2.2	Objetivos específicos.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Amostra em análise	48
3.2	Lavagem das vidrarias para as validações de métodos	48
3.3	Instrumentação	48
3.4	Validação de método do produto formulado	49
3.4.1	Parâmetros cromatográficos	49
3.4.2	Preparo da fase móvel.....	50

3.4.3	Preparo das soluções	50
3.5	Validação de método para a descontaminação	54
3.5.1	Parâmetros cromatográficos	54
3.5.2	Preparo da fase móvel	55
3.5.3	Preparo das soluções	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Validação de método do produto formulado	60
4.1.1	Adequação do sistema.....	60
4.1.2	Seletividade e especificidade.....	60
4.1.3	Linearidade.....	61
4.1.4	Exatidão.....	63
4.1.5	Precisão	64
4.1.6	Resumo da validação de método do produto formulado.....	69
4.2	Validação de método para a descontaminação	69
4.2.1	Seletividade e especificidade.....	69
4.2.2	Linearidade.....	71
4.2.3	Exatidão.....	74
4.2.4	Precisão	76
4.2.5	Resumo da validação de método da descontaminação	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
6	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos Defensivos Agrícolas

Defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas, produtos fitossanitários, remédios ou veneno. Estas são algumas das denominações que os agrotóxicos já tiveram no passado e que hoje, dependendo do grupo (ou grupos) de interesse, são utilizadas para conferir um carácter negativo ou positivo ao tema. Este grupo de substâncias são utilizadas para o controle de pragas (animais e vegetais), doenças de plantas, para combater vetores de doenças em campanhas sanitárias e também nas pastagens para a pecuária (PERES, MOREIRA e DUBOIS, 2003).

Existem relatos que, desde a antiguidade, o homem já lidava contra pragas que afetavam as lavouras e transmitiam doenças. Destaca-se o uso do arsênio na Idade Média, assim como a utilização de compostos orgânicos, como a nicotina com a finalidade de atuar como inseticida na Europa e nos Estados Unidos (GONÇALVES, 2004) e (GASPARIN, 2005).

O crescente aumento populacional aliado ao desenvolvimento agrícola levou o homem a estocar grãos e à criar animais domésticos. Os campos cultiváveis, entretanto, tornaram-se suscetíveis a ataques de roedores, insetos, fungos e bactérias, devido à grande quantidade de alimentos, colocando em risco a saúde e o bem-estar das pessoas (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012). O controle das pragas, como são conhecidas até os dias atuais, foi o principal motivo para o desenvolvimento crescente dos agrotóxicos ao longo dos anos, cujos produtos/moléculas estão cada vez mais eficazes e seletivos, assim como menos persistentes nos alimentos em que são aplicados e no meio ambiente (NUNES e RIBEIRO, 1999).

Atualmente o Brasil é o terceiro maior exportador de alimentos no mundo. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no ano de 2017 o país teve uma produção recorde de 237,6 milhões de toneladas para 61,0 milhões de hectares de área plantada (MAPA, 2018). Em 2017 o Produto Interno Bruto totalizou R\$ 6.559,9 bilhões, sendo R\$ 5.648,6 bilhões referentes ao valor adicionado a preços básicos. No mesmo ano de 2017, a agropecuária registrou R\$ 299,5 bilhões, representando 5,3% do total do PIB, considerando o valor adicionado a preços básicos (IBGE, 2017).

É incontestável a importância da agricultura para o Brasil. De acordo com a Projeção do Agronegócio para o Brasil em 2017/2018 a 2027/2028 (MAPA, 2018, p. 82), “A produção de grãos deverá passar de 232,6 milhões de toneladas em 2017/2018 para 302 milhões de toneladas em 2027/28. Isso indica um acréscimo de 69 milhões de toneladas à produção atual do Brasil.”. Esse avanço exigirá um esforço de crescimento que deve consistir em infraestrutura, investimento em pesquisa e financiamento (MAPA, 2018).

Para Bombardi (2012) a alta produtividade agrícola do agronegócio brasileiro é responsável, em termos totais, pelo maior consumo de agrotóxicos, de modo que os cultivos de soja, milho e cana, juntos, respondem por praticamente 70% de todo seu uso no Brasil. Já para Pignati (2017), estes três cultivos corresponderam a 82% de todo o volume de agrotóxicos utilizados no país no ano de 2015, indicando uma tendência de aumento do uso desses insumos nestas culturas. A tabela 1 abaixo expõe o consumo de agrotóxico em 2015 para cada tipo de lavoura.

Tabela 1 - Área plantada, média de uso por hectare e total de agrotóxicos por tipo de lavoura no Brasil, 2015.

Cultura agrícola	Área plantada (hectares)	Média de uso de agrotóxicos (litros/hectares)	Consumo de agrotóxicos (litros)
Soja	32.206.787	17,7	570.060.129,90
Milho	15.846.517	7,4	117.264.225,80
Cana-de-açúcar	10.161.622	4,8	48.775.785,60
Algodão	1.047.622	28,6	29.961.989,20
Trigo	2.490.115	10	24.901.150,00
Fumo	406.377	60	24.382.620,00
Arroz	2.162.178	10	21.621.780,00
Café	1.988.272	10	19.882.720,00
Cítricos	766.516	23	17.629.868,00
Feijão	3.130.036	5	15.650.180,00
Banana	484.430	10	4.844.300,00
Tomate	63.626	20	1.272.520,00
Uva	78.026	12	936.312,00
Girassol	111.843	7,4	827.638,20
Mamão	30.445	10	304.450,00
Melancia	97.910	3	293.730,00
Abacaxi	69.565	3	208.695,00
Manga	64.412	3	193.236,00
Melão	20.837	3	62.511,00
Total	71.227.136	-	899.073.840,70

(Fonte: IBGE-SIDRA; Pignati et al.)

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) órgão ligado a Organização das Nações Unidas (ONU), o Brasil aparece em 44º posição no ranking de países que utilizam as substâncias químicas. Segundo os dados da entidade, o consumo relativo no país foi de 4,31 quilos de defensivos por hectare cultivado em 2016. Quando avaliado o consumo em função da produção agrícola, o Brasil fica em 58º lugar, com o uso de 0,28 quilos de defensivos por tonelada de produto produzido (MAPA,2019).

O consumo de defensivos no Brasil é influenciado pelo clima tropical brasileiro, o qual favorece a proliferação de pragas e, conseqüentemente, a possibilidade de mais aplicação de defensivo agrícola em safra de inverno e safrinha, para não ocorrer a quebra do ciclo de reprodução. Diferente do que ocorre em países de clima temperado que em época de inverno as pragas são inativadas pelo frio (MAPA,2019).

1.2 Legislações e Órgãos Regulamentadores

Após a II guerra mundial houve uma rápida explosão no desenvolvimento e modernização da agricultura, a qual foi acompanhada do intensivo uso de insumos químicos, biológicos e mecânicos. Para a indústria de agrotóxicos no Brasil, foi de fundamental importância a criação em 1975 do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento, que proporcionou recursos financeiros para a criação de empresas nacionais e a instalação de subsidiárias de empresas transnacionais no Brasil. Além disso, a existência de um marco regulatório defasado e pouco rigoroso, baseado no Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal de 1934, facilitou o rápido registro de substâncias agrotóxicas, muitas delas já banidas pelas legislações de países desenvolvidos (PELAEZ, TERRA, SILVA, 2010).

O uso de agrotóxicos no Brasil é regido pela Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989 e conhecida como “Lei dos Agrotóxicos”, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002. De acordo com o seu Artigo 1º, esta lei versa sobre a:

“pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins” (BRASIL, 1989, art.1º).

A nova lei foi um grande avanço para a concessão de novos registros de agrotóxicos, pois as regras se tornaram mais rigorosas e a concessão exigirá a aprovação diante três órgãos: MAPA, IBAMA e ANVISA. Além disso, a nova legislação previu, de acordo com o Artigo 3º, a concessão do registro de novos agrotóxicos, caso “a ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente for comprovadamente igual ou menor do que a daqueles já registrados, para um mesmo fim”. Descrito no Artigo 5º, existe a possibilidade de impugnação ou cancelamento do registro por solicitação de entidades representativas da sociedade civil (BRASIL, 1989).

A portaria Nº45, de 10 de dezembro de 1990 determina, no Artigo 11º, que os limites aceitáveis de diferença entre a composição do produto formulado e o resultado da avaliação química, obedecerão ao que consta na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Limites aceitados de I.A. pela Portaria Nº45, Artigo 11º

Quantidade declarada do I.A. g/kg ou g/L do produto	Limites Aceitáveis de diferença	Valor declarado em g/Kg ou g/L de I.A.	Limites aceitáveis
500 ou mais	± 25 unidades	700	675 a 725
250 a 500	± 05%	400	380 a 420
100 a 250	± 06%	200	188 a 212
25 a 100	± 10%	80	72 a 88
0 a 25	± 15%	10	8,5 a 11,5

(Fonte: MAPA, 1990)

1.3 Defensivos Agrícolas: Definições, Classificações e Formulações.

1.3.1 Definições

Segundo definição descrita na Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos são produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Os agrotóxicos são também as substâncias e os produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos são compostos basicamente por um princípio ativo, ingredientes inertes e adjuvantes. Os princípios ativos ou ingredientes ativos são as substâncias químicas ou biológicas que dão a eficácia aos produtos, ou, segundo a definição do Decreto nº 4.074, artigo 1º, de 4 de janeiro de 2002, é a “substância, produto ou agente resultante de processos de natureza química, física ou biológica, empregados para conferir eficácia aos agrotóxicos e afins”(BRASIL, 2002, Art. 1º). Os ingredientes inertes são as substâncias utilizadas como diluentes ou veículos para os princípios ativos de uma formulação agroquímica. Podem ser dos mais diversos tipos como, por exemplo, talco, apatita, bentonita, calcita, argila calcinada, enxofre, dolomita, diluentes vegetais como polpas, farinhas, etc (SILVA, 2005).

Adjuvantes são substâncias usadas para imprimir as características desejadas às formulações. De acordo com Silva (2015), os principais adjuvantes são:

- a) emulsificantes: substâncias utilizadas para estabilizar uma emulsão, que diminuem a tensão interfacial entre as duas fases líquidas;
- b) agentes umectantes: tem a função de molhar, umedecer, com a substância que se dilui;
- c) dispersantes: separar, espalhar, fazer ir para diferentes partes;
- d) espalhantes adesivos: diminuem a tensão superficial das gotículas, diminuindo o ângulo de contato das gotas com a superfície e, conseqüentemente, aumentando a superfície molhada comum mesmo volume; ao mesmo tempo promovem a aderência, cola, união do produto ao alvo desejado;
- e) desodorizantes: ou desodorantes, servem para tirar o odor, ou o mau odor;
- f) estabilizantes: tornam estável uma solução;
- g) antiespumantes: impedem a formação excessiva de espuma na calda;

- h) surfactantes: substâncias que alteram as propriedades da superfície de um líquido ou da interface de um sólido e de um líquido, para que não reste nenhuma área sem molhamento;
- i) corantes: servem para detectar a presença do produto tóxico.

1.3.2 Classificações

1.3.2.1 Conforme Organismo Alvo

Existem diferentes formas de classificar os agroquímicos. De acordo com Karam, et al (2015), estes produtos podem ser classificados de acordo com o seu organismo alvo:

- Inseticidas: Os quais possuem ação de combate a insetos, larvas e formigas;
- Fungicidas: Os que atuam no combate a fungos;
- Herbicidas: Os quais apresentam ação sobre plantas invasoras;
- Raticidas: Os quais são utilizados no combate de roedores;
- Acaricidas: Os quais têm ação sobre diferentes ácaros;
- Nematicidas: Os quais agem no controle de nematoides;
- Fumigantes: Os quais utilizados no controle de pragas e bactérias;
- Moluscicidas: Os quais são produtos para o combate de moluscos;

1.3.2.2 Conforme sua toxicidade

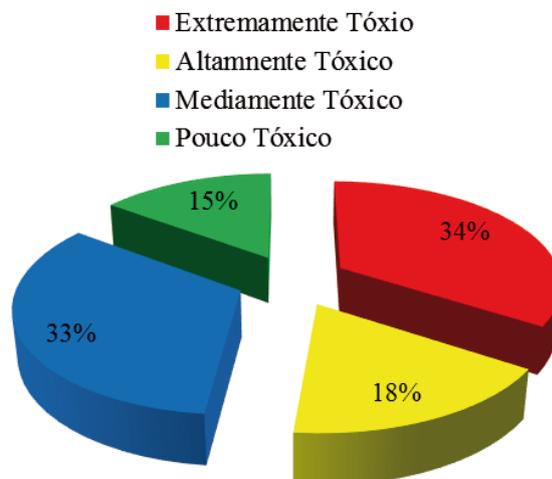
Os agrotóxicos são classificados pela Anvisa de acordo com sua toxicidade do ponto de vista dos seus efeitos agudos. Para o Ministério da Saúde, os produtos são baseados na DL50 oral das formulações líquidas e sólidas. Já para a Organização Mundial da Saúde – OMS, a classificação toxicológica do agrotóxico é baseada na DL50 em ratos, oral e dérmica, por mg/kg de peso, das formulações líquidas e sólidas. No quadro 1 abaixo pode-se observar as classificações adotadas para cada DL50 e as faixas coloridas indicativa de sua classe toxicológica que devem estar presentes nos rótulos.

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agroquímicos				
GRUPOS	DL50 (mg/Kg)	DOSE CAPAZ DE MATAR UMA PESSOA ADULTA	CLASSIFICAÇÃO MS PRODUTO COMERCIAL	
Extremamente Tóxico	<5	1 pitada/algumas gotas	Classe I	Faixa Vermelha
Altamente Tóxico	5-50	Algumas gotas/1 colher de chá	Classe II	Faixa Amarela
Medianamente Tóxico	50-500	1 colher de chá/2 colheres de sopa	Classe III	Faixa Azul
Pouco Tóxico	500-5000	2 colheres de sopa – um copo	Classe IV	Faixa Verde
Muito Pouco Tóxico	>5000	Um copo – um litro		

Fonte: (VELASCO e CAPANEMA, 2006)

Atualmente, no Brasil, 34% dos produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento são classificados como extremamente tóxicos e 18% como altamente tóxicos (Figura 1).

Figura 1- Porcentagem das classes toxicológica dos agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para uso na agricultura brasileira.



Fonte: (KARAM, SILVA, *et al.*, 2015).

1.3.3 Formulações

Para Lima e Sant'anna Jr. (2010, p. 47), “o processo de formulação de defensivos agrícolas está em contínua evolução, sempre buscando formas de melhorar a eficácia agrônômica e a segurança ao homem e ao meio ambiente, além de redução de custos para os agricultores e garantia de suprimento adequado ao mercado”. As formulações visam cada vez mais agregar novas tecnologias, mais qualidade e melhorar a segurança e o perfil ambiental dos produtos agroquímicos. As formulações são as principais vias e “sistema de entrega” para que os ingredientes ativos consigam atingir seu potencial total. Durante o desenvolvimento de produtos agroquímicos, a escolha certa do tipo de formulação ajuda a diminuir a sua toxicidade ao meio ambiente e a sua volatilidade (CROPLIFE, 2019).

As formulações podem ser do tipo de pré-misturas ou de pronto uso. As pré-mistura são formulações que necessitam ser diluídas (geralmente com água) até uma concentração adequada, no ato da aplicação. Por exemplo: Pó Molhável (WP), Concentrado Emulsionável (EC), Suspensão Concentrada (SC). Já formulações de pronto uso são formulações cujas concentrações já estão adequadas para aplicação em campo. Por exemplo: Pó Seco (DP), Granulados (GR) e Ultra Baixo Volume (UBV). Estas praticamente não são mais utilizadas devido à riscos de contaminação do ambiente (deriva) e segurança na aplicação (SILVA, 2005). O quadro 2 mostra alguns tipos de formulações presentes no mercado.

Quadro 2 - Principais Tipos de Formulações de Agroquímicos

Estado Físico	Tipo	Sigla	Descrição resumida
Líquidas	Líquido solúvel	SL	O ingrediente ativo (IA) é dissolvido em água ou em solvente orgânico miscível em água.
	Concentrado emulsionável	EC	O IA é dissolvido em um solvente orgânico apolar. A formulação contém aditivos que garantem a emulsificação do produto no momento da aplicação.
	Suspensão concentrada	SC	O IA é praticamente insolúvel no solvente utilizado como diluente. No processo de formulação, o IA é moído já disperso no diluente. O produto é estabilizado pela ação de agentes dispersantes, umectantes, espessantes, anticongelantes e biocidas.
	Emulsão	EO e EW	A formulação é composta de duas fases, uma fase aquosa e outra orgânica, estabilizadas em uma única fase pela ação de agentes emulsificantes. Estas podem ser de dois tipos: diluente em água (EW) e diluente orgânico (EO).
	Suspo-emulsão	SE	A formulação contém partículas sólidas e líquidas em suspensão no meio diluente. É estabilizada pela ação de aditivos.
Sólidas	Pós solúveis	SP	O IA é solúvel em água.
	Pós molháveis	WP	O IA é insolúvel em água. Aditivos garantem a umectação do produto no momento da aplicação.
	Grânulos dispersíveis	WG	Formulação granulada com altos teores de ingrediente ativo. Contém agentes dispersantes que garantem a dispersão no momento da aplicação do produto.

(Fonte: Adaptada de http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/9960/9960_2.PDF – PUC-Rio - N°0511081/CA.)

1.4 Prevenção à Contaminação

Uma prática comum entre empresas formuladoras de defensivos agrícolas é o planejamento do uso de equipamentos e unidades de produção para mais de um produto formulado, visto que é inviável a segregação de uma unidade de produção para um só produto, dado ao portfólio diversificado das empresas agroquímicas. As vendas sazonais, que vai de acordo com as necessidades dos clientes e do campo, permitem que haja a rotatividade entre a produção de produtos durante o ano.

No entanto, é de extrema importância que ocorra a devida descontaminação das linhas produtivas entre cada produção. Sem um controle cuidadoso, a contaminação por ingredientes ativos previamente presentes nos equipamentos pode ocorrer e possivelmente causar efeitos adversos em culturas sensíveis e tratadas ou em espécies não alvo, como por exemplo fitotoxicidade (CROPLIFE, 2019).

Uma política de prevenção a contaminação deve ser seguida à risca dentro de toda empresa que produza defensivos agrícolas para diminuir os riscos de contaminação cruzada. De acordo com a Croplife (2015, p.30) existem alguns requisitos gerais que os fabricantes devem seguir:

- Avaliações de risco de prevenção de contaminação documentadas devem ser conduzidas.
- Os níveis de limpeza devem ser definidos.

- Os produtos não herbicidas não devem ser fabricados nos mesmos equipamentos que os herbicidas, isto é, a separação de unidades de fabricação deve ser garantida. Isso se aplica a todas as operações de síntese, formulação, envase e embalagem. Uma exceção a essa regra somente pode ser permitida quando uma verificação rigorosa da limpeza for confirmada e houver uma aprovação documentada da alta administração.
- O manuseio de matérias-primas deve ser avaliado com o objetivo de minimizar o risco de uso de matérias-primas em comum para herbicidas e não herbicidas.
- Equipamentos portáteis móveis (aspiradores a vácuo, mangueiras flexíveis, bombas, ferramentas, etc.) devem ser dedicados às áreas de herbicidas ou não herbicidas [...];
- Recipientes recarregáveis (IBCs, ISOs, *Big Bags*, caminhões ferroviários, etc.) devem ser tratados da mesma maneira que os equipamentos químicos quando entram em contato com produtos.
- A reciclagem e o retrabalho devem ser administrados no sentido de se minimizar riscos de contaminação cruzada.
- Todos os materiais devem ser clara e devidamente rotulados, incluindo, entre outros: matérias-primas, intermediários, formulações a granel, produtos acabados, retrabalho, reciclados e resíduos [...].
- Procedimentos de limpeza eficazes e métodos analíticos validados devem estar disponíveis para analisar resíduos em líquidos de lavagem (enxágue) e/ou no produto subsequente.
- Uma operação de limpeza deve ser executada logo que possível após a produção ter parado, não apenas na troca de um produto para o próximo, mas também se o equipamento for deixado inativo [...]. Isso se aplica a todos os equipamentos de síntese, formulação, envase e embalagem.

1.4.1 Níveis de Limpeza

O nível de limpeza exigido para uma troca de produto em uma mesma planta produtiva é o principal indicativo de risco envolvido, 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, para se alcançar os níveis mais baixos de limpeza exigidos, é necessário mais mão de obra, tempo de parada, custos elevados de limpeza e maiores necessidades de disposição de resíduos (CROPLIFE, 2015).

De acordo com a Croplife (2015, p. 28),

O objetivo da definição de níveis de limpeza em instalações de fabricação multifuncionais é assegurar que, após as operações de limpeza para uma troca de produto, o produto subsequente possa ser usado de modo seguro em todas as culturas para as quais esteja registrado, sem risco de apresentar efeitos adversos causados por impurezas residuais de produtos precedentes.

Deve-se levar em consideração alguns fatores ao calcular os níveis de limpeza, como a categoria do produto (herbicida, fungicida ou inseticida), os requisitos legais de cada região, a toxicidade em culturas não alvos e organismos não alvos, a taxa e número de aplicações e os fatores de segurança, os quais estes são determinados por cada empresa para mitigar ainda mais os riscos (CROPLIFE, 2019).

De acordo com a Croplife (2019), para calcular os níveis aceitáveis de contaminação ou ACLs (sigla da palavra em inglês *Acceptable Contamination Levels*), algumas informações são necessárias:

- Para ingrediente ativo de qualquer herbicida é necessário ter conhecimento dos níveis de efeito não observável (NOELs em sigla inglês). Os dados de NOEL para herbicidas não são disponíveis na literatura científica e normalmente são gerados nas estufas da empresa que originalmente descobriram o ingrediente ativo. O NOEL geralmente não é necessário para fungicidas e inseticidas.
- As vazões máximas de aplicação do produto seguinte em todas as culturas que ele foi Registrado e o número de aplicações por estação de cultivo.
- Classificação de acordo com as categorias listadas no Regulamento de Pesticidas (PR) Aviso 96-8, 31 de outubro de 1996 (US EPA PRN 96-8) demonstrado na figura 2.
- Para o cálculo da ACLs para inseticidas é necessário ter o DL50 (abelha).
- A região geográfica onde o produto está registrado para cobrir os requerimentos legais.

Figura 2 - Classificação de acordo com as categorias listadas no Regulamento de Pesticidas (PR) Aviso 96-8, 31 de outubro de 1996 (US EPA PRN 96-8).

Categoria	Tipo de contaminante	Tipo de pesticida contaminado	Nível Toxicologicamente Significativo (3) (ppm)(4)
1	Inseticida (5), fungicida, moluscicida ou nematocida em...	Qualquer inseticida, fungicida, moluscicida, nematocida, herbicida, regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante.	1000
2	Herbicida, regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante em...	Qualquer pesticida (6) em que o contaminante seja aceito para uso em todos os locais onde o produto é rotulado.	1000
3	Qualquer pesticida (6) que não seja um herbicida de baixa taxa de aplicação (7) em...	Qualquer pesticida antimicrobiano.	1000
4	Herbicida de taxa normal (8), regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante em...	Qualquer herbicida, regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante.	250
5	Qualquer pesticida (6) em...	Um pesticida (6) aplicado no corpo humano.	100
6	Herbicida de taxa normal, regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante em...	Qualquer inseticida, fungicida, moluscicida ou nematocida.	100

Figura 2 -(Continuação)

Categoria	Tipo de contaminante	Tipo de pesticida contaminado	Nível Toxicologicamente Significativo (3) (ppm)(4)
7	Herbicida de baixa taxa de aplicação em...	Um herbicida de baixa taxa de aplicação.	Nível de quantificação (9) ou 100 ppm, o que for mais alto.
8	Herbicida de baixa taxa de aplicação em...	Um herbicida de taxa normal, regulador de crescimento de plantas, desfolhante ou dessecante.	Nível de quantificação (9) ou 20 ppm, o que for mais alto
9	Herbicida de baixa taxa de aplicação em...	Um pesticida (6) que não seja herbicida, regulador de crescimento de planta, desfolhante ou dessecante.	Nível de quantificação (9) ou 1 ppm, o que for mais alto

Fonte: (CROPLIFE, 2015)

Notas:

- (1) Para os fins desta notificação, um contaminante é definido como um ingrediente ativo que não está na declaração confidencial da fórmula do produto, nem listado na discussão de impurezas;
- (2) [...]
- (3) Essa coluna apresenta o nível toxicologicamente significativo, isto é, a concentração na qual, ou acima da qual, a EPA considera o contaminante como toxicologicamente significativo.
- (4) A concentração é determinada em ppm com base na proporção entre a massa do contaminante e a massa do produto formulado.
- (5) A definição de insetos da FIFRA inclui ácaros e outros artrópodes que não são classificados pela nomenclatura científica como “insetos”. Ver FIFRA Seção 2(o).
- (6) As expressões “qualquer pesticida” e “um pesticida” não incluem os pesticidas que estão especificamente isentos desta notificação, conforme descrito na Nota 2 acima.
- (7) Para os fins desta notificação, um herbicida de baixa taxa de aplicação é definido como aquele com uma taxa máxima de aplicação de AI identificada no rótulo menor ou igual a 0.5 libra AI/acre (560 g AI/ha). Esta definição incluir produtos com AIs que são inibidores de aminoácidos ou inibidores de ALS, incluindo, entre outros, sulfonilureias, imidazolinonas e triazolopirimidinas.
- (8) Para os fins desta notificação, um herbicida de taxa normal é definido como um aquele com uma taxa de aplicação máxima de AI identificada no rótulo maior que 0.5 libra AI/ acre (560 g AI/ha).
- (9) Para fins desta notificação, o nível de quantificação é aquele que pode ser obtido pela EPA ou seu representante designado (State Lead Agency) usando um método analítico adequados fins de aplicação da norma no momento em que a análise é executada.

1.4.2 Cálculo da ACL de fungicidas

Os fungicidas foliares e os fungicidas foliares sistêmicos são tipicamente registrados em muitas culturas e normalmente não causam fitotoxicidade em produtos subsequentes, desde que sejam aplicados como spray foliar, de acordo com as diretrizes no rótulo do produto seguinte. Na maioria dos casos, é considerado seguro usar o valor padrão <1000 ppm listado para a categoria 1 do US EPA PRN 96-8 na figura 2 (CROPLIFE, 2019).

De acordo com a Croplife (2019) alguns pontos críticos devem ser levados em consideração durante o planejamento da produção:

- Ingredientes ativos e formulações coloridas (geralmente formulações de tratamento de sementes ou FS) geralmente requerem limpeza muito abaixo da ACL biologicamente determinada para atender aos padrões de cores especificados para o produto subsequente.
- Em casos de sequência de uma formulação aquosa para uma formulação a base de solvente orgânico ou vice-versa é necessário a remoção completa do solvente usado para formular o produto anterior.
- Alguns fungicidas azólicos podem causar fitotoxicidade nas mudas ou falha na germinação quando contaminam fungicidas e inseticidas do tratamento de sementes em ACLs consideráveis abaixo dos valores listados na US EPA PRN 96-8 na figura 2.

Fatores devem ser levados em consideração nos casos em que o IA contaminante não esteja registrado na colheita-alvo na qual os produtos sucessivos estiverem registrados. Assim, os modelos de cálculo da ACL podem ser insuficientes para atingir esse requisito. De acordo com a Croplife (2019), os seguintes critérios devem ser levados em consideração para determinar as ACLs corretas para IAs não registradas:

- O limite máximo permitido de <1000 ppm para produtos que não são listados como ingredientes do produto seguinte nunca devem ser excedidos.
- Em casos de não existir dados de LMR (Limite Máximo de Resíduo) de um AI na colheita-alvo de um produto, em que este AI esteja como contaminante, e que esse IA não seja registrado para aquela colheita-alvo, deve-se ser seguido o LMR de 0,01ppm de acordo com o artigo 18°
- O LMR (Limite Máximo de Resíduo) de um IA não registrado para frutas, leguminosas, verduras e afins deve ser de 0,01 ppm (10 ppb). Estes casos se aplicam quanto for aplicado um produto agroquímico na plantação e existe um nível de contaminação com um IA o qual não existe registro para aquela colheita-alvo. Regulamento (CE) n° 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho (23 de fevereiro de 2005), Capítulo III, artigo 18
- O limite legal pode ser diferente em outras regiões geográficas. Como os LMRs não são normalmente estabelecidos para IAs em culturas que não devem ser tratadas com produtos baseados nesses AIs, um LMR padrão é considerado necessário pelas autoridades.

A única maneira de garantir o nível de resíduo de IAs não registradas em uma colheita seja ≤ 10 ppb, é "ajustando" o ACL do IA contaminante no produto aplicado nessa colheita durante a fabricação deste produto. Isso requer um cálculo específico para cada cultura e país.

Nestes casos, a ACL pode ser menor do que as ACLs necessárias para evitar fitotoxicidade ou outros efeitos adversos.

1.4.2.1 Calculation of ACLs for non-registered AIs

O cálculo da ACL de IAs não registradas é o seguinte (equação 1):

$$ACL \text{ [ppm]} = \frac{LL \times Yield \times 10^{-3}}{SF \times AR \times NRA \times LF \times DR} \quad (1)$$

Onde:

AR: Taxa máxima de aplicação única do produto seguinte [g FP/ha] ou [ml FP/ha].

ACL: Nível de Concentração Aceitável; ppm [mg de AI / kg ou L de produto formulado].

DR: Taxa de Dissipação (o valor padrão é 1 - sem dissipação, por exemplo, aplicações pós-colheita). A quantidade do produto aplicado está presente na colheita após a última aplicação, p. se diminuído para 20%, o DR é igual a 0,2. Supõe-se que o DR do produto e a impureza residual sejam idênticos.

LF: Fator de carga, é a parte do produto aplicado efetivamente capturada no produto.

Intervalo: 0,1 -1.

Exemplos:

Aplicação pós-colheita: LF = 1 (100% de contaminante pode ser encontrado em o produto).

Pré-fruto (aplicação antes da formação de qualquer fruto): LF = 0 (0%)

LL: limite legal (expresso em ppb), por exemplo União Europeia: 10 ppb (0,01 mg / kg).

NRA: Número de aplicações relevantes (o valor padrão é 1). O NRA é específico para o produto, cultura tratada e geografia. Depende do comportamento contaminante e físico-químico. Como pior cenário, todos os aplicativos são relevantes.

SF: Fator de segurança (o padrão é 1).

Rendimento: Rendimento médio / ha expresso em kg de produção / ha.

10⁻³: Fator de conversão (usado para converter de ppb para ppm).

Cada fabricante do produto define os valores de DR, LF, NRA e SF com base no risco política de gestão dessa empresa. Antes de qualquer primeira produção é necessário realizar uma avaliação de risco para determinar as ACLs apropriadas para cada produto e planta, levando em consideração os ativos utilizados em cada planta.

1.4.3 Análise de impurezas residuais

Para a Croplife (2015, p.74) é necessário que:

Os produtos fabricados não devem ser liberados antes que seja demonstrado que a concentração de impurezas residuais está abaixo do nível em que efeitos biológicos, toxicológicos e ecológicos indesejáveis ou problemas normativos podem ocorrer. Isso exige, além de níveis de limpeza específicos para cada troca de produto, procedimentos de amostragem, métodos analíticos e análises comprovados.

Um nível aceitável de concentração (ACL) é definido como a concentração dos resíduos do (s) ingrediente (s) ativo (s) do produto anterior no produto seguinte que não causa efeitos adversos, portanto, não se aplica aos efluentes de descontaminação do produto anterior. Portanto, os contaminantes são analisados preferencialmente no produto seguinte, mas também pode ser analisado no efluente de descontaminação no produto anterior. É importante ressaltar que a determinação do contaminante no efluente de descontaminação não garante automaticamente que o nível dos contaminantes do produto a seguir esteja sempre abaixo da ACL acordada, mesmo que o nível de limpeza seja alcançado no efluente de descontaminação (CROPLIFE, 2019).

É necessário o desenvolvimento de método analítico para a quantificação dos contaminantes no produto seguinte e / ou no último efluente de descontaminação. No Brasil a validação dos métodos para análise de impurezas se dar pela ABNT NBR 14029 - Agrotóxicos e afins — Validação de métodos analíticos.

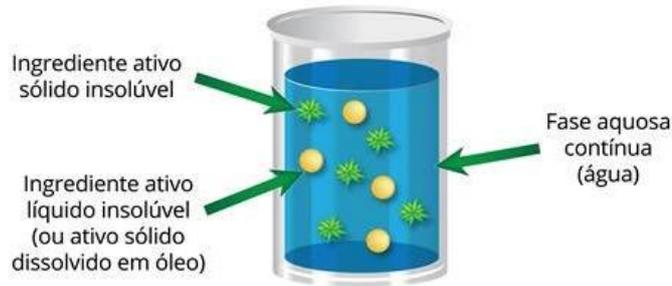
1.5 Amostra em análise

1.5.1 Tipo de formulação

A formulação em estudo por esse trabalho é uma formulação do tipo Suspoemulsão (SE), a qual combina dois ingredientes ativos (Azoxystrobin e Tebuconazole) com propriedades físicas diferentes. As formulações do tipo SE são formulações de combinação das tecnologias de suspensão concentrada (SC) e emulsão concentrada (EC). Esses tipos de formulações tem as vantagens de formular múltiplos ingredientes ativos juntos, aumentar o espectro de atividade e eliminar a desvantagem de incompatibilidade das misturas em tanque. A figura 3 mostra a mistura entre os dois tipo de formulações.

De acordo com a Croda (2019) é recomendável desenvolver as formulações SC e EC separadamente e, após a estabilização das duas, juntá-las. E ainda, para um boa estabilização desse tipo de formulação, é recomendável o uso de surfactantes poliméricos para dar melhor ancoragem e estabilização coloidal à mistura.

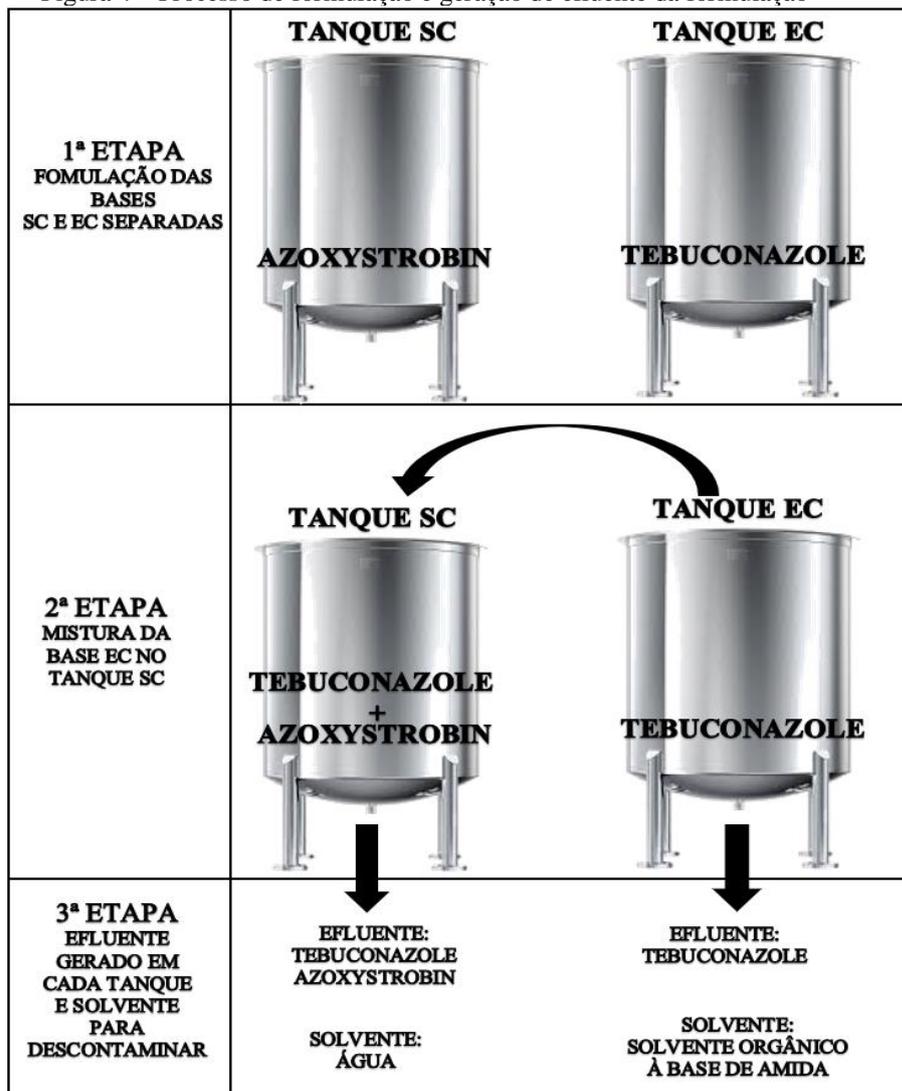
Figura 3– Esquema de formulação SE



(Fonte: Croda, 2019)

Para a formulação em nível industrial a base EC é formulada em tanque separado da base SC. Após a formulação das duas bases, ocorre a mistura no tanque SC. Para o processo de descontaminação dos dois tanques foi levado em consideração os contaminantes e os solventes para descontaminar esquematizados na figura 4 abaixo.

Figura 4 – Processo de formulação e geração de efluente da formulação



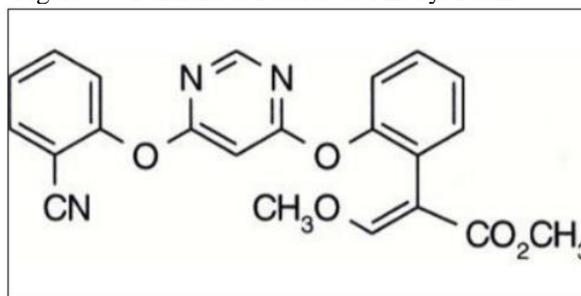
(Fonte:Autor, 2019)

1.5.2 Ingrediente ativo: Azoxystrobin

Segundo o índice monográfico para o Azoxystrobin disponibilizado pela Anvisa:

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: AZOXISTROBINA (azoxystrobin)
- b) N° CAS: 131860-33-8
- c) Nome químico: methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate
- b) Fórmula bruta: C₂₂H₁₇N₃O₅
- e) Grupo químico: Estrobilurina
- f) Classe: Fungicida
- g) Classificação toxicológica: Classe III (ANVISA, 2019)

Figura 5 – Fórmula estrutural do Azoxystrobin



(Fonte: ANVISA, 2019)

Figura 6 - Uso agrícola nas culturas autorizadas para Azoxystrobin e respectivos LMR

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)
Abacate ¹	Foliar	1,0	Citros	Foliar	0,5
Abóbora ¹	Foliar	0,5	Couve-flor	Foliar	0,5
Abobrinha ¹	Foliar	0,5	Crisântemo	Foliar	UNA
Alface	Foliar	1,0	Ervilha	Foliar	0,3
Algodão	Semente	0,1	Eucalipto	Foliar	UNA
	Foliar		Feijão	Foliar	0,1
Alho	Foliar	0,2	Figo	Foliar	1,0
Alstroeméria	Foliar	UNA	Gérbera	Foliar	UNA
Ameixa ¹	Foliar	1,0	Girassol	Foliar	0,1
Amendoim	Foliar	0,2	Goiaba	Foliar	0,2
Antúrio	Foliar		Kalanchoe	Foliar	UNA
Arroz	Foliar	0,7	Lisianthus	Foliar	UNA
Aveia	Foliar	1,0	Mamão	Foliar	0,3
Azaléia	Foliar	UNA	Manga	Foliar	0,4
Banana	Foliar	2,0	Maracujá ¹	Foliar	0,4
Batata	Foliar	0,1	Melancia	Foliar	0,05
Begônia	Foliar	UNA	Melão	Foliar	0,05
Berinjela	Foliar	0,05	Milho	Foliar	0,01
Beterraba	Foliar	0,2		Sementes	
Café	Foliar	0,05	Milheto ¹	Foliar	0,01
Caju ¹	Foliar	0,2	Morango	Foliar	0,3
Calandiva	Foliar	UNA	Nectarina ¹	Foliar	1,0
Cana-de-açúcar	Foliar		Pepino	Foliar	0,5
	Tratamento industrial de propágulos vegetativos (mudas) antes do plantio	0,5		Sulco de plantio	
			Pêssego	Foliar	1,0
Caqui ¹	Foliar	0,2	Pimentão	Foliar	0,5
Chalota ¹	Foliar	0,2	Rosa	Foliar	UNA
Cebola	Foliar	0,2	Soja	Foliar	0,5
Cenoura	Foliar	0,2	Sorgo ¹	Foliar	0,01
Centeio ¹	Foliar	0,1		Sementes	
Cevada	Foliar	0,6	Tomate	Foliar	0,5
			Trigo	Foliar	0,1
			Triticale ¹	Foliar	0,1
			Uva	Foliar	1,0

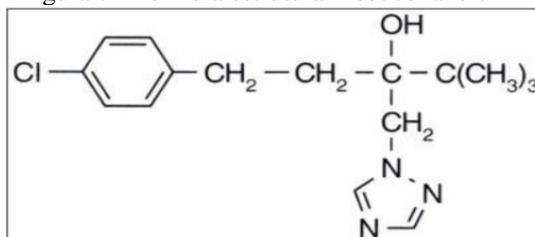
(Fonte: adaptado de ANVISA, 2019)

Nota: UNA = Uso Não Alimentar

1.5.3 Ingrediente ativo: Tebuconazole

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: TEBUCONAZOL (tebuconazole)
- b) Nº CAS: 107534-96-3
- c) Nome químico: (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
- d) Fórmula bruta: C₁₆H₂₂ClN₃O
- e) Grupo químico: Triazol
- f) Classe: Fungicida
- g) Classificação toxicológica: Classe IV (ANVISA, 2019)

Figura 7 - Fórmula estrutural Tebuconazole



(Fonte: ANVISA, 2019)

Figura 8 - Uso agrícola nas culturas autorizadas para Tebuconazole e respectivos LMR

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)
Abacaxi	Foliar	0,3	Gladíolo	Foliar	UNA
Abóbora ¹	Foliar	0,5	Goiaba	Foliar	0,1
Abobrinha ¹	Foliar	0,5	Gramados	Foliar	UNA
Acelga ¹	Foliar	3,5	Inhame	Foliar	0,3
Acerola ¹	Foliar	0,7	Jiló ¹	Foliar	0,2
Álamo	Foliar	UNA	Maçã	Foliar	0,1
Alface	Foliar	3,5	Mamão	Foliar	1,0
Algodão	Foliar	0,1		Imersão de Frutos	
Alho	Foliar	0,1	Mandioca ¹	Foliar	0,3
Almeirão ¹	Foliar	3,5	Mandioquinha-salsa ¹	Foliar	0,3
Ameixa ¹	Foliar	0,7	Manga	Foliar	0,1
Amendoim	Foliar	0,1		Imersão de Frutos	
Arroz	Foliar	1,0	Maracujá	Foliar	0,1
Aveia ¹	Foliar	0,1	Maxixe ¹	Foliar	0,5
Banana	Foliar	0,3	Melancia	Foliar	0,1
Batata	Foliar	0,1	Melão	Foliar	0,1
Berinjela ¹	Foliar	0,2		Imersão de Frutos	
Beterraba	Foliar	0,3	Milheto ¹	Foliar	0,1
Brócolis ¹	Foliar	2,0	Milho	Foliar	0,1
Cacau	Foliar	0,1	Morango	Foliar	0,7
Café	Foliar	0,2	Mostarda ¹	Foliar	3,5
Cana-de-açúcar	Foliar	0,2	Nabo ¹	Foliar	0,3
	Sulco de plantio				
Caqui	Foliar	0,2	Nectarina ¹	Foliar	0,7
Cebola	Foliar	0,1	Nêspera ¹	Foliar	0,7
Cenoura	Foliar	0,6	Pepino	Foliar	0,5
Centeio ¹	Foliar	0,1	Pera ¹	Foliar	0,7
Cevada ¹	Foliar	0,5	Pêssego	Foliar	0,7
Chalota ¹	Foliar	0,1	Pimentão	Foliar	0,2
Chicória ¹	Foliar	3,5	Rabanete ¹	Foliar	0,3
Chuchu ¹	Foliar	0,5	Repolho	Foliar	2,0
Citros	Foliar	5,0	Rosa	Foliar	UNA
Couve ¹	Foliar	2,0	Seriguela ¹	Foliar	0,7
Couve-de-bruxelas ¹	Foliar	2,0	Soja	Foliar	0,1
Couve-flor ¹	Foliar	2,0	Sorgo	Foliar	0,1
Cravo	Foliar	UNA	Tomate	Foliar	0,3
Crisântemo	Foliar	UNA	Trigo	Foliar	0,1
Eucalipto	Foliar	UNA		Sementes	
Feijão	Foliar	0,1	Triticale ¹	Foliar	0,1
Figo	Foliar	0,1	Uva	Foliar	2,0

(Fonte: adaptado de ANVISA, 2019)

Nota: UNA = Uso Não Alimentar

1.5.4 Níveis de limpeza

Durante o processo de descontaminação de ambos os tanques é levado em consideração o solvente apropriado para que haja a solubilização ou arraste do máximo de ingrediente ativo. Assim, para o tanque que foi produzido a base EC de Tebuconazole, foi utilizado um solvente orgânico à base de amidas. Para o tanque da base SC e do produto SE é padrão utilizar água.

Durante o *Risk Assessment* realizado, os níveis de limpeza aceitável (ACL) estipulado pela empresa para o tanque EC foi de 1000ppm de Tebuconazole. Para o tanque SC, visto que há a contaminação de Azoxystrobin, é padrão da empresa baixar o nível de limpeza aceitável (ACL) para 10ppm para o ativo Azoxystrobin, devido a estudos internos mostrarem que ele causa fitotoxicidade em maçãs. Outra medida para verificar e mitigar qualquer contaminação no produto seguinte é a análise em Cromatografia Líquida Acoplada a Detector Triplo Quadrupolo (LCMS/MS/MS) dos 3 primeiros lotes de produção do produto seguinte para o contaminante de Azoxystrobin, cujo limite aceitável para liberação foi estipulado 10ppm. Aliado a isso, é proibido a fabricação posterior ao produto em questão de qualquer produto cuja colheita-alvo seja maçã.

1.6 Cromatografia

1.6.1 Introdução

A cromatografia é um método físico-químico de separação de uma mistura de compostos, a qual depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase móvel e uma fase estacionária (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1997). A amostra é transportada pela fase móvel, a qual pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Ao ser forçada a passar pela fase estacionária fixa, que pode ser um líquido ou um sólido, os compostos se distribuem entre as duas fases dependendo das interações das moléculas com as mesmas. Os compostos que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente e, em contrapartida, os que menos interagem com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009)

Para Holler, Skoog e Crouch (2009) os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com:

- O meio físico que as fases estacionárias e móvel entram em contato, dividindo-se em cromatografia de coluna e cromatografia planar (camada fina ou papel);

- Quanto a natureza da fase móvel, dividida em: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) e cromatografia com fluido supercrítico (CFS).

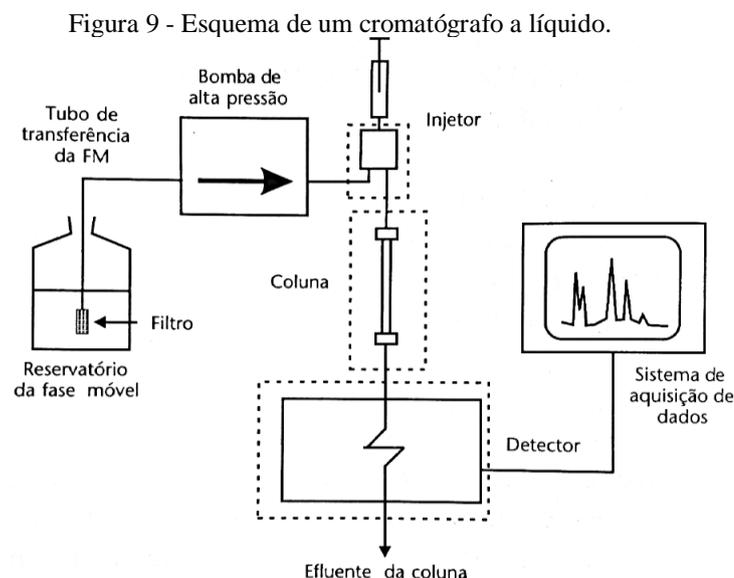
Para Harris (2012), a cromatografia pode ser classificada também pelo tipo de interação entre o soluto e a fase estacionária, podendo ser cromatografia: de adsorção, de partição. De troca iônica ou de exclusão molecular.

Neste trabalho iremos focar na Cromatografia Líquida de adsorção em coluna de fase reversa e detector de DAD.

1.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida é a mais utilizada de todas as técnicas analíticas de separação, de acordo com Holler, Skoog e Crouch (2009, p. 830) isso é devido “a sua detectabilidade, a sua pronta adaptabilidade às determinações quantitativas com exatidão, a sua adequação para a separação de compostos não-voláteis ou termicamente instáveis e, acima de tudo, a sua ampla aplicação a substâncias de grande interesse para a indústria [...]”

Na cromatografia líquida a fase móvel é constituída de um solvente líquido ou mistura de solventes que eluem a amostra dentro de uma coluna cilíndrica empacotadas com partículas porosas esféricas de tamanho muito pequeno, 3-10 μm , constituindo a fase estacionária. A fase móvel passa continuamente pela coluna, a uma pressão elevada e com um fluxo controlado. A utilização de pressões elevadas permite uma maior eficiência das análises e o uso de colunas com micropartículas permite uma elevada eficiência na separação dos compostos. (PORTO, 2014). O sistema cromatográfico da CLAE é composto por vários componentes, como mostrado na Figura 9:



(Fonte: COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006)

1.6.2.1 Reservatório da fase móvel

As fases móveis são normalmente reservadas em recipientes de vidro e captadas através de filtros na tubulação, afim de remover pequenas partículas que podem obstruir e estragar o sistema de bombeamento e a coluna. As fases móveis polares tem uma grande tendência de dissolver oxigênio e outros gases, portanto é recomendável que antes de serem utilizadas as fases móveis sejam filtradas em filtros de porosidades entre 5 à 0,25µm e colocadas sob a ação de ultra-som e/ou aquecimento. O processo de filtração é também eficiente para retirar pequenas partículas nas fases móveis (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1997) .

1.6.2.2 Bombas de alta pressão

O sistema de bombeamento tem a função de pressurizar a fase móvel do reservatório para dentro do cromatógrafo, a uma velocidade de fluxo constante e reprodutível. Um bom sistema de bombeamento é necessário para proporcionar uma vazão razoável e constante através da coluna para que a análise não seja lenta e não atrapalhe no sistema de detecção. (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1997)

As colunas para CLAE costumam ser de sílica com tamanho de partículas de 5 µm. Bombas capazes de gerar uma vazão com pressão acima de 400 bar são suficientes para uso em colunas CLAE entre 50 e 300mm de comprimento e com um diâmetro interno de 4,6 mm. (AGILENT, 2016)

1.6.2.3 Sistema de injetor de amostra

O sistema de injetor serve para inserir a amostra, previamente solubilizada na fase móvel, na coluna cromatográfica. É necessário que a amostra seja filtrada em filtros entre 0,45 - 0,25 µm após o seu preparo, para que não haja entupimento do injetor e evitar bolhas de ar. (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

1.6.2.4 Coluna Cromatográfica e forno

As colunas cromatográficas são compostas de material específicos que compõe a fase estacionária, a qual depende do tipo de interação desejada entre a fase móvel, a fase estacionária e os compostos em análise. Geralmente as colunas para a CLAE apresentam comprimento na faixa de 5 a 25 cm, diâmetro interno entre 3 a 5mm e tamanho de partícula de recheio de 3 a 5 µm. As mais comuns possuem 10 ou 15cm de comprimento, 4,6mm de diâmetro interno e são recheadas com partículas de 5 µm. Esses tipos de colunas geralmente fornecem 10.000 pratos

teóricos. O forno da coluna é onde está é mantida a uma temperatura constante definida, funcionando como uma câmara termostática. (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

1.6.2.5 Detector

O detector tem a função de visualizar a separação dos componentes eluidos da coluna e enviar o sinal a um sistema de recolha de dados. Os detectores por absorbância no ultravioleta (UV) e no visível (VIS) são amplamente utilizados devido ao fato de que muitos compostos absorvem nessa região. A concentração do analito é determinada pela Lei de Beer-Lambert (Equação 2):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (2)$$

onde, A é absorbância, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz transmitida; ϵ é a absorvidade molar ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); b é o comprimento do caminho que a luz precisa atravessar na cuba onde esteja a amostra e a grandeza é dada em centímetros; c é a concentração molar do a ($\text{mol}^{-1}\text{ l}$) (SWARTZ, 2010).

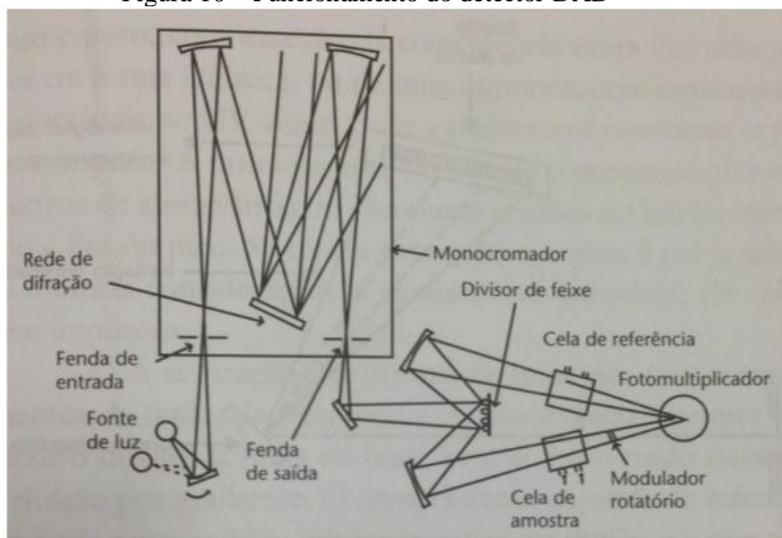
Um detector de CLAE deve seguir alguns requisitos, de entre os quais se destacam:

- Boa sensibilidade para todos os solutos;
- Limite de detecção suficientemente baixo;
- Boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal;
- Resposta rápida do sensor;
- Detector com menor volume possível (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

Além disso, o detector deve possuir algumas características que vão afetar a aplicação dele. É necessário que sinal do detector seja o menos possível influenciado pela temperatura, pela velocidade do fluxo e pela composição da fase móvel, para que seja garantida uma correta detecção dos analitos.

O Detector de arranjo de diodos (DAD) tem o mesmo funcionamento que o detector de UV-Vis, porém o DAD realiza varredura da amostra em diversos comprimentos de onda ao mesmo tempo, o que o torna detector ideal para realizar desenvolvimento de uma metodologia por CLAE. (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000). A figura 10 mostra o funcionamento do detector DAD.

Figura 10 – Funcionamento do detector DAD



(Fonte: COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006)

1.7 Validação de Método Analítico

A validação de método analítico tem por objetivo demonstrar que ele é adequado para a sua determinada finalidade. A validação se dar por meio de ensaios experimentais de modo a garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem documentos oficiais que direcionam o processo de validação. (RIBANI, BOTTOLI, *et al.*, 2004)

A ABNT NBR 14029:2016 descreve o procedimento para a validação de métodos para a determinação do teor de ingrediente ativo em formulações e teor de impureza em produtos agrotóxicos e afins (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016).

Os parâmetros avaliados para a metodologia proposta para determinação de Azoxystrobin e Tebuconazole em uma formulação agroquímica e a análise de impurezas foram as descritas no quadro 3 abaixo:

Quadro 3 - Parâmetros de validação de acordo com a ABNT NBR 14029:2016

Parâmetro	Determinação de ingrediente ativo em formulação	Determinação de impureza
Seletividade	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim
Exatidão/recuperação	Sim	Sim
Precisão	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Sim
Limite de quantificação	Não	Sim

(Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016)

1.7.1 Seletividade

Para a associação brasileira de normas técnicas (2016), a seletividade avalia a habilidade do método em determinar seletivamente o analito de interesse na presença da matriz da amostra. A seletividade busca determinar se existe algum interferente na matriz da amostra que interfira no sinal analítico de interesse. É necessário no mínimo uma leitura da solução do branco dos reagentes e uma do branco da amostra (matriz da amostra isenta do analito em interesse) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma maneira é comparando o cromatograma da matriz da amostra isenta do analito em estudo com o cromatograma da matriz com a adição do padrão desse analito. Nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse. Se o branco da amostra não tiver disponível, a seletividade deve ser comprovada pela obtenção de pureza do pico, empregando o detector de arranjo de diodos (DAD) ou detector de massas (EM) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016) e (RIBANI, BOTTOLI, *et al.*, 2004).

1.7.2 Linearidade

Para a ABNT NBR 14029:2016 a linearidade é a “habilidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração”. Segundo a norma é necessário preparar no mínimo 5 padrões analíticos com níveis de concentrações diferentes, a qual deve-se incluir a faixa de concentração nominal de 80% a 120% do analito de interesse. Cada solução deve ser analisada no mínimo uma vez (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016).

A linearidade é obtida pela correlação entre os sinais medidos (área ou altura do pico) e concentração conhecidas da espécie a ser quantificada. Essa relação matemática frequentemente é expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica de no mínimo 5 pontos que não incluam o ponto zero da curva. O modelo matemático mais utilizado é o da regressão linear, que estima os coeficientes da regressão **a** e **b** e o coeficiente de correlação **r**. Estes parâmetros são importantes para estimar a qualidade da curva obtida (RIBANI, BOTTOLI, *et al.*, 2004). Abaixo temos a representação genérica de uma equação de curva de calibração linear (equação 3):

$$y = ax + b \tag{3}$$

onde:

y = sinal analítico (altura ou área do pico cromatográfico);

x = concentração do analito;

a = inclinação (coeficiente angular);

b = intercepto (coeficiente linear).

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição padrão. O método escolhido para essa validação é o método de padrão externo o qual compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.

1.7.3 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância encontrada entre um valor de medida experimental e o “valor real” ou valor esperado para a amostra. A exatidão é sempre esperada dentro de certos limites. Esses limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. (RIBANI, BOTTOLI, *et al.*, 2004)

O número de ensaios varia segundo a legislação. A ABNT NBR 14029:2016 determina que a recuperação de ingredientes ativos em produto formulado seja feita “Através da adição de material com concentração definida do analito de interesse ao branco de amostra, preparar três níveis de fortificação (80 %, 100 % e 120 % da concentração nominal do analito) e analisar no mínimo uma vez cada solução (uma leitura).” Já para analitos em concentrações baixas deve-se preparar no mínimo dois níveis de fortificação e analisar no mínimo uma vez cada solução. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016). A tabela 3 mostra os níveis toleráveis para a recuperação de acordo com a ABNT NBR 14029:2016.

Tabela 3 - Recuperação aceitadas de acordo com a ABNT NBR 14029:2016

Concentração nominal do ingrediente ativo (% m/m)	Recuperação tolerável (%)
>10	98 – 102
1 – 10	97 – 103
<1	95 – 105
0,01 – 0,1	90 - 110
<0,01	80 - 120
Concentração nominal das impurezas (% m/m)	Recuperação tolerável (%)
>1	90 – 110
0,1 – 1	80 – 120
<0,1	75 - 125

(Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016)

De acordo com a ABNT NBR 14029:2016 O valor de recuperação para impurezas e ingrediente ativo é determinado pela seguinte equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

onde

C_1 é a concentração encontrada após adição do padrão;

C_2 é a concentração encontrada antes da adição do padrão (branco);

C_3 é a concentração conhecida adicionada do padrão analítico.

1.7.4 Limite de Detecção (LD)

Para Ribani, Bottoli, et al. (2004), limite de detecção (LD) representa “a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental”.

A ABNT NBR 14029:2016 determina que esse parâmetro é aplicável somente para análise de analitos em baixas concentrações (impureza e ingrediente ativo em baixas concentrações). Para se calcular esse parâmetro é necessário determinar a relação entre sinal/ruído (S/R) na injeção do padrão analítico de menor concentração da curva analítica. A equação 5 mostra o cálculo para determinar o LD:

$$LD = \frac{3 \times (C_{std})}{\left(\frac{S}{R}\right) \times C_s} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

LD = é o limite de detecção do método expresso pela porcentagem de massa por massa (% m/m);

Cstd = 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;

Cs = é a concentração nominal teórica da amostra.

1.7.5 Limite de Quantificação (LQ)

Para Ribani, Bottoli, et al. (2004), limite de quantificação (LQ) representa “a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental”.

A ABNT NBR 14029:2016 determina que esse parâmetro é aplicável somente para análise de impureza. Para se calcular esse parâmetro é necessário realizar cinco determinações

da solução de calibração de menor concentração. Assim, o limite de quantificação é definido como a concentração do primeiro nível da faixa da curva de calibração, desde que o desvio padrão relativo (DPR) entre as cinco medidas seja menor que o DPR calculado pela equação estendida de Horwitz e que a relação entre sinal/ruído (S/R) seja maior ou igual a 10. A equação 6 mostra a equação estendida de Horwitz:

$$\%DPR_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)} \times 0,67 \quad (6)$$

NOTA C = concentração do analito (% m/m) dividido por 100: por exemplo, se a concentração do analito for 99 % m/m, utilizar C = 0,99 na equação estendida de Horwitz.

1.7.6 Precisão

De acordo com Nascimento, Lima, *et al.* (2018), a precisão de um método é a sua capacidade em gerar resultados concordantes com baixa dispersão para a concentração do analito em replicatas de uma mesma amostra sob condições estabelecidas. A precisão pode ser avaliada com base em três níveis específicos:

- Repetibilidade;
- Precisão intermediária;
- Reprodutibilidade.

De acordo com a ABNT NBR 14029:2016 é exigido que se realize os ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

2.7.6.1 Repetitividade

A repetitividade expressa a precisão dos resultados intraensaio, ou seja, o grau de concordância entre os resultados da concentração do analito de interesse obtidos sob as seguintes condições). (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016):

- a) mesmo equipamento;
- b) mesmo analista;
- c) mesmo dia (repetição em instantes sucessivos).

Ainda de acordo com a ABNT NBR 14029:2016, é necessário preparar no mínimo cinco soluções independentes de um mesmo lote da amostra e fazer no mínimo uma leitura de cada solução. Deve-se fazer o tratamento estatístico pelos cálculos de média, estimativa do desvio-padrão, teste de Grubbs para verificação de valores dispersos e o desvio-padrão relativo, o qual deve estar em conformidade com o valor determinado pela equação 6 estendida de Horwitz (DPR calculado \leq DPR Horwitz).

É necessário, ainda, realizar um segundo ensaio de repetitividade e variar pelo menos uma das condições analíticas (equipamento, analista ou dia de análise) e proceder conforme o primeiro ensaio de repetitividade (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016).

2.7.6.2 Precisão intermediária

De acordo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (2016) a precisão intemediária avalia a concordancia dos resultados dos dois ensaios de repetitividade e realizar o tratamento estatístico pelos cálculos de média, estimativa do desvio-padrão, teste de Grubbs para verificação de valores dispersos e o desvio-padrão relativo, o qual deve estar em conformidade com o valor determinado pela equação 7 de Horwitz (DPR calculado \leq DPR Horwitz).

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (7)$$

NOTA C = concentração do analito (% m/m) dividido por 100: por exemplo, se a concentração do analito for 99 % m/m, utilizar C = 0,99 na equação estendida de Horwitz.

1.7.7 Cálculos

De acordo com a ABNT NBR 14029:2016, os cálculos necessários para a validação de método são: média aritmética, estimativa do desvio-padrão, coeficiente da variação e teste de Grubbs.

1.7.7.1 Média aritmética

Conforme equação abaixo:

$$\bar{X} = \frac{\sum_1^n X}{n} \quad (8)$$

onde

X é a média aritmética;

Σ é o somatório;

X é valor de cada medida;

n é o número de medidas.

1.7.7.2 Estimativa do desvio-padrão

Conforme equação abaixo:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(X_n - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad (9)$$

onde

Sr é a estimativa do desvio-padrão;

Σ é o somatório;
 X_n é o valor de cada medida;
 \bar{X} é a medida aritmética;
 n é o número de medidas.

1.7.7.3 Coeficiente de variação (CV) = desvio-padrão relativo (DPR)

Conforme equação abaixo:

$$CV=DPR= \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (10)$$

onde

CV = DPR é o coeficiente de variação = desvio-padrão relativo;

S é a estimativa do desvio-padrão;

\bar{X} é a média aritmética.

1.7.7.4 Teste de Grubbs

Conforme equação abaixo:

$$G_n = \frac{(X_n - \bar{X})}{s} \quad (11)$$

onde

G_n é o valor de Grubbs determinado para a maior medida;

X_n é o valor da maior medida;

\bar{X} é a média aritmética;

s é a estimativa do desvio padrão.

$$G_1 = \frac{(\bar{X} - X_1)}{s} \quad (12)$$

onde

G_1 é o valor de Grubbs determinado para a menor medida;

\bar{X} é a medida aritmética;

X_1 é o valor da menor medida;

s é a estimativa do desvio-padrão.

NOTA 1: Se $G_{calculado} \leq G_c$ (2,5 %), o valor é aceito; e se $G_{calculado} \geq G_c$ (2,5 %) o valor é rejeitado.

NOTA 2: Em caso de rejeição acima de 22,2 % dos dados, é necessário refazer os ensaios referentes a este conjunto de dados.

Os valores críticos (Gc) para o teste de Grubbs ao nível de 97,5 % de confiança são apresentados conforme a tabela 6.

Tabela 4 - Valores críticos (Gc)

Número de medidas	GC
N	2,5 %
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290
11	2,355
12	2,412
13	2,462
14	2,507

(Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016)

1.7.8 Critério de aceitação

De acordo com a ABNT NBR 14029:2016, para o método ser considerado validado e apto a ser utilizado, deve atender aos critérios de aceitação descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Critérios de aceitação

Parâmetro	Determinação de ingrediente ativo																				
Seletividade	Ausência de interferentes. Mas caso existam interferentes que não possam ser eliminados durante o desenvolvimento do método, descrever a forma de eliminar seus efeitos.																				
Linearidade	Coefficiente de correlação (r) $\geq 0,99$																				
Repetitividade	DPR calculado \leq DPR calculado pela equação estendida de Horwitz																				
Precisão intermediária	DPR calculado \leq DPR calculado pela equação de Horwitz																				
Limite de detecção	Relação (sinal/ruído) ≥ 3																				
Limite de quantificação	Relação (sinal/ruído) ≥ 10 DPR calculado \leq DPR calculado pela equação estendida de Horwitz																				
Recuperação/exatidão	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentração nominal do ingrediente ativo (% m/m)</th> <th>Recuperação tolerável (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>>10</td> <td>98 – 102</td> </tr> <tr> <td>1 – 10</td> <td>97 – 103</td> </tr> <tr> <td><1</td> <td>95 – 105</td> </tr> <tr> <td>0,01 – 0,1</td> <td>90 - 110</td> </tr> <tr> <td><0,01</td> <td>80 – 120</td> </tr> <tr> <th>Concentração nominal das impurezas (% m/m)</th> <th>Recuperação tolerável (%)</th> </tr> <tr> <td>>1</td> <td>90 – 110</td> </tr> <tr> <td>0,1 – 1</td> <td>80 – 120</td> </tr> <tr> <td><0,1</td> <td>75 - 125</td> </tr> </tbody> </table>	Concentração nominal do ingrediente ativo (% m/m)	Recuperação tolerável (%)	>10	98 – 102	1 – 10	97 – 103	<1	95 – 105	0,01 – 0,1	90 - 110	<0,01	80 – 120	Concentração nominal das impurezas (% m/m)	Recuperação tolerável (%)	>1	90 – 110	0,1 – 1	80 – 120	<0,1	75 - 125
Concentração nominal do ingrediente ativo (% m/m)	Recuperação tolerável (%)																				
>10	98 – 102																				
1 – 10	97 – 103																				
<1	95 – 105																				
0,01 – 0,1	90 - 110																				
<0,01	80 – 120																				
Concentração nominal das impurezas (% m/m)	Recuperação tolerável (%)																				
>1	90 – 110																				
0,1 – 1	80 – 120																				
<0,1	75 - 125																				

(Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo apresentar os dados das validações de metodologias realizadas em uma empresa agroquímica do estado do Ceará para análise da concentração do princípio ativo Azoxystrobin e Tebuconazole em um produto agroquímico e no resíduo gerado durante o processo de descontaminação da planta para produções seguintes, de modo a garantir a conformidade e a limpeza adequada para levar produtos de qualidade ao mercado.

2.2 Objetivos específicos

- Validação de método cromatográfico para garantir que as concentrações de Azoxystrobin e Tebuconazole estejam dentro dos limites especificados do produto utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Validação de método cromatográfico utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para garantir que as concentrações de Azoxystrobin e Tebuconazole estejam abaixo dos limites estabelecidos pela empresa após procedimento de limpeza da planta produtiva, a fim de evitar contaminação cruzada em produções seguintes;
- Avaliar os parâmetros das validações conforme exige a ABNT NBR 14029:2016 - Agrotóxicos e afins: Validação de Métodos Analíticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos executados para a elaboração deste trabalho foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de uma empresa agroquímica do estado do Ceará.

3.1 Amostra em análise

Foi realizado a validação de método por padronização externa para a análise de um produto agroquímico contendo as concentrações de 120g/L de Azoxystrobin e 160g/L de Tebuconazole em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à detector DAD. Em sequência, foi validado o método por padronização externa para a análise do produto da descontaminação do reator da base EC (que contém somente o ingrediente ativo Tebuconazole) e do produto da descontaminação do reator do produto final SE, que contém os dois ingredientes ativos Azoxystrobin e Tebuconazole.

O solvente utilizado para a descontaminação da base EC é composto de amidas e o limite de descontaminação para o Tebuconazole é de 1000ppm. O solvente para a descontaminação do tanque do produto SE é a água e o limite para a descontaminação para o Azoxystrobin é de 10ppm e para o Tebuconazole é 1000ppm. Abaixo segue tabela 8 com a relação dos tanques com os limites dos Ingredientes Ativos e solventes de descontaminação.

Tabela 5 - Relação dos tanques com os limites dos Ingredientes Ativos e solventes de descontaminação

Tanque	Solvente de descontaminação	Limite do Azoxystrobin em ppm	Limite do Tebuconazole em ppm
Tanque EC	Solvente à base de Amidas	NA	1000
Tanque SE	Água	10	1000

(Fonte: Autor, 2019)

3.2 Lavagem das vidrarias para as validações de métodos

Os balões volumétricos, as pipetas graduadas e as espátulas foram lavados com água da torneira abundante e detergente neutro por duas vezes, posteriormente foram rinsados 2 vezes com água destilada e 2 vezes com Acetona. As vidrarias foram deixadas em posição vertical invertidas durante 1h ou até a total secura.

3.3 Instrumentação

Segue abaixo os seguintes instrumentos utilizados para execução do trabalho.

- Sistema de purificação de água Milli-Q. Marca: Merck;

- Coluna cromatográfica de fase reversa Phenomenex: Luna C18(2)[®], com as dimensões de 250 mm x 4,6 mm d.i. (diâmetro interno), 100 Å de tamanho de poro e 5 µm de tamanho de partículas. Serial N^o: H17-123149 e lote N^o:529-0146;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (*Alliance e2695 Separation Module*) com detector DAD (*Waters 2998 photodiode Array Detector*) -WATERS;
- Acetona P.A (Synth);
- Metanol grau HPLC (Merck);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-aldrich);
- Micropipetador Eletrônico de 5-100µL, modelo Gilson (P100M);
- Micropipetador Eletrônico de 20-200µL, modelo Gilson (P200M);
- Micropipetador Eletrônico de 100-1200µL, modelo Gilson (P1200M);
- Padrões primários de agrotóxicos: Azoxystrobin e Tebuconazole pureza acima de 98% (Sigma);
- Padrão secundário de agrotóxico: Tebuconazole pureza acima de 98% (técnico validado com padrão primário);
- Tubo cônico de 5mL. Marca: MacroTube5TM;
- Vial de 2,0mL. Marca: Flowsupply;
- Filtro para Seringa de 0,45 µm. Marca: Flowsupply ;
- Banho Ultrassônico. Marca: Elma, modelo S120H;

3.4 Validação de método do produto formulado

3.4.1 Parâmetros cromatográficos

O quadro 5 especifica as condições cromatográficas escolhidas para a validação de método em questão.

Quadro 5 -Condições cromatográficas para a validação do produto formulado

Parâmetros	Especificações
Coluna	C18- Phenomenex Luna 5 µm; 250mm x 4,6mm)
Temperatura da Coluna	35°C
Fluxo	Isocrático, 1,5mL/min
Fase móvel	Metanol e Ácido Fórmico 0,1%, pH=3,0
Proporção de Fase móvel	Orgânico (80%) e aquoso (20%)
Volume de injeção	10 µL
Detector	PDA 225nm
Tempo de análise	8 min

(Fonte: Autor, 2019)

3.4.2 Preparo da fase móvel

Para o preparo de ácido fórmico 0,1% adicionou-se aproximadamente 950mL de água milli-Q em um balão volumétrico de 1 L e, com o auxílio de uma pipeta eletrônica (capacidade máxima de 1200µL), adicionou-se duas alíquotas de 800µL de ácido necessária para obter a concentração de 0,1% e aferiu-se com água milli-Q. Após a homogeneização da solução, filtrou-a em sistema de filtração à vácuo com membrana de 0,45µm, transferiu-a para um frasco de fase móvel, o qual foi posto no banho ultrassônico por 30 minutos afim de retirar gases dissolvidos. Para o preparo do metanol foi colocado para sonicar 1 L de metanol grau HPLC (Marca: Merck, lote: I0970007 835, pureza:99,99%) por 30min.

Ambas as soluções foram purgadas no mínimo 10 min por um fluxo de 3mL/min no sistema de gaseificador do equipamento.

3.4.3 Preparo das soluções

4.4.3.1 Curva de Calibração

Foi realizado o preparo de duas curvas de calibrações, uma para o Azoxystrobin e outra para o Tebuconazole, ambas com 5 pontos variando as concentrações entre 80% até 120% do teor nominal para cada ingrediente ativo. A equação da reta foi calculada por regressão linear.

Curva de calibração do ingrediente ativo Azoxystrobin (Padrão sigma; Lote: SZBF054XV; Pureza:99,4%):

Em um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de concentração de 240 mg/L de Azoxystrobin (aproximadamente 12,072mg). Por fim, adicionou-se 30 mL de Metanol no balão volumétrico, homogeneizou-se sem inverter o balão, adicionou-se mais 10 mL de solução de ácido fórmico 0,1% e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea.

Aferiu-se o balão com metanol, homogeneizou-se vigorosamente e filtrou-se aproximadamente 5mL em membrana de 0,45µm para um tubo cônico de 5mL. Identificou-se esta solução como: “STD.AZOX1”.

Preparou-se 200 mL de uma solução composta de 80% de metanol e 20% de ácido fórmico 0,1%. Identificou-se esta solução como “Diluyente”. Preparou-se os pontos da curva diluindo “STD.AZOX1” com a solução “Diluyente”, utilizou-se as proporções recomendadas na tabela 6, em *vials* de 2mL.

Tabela 6 - Diluição do padrão do Ingrediente Ativo Azoxystrobin para a validação do produto formulado

Ponto do Azoxystrobin	Volume do STD.AZOX1 (μL)	Volume de diluente (μL)
1	600	900
2	675	825
3	750	750
4	825	675
5	900	600

(Fonte: Autor, 2019)

Tampou-se os *vials*, agitou-se vigorosamente, identificou-os de acordo com as concentrações obtidas e injetou cada ponto duas vezes no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

Curva de calibração do Tebuconazole (Padrão sigma; Lote: BCBS8782V; Pureza:99,4%):

Em um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de concentração de 320 mg/L do Tebuconazole (aproximadamente 16,097mg). Por fim, adicionou-se 30 mL de Metanol no balão volumétrico, homogeneizou-se sem inverter o balão, adicionou-se mais 10 mL de ácido fórmico 0,1% e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea.

Aferiu-se o balão com metanol, homogeneizou-se vigorosamente e filtrou-se aproximadamente 5mL em membrana de 0,45 μ m para um tubo cônico de 5mL. Identificou-se esta solução como: “STD.TEBU1”. Preparou-se os pontos da curva diluindo “STD.TEBU1” com a solução “Diluyente”, utilizou-se as proporções recomendadas na tabela 7, em *vials* de 2mL.

Tabela 7 - Diluição do padrão do Ingrediente Ativo Tebuconazole

Ponto do Tebuconazole	Volume do STD.TEBU1 (μL)	Volume de diluente (μL)
1	600	900
2	675	825
3	750	750
4	825	675
5	900	600

(Fonte: Autor, 2019)

Tampou-se os *vials*, agitou-se vigorosamente, identificou-os de acordo com as concentrações obtidas e injetou cada ponto duas vezes no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

4.4.3.2 Adequação de sistema

Com o auxílio de uma pipeta eletrônica, adicionou-se 750 µL da solução padrão identificada como “STD.AZOX1” e 750 µL da “STD.TEBU1” em um *vial*. Tampou-se o *vial* e agitou-se vigorosamente. Foram realizadas seis injeções deste padrão conforme condições cromatográficas estabelecidas anteriormente para verificar as condições do equipamento.

4.4.3.3 Seletividade

O estudo da seletividade foi executado pela avaliação dos brancos dos reagentes (solução de diluição da amostra) e do branco da amostra (Placebo).

Branco dos reagentes

Em um *vial* adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta eletrônica, 1500µL de solução diluente preparada anteriormente (80% metanol e 20% ácido fórmico 0,1%). Injetou-se essa solução no cromatógrafo 2 vezes conforme condições do método.

Branco da amostra

Em um balão volumétrico de 25mL adicionou-se 30mg de placebo. Suspendeu-se a amostra em 5mL de ácido fórmico 0,1%, adicionou-se 15mL de metanol e levou ao banho ultrassônico por 5min. Após retirar, esperou-se atingir a temperatura ambiente e aferiu com metanol. Agitou-se vigorosamente e transferiu-se para um *vial* filtrando em membrana de 0,45mm. Injetou-se essa solução no cromatógrafo 2 vezes conforme condições do método.

4.4.3.4 Exatidão

Recuperação do Azoxystrobin

Em um balão volumétrico de 50mL adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de Azoxystrobin (Padrão sigma; Lote: SZBF054XV; Pureza:99,4%) de concentração de 240mg/L (aproximadamente 12,072mg). Adicionou-se 30mL de Metanol e 10mL de ácido fórmico 0,1%, homogeneizou-se sem inverter o balão e levou-se ao banho ultrassônico até obter uma solução homogênea. Aferiu-se o balão com metanol e agitou-se. O padrão foi identificado como STD.AZOX2 e reservou-se.

Identificou-se 3 balões volumétricos de 25mL com os seguintes caracteres: REC.AZOX80%, REC.AZOX100% e REC.AZOX120%. Adicionou-se a cada um deles aproximadamente 25,75mg de placebo e em seguida adicionou-se as seguintes alíquotas de STD.AZOX2 descritas na tabela 8 abaixo.

Tabela 8 - Volumes da recuperação do Azoxystrobin na validação do produto final

Amostra	Volume do STD.AZOX2 (mL)
REC.AZOX80%	10,0
REC.AZOX100%	12,5
REC.AZOX120%	15,0

(Fonte: Autor, 2019)

Aferiu-se os balões com a solução diluente, agitou-se vigorosamente e filtrou-se em membrana de 0,45mm para um *vial*. As amostras foram injetadas em duplicata no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

Recuperação do Tebuconazole

Em um balão volumétrico de 50mL adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de Tebuconazole (Padrão sigma; Lote: BCBS8782V; Pureza:99,4%) de concentração de 320mg/L (aproximadamente 16,097mg). Adicionou-se 30mL de Metanol e 10mL de ácido fórmico 0,1%, homogeneizou-se sem inverter o balão e levou-se ao banho ultrassônico até obter uma solução homogênea. Aferiu-se o balão com metanol e agitou-se. O padrão foi identificado como STD.TEBU2 e reservou-se.

Identificou-se 3 balões volumétricos de 25mL com os seguintes caracteres: REC.TEBU80%, REC.TEBU100% e REC.TEBU120%. Adicionou-se a cada um deles aproximadamente 25,75mg de placebo e em seguida adicionou-se as seguintes alíquotas de STD.TEBU2 descritas na tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Volumes da recuperação do Tebuconazole para a validação do produto formulado.

Amostra	Volume do STD.TEBU2 (mL)
REC.TEBU80%	10,0
REC.TEBU100%	12,5
REC.TEBU120%	15,0

(Fonte: Autor, 2019)

Aferiu-se os balões com a solução diluente, agitou-se vigorosamente e filtrou-se em membrana de 0,45mm para um *vial*. As amostras foram injetadas em duplicata no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

4.4.3.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo ensaio de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada pelo preparo de cinco alíquotas independentes de uma mesma amostra (Lote:001/1778B), que foram injetadas conforme método proposto. Já a precisão

intermediária foi avaliada repetindo o mesmo procedimento da repetitividade variando o analista.

Para preparar as amostras dos testes, foi adicionado a massa correspondente ao volume de 25 µL de formulação em um balão volumétrico de 25 mL, de acordo com a equação 13:

$$\text{Massa para pesar} = 0,025\text{mL} * \text{densidade do produto } g \text{ mL}^{-1} \quad (13)$$

Suspendeu-se a amostra em 5mL de ácido fórmico 0,1%, adicionou-se 15mL de metanol e a levou ao sonicador por 5min. Após este período, aguardou a até a amostra estivesse a temperatura ambiente e aferiu com metanol. Filtrou-se a amostra em membrana de 0,45mm para um *vial* e injetou em duplicata no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

4.4.3.6 Ordem de injeção

As soluções preparadas anteriormente foram injetadas de acordo com a sequência indicada no quadro 6 abaixo:

Quadro 6 - Sequência de injeção da validação do produto formulado no cromatógrafo

Ordem	Parâmetros
1	Adequação do sistema
2	Seletividade
3	Linearidade
4	Recuperação
5	Repetibilidade
6	Precisão intermediária

(Fonte: Autor, 2019)

3.5 Validação de método para a descontaminação

3.5.1 Parâmetros cromatográficos

O quadro 7 especifica as condições cromatográficas escolhidas para a validação de método em questão.

Quadro 7 - Condições cromatográficas para a validação da descontaminação

Parâmetros	Especificações
Coluna	C18- Phenomenex Luna 5 µm (250mm x 4,6mm)
Temperatura da Coluna	25°C
Fluxo	Isocrático, 1,5mL/min
Fase móvel	Acetonitrila e Água
Proporção de Fase móvel	Orgânico (60%) e Aquoso (40%)
Volume de injeção	40 µL
Detector	UV 210nm (Tanque SE); UV 225nm (Tanque EC)
Tempo de análise	11 min

(Fonte: Autor, 2019)

3.5.2 Preparo da fase móvel

Para o preparo das fases móveis, foi colocado para sonicar 2 L de acetonitrila grau HPLC (Marca: Sigma-Aldrich, lote:SHBL0136 , pureza:99,9%) e 2L água Milli-Q por 30min.

Ambas as soluções foram purgadas no mínimo 10 min por um fluxo de 3mL/min no sistema desgaseificador do equipamento.

3.5.3 Preparo das soluções

3.5.3.1 Curva de calibração

Foi realizado o preparo de duas curvas de calibrações, uma para o Azoxystrobin e outra para o Tebuconazole. Para o preparo da curva do Azoxystrobin foi preparado 9 amostras variando as concentrações entre 1 a 9 ppm. Já para a curva do Tebuconazole foi preparado 7 amostras variando as concentrações entre 5 à 500ppm. As equações da reta foram calculadas por regressão linear.

Curva de calibração do ingrediente ativo Azoxystrobin (Padrão sigma; Lote: SZBF054XV; Pureza:99,4%):

Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de concentração de 100 mg/L de Azoxystrobin (aproximadamente 10,06mg). Por fim, adicionou-se 70 mL de acetonitrila no balão volumétrico, homogeneizou-se sem inverter o balão e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea.

Aferiu-se o balão com acetonitrila, homogeneizou-se vigorosamente e identificou-se esta solução como: “STD.AZOX3”. Com o auxílio de uma pipeta eletrônica, transferiu-se para um balão de 10mL os volumes de solução “STD.AZOX3” necessários para o preparo da curva de calibração variando a concentração de 1 a 9 ppm. A tabela 10 abaixo indica os volumes necessários e a concentração equivalente:

Tabela 10 - Diluição do padrão Azoxystrobin para a curva de calibração da descontaminação

Ponto do Azoxystrobin	Volume do STD.AZOX3 (μ L)	Concentração do padrão (ppm)
1	100	1
2	200	2
3	300	3
4	400	4
5	500	5
6	600	6
7	700	7
8	800	8
9	900	9

(Fonte: Autor, 2019)

Os balões foram aferidos com acetonitrila, agitados vigorosamente e filtrados em membrana de 0,45µm para *vials*. Os *vials* foram identificados de acordo com as concentrações obtidas e injetados cada ponto no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

Curva de calibração do Tebuconazole (Padrão sigma; Lote: BCBS8782V; Pureza 99,4%)

Em um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se a massa necessária para preparar um padrão de concentração de 1000 mg/L de Tebuconazole (aproximadamente 10,06mg). Por fim, adicionou-se 7 mL de Acetonitrila no balão volumétrico, homogeneizou-se sem inverter o balão e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea.

Aferiu-se o balão com acetonitrila, homogeneizou-se vigorosamente e identificou-se esta solução como: “STD.TEBU3”. Com o auxílio de uma pipeta eletrônica, transferiu-se para um balão de 10mL os volumes de solução “STD.TEBU3” necessários para o preparo da curva de calibração variando a concentração de 5 a 500 ppm. A tabela 11 abaixo indica os volumes necessários e a concentração equivalente:

Tabela 11 - Diluição do padrão Tebuconazole para a curva de calibração da descontaminação

Ponto do Tebuconazole	Volume do STD.TEBU3 (µL)	Concentração do padrão (ppm)
1	50	5
2	94	9.4
3	180	18
4	500	50
5	1000	100
6	2500	250
7	5000	500

(Fonte: Autor, 2019)

Os balões foram aferidos com acetonitrila, agitados vigorosamente e filtrados em membrana de 0,45µm para *vials*. Os *vials* foram identificados de acordo com as concentrações obtidas e injetados cada ponto no cromatógrafo conforme condições cromatográficas.

3.5.3.2 Seletividade

O estudo da seletividade foi executado pela avaliação dos brancos dos reagentes (acetonitrila) e do branco da amostra.

Branco dos reagentes

Em um *vial*, adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta eletrônica, 1500µL de acetonitrila e injetou-se essa solução no cromatógrafo conforme condições do método.

Branco da amostra – Tanque SE

Em um tubo cônico de 5mL, diluiu-se água da torneira (branco da amostra do tanque SE) de modo que obteve uma proporção de 50% de água para 50% de acetonitrila. Homogeneizou-

se a solução, filtrou-se em filtro de 0,45mm para um *vial* e injetou-se essa solução no cromatógrafo conforme condições do método.

Branco da amostra – Tanque EC

Em um tubo cônico de 5mL, diluiu-se o solvente utilizado na base EC (branco da amostra do tanque EC – Solvente composto de amidas) de modo que obteve uma proporção de 5% de solvente para 95% de acetonitrila. Homogeneizou-se a solução, filtrou-se em filtro de 0,45mm para um *vial* e injetou-se essa solução no cromatógrafo conforme condições do método.

3.5.3.3 Exatidão

Recuperação no tanque SE

Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se a massa necessária para preparar uma amostra de formulado com concentração de 120 ppm de Azoxystrobin e 160 ppm de Tebuconazole (amostra analisada durante a repetibilidade do produto formulado). Por fim, adicionou-se 70 mL de acetonitrila no balão volumétrico, homogeneizou-se sem inverter o balão e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea.

Aferiu-se o balão com acetonitrila, homogeneizou-se vigorosamente e identificou-se esta solução como “SOL.ESTOQUE”. Com o auxílio de uma pipeta eletrônica, transferiu-se para 3 balões de 10mL os volumes de solução “SOL.ESTOQUE” necessários para o preparo de três fortificações variando a concentração de 80% à 120% da concentração de 10 ppm de Azoxystrobin (limite de liberação da descontaminação) e 13,33 ppm de Tebuconazole (teor previsto de Tebuconazole quando o Azoxystrobin estiver com 10ppm, dado a relação entre as concentrações no produto final de 0,75). A tabela 12 abaixo indica os volumes necessários e a concentração esperadas:

Tabela 12 - Volumes da recuperação do Azoxystrobin para a descontaminação.

	Amostra	Volume do SOL.ESTOQUE (µL)	Concentração esperada (ppm)
RECUPERAÇÃO INFERIOR	REC.AZOX.INF	700	8,4
	REC.TEBU.INF		11,3
RECUPERAÇÃO NOMINAL	REC.AZOX.NOM	1000	10,8
	REC.TEBU.NOM		14,6
RECUPERAÇÃO SUPERIOR	REC.AZOX.SUP	1200	12,0
	REC.TEBU.BUP		16,2

(Fonte: Autor, 2019)

Os balões foram aferidos com água da torneira, agitados vigorosamente e filtrados em membrana de 0,45µm para um tubo cônico de 5mL. Estas soluções foram diluídas na proporção de 50% de solução e 50% de acetonitrila para um *vial*. Os *vials* foram identificados de acordo

com as concentrações obtidas e injetados cada ponto na proporção de 1:2 no cromatógrafo, conforme condições cromatográficas.

Recuperação do Tebuconazole no tanque EC

Para a recuperação do Tebuconazole no tanque EC, foi necessário preparar fortificações no solvente de descontaminação variando a concentração de 80% a 120% da concentração de 1000ppm de Tebuconazole (Limite de liberação da ACL).

Em um balão volumétricos de 100 mL, adicionou-se as massas necessárias de um padrão de Tebuconazole (Padrão secundário; Lote:0026-19; Pureza:98,64%) para preparar amostras de concentração de 800, 1000 e 1200 mg/L. As massas pesadas estão de acordo com a tabela 13. Por fim, adicionou-se 70 mL do solvente especificado para a descontaminação do reator EC nos balões volumétricos, homogeneizou-se sem inverter os balões e o levou ao banho ultrassônico até que se obteve uma solução homogênea. Aferiu-se os balões com o solvente da descontaminação, homogeneizou-se vigorosamente.

Tabela 13 - Volumes da recuperação do Tebuconazole para a descontaminação do tanque EC.

Amostra	Massa de SEC de Tebuconazole (g)	Concentração (ppm)
REC.TEBU.INF	0,08110	800
REC.TEBU.NOM	0,10138	1000
REC.TEBU.SUP	0,12165	1200

(Fonte: Autor, 2019)

As soluções dos balões foram transferidas para tubos cônicos de 5 mL. Estas soluções foram diluídas na proporção de 5% de solução e 95% de acetonitrila, ou seja, com o auxílio de uma pipeta eletrônica foi transferido 200 µL de solução e 3800 µL de acetonitrila para um tubo cônico de 5 mL. Agitou-se vigorosamente as soluções e filtrou-se em membrana de 0,45 µm para *vials* de 2,0 mL. Os *vials* foram identificados de acordo com as concentrações obtidas e injetados cada ponto na proporção de 200:4000 no cromatógrafo, conforme condições cromatográficas.

4.5.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo ensaio de repetitividade e precisão intermediária.

Precisão do método para amostra da descontaminação do tanque SE

A repetitividade foi avaliada pelo preparo de sete alíquotas independentes de uma mesma amostra, que foram injetadas conforme método proposto. Já a precisão intermediária foi avaliada repetindo o mesmo procedimento da repetitividade variando o analista.

Para preparar as amostras, pipetou-se 1000µL da amostra da descontaminação do tanque SE (produto formulado + água) e 1000µL de Acetonitrila em um tubo cônico de 5mL e agitou-se vigorosamente. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm para *vials* e injetada no

cromatógrafo utilizando a proporção 1:2 para quantificação por padronização externa. Repetiu-se o mesmo procedimento para as outras replicatas.

Foi realizado o mesmo procedimento acima para o preparo de sete alíquotas variando o analista. As amostras foram injetadas nas mesmas condições que as iniciais.

Precisão do método para amostra da descontaminação do tanque EC

A repetitividade foi avaliada pelo preparo de cinco alíquotas independentes de uma mesma amostra, que foram injetadas conforme método proposto. Já a precisão intermediária foi avaliada repetindo o mesmo procedimento da repetitividade variando o analista

Para preparar as amostras, pipetou-se 200µL da amostra da descontaminação do tanque EC (Tebuconazole + Solvente) e 3800µL de Acetonitrila em um tubo cônico de 5mL e agitou-se vigorosamente. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm para *vials* e injetada no cromatógrafo utilizando a proporção 200:4000 para quantificação por padronização externa. Repetiu-se o mesmo procedimento para as outras replicatas.

Foi realizado o mesmo procedimento acima para o preparo de cinco alíquotas variando o analista. As amostras foram injetadas nas mesmas condições que as iniciais.

4.5.3.5 Ordem de injeção

As soluções preparadas anteriormente foram injetadas de acordo com a sequência indicada na tabela 14 abaixo:

Tabela 14 - Sequência de injeção da validação da descontaminação no cromatógrafo

Ordem	Parâmetros	Comprimento de onda(nm)
1	Seletividade Reator SE	210
2	Linearidade Reator SE	210
3	Recuperação Reator SE	210
4	Repetibilidade SE	210
5	Precisão intermediária SE	210
6	Seletividade Reator EC	225
7	Linearidade Reator EC	225
8	Recuperação Reator EC	225
9	Repetibilidade EC	225
10	Precisão intermediária EC	225

(Fonte: Autor, 2019)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação de método do produto formulado

4.1.1 Adequação do sistema

A adequação de sistema foi avaliada pelo tratamento de dados obtidos de 6 injeções consecutivas de um mesmo material de referência. Os resultados estão expostos na tabela

Tabela 15 - Resultados da adequação de sistema

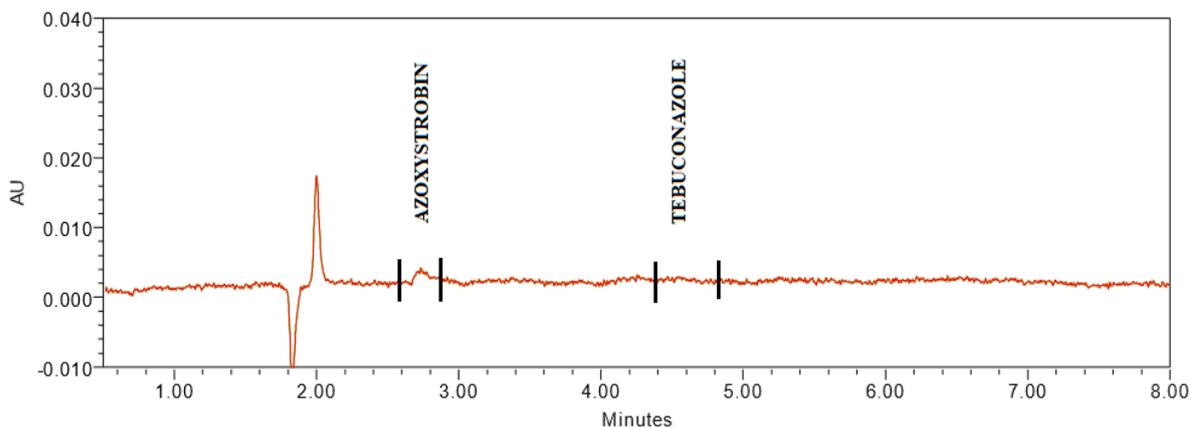
Parâmetro	Recomendações	Resultado Obtido Azoxtrobina	Resultado Obtido Tebuconazole
Fator de Simetria	Máximo 2	1	1
Tailing Máximo	Máximo 2	1	1
Nº pratos teóricos	>2000	9879	11591

(Fonte: Autor, 2019)

4.1.2 Seletividade e especificidade

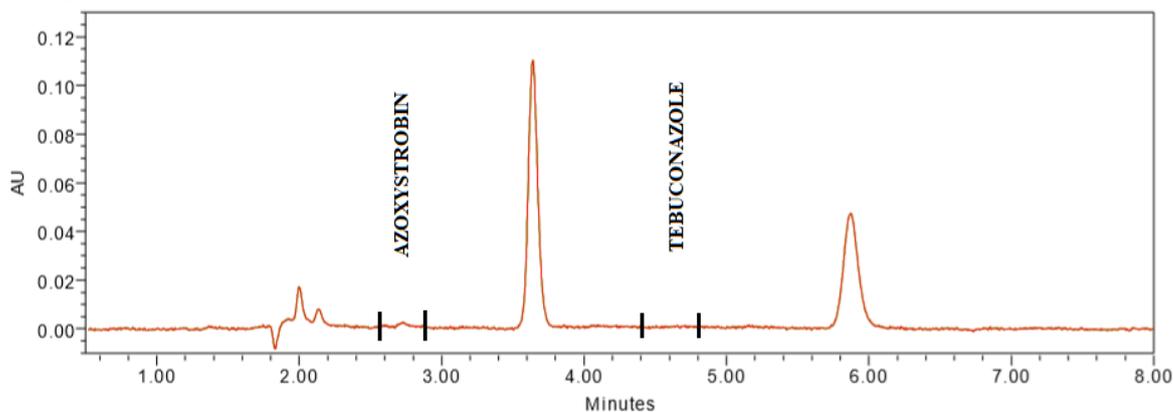
O estudo da seletividade foi executado pela avaliação dos brancos dos reagentes (solução de diluição da amostra) e do branco da amostra (placebo). Os cromatogramas obtidos encontram-se ilustrados respectivamente nas figuras 11 e 12 respectivamente.

Figura 11 - Cromatograma do branco dos reagentes da validação de método para o produto formulado



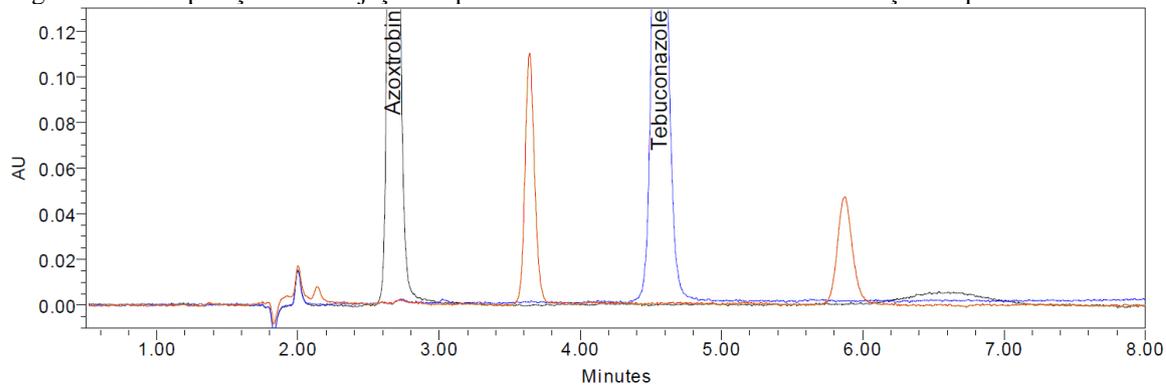
(Fonte: Autor, 2019)

Figura 12 - Cromatograma do branco da amostra da validação de método para o produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

Figura 13 - Comparação entre injeção do padrão e do branco da amostra na validação do produto formulado



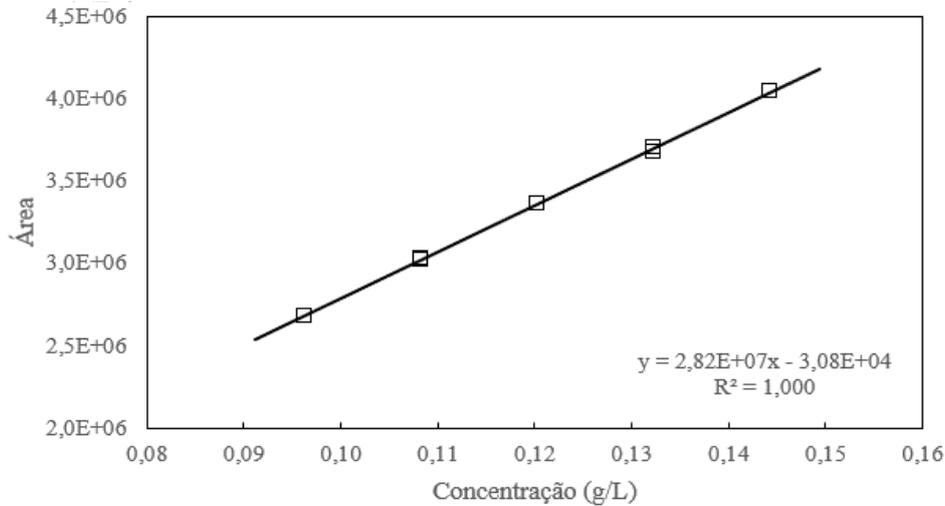
(Fonte: Autor, 2019)

A figura 13 mostra uma comparação da injeção de um padrão analítico com a matriz da amostra (placebo). Assim, conforme verificado nos cromatogramas das figuras 11, 12 e 13 não foram encontrados interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Deste modo, conclui-se que o método é seletivo e específico para Azoxystrobin e Tebuconazole, conforme exige a ABNT NBR 14029:2016.

4.1.3 Linearidade

Para avaliar se a resposta do sinal analítico é diretamente proporcional a concentração do princípio ativo, foram preparados cinco padrões de modo a obter uma curva de calibração com concentrações variando de 80 a 120% do valor nominal para cada ativo. A curva de calibração na figura 14 é referente ao ativo Azoxystrobin e a equação da reta foi extraída por regressão linear a partir dos dados da tabela 16.

Figura 14 - - Curva de calibração do Azoxystrobin para o produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

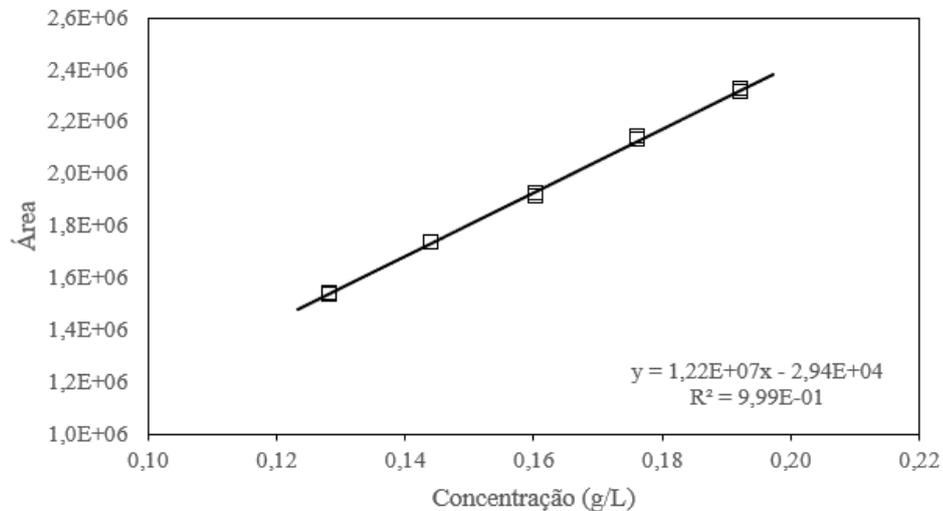
Tabela 16 - Dados da curva de calibração do Azoxystrobin na validação do produto formulado

Nome	Level	Valor de X	Área	Valor Calc.	% Desvio	
1	Azoxystrobin	Level 1	0,0962	2.681.981,714	0,09617	-0,03
2	Azoxystrobin	Level 1	0,0962	2.679.871,950	0,09609	-0,11
3	Azoxystrobin	Level 2	0,1082	3.028.372,690	0,10845	0,23
4	Azoxystrobin	Level 2	0,1082	3.027.358,847	0,10841	0,2
5	Azoxystrobin	Level 3	0,1203	3.361.241,433	0,12025	-0,04
6	Azoxystrobin	Level 3	0,1203	3.361.780,689	0,12027	-0,03
7	Azoxystrobin	Level 4	0,1323	3.677.610,811	0,13146	-0,63
8	Azoxystrobin	Level 4	0,1323	3.706.241,538	0,13248	0,13
9	Azoxystrobin	Level 5	0,1443	4.046.360,243	0,14454	0,16
10	Azoxystrobin	Level 5	0,1443	4.045.021,995	0,14449	0,13

(Fonte: Autor, 2019)

A curva de calibração na figura 15 é referente ao ativo Tebuconazole e a equação da reta foi extraída por regressão linear a partir dos dados da tabela 17.

Figura 15 - Curva de calibração do Tebuconazole para o produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 17- Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação do produto final

	Nome	Level	Valor de X	Área	Valor Calc.	% Desvio
1	Tebuconazole	Level 1	0,1282	1.543.910,324	0,12858	0,29
2	Tebuconazole	Level 1	0,1282	1.536.505,314	0,12797	0,18
3	Tebuconazole	Level 2	0,1442	1.737.287,067	0,14438	0,12
4	Tebuconazole	Level 2	0,1442	1.739.282,315	0,14454	0,24
5	Tebuconazole	Level 3	0,1603	1.911.932,051	0,15865	-1,03
6	Tebuconazole	Level 3	0,1603	1.927.665,575	0,15994	0,23
7	Tebuconazole	Level 4	0,1763	2.143.412,681	0,17757	0,72
8	Tebuconazole	Level 4	0,1763	2.135.052,410	0,17689	0,33
9	Tebuconazole	Level 5	0,1923	2.326.796,875	0,19256	0,13
10	Tebuconazole	Level 5	0,1923	2.314.163,189	0,19152	0,40

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que método empregado para determinação dos ativos Azoxystrobin e Tebuconazole responde linearmente para o intervalo de concentração de 96-144 g L⁻¹ e 128-192 g L⁻¹ em produto formulado, respectivamente.

Os valores obtidos para o coeficiente de correlação estão em conformidade com exigências (ABNT NBR 14029:2016) para o qual o método se aplica (R≥0,99).

4.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da fortificação de amostras do placebo com padrões dos analitos de modo a obter as concentrações relacionadas a 80, 100 e 120% do valor nominal. De acordo com a equação 4 abaixo, foi obtido os resultados da tabela 18. Levou-se em consideração que as concentrações dos ativos na amostra do branco foi 0 g L⁻¹, como visto na seletividade.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde

C₁ é a concentração encontrada após adição do padrão;

C₂ é a concentração encontrada antes da adição do padrão (branco);

C₃ é a concentração conhecida adicionada do padrão analítico.

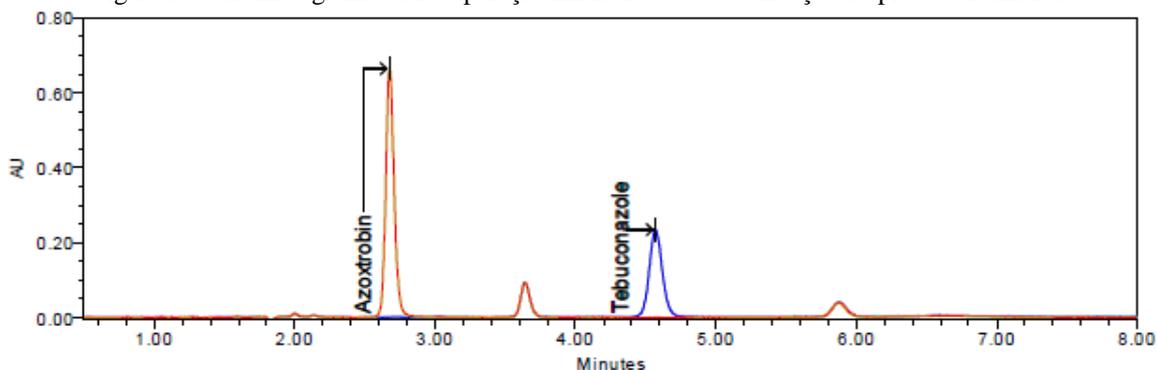
Tabela 18 - Dados da exatidão na validação do produto formulado

Recuperação	Ativo	Resultado esperado (g L ⁻¹)	Resultado obtido (g L ⁻¹)	% Recuperação
Limite inferior 80%	Azoxystrobin	96	95	99
	Tebuconazole	128	126	99
Limite nominal 100%	Azoxystrobin	120	118	98
	Tebuconazole	159	155	98
Limite superior 120%	Azoxystrobin	143	140	98
	Tebuconazole	190	186	98

(Fonte: Autor, 2019)

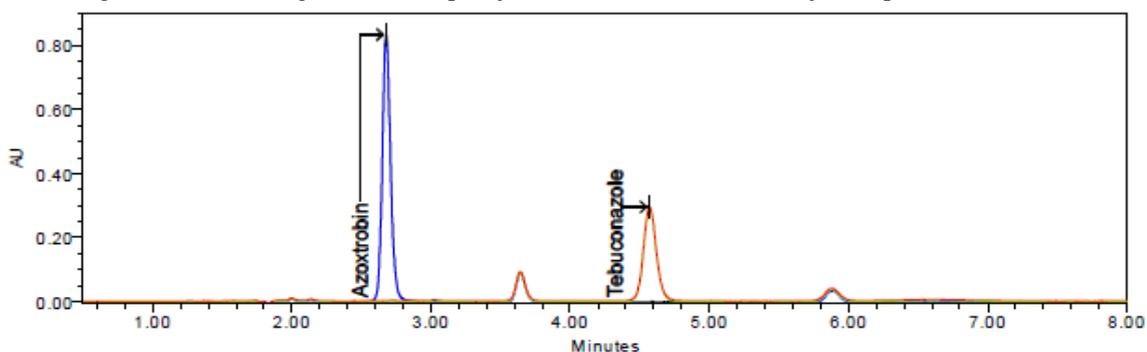
Os resultados obtidos demonstram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado e está em conformidade com os requisitos normativos exigidos pela ABNT NBR 14029:2016: 98 - 102% de recuperação. A figura 16, 17 e 18 mostram os cromatogramas obtidos.

Figura 16 - Cromatograma da recuperação inferior 80 % da validação do produto formulado



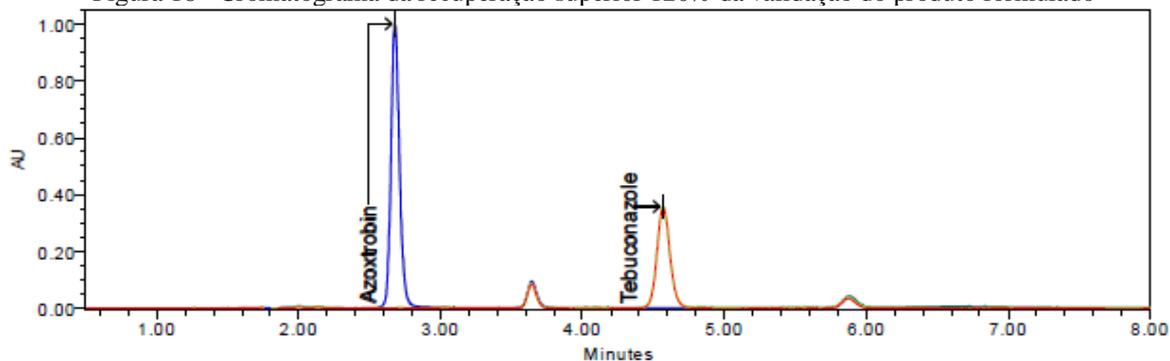
(Fonte: Autor, 2019)

Figura 17 - Cromatograma da recuperação nominal 100 % da validação do produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

Figura 18 - Cromatograma da recuperação superior 120% da validação do produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

4.1.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo ensaio de repetitividade e precisão intermediária.

4.1.5.1 Repetitividade

A repetitividade foi avaliada pelo preparo de cinco alíquotas independentes de uma mesma amostra, que foram injetadas conforme método proposto.

Os dados obtidos foram utilizados em tratamentos estatísticos (Teste G) para avaliar a existência de valores dispersos. Os resultados encontram-se dispostos na tabela 19 abaixo.

Tabela 19 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação do produto formulado

Ativo	Média (g L ⁻¹)	CV(%)	Valor máximo (g L ⁻¹)	Valor mínimo (g L ⁻¹)	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor máx..	Gc Tabelado
Azoxystrobin	118,8	0,3	118,9	118,4	1,3	0,5	2,3
Tebuconazole	153,2	0,5	153,3	152,0	1,7	0,1	2,3

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ (2,3 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016. Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz estendida, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Azoxystrobin temos:

DPR Calculado = 0,3, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$CV=DPR= \frac{0,32}{118,8} \times 100 = 0,3$$

DPR Horwitz = 1,9, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 6. Levou-se em consideração que a densidade analisada da amostra de 1032 g L⁻¹, assim a %m/m do Azoxystrobin na amostra é igual a 11,5%

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,115)} \times 0,67 = 1,9$$

Para Tebuconazole temos:

DPR Calculado = 0,5, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 9:

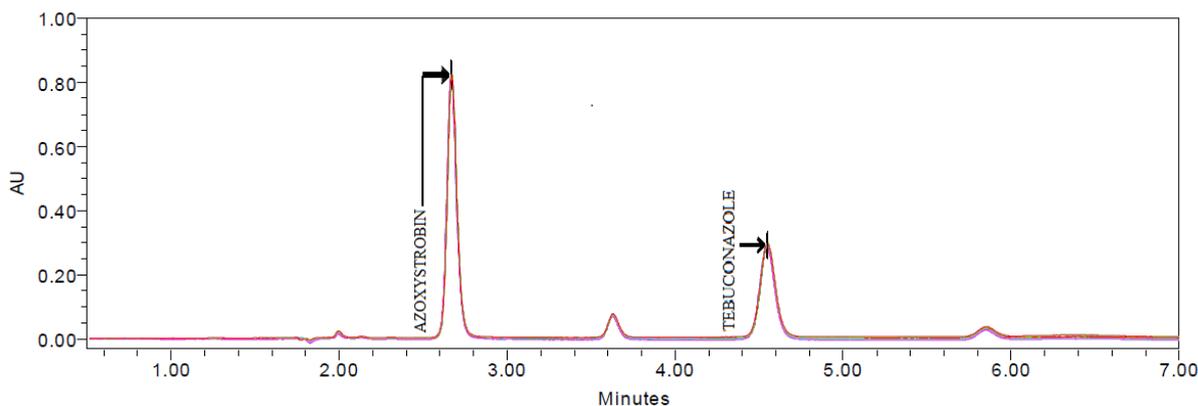
$$CV=DPR= \frac{0,8}{153,3} \times 100 = 0,5$$

DPR Horwitz = 1,8, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 6. Levou-se em consideração que a densidade analisada da amostra de 1032 g L⁻¹, assim a %m/m do Tebuconazole na amostra é igual a 15,8%:

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,158)} \times 0,67 = 1,8$$

O Cromatograma obtido das análises de repetitividade do analista 1 encontra-se ilustrado na figura 19. Os dados foram extraídos a partir das tabelas 20 e 21.

Figura 19 - Cromatograma do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 20 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto final para o ativo Azoxystrobin

	Ativo	Inj.	RT	Massa da amostra	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Conc.	Unidade
1	Azoxystrobin	1	2,672	0,02495	3301587	118,370	g/L
2	Azoxystrobin	2	2,671	0,02495	3305718	118,517	g/L
3	Azoxystrobin	1	2,669	0,02500	3314207	118,580	g/L
4	Azoxystrobin	2	2,668	0,02500	3320665	118,809	g/L
5	Azoxystrobin	1	2,670	0,02497	3320298	118,939	g/L
6	Azoxystrobin	2	2,670	0,02497	3308131	118,507	g/L
7	Azoxystrobin	1	2,670	0,02509	3345157	119,248	g/L
8	Azoxystrobin	2	2,668	0,02509	3347367	119,326	g/L
9	Azoxystrobin	1	2,669	0,02493	3313098	118,874	g/L
10	Azoxystrobin	2	2,667	0,02493	3307073	118,660	g/L
Mean			2,669	0,0	3318330	118,783	
Std. Dev.			0,001	0,0	15939,652	0,320	
% RSD			0,1	0,2	0,5	0,3	

(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 21 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto final para o ativo Tebuconazole

	Ativo	Inj.	RT	Massa da amostra	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Conc.	Unidade
1	Tebuconazole	1	4,552	0,02495	1831932	152,419	g/L
2	Tebuconazole	2	4,550	0,02495	1835201	152,687	g/L
3	Tebuconazole	1	4,549	0,02500	1846694	153,321	g/L
4	Tebuconazole	2	4,547	0,02500	1846224	153,283	g/L
5	Tebuconazole	1	4,548	0,02497	1827750	151,955	g/L
6	Tebuconazole	2	4,551	0,02497	1845277	153,389	g/L
7	Tebuconazole	1	4,548	0,02509	1866018	154,345	g/L
8	Tebuconazole	2	4,550	0,02509	1864796	154,245	g/L
9	Tebuconazole	1	4,549	0,02493	1838887	153,112	g/L
10	Tebuconazole	2	4,546	0,02493	1845946	153,690	g/L
Mean			4,549	0,00	1844873	153,245	
Std. Dev.			0,0	0,0	12.651,460	0,8	
% RSD			0,0	0,2	0,7	0,5	

(Fonte: Autor, 2019)

4.1.5.2 Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária um segundo analista preparou, seis alíquotas independentes da mesma amostra preparada no teste de repetibilidade e estas foram injetadas conforme método proposto.

Os resultados obtidos foram combinados aos resultados da repetibilidade e conjunto de dados foram submetidos a tratamento estatístico para obtenção de média, estimativa do desvio-padrão, teste de Grubbs para verificação de valores dispersos e o desvio padrão relativo. Os dados obtidos encontram-se dispostos na tabela 27:

Tabela 22 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação do produto final

Ativo	Média (g L ⁻¹)	CV (%)	Valor máximo (g L ⁻¹)	Valor mínimo (g L ⁻¹)	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor máx..	Gc Tabelado
Azoxystrobin	118,7	0,6	120,1	117,2	2,1	2,0	2,5
Tebuconazole	153,0	0,7	154,0	150,5	2,5	1,4	2,5

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ (2,5 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016: Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Azoxystrobin temos:

DPR Calculado = 0,6, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$CV=DPR= \frac{0,7}{118,7} \times 100 = 0,6$$

DPR Horwitz = 2,8, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 7. Levou-se em consideração que a densidade analisada da amostra de 1032 g L⁻¹, assim a %m/m do Azoxystrobin na amostra é igual a 11,5%:

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,115)} = 2,8$$

Para Tebuconazole temos:

DPR Calculado = 0,7, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

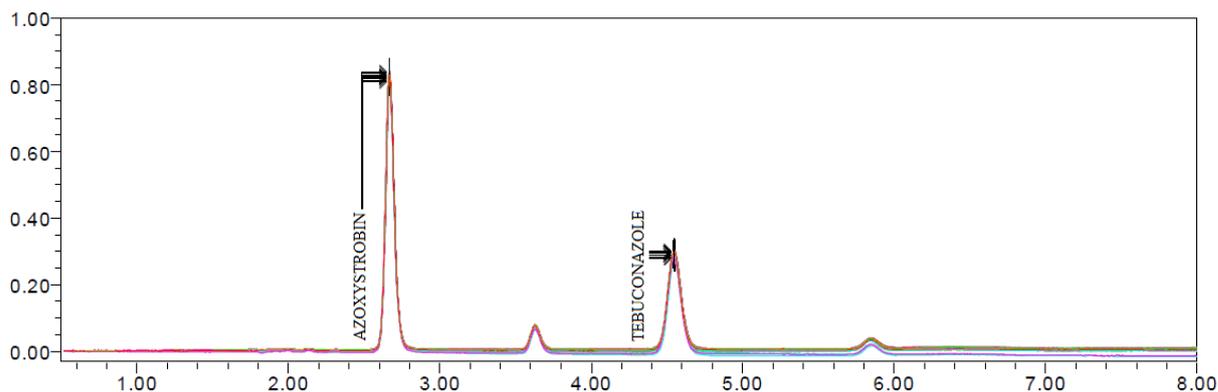
$$CV=DPR= \frac{1,0}{153,0} \times 100 = 0,7$$

DPR Horwitz = 2,6, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 7. Levou-se em consideração que a densidade analisada da amostra de 1032 g L⁻¹, assim a %m/m do Tebuconazole na amostra é igual a 15,8%:

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,158)} = 2,6$$

O Cromatograma obtido das análises de repetitividade do analista 2 encontra-se ilustrado na Figura 20. Os dados foram extraídos a partir das tabelas 23 e 24.

Figura 20 - Cromatograma do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto formulado



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 23 - Dados do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto final para o ativo Azoxystrobin

Amostra	Ativo	Inj.	RT	Massa da amostra	Área (µV*sec)	Concentração	Unidade
Repe 1.1	Azoxystrobin	1	2,669	0,02503	3323913	118,782	g/L
	Azoxystrobin	2	2,668	0,02503	3328182	118,933	g/L
Repe 1.2	Azoxystrobin	1	2,667	0,02501	3277479	117,232	g/L
	Azoxystrobin	2	2,669	0,02501	3288183	117,611	g/L
Repe 1.3	Azoxystrobin	1	2,668	0,02519	3382620	120,093	g/L
	Azoxystrobin	2	2,669	0,02519	3378161	119,936	g/L
Repe 1.4	Azoxystrobin	1	2,666	0,02510	3309061	117,926	g/L
	Azoxystrobin	2	2,667	0,02510	3311093	117,998	g/L
Repe 1.5	Azoxystrobin	1	2,669	0,02508	3331798	118,824	g/L
	Azoxystrobin	2	2,670	0,02508	3345247	119,299	g/L
Repe 2.1	Azoxystrobin	1	2,672	0,02495	3301587	118,370	g/L
	Azoxystrobin	2	2,671	0,02495	3305718	118,517	g/L
Repe 2.2	Azoxystrobin	1	2,669	0,02500	3314207	118,580	g/L
	Azoxystrobin	2	2,668	0,02500	3320665	118,809	g/L
Repe 2.3	Azoxystrobin	1	2,670	0,02497	3320298	118,939	g/L
	Azoxystrobin	2	2,670	0,02497	3308131	118,507	g/L
Repe 2.4	Azoxystrobin	1	2,670	0,02509	3345157	119,248	g/L
	Azoxystrobin	2	2,668	0,02509	3347367	119,326	g/L
Repe 2.5	Azoxystrobin	1	2,669	0,02493	3313098	118,874	g/L
	Azoxystrobin	2	2,667	0,02493	3307073	118,660	g/L
Mean			2,669	0,025035	3322951,9	118,723	
Std. Dev.			0,00	0,00	26479,84	0,70	
% RSD			0,1	0,3	0,8	0,6	

(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 24 - Dados do estudo da repetitividade do analista 2 na validação do produto final para o ativo Tebuconazole

Amostra	Ativo	Inj.	RT	Massa da amostra	Área (µV*sec)	Concentração	Unidade
Repe 1.1	Tebuconazole	1	4,552	0,02495	1831932	152,419	g/L
	Tebuconazole	2	4,550	0,02495	1835201	152,687	g/L
Repe 1.2	Tebuconazole	1	4,549	0,02500	1846694	153,321	g/L
	Tebuconazole	2	4,547	0,02500	1846224	153,283	g/L
Repe 1.3	Tebuconazole	1	4,548	0,02497	1827750	151,955	g/L
	Tebuconazole	2	4,551	0,02497	1845277	153,389	g/L
Repe 1.4	Tebuconazole	1	4,548	0,02509	1866018	154,345	g/L
	Tebuconazole	2	4,550	0,02509	1864796	154,245	g/L
Repe 1.5	Tebuconazole	1	4,549	0,02493	1838887	153,112	g/L
	Tebuconazole	2	4,546	0,02493	1845946	153,690	g/L
Repe 2.1	Tebuconazole	1	4,547	0,02503	1854330	153,761	g/L
	Tebuconazole	2	4,546	0,02503	1840006	152,591	g/L
Repe 2.2	Tebuconazole	1	4,543	0,02501	1813101	150,515	g/L
	Tebuconazole	2	4,545	0,02501	1823038	151,327	g/L

Tabela 24 – (continuação)

Repe 2.3	Tebuconazole	1	4,545	0,02519	1866544	153,775	g/L
	Tebuconazole	2	4,549	0,02519	1871595	154,184	g/L
Repe 2.4	Tebuconazole	1	4,544	0,02510	1843536	152,453	g/L
	Tebuconazole	2	4,546	0,02510	1840841	152,234	g/L
Repe 2.5	Tebuconazole	1	4,549	0,02508	1843830	152,599	g/L
	Tebuconazole	2	4,549	0,02508	1850842	153,170	g/L
Mean			4,548	0,025	1844819,400	152,953	
Std. Dev.			0,0	0,0	15005,8	1,0	
% RSD			0,1	0,3	0,8	0,6	

(Fonte: Autor, 2019)

4.1.6 Resumo da validação de método do produto formulado

O método proposto para quantificação de Azoxystrobin e Tebuconazole no produto agroquímico avaliado é seletivo, exato e preciso nas faixas de trabalho de 96-144g L⁻¹ para Azoxystrobin e 128-192g L⁻¹ para Tebuconazole em produto formulado. Deste modo, conclui-se que o método está em conformidade com os requisitos normativos (ABNT NBR 14029:2016) e está apto a utilização de acordo com os parâmetros proposto. A tabela 25 mostra um resumo da validação do produto formulado.

Tabela 25 - Resumo da validação do produto formulado

Parâmetro da validação		Resultado Azoxystrobin	Resultado Tebuconazole
Especificidade/Seletividade		Seletivo com ausência de interferentes no tempo de retenção do Azoxystrobin e do Tebuconazole	
Linearidade		Y = 2,82E+07x - 3,08E+04 R ² = 1,000	y = 1,22E+07x - 2,94E+04 R ² = 0,999
		96-144g.L-1 para Azoxystrobin	128-192g.L-1 para Tebuconazole
Exatidão	Recuperação Inferior (%)	99	99
	Recuperação Nominal (%)	98	98
	Recuperação Superior (%)	98	98
	Recuperação Média	98	98
Precisão	Repetitividade (CV%)	0,3	0,5
	Precisão Intermediária (CV%)	0,6	0,6

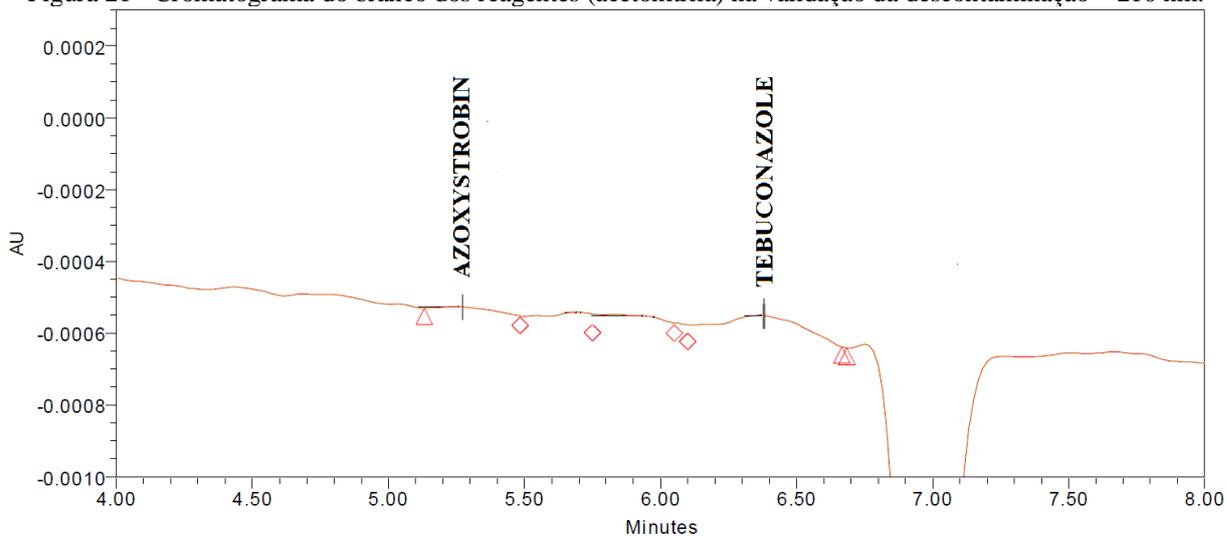
(Fonte: Autor, 2019)

4.2 Validação de método para a descontaminação

4.2.1 Seletividade e especificidade

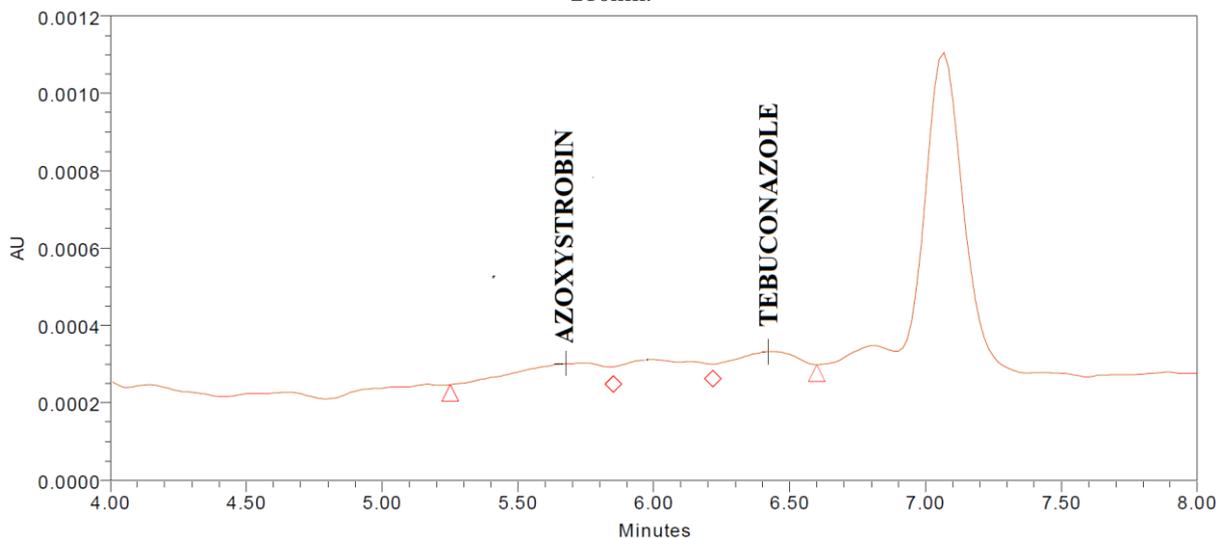
O estudo da seletividade foi executado pela avaliação dos brancos dos reagentes (acetonitrila) e do branco da amostra (água para o tanque SE e solvente orgânico a base de amida para o tanque EC). Os cromatogramas obtidos encontram-se ilustrados respectivamente nas figuras 21, 22 e 23 respectivamente.

Figura 21 - Cromatograma do branco dos reagentes (acetonitrila) na validação da descontaminação – 210 nm.



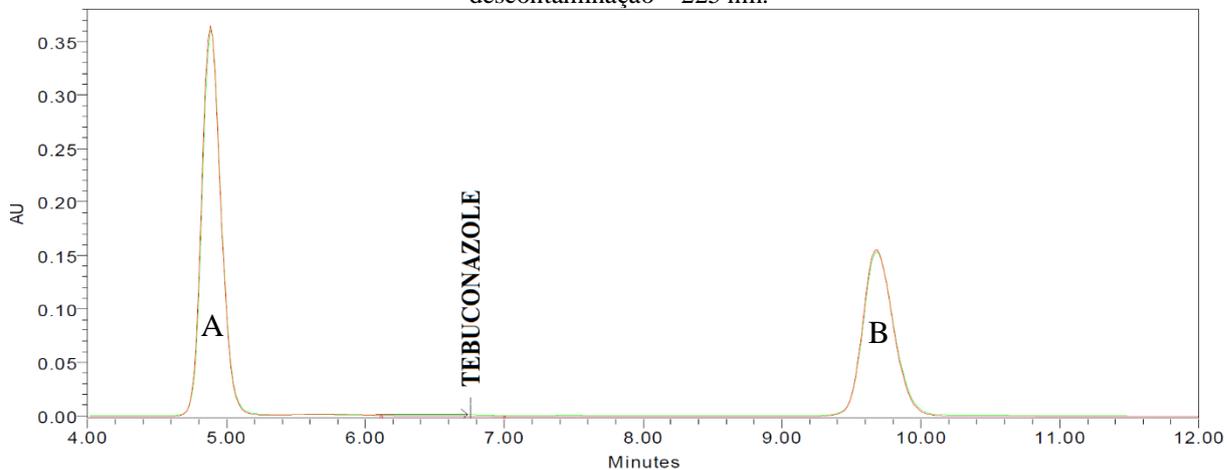
(Fonte: Autor, 2019)

Figura 22 - Cromatograma do branco da amostra do tanque SE (água) na validação da descontaminação – 210nm.



(Fonte: Autor, 2019)

Figura 23 - Cromatograma do branco da amostra do tanque EC (solvente orgânico) na validação da descontaminação – 225 nm.



(Fonte: Autor, 2019)

A figura 23 mostra os picos A e B referentes ao solvente de descontaminação, optou-se por utilização um comprimento de onda diferente para a análise do produto do tanque EC para diminuir o sinal dos solventes. Para a escolha do comprimento de onda a amostra da descontaminação do tanque EC foi analisada em um CLAE com detector DAD para avaliar o melhor comprimento de onda que obtivesse um sinal bom para o Tebuconazole e diminuísse o sinal A e B do solvente.

Conforme verificado nos cromatogramas das figuras 21, 22 e 23 não foram encontrados interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Deste modo, conclui-se que o método é seletivo e específico para Azoxystrobin e Tebuconazole, conforme exige a ABNT NBR 14029:2016.

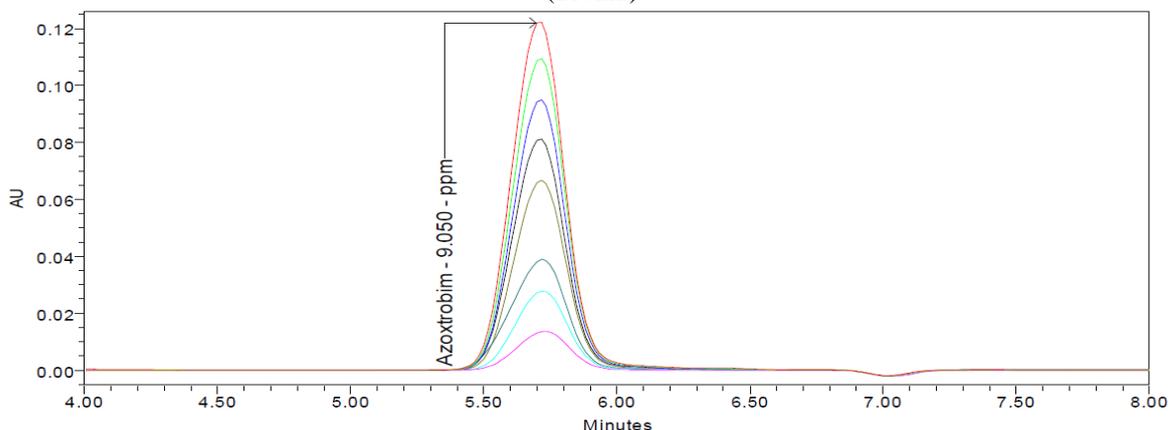
4.2.2 Linearidade

Para avaliar se a resposta do sinal analítico é diretamente proporcional a concentração do princípio ativo, foram preparadas 2 curvas de calibrações com o método de padronização externa para os ativos Azoxystrobin e Tebuconazole. Para a análise do produto do tanque SE as duas curvas foram geradas no comprimento de onda de 210 nm. Enquanto para a análise do produto do tanque EC a curva do Tebuconazole foi gerada novamente no comprimento de onda de 225 nm. Os dados foram tratados pelo modelo matemático de regressão linear.

4.2.2.1 Linearidade para o tanque SE

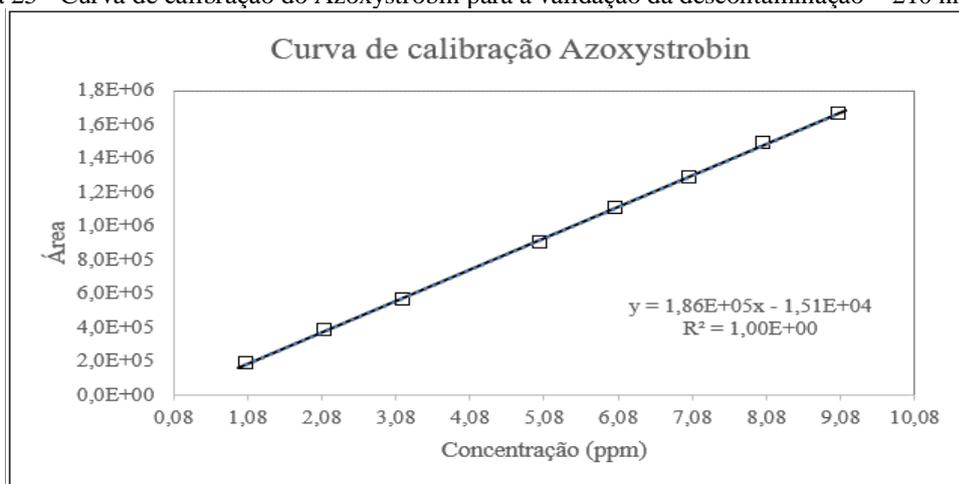
Para a curva do Azoxystrobin, foram preparados 9 padrões de modo a obter uma curva de calibração com concentrações entre 1 ppm à 9 ppm. A curva de calibração na figura 25 é referente ao ativo Azoxystrobin e a equação da reta foi extraída por regressão linear a partir dos dados da tabela 26, a figura 24 mostra a sobreposição dos cromatogramas dos pontos da curva. Após tratamento estatístico, o ponto referente a concentração 4 ppm foi excluído.

Figura 24 - Sobreposição dos pontos da curva de calibração do Azoxystrobin na validação da descontaminação (210nm)



(Fonte: Autor, 2019)

Figura 25 - Curva de calibração do Azoxystrobin para a validação da descontaminação – 210 nm



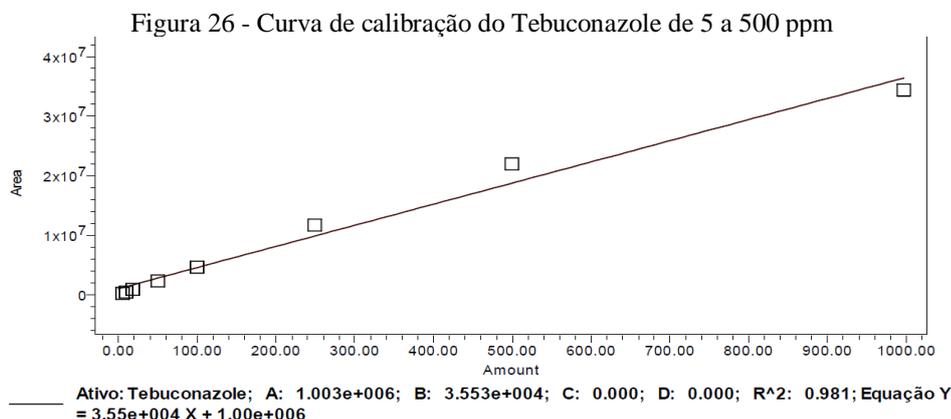
(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 26 - Dados da curva de calibração do Azoxystrobin na validação da descontaminação

Nome	Level	Valor de X	Área	Valor Calc.	% Desvio	
1	Azoxystrobin	Level 1	1,060	190.209,569	1,106	4.373
2	Azoxystrobin	Level 2	2,120	381.476,806	2,137	0.813
3	Azoxystrobin	Level 3	3,180	567.957,201	3,142	-1.185
4	Azoxystrobin	Level 4	5,030	904.057,782	4,954	-1.515
5	Azoxystrobin	Level 5	6,040	1.105.563,600	6,040	-0.002
6	Azoxystrobin	Level 6	7,040	1.289.392,406	7,031	-0.133
7	Azoxystrobin	Level 7	8,050	1.489.104,724	8,107	0.709
8	Azoxystrobin	Level 8	9,050	1.664.569,049	9,053	0.030

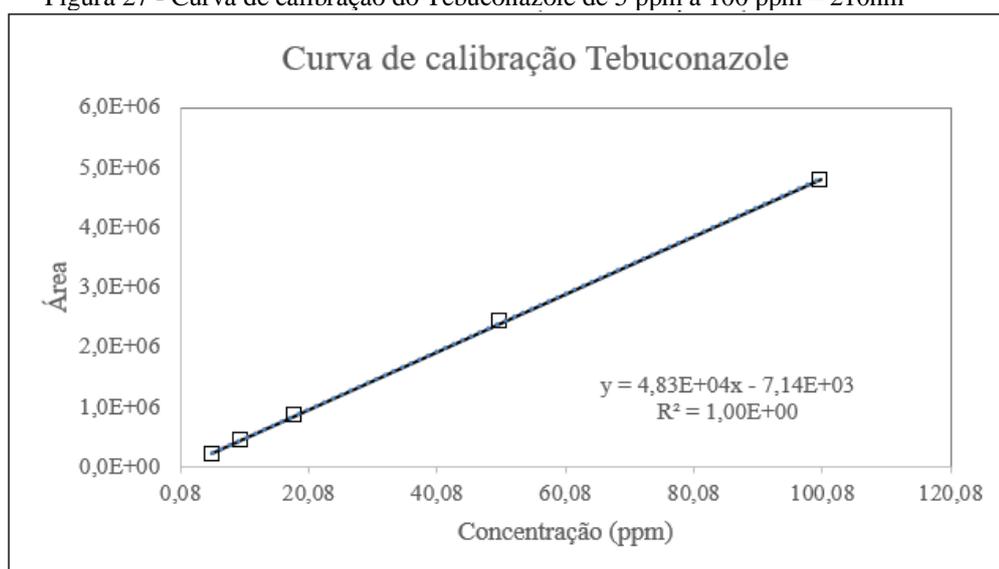
(Fonte: Autor, 2019)

Para a curva do Tebuconazole, foram preparados 7 padrões de modo a obter uma curva de calibração com concentrações entre 5 - 500ppm. O método demonstrou linearidade de 5 a 500 ppm como pode observar na figura 26, entretanto, optou-se por trabalhar na faixa até 100 ppm, visto que para o produto formulado a relação é de Azoxystrobin/Tebuconazole = 0,75. Ou seja, quando a concentração de Azoxystrobin for de 10 ppm (limite de liberação) o teor de Tebuconazole estimado é de $13,33 \pm 9$ ppm, aproximadamente. A figura 27 mostra a curva de calibração obtida a partir dos pontos 5 a 100 ppm, a equação da reta foi extraída por regressão linear a partir dos dados da tabela 27, a figura 28 mostra a sobreposição dos cromatogramas dos pontos da curva.



(Fonte: Autor, 2019)

Figura 27 - Curva de calibração do Tebuconazole de 5 ppm a 100 ppm – 210nm



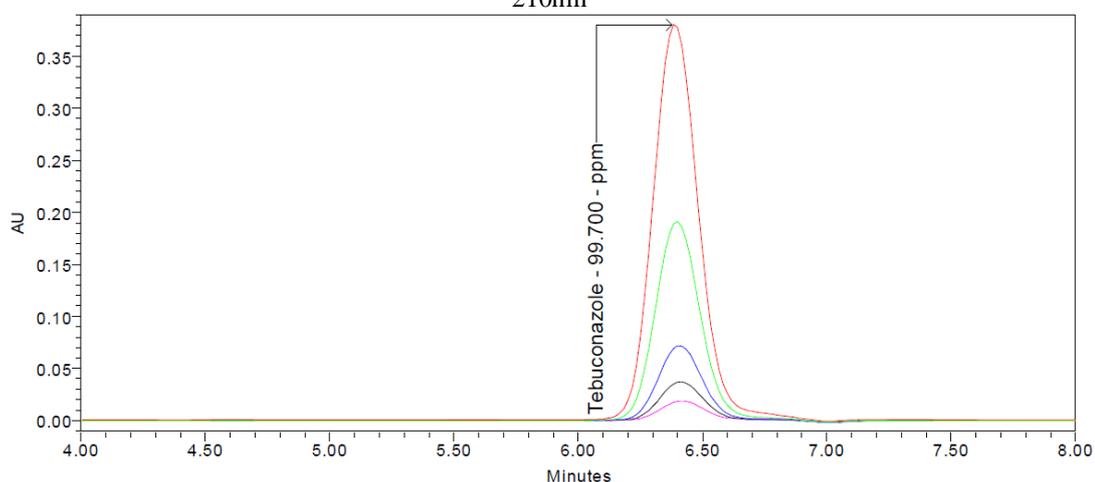
(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 27 - Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação – 210 nm

	Nome	Level	Valor de X	Área	Valor Calc.	% Desvio
1	Tebuconazole	Level 1	5,00	211.523,455	4,528	-9,449
2	Tebuconazole	Level 2	9,40	447.426,543	9,412	0,129
3	Tebuconazole	Level 3	18,00	872.358,627	18,211	1,170
4	Tebuconazole	Level 4	49,90	2.428.464,557	50,431	1,064
5	Tebuconazole	Level 5	99,70	4.794.375,812	99,419	-0,282

(Fonte: Autor, 2019)

Figura 28 - Sobreposição dos pontos da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação - 210nm

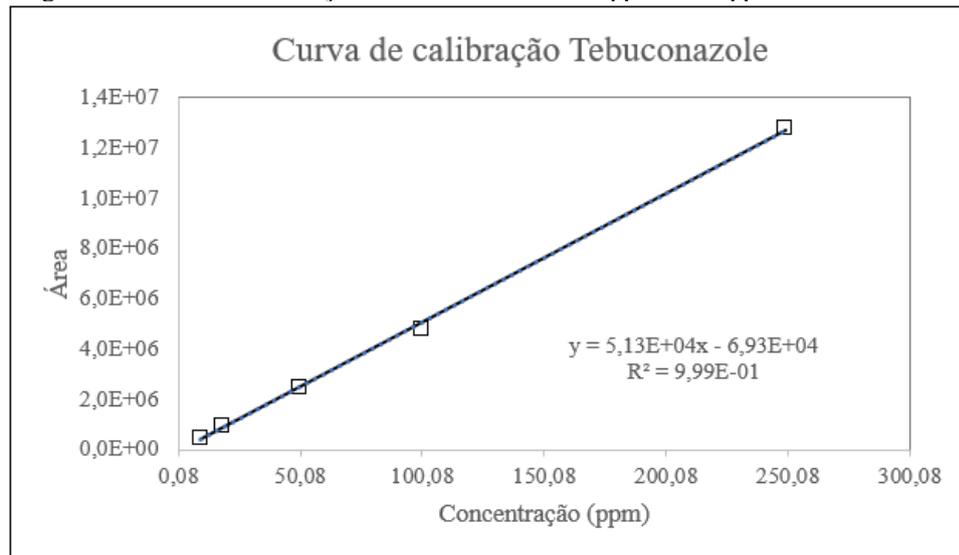


(Fonte: Autor, 2019)

4.2.2.2 Linearidade para o tanque EC

Para a análise da amostra da descontaminação do tanque EC, a os pontos da curva de calibração do Tebuconazole foi injetado no comprimento de onda de 225 nm. A figura 29 mostra a curva de calibração obtida a partir dos pontos 9 a 250 ppm, a equação da reta foi extraída por regressão linear a partir dos dados da tabela 28.

Figura 29 - Curva de calibração do Tebuconazole de 5 ppm a 100 ppm – 225 nm



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 28 - Dados da curva de calibração do Tebuconazole na validação da descontaminação – 225 nm

	Nome	Level	Valor de X	Area	Valor Calc.	% Desvio
1	Tebuconazole	Level 2	9,40	495.147	11,011	17,137
2	Tebuconazole	Level 3	18,00	934.233	19,577	8,761
3	Tebuconazole	Level 4	49,90	2.457.743	49,299	-1,204
4	Tebuconazole	Level 5	99,70	4.824.715	95,476	-4,236
5	Tebuconazole	Level 6	249,00	12.778.006	250,637	0,657

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que método em 210 nm empregado para determinação dos ativos Azoxystrobin e Tebuconazole responde linearmente para o intervalo de concentração de 1 - 9 ppm e 5 – 100ppm para o produto da descontaminação do tanque SE, respectivamente. Enquanto o método em 225 nm empregado para determinação do Tebuconazole responde linearmente para o intervalo de concentração de 9 – 250ppm para o produto da descontaminação do tanque EC.

Os valores obtidos para o coeficiente de correlação estão em conformidade com exigências (ABNT NBR 14029:2016) para o qual o método se aplica ($R \geq 0,99$).

4.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada para a amostra do tanque SE, através da fortificação em água com uma amostra diluída do produto formulada com concentrações teóricas de 120ppm para Azoxystrobin e 160ppm para Tebuconazole, e para a amostra do tanque EC, através da fortificação no solvente usado para descontaminação com padrões dos analitos, de modo a obter nas duas matrizes as concentrações relacionadas a 80, 100 e 120% do valor nominal dos ativos.

4.2.3.1 Exatidão do tanque SE

A amostra diluída para o preparo da solução estoque foi a amostra analisada na repetitividade da validação do método do produto formulado. Os teores analisados foram para o Azoxystrobin de 118,78 g L⁻¹ e para o Tebuconazole foi de 153,2 g L⁻¹. Sabendo que a massa pesada do produto foi de 0,1043 g em um balão de 100 mL e que a densidade do produto é de 1032 g L⁻¹, tem-se que as concentrações teóricas para a solução estoque foi de 120,05 ppm para Azoxystrobin e 154,83 ppm para Tebuconazole. De acordo com a equação 4 abaixo, foi obtido os resultados da tabela 29. Levou-se em consideração que as concentrações dos ativos na amostra do branco foi 0 g L⁻¹, como analisado na seletividade.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde

C₁ é a concentração encontrada após adição do padrão;

C₂ é a concentração encontrada antes da adição do padrão (branco);

C₃ é a concentração conhecida adicionada do padrão analítico.

Tabela 29 - Resultados da recuperação da amostra do tanque SE.

Recuperação	Ativo	Resultado esperado (ppm)	Resultado obtido (ppm)	% Recuperação
Limite inferior	Azoxystrobin	8,4	9,8	117
80%	Tebuconazole	10,8	12,3	114
Limite nominal	Azoxystrobin	10,8	9,9	92
100%	Tebuconazole	13,9	12,3	88
Limite superior	Azoxystrobin	12,0	11,4	98
120%	Tebuconazole	15,5	13,7	89

(Fonte: Autor, 2019)

Os resultados obtidos demonstram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado e está em conformidade com os requisitos normativos exigidos pela ABNT NBR 14029:2016: 80 - 120% de recuperação.

4.2.3.2 Exatidão do tanque EC

A exatidão da análise da amostra do tanque EC foi avaliada no comprimento de onda de 225 nm fortificando no solvente da descontaminação três níveis de concentração 80%, 100% e 120% da concentração de Tebuconazole aprovada na ACL (1000 ppm). De acordo com a equação 4 abaixo, foi obtido os resultados da tabela 30. Levou-se em consideração que as concentrações dos ativos na amostra do branco foi 0 g L⁻¹, como analisado na seletividade.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde

C_1 é a concentração encontrada após adição do padrão;

C_2 é a concentração encontrada antes da adição do padrão (branco);

C_3 é a concentração conhecida adicionada do padrão analítico.

Tabela 30 - Resultados da recuperação da amostra do tanque EC.

Recuperação	Ativo	Resultado esperado (ppm)	Resultado obtido (ppm)	% Recuperação
Limite inferior 80%	Tebuconazole	815,0	800,1	98
Limite nominal 100%	Tebuconazole	1000,1	973,7	97
Limite superior 80%	Tebuconazole	1204,9	1184,0	98

(Fonte: Autor, 2019)

Os resultados obtidos demonstram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado e está em conformidade com os requisitos normativos exigidos pela ABNT NBR 14029:2016: 97 - 103% de recuperação.

4.2.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo ensaio de repetitividade e precisão intermediária para a amostra do tanque SE e amostra do tanque EC.

5.2.5.1 Precisão da amostra do tanque SE

A repetitividade foi avaliada pelo preparo de sete alíquotas independentes de uma mesma amostra, que foram injetadas conforme método proposto.

Os dados obtidos foram utilizados em tratamentos estatísticos (Teste G) para avaliar a existência de valores dispersos. Os resultados encontram-se dispostos na tabela 31 abaixo.

Tabela 31 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação da descontaminação produto do tanque SE

Ativo	Média (g L ⁻¹)	CV (%)	Valor máximo (g L ⁻¹)	Valor mínimo (g L ⁻¹)	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor max.	Gc Tabelado
Azoxystrobin	9,56	0,8	9,7	9,5	1,3	1,8	2,02
Tebuconazole	11,87	0,6	12,0	11,8	1,3	1,3	2,02

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ (2,02 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016. Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz estendida, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Azoxtrobin temos:

DPR Calculado = 0,8 , vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$CV=DPR= \frac{0,08}{9,56} \times 100 = 0,8$$

DPR Horwitz = 7,6, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 6. Levou-se em consideração que o %m/m do Azoxystrobin na amostra é igual a 0,000958%

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,0000958)} \times 0,67 = 7,6$$

Para Tebuconazole temos:

DPR Calculado = 0,6, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 9:

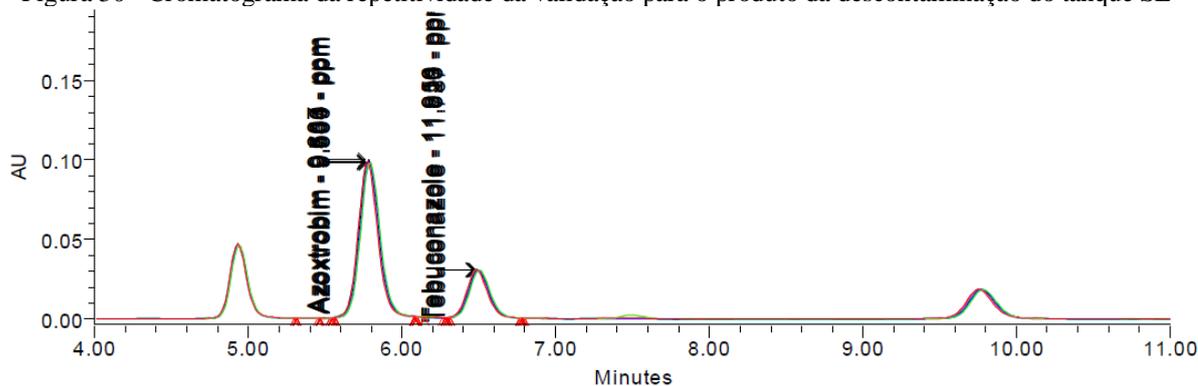
$$CV=DPR= \frac{0,07}{11,87} \times 100 = 0,6$$

DPR Horwitz = 7,3, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 6. Levou-se em consideração que o %m/m do Tebuconazole na amostra é igual a 0,001316%:

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,00001316)} \times 0,67 = 7,3$$

O Cromatograma obtido das análises de repetitividade do analista 1 encontra-se ilustrado na figura 30 e os dados para os cálculos foram retirados das tabelas 32 e 33.

Figura 30 - Cromatograma da repetitividade da validação para o produto da descontaminação do tanque SE



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 32 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Azoxystrobin

	Ativo	Inj.	RT	Área (µV*sec)	Conc.	Unidade
1	Azoxystrobin	1	5.776	862126	9.456	ppm
2	Azoxystrobin	1	5.777	876163	9.607	ppm
3	Azoxystrobin	1	5.783	866375	9.501	ppm
4	Azoxystrobin	1	5.781	870217	9.543	ppm
5	Azoxystrobin	1	5.784	884796	9.700	ppm
6	Azoxystrobin	1	5.790	871748	9.559	ppm
7	Azoxystrobin	1	5.793	871283	9.554	ppm
Mean			5.784	871815.4	9.6	
Std. Dev.			0.006	7230.9	0.1	
% RSD			0.1	0.8	0.8	

(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 33 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Tebuconazole

	Ativo	Inj.	RT	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Conc.	Unidade
1	Tebuconazole	1	6.486	278198	11.816	ppm
2	Tebuconazole	1	6.487	281173	11.939	ppm
3	Tebuconazole	1	6.494	281514	11.954	ppm
4	Tebuconazole	1	6.491	279162	11.856	ppm
5	Tebuconazole	1	6.496	278282	11.820	ppm
6	Tebuconazole	1	6.502	280528	11.913	ppm
7	Tebuconazole	1	6.505	277490	11.787	ppm
Mean			6.494	279478.1	11.9	ppm
Std. Dev.			0.007	1594.0	0.1	
% RSD			0.1	0.6	0.6	

(Fonte: Autor, 2019)

Para avaliação da precisão intermediária um segundo analista preparou, sete alíquotas independentes da mesma amostra preparada no teste de repetibilidade e estas foram e injetadas conforme método proposto.

Os resultados obtidos foram combinados aos resultados da repetibilidade e conjunto de dados foram submetidos a tratamento estatístico para obtenção de média, estimativa do desvio-padrão, teste de Grubbs para verificação de valores dispersos e o desvio padrão relativo. Os dados obtidos encontram-se dispostos na tabela 34:

Tabela 34 - Teste G para valores dispersos no ensaio de precisão intermediária na validação da descontaminação produto do tanque SE

Ativo	Média (g L^{-1})	CV (%)	Valor máximo (g L^{-1})	Valor mínimo (g L^{-1})	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor max.	Gc Tabelado
Azoxystrobin	9,63	1,1	9,9	9,5	1,6	2,1	2,5
Tebuconazole	12,04	1,7	12,4	11,8	1,3	1,7	2,5

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{\text{calculado}} \leq G_c$ (2,5 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016: Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Azoxystrobin temos:

DPR Calculado = 1,1, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$CV = \text{DPR} = \frac{0,1}{9,63} \times 100 = 1,1$$

DPR Horwitz = 11,3, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 7. Levou-se em consideração que o %m/m do Azoxystrobin na amostra é igual a 0,000958%:

$$\% \text{DPR Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log 0,0000958)} = 11,3$$

Para Tebuconazole temos:

DPR Calculado = 1,7, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$CV=DPR= \frac{0,2}{12,04} \times 100 = 1,7$$

DPR Horwitz = 10,9, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 7. Levou-se em consideração que o %m/m do Azoxystrobin na amostra é igual a 0,001316%:

$$\%DPR \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,0001316)} = 10,9$$

Os dados foram extraídos das tabelas 35 e 36 para o tratamento estatístico.

Tabela 35 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Azoxystrobin

	Ativo	Inj.	RT	Área (µV*sec)	Conc.	Unidade
1	Azoxystrobin	1	5,776	862126	9,456	ppm
2	Azoxystrobin	1	5,777	876163	9,607	ppm
3	Azoxystrobin	1	5,783	866375	9,501	ppm
4	Azoxystrobin	1	5,781	870217	9,543	ppm
5	Azoxystrobin	1	5,784	884796	9,700	ppm
6	Azoxystrobin	1	5,790	871748	9,559	ppm
7	Azoxystrobin	1	5,793	871283	9,554	ppm
8	Azoxystrobin	1	5,848	873785	9,581	ppm
9	Azoxystrobin	1	5,841	888033	9,735	ppm
10	Azoxystrobin	1	5,838	886005	9,713	ppm
11	Azoxystrobin	1	5,835	880295	9,651	ppm
12	Azoxystrobin	1	5,828	883283	9,684	ppm
13	Azoxystrobin	1	5,829	899539	9,859	ppm
14	Azoxystrobin	1	5,827	883008	9,681	ppm
Mean			5,809	878332,6	9,630	
Std. Dev.			0,027	9940,631	0,107	
% RSD			0,47	1,131762	1,11	

(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 36 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque SE para o ativo Tebuconazole

	Ativo	Inj.	RT	Área (µV*sec)	Conc.	Unidade
1	Tebuconazole	1	6,486	278.198	11,816	ppm
2	Tebuconazole	1	6,487	281.173	11,939	ppm
3	Tebuconazole	1	6,494	281.514	11,954	ppm
4	Tebuconazole	1	6,491	279.162	11,856	ppm
5	Tebuconazole	1	6,496	278.282	11,820	ppm
6	Tebuconazole	1	6,502	280.528	11,913	ppm
7	Tebuconazole	1	6,505	277.490	11,787	ppm
8	Tebuconazole	1	6,566	282.728	12,004	ppm
9	Tebuconazole	1	6,557	280.346	11,905	ppm
10	Tebuconazole	1	6,555	292.763	12,419	ppm
11	Tebuconazole	1	6,551	290.660	12,332	ppm
12	Tebuconazole	1	6,545	289.750	12,295	ppm
13	Tebuconazole	1	6,545	289.601	12,288	ppm
14	Tebuconazole	1	6,541	289.363	12,279	ppm
Mean			6,523	283682,71	12,043	ppm
Std. Dev.			0,031	5451,00	0,226	
% RSD			0,468	1,92	1,874	

(Fonte: Autor, 2019)

5.2.5.1 Precisão da amostra do tanque EC

A repetitividade foi avaliada pelo preparo de cinco alíquotas independentes de uma mesma amostra, que foram injetadas conforme método proposto.

Os dados obtidos foram utilizados em tratamentos estatísticos (Teste G) para avaliar a existência de valores dispersos. Os resultados encontram-se dispostos na tabela 37 abaixo.

Tabela 37 - Teste G para valores dispersos no ensaio de repetitividade na validação da descontaminação produto do tanque EC

Ativo	Média (g L ⁻¹)	CV (%)	Valor máximo (g L ⁻¹)	Valor mínimo (g L ⁻¹)	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor max.	Gc Tabelado
Tebuconazole	1088,5	1,9	1115,9	1059,5	1,4	1,3	1,7

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ (1,7 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016. Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz estendida, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Tebuconazole temos:

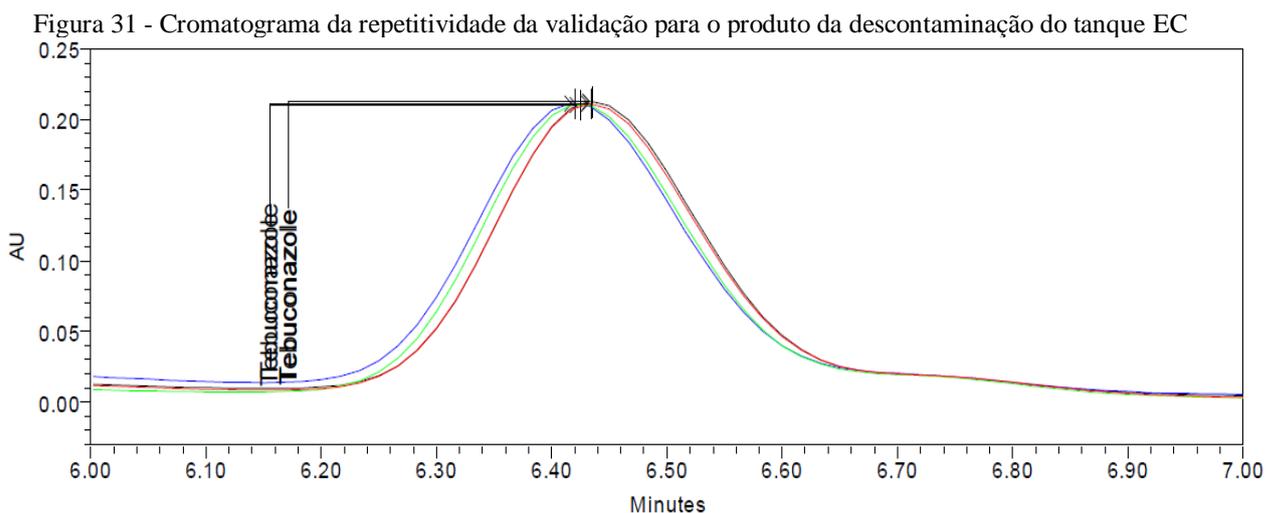
DPR Calculado = 1,9, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 9:

$$CV=DPR= \frac{20,8}{1088,5} \times 100 = 1,9$$

DPR Horwitz = 3,8, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 6. Levou-se em consideração que o % m/m do Tebuconazole na amostra é igual a 0,09875%:

$$\%DPR\ Horwitz = 2^{(1-0,5 \log 0,0009875)} \times 0,67 = 3,8$$

O Cromatograma obtido das análises de repetitividade do analista 1 encontra-se ilustrado na figura 31 e os dados para os cálculos foram retirados da tabela 38.



(Fonte: Autor, 2019)

Tabela 38 - Dados do estudo da repetitividade do analista 1 na validação do produto da descontaminação do tanque EC para o ativo Tebuconazole

	Ativo	Inj.	RT	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Conc.	Unidade
1	Tebuconazole	1	6,397	2689687	1.098,99	ppm
2	Tebuconazole	1	6,394	2730981	1.115,85	ppm
3	Tebuconazole	1	6,407	2653775	1.084,32	ppm
4	Tebuconazole	1	6,403	2592950	1.059,48	ppm
5	Tebuconazole	1	6,421	2652986	1.084,00	ppm
Mean			6,404	2.664.075,8	1.088,53	ppm
Std. Dev.			0,010	51039,71	20,85	
% RSD			0,165	1,915850603	1,915	

(Fonte: Autor, 2019)

Para avaliação da precisão intermediária um segundo analista preparou, cinco alíquotas independentes da mesma amostra preparada no teste de repetibilidade e estas foram e injetadas conforme método proposto.

Os resultados obtidos foram combinados aos resultados da repetibilidade e conjunto de dados foram submetidos a tratamento estatístico para obtenção de média, estimativa do desvio-padrão, teste de Grubbs para verificação de valores dispersos e o desvio padrão relativo. Os dados obtidos encontram-se dispostos na tabela 39:

Tabela 39 - Teste G para valores dispersos no ensaio de precisão intermediária na validação da descontaminação produto do tanque EC

Ativo	Média (g L^{-1})	CV (%)	Valor máximo (g L^{-1})	Valor mínimo (g L^{-1})	G Calculado Valor mín.	G Calculado Valor max.	Gc Tabelado
Tebuconazole	1095,9	1,8	1124,2	1059,5	1,9	1,5	2,3

(Fonte: Autor, 2019)

De acordo com os dados obtidos, não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{\text{calculado}} \leq G_c$ (2,5 %) e resultados encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos em ABNT NBR 14029:2016: Além disso, o DPR calculado \leq DPR Horwitz, como demonstrado nos cálculos abaixo:

Para Tebuconazole temos:

DPR Calculado = 1,8, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 10:

$$\text{CV}=\text{DPR}=\frac{19,1}{1095,9} \times 100 = 1,8$$

DPR Horwitz = 5,7, vide cálculo abaixo de acordo com a equação 7. Levou-se em consideração que o %m/m do Tebuconazole na amostra é igual a 0,09875%:

$$\% \text{DPR Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,0009875)} = 5,7$$

Os dados foram extraídos da tabela 40 para o tratamento estatístico.

Tabela 40 - Dados do estudo da precisão intermediária do analista 2 na validação do produto da descontaminação do tanque EC para o ativo Tebuconazole

	Ativo	Inj.	RT	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Conc.	Unidade
1	Tebuconazole	1	6,397	2.689.687,0	1.099,0	ppm
2	Tebuconazole	1	6,394	2.730.981,0	1.115,9	ppm
3	Tebuconazole	1	6,407	2.653.775,0	1.084,3	ppm
4	Tebuconazole	1	6,403	2.592.950,0	1.059,5	ppm
5	Tebuconazole	1	6,421	2.652.986,0	1.084,0	ppm
6	Tebuconazole	1	6,435	2.706.254,0	1.105,8	ppm
7	Tebuconazole	1	6,435	2.706.254,0	1.105,8	ppm
8	Tebuconazole	1	6,436	2.695.426,0	1.101,3	ppm
9	Tebuconazole	1	6,425	2.751.521,0	1.124,2	ppm
10	Tebuconazole	1	6,417	2.682.222,5	1.095,94	ppm
Mean			0,016	46.886,3	19,149	ppm
Std. Dev.			0,250	1,748	1,747	
% RSD			6,425	2.751.521,0	1.124,2	

(Fonte: Autor, 2019)

4.2.5 Resumo da validação de método da descontaminação

O método proposto para quantificação de Azoxystrobin e Tebuconazole em amostras de descontaminação no produto agroquímico avaliado é seletivo, exato e preciso nas faixas de trabalho de 2 – 18 ppm para Azoxystrobin e 10 - 200 ppm para Tebuconazole, quando em amostras da descontaminação do tanque SE. A faixa de trabalho para Tebuconazole em amostras de descontaminação da base EC é de 188 ppm a 2000 ppm.

Deste modo conclui-se que o método está em conformidade com os requisitos normativos (ABNT NBR 14029:2016) e está apto a utilização de acordo com os parâmetros proposto. A tabela 41 expõe um resumo da validação do método de descontaminação.

Tabela 41 - Resumo da validação do método da descontaminação do produto

Parâmetro da validação		Resultado Azoxystrobin	Resultado Tebuconazole
Especificidade/Seletividade		Seletivo com ausência de interferentes no tempo de retenção do Azoxystrobin e do Tebuconazole	
Linearidade		R \geq 0,99	
Exatidão Tanque SE	Recuperação Inferior (%)	117	114
	Recuperação Nominal (%)	92	88
	Recuperação Superior (%)	98	89
Exatidão Tanque EC	Recuperação Inferior (%)	NA	98
	Recuperação Nominal (%)	NA	97
	Recuperação Superior (%)	NA	98
Precisão Tanque SE	Repetitividade (CV%)	0,8	0,6
	Precisão Intermediária (CV%)	1,1	1,7
Precisão Tanque EC	Repetitividade (CV%)	NA	1,92
	Precisão Intermediária (CV%)	NA	1,8

(Fonte: Autor, 2019)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou a validação de dois métodos analíticos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o controle da qualidade de um produto agroquímico e da conformidade dos efluentes gerados no processo de descontaminação da planta produtiva.

O método proposto para a análise do produto agroquímico demonstrou todos os parâmetros em conformidade de acordo com a norma ABNT NBR 14029:2016. Durante a seletividade não foram encontrados interferentes nos tempos de retenção dos analitos, deste modo, conclui-se que o método é seletivo e específico para Azoxystrobin e Tebuconazole. O método respondeu linearmente para a faixa de trabalho de concentração de 96-144 g L⁻¹ e de 128-192 g L⁻¹ para Azoxystrobin e Tebuconazole em produto formulado, respectivamente. Os valores obtidos para o coeficiente de correlação estão em conformidade com exigências (ABNT NBR 14029:2016) para o qual o método se aplica ($R \geq 0,99$). Os testes de recuperação demonstraram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado com níveis entre 98 – 99% de recuperação para ambos os ingredientes ativo. Os testes para avaliar a precisão do método que foram os testes de repetibilidade e de precisão intermediária, também obtiveram resultados em conformidades com a Norma, onde não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ e o desvio-padrão calculado foi menor que o desvio-padrão calculado pela equação de Horwitz.

O método proposto para a análise dos produtos da descontaminação da planta produtiva demonstrou todos os parâmetros em conformidade de acordo com a norma ABNT NBR 14029:2016. Durante a seletividade não foram encontrados interferentes nos tempos de retenção dos analitos nas matrizes dos solventes de descontaminação, no caso água e solvente orgânico a base de amida, deste modo, conclui-se que o método é seletivo e específico para Azoxystrobin e Tebuconazole. Optou-se a conduzir a análise da amostra de descontaminação do tanque EC em comprimento de onda de 225nm para diminuir a intensidade do sinal dos picos referentes ao solvente. O método respondeu linearmente para a faixa de trabalho de 2 – 18 ppm para Azoxystrobin e 10 - 200 ppm para Tebuconazole, quando em amostras da descontaminação do tanque SE. Já em amostras de descontaminação da base EC, a faixa de trabalho para Tebuconazole foi de 188 ppm a 2000 ppm. Os valores obtidos para o coeficiente de correlação estão em conformidade com exigências (ABNT NBR 14029:2016) para o qual o método se aplica ($R \geq 0,99$).

Os testes de recuperação da amostra da descontaminação do tanque SE demonstraram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado com níveis entre 88 – 117% de recuperação para ambos os ingredientes ativo. Já os testes de recuperação da amostra da descontaminação do tanque EC demonstraram que o método é exato no intervalo de trabalho adotado com níveis entre 97 - 98% de recuperação para Tebuconazole. Os testes para avaliar a precisão do método que foram os testes de repetibilidade e de precisão intermediária, também obtiveram resultados em conformidades com a norma para as duas amostras de descontaminação, onde não foram encontrados valores dispersos, visto que $G_{calculado} \leq G_c$ e o desvio-padrão calculado foi menor que o desvio-padrão calculado pela equação de Horwitz.

De modo geral, conclui-se que os métodos propostos se mostraram viáveis a determinação de Azoxystrobin e Tebuconazole em produto formulado e amostras da descontaminação da planta produtiva, e, portanto, pode ser utilizado para o controle de qualidade do produto em questão e para a liberação da planta produtiva nos níveis de limpeza adequados determinados pela empresa, dado que as características de desempenho do método atendem aos critérios estabelecidos pela ABNT NBR 14029:2016.

6 REFERÊNCIAS

AGILENT. **The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development**. Santa Clara: Agilent, 2016.

ANVISA. **Monografias de agrotóxicos.**, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T32+%E2%80%93+Tebuconazol/8e7d87dc-8400-4e3a-910b-dca69b043d77>>. Acesso em: 03 dezembro 2019.

ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A26%2B%2BAzoxistrobina.pdf/6b3c8202-7ef3-47be-8a04-5f60e380bbd1>>. Acesso em: 03 dezembro 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14029 - Agrotóxicos e afins - Validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro. 2016.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, 34, n. 1, fevereiro 2012. 10 -15. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf>. Acesso em: 15 Novembro 2019.

BRASIL. Lei 7802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Republica Federativa do Brasil, Brasília, 11 Julho 1989.

BRASIL. Decreto 4074, de 04 de Janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, República Federativa do Brasil, Brasília, 04 janeiro 2002.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 2ª. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, v. I, 1997.

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

CRODA. Crodacropcare, 2019. Disponível em: <<https://www.crodacropcare.com/pt-br/products-and-applications/suspoemulsion>>. Acesso em: 03 dezembro 2019.

CROPLIFE. **Prevenção de Contaminação na Fabricação de Produtos para Proteção de Culturas**. Tradução de Juliana Del Tio de Faveri; Marcelo Gustavo Missfeld e Rafael Guimarães Pereira. 1ª. ed. Bruxelas: Croplife international, 2015. 146 p. Disponível em: <https://croplife.org/wp-content/uploads/2015/12/CPMCPPT-Portuguese_Nov2015_1-148-LR.pdf>. Acesso em: 18 Novembro 2019.

CROPLIFE. **Contamination Prevention in the Manufacture of Crop Protection Products**. 4ª. ed. Brussels: CropLife International, 2019. Disponível em: <https://croplife.org/wp-content/uploads/2019/01/CPMCPPT_4th-edition-English_Jan19-complete-without-cutting-marks-HR.pdf>. Acesso em: 18 Novembro 2019.

CROPLIFE. CropTech Innovation Series: Episode 5 - Formulations. **Youtube**, 2019. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=cYMkFPnQ0e8>>. Acesso em: 18 Novembro 2019.

GASPARIN, D. C. **Defensivos agrícolas e seus impactos**. PUC. Curitiba. 2005.

GONÇALVES, F. M.. **Agrotóxicos: o controle da saúde dos trabalhadores expostos**. Curso do “Congresso ANAMT”. Goiânia. 2004.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Tradução de Oswaldo Esteves Barcia e Júlio Carlos Afonso. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. I, 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípio de Análise Instrumental**. Tradução de Celio Pasquini; Jarbas José Rodrigues Rohwedder, *et al.* 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. ISBN 978-85-7780-460-3.

IBGE. **Contas Nacionais Trimestrais: Indicadores de Volume e Valores Corretos**. IBGE. Brasília. 2017.

KARAM, D. et al. **Agrotóxicos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 28 p. ISBN 1518-4277. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1039789/agrotoxicos>>. Acesso em: 15 novembro 2019.

LIMA, L. C. S. F.; SANT'ANNA JR., R. F. D. Substituir componentes nas formulações. **Agroanalysis**, v. 30, n. 1, p. 46-47, Janeiro 2010. ISSN ISSN:0100-4298. Disponível em: <<http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/view/26492/25349>>. Acesso em: 18 Novembro 2019.

MAPA. **PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO Brasil 2017/18 a 2027/28 Projeções de Longo Prazo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, p. 112. 2018. (978-85-7991-116-3).

NASCIMENTO, R. F. D. et al. **Cromatografia gasosa: Aspectos teóricos e práticos**. 1st. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2018.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Pesticidas: uso, legislação e controle. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 9, p. 31 - 44, dezembro 1999. ISSN 19839847.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. **É veneno ou é remédio?** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. 1, 2003. 21 - 41 p. ISBN 85-7541-031-8. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sg3mt/pdf/peres-9788575413173-03.pdf>>. Acesso em: 09 Dezembro 2019.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. Universidade de Coimbra. Coimbra, p. 118. 2014.

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

SILVA, S. D. L. Tecnologia para aplicação de defensivos agrícolas. **Academia Edu**, Cascavel, 2005. Disponível em:

<https://www.academia.edu/4562196/Apostila_Tecnologia_Aplicacao_de_Defensivos>.
Acesso em: 17 Novembro 2019.

SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Massachusetts, v. 33, p. 1130 - 1150, 2010.

VELASCO, L. O. M. D.; CAPANEMA, L. X. D. L. O Setor de Agroquímicos. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, Setembro 2006. 69-96. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%20c3%20admicos_P.pdf>. Acesso em: 9 Novembro 2019.