

CAPÍTULO XIII

Desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação de bentazona em água superficial

*Teresa Cristina Brazil de Paiva, Paula Rodrigues de Souza, Flávio Teixeira da Silva

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP

*teresapaiva@usp.br

<https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-13>

RESUMO

O modelo produtivo da Revolução Verde, iniciado no pós-guerra, buscou elevar a produtividade agrícola, com o discurso de suprir as necessidades alimentares de uma crescente população mundial, instalando novas tecnologias que utilizam fertilizantes e pesticidas a fim de garantir elevada produção no campo. A cultura de arroz irrigado, desde o século XX, é a principal atividade agrícola da região do Vale do Paraíba, exibindo uso contínuo de pesticidas com o intuito de combater as pragas. Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir elevado suprimento de água, conduzindo o desenvolvimento das riziculturas próximo aos rios. O comprometimento destes recursos naturais gera prejuízos às espécies aquáticas e a saúde humana, principalmente quando são utilizados para abastecimento público. Tal situação exige controle e estudos que possibilitem o monitoramento de pesticidas no ambiente e, que possibilitem conhecer e determinar os efeitos tóxicos que são causados aos organismos, em decorrência da exposição a estas substâncias químicas. Novos métodos analíticos com sensibilidade e robustez adequados, que correlacionem o desenvolvimento e a otimização de maneira lógica e organizada, devem ser desenvolvidos e validados, a fim de possibilitar a quantificação confiável destes compostos em água. Neste sentido, este trabalho propôs um estudo para o desenvolvimento e a validação de um método analítico cromatográfico para a determinação de bentazona em água. O método cromatográfico foi desenvolvido e validado seguindo os principais guias de validação analítica, INMETRO, ANVISA, EURACHEM e IUPAC. A faixa linear, obtida após a validação do método, encontra-se compreendida entre 0,12 a 6 mg L⁻¹. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) determinados foram de 0,08 e 0,12 mg L⁻¹, respectivamente. Aplicando o método cromatográfico desenvolvido, foi possível determinar resíduos de bentazona em amostras de água coletada do Rio Canas, obtendo concentrações que variaram de 0,199 a 5,524 mg L⁻¹ durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015.

Palavras-chave: Validação; Métodos Analíticos; Detecção e quantificação; Bentazona; Água Superficial

INTRODUÇÃO

Os pesticidas são desenvolvidos visando potencializar suas características químicas de maneira específica e tóxica a certos tipos de insetos, animais, plantas ou fungos. Embora esta letalidade seja direcionada, estes compostos químicos podem causar sérios danos a organismos não alvos (Ali et al., 2014; Veiga et al., 2006).

A contaminação por pesticidas ocorre tanto pontualmente como em áreas adjacentes as regiões de aplicação, podendo atingir locais distantes do ponto de partida. Analisando as propriedades físico-químicas destes compostos é possível, na maioria das vezes, estimar seu comportamento no meio ambiente, as interações com o solo, o transporte, as tendências de escoamento superficial quando dissolvidos em água ou associados ao sedimento (Spadotto, 2006).

Os recursos hídricos são os mais afetados com a contaminação por pesticidas devido à agricultura exigir elevado suprimento de água, conduzindo o desenvolvimento da rizicultura próximo a rios e lagos. Estudos (Sharma et al., 2014; Yadav et al., 2015; Nogueira et al., 2012) comprovam que a presença destes compostos nos sistemas hídricos é mais comum do que se imagina, principalmente, nos que estão localizados próximos de regiões agrícolas que empregam uso intenso e intermitente de pesticidas. O comprometimento destes recursos naturais gera graves prejuízos ao ambiente aquático e à saúde humana. Tal situação exige controle e estudos que possibilitem o monitoramento e análise de risco de pesticidas no ambiente, além de conhecer e determinar os efeitos tóxicos que são causados aos organismos em decorrência da exposição a estas substâncias químicas (Cerejeira et al., 2003; Mogensen and Spliid, 1995 apud Papadakis et al., 2015).

A descoberta de resíduos de pesticidas em vários compartimentos do ambiente tem levantado sérias preocupações relacionada à sua utilização. Sabendo disto e tendo conhecimento da periculosidade que os mesmos apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade torna-se necessário intensificar estudos que possibilitem o monitoramento eficiente de possíveis contaminações no ambiente, juntamente, a motivação do desenvolvimento de métodos analíticos visando a identificação e quantificação destes micropoluentes (Sharma et al., 2014).

A cultura de arroz irrigado é a principal atividade agrícola existente na região Vale do Paraíba, exibindo relevante importância econômica/social apresentando uso contínuo de pesticidas. O município de Canas – SP encontra-se localizado no o eixo Rio de Janeiro – São Paulo – Minas Gerais nessa região, entre os municípios de Lorena e Cachoeira Paulista as margens do Rio Paraíba do Sul (RPS). Possui dois rios que abastecem a cidade, Canas e Caninhas, que juntos somam uma área de 70 Km². A economia do município é diversificada com destaque a pecuária, horticultura e a rizicultura exibindo extensas áreas destinadas ao cultivo de arroz irrigado (Prefeitura Municipal de Canas, 2013).

A rizicultura presente no município de Canas apresenta o sistema de cultivo de polders utilizando água do Rio Canas, afluente do RPS, para realizar o alagamento e manter a lâmina d'água dentro das quadras de arroz. A drenagem da água do cultivo é contínua e junto desta, resíduos de pesticidas e fertilizantes são liberados diretamente no Rio Canas. Esta dinâmica vem ocorrendo há décadas e muito pouco se sabe sobre a influência e os impactos que este evento ocasiona diretamente ao Rio Canas e indiretamente ao RPS. Diante disso foi necessário determinar a ocorrência dos herbicidas em uso na rizicultura, na água do Rio Canas.

Classificação dos Pesticidas

A classificação dos pesticidas pode ser expressa de acordo com alguns critérios, como: a peste alvo do controle podendo agir contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros; o grupo químico presente no composto, como, carbamatos, piretróides, organoclorados, organofosforados e triazínas; e o grau ou tipo de prejuízo ao meio ambiente e a saúde humana, estipulado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1995.

A avaliação e a classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) se baseia na toxicidade, nas características intrínsecas do composto e na capacidade da substância química causar danos aos organismos. Para isso são realizados no mínimo 82 estudos (físico-químicos, ecotoxicológicos) do produto técnico ou ingrediente ativo (I.A) e do produto formulado (comercialmente vendido). A partir da avaliação destes estudos é

possível caracterizar o produto e estimar o seu comportamento e destino ambiental, assim como, a sua toxicidade a diferentes organismos (“Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) - Qualidade Ambiental”, 2015).

A classificação do PPA é realizada pelo IBAMA através da avaliação dos relatórios obtidos por meio de todos os estudos realizados. A classificação se dá de I a IV, conforme Tab. 1, quanto menor a classe maior será o perigo de dano ambiental. Esta informação vem disponibilizada no rótulo das embalagens dos produtos e também nas bulas dos mesmos (“Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) - Qualidade Ambiental”, 2015).

Tab. 1. Classificação ambiental dos pesticidas

CLASSE I	Produto altamente perigoso ao meio ambiente
CLASSE II	Produto muito perigoso ao meio ambiente
CLASSE III	Produto perigoso ao meio ambiente
CLASSE IV	Produto pouco perigoso ao meio ambiente

Fonte: IBAMA/MMA, 2015

Pesticida Bentazona

O bentazona, 3-isopropyl-1H-2, 1,3-benzothiadiazin-4 (3H)-one 2,2-dioxide, $C_{10}H_{12}N_2O_3S$, é um herbicida seletivo de ação sistêmica que apresenta classificação toxicológica nível I e ambiental III. Pertencente à classe benzotiadiazinona e é utilizado no controle de plantas daninhas em culturas de soja, arroz e cereais. É estruturalmente composto por duplo anel, um aromático e o outro heterocíclico contendo átomos de nitrogênio e enxofre, Fig. 1 (Lima, 2003).



Fig. 1. Estrutura química do bentazona. Fonte: Lima, 2003.

O Basagran®, sintetizado e comercializado pela BASF, é o produto formulado que contém o bentazona como I.A. Este herbicida tem ação pós-emergente seletivo e é utilizado para controlar muitos infestantes de folha larga e ciperáceas principalmente pela ação de contato, apresentando pouco efeito sobre a germinação das sementes (Pourata et al., 2009). É perigoso se ingerido ou absorvido pela pele.

O bentazona é classificado como um inibidor da fotossíntese. Geralmente, os inibidores de fotossíntese são divididos em dois grupos distintos, os inibidores de fotossistema I (PSI) e os inibidores da fotossistema II (PSII). O bentazona encaixa-se neste último grupo onde ocorre a oxidação da água durante processo fotossintético.

A captura e o armazenamento de energia luminosa pelas folhas das plantas superiores são mediados por uma intrincada associação entre os complexos pigmentosos captadores de luz e um transporte sequencial de elétrons do PSII para o PSI (Barber, 1998).

Uma vez dentro das células das plantas, o bentazona atua bloqueando o fluxo de transferência de elétrons no PSII. O bloqueio do PSII induz efeitos secundários em várias vias metabólicas, tais como produção de singlete e tripleto de clorofila no estado energizado e formação de radicais superóxido. Estes compostos energizados promovem danos oxidativos as proteínas e as membranas dos cloroplastos (Asada, 2006).

As plantas absorvem e translocam o bentazona do local de sua aplicação, sendo que, o grau de translocação depende da espécie da planta. Este herbicida é metabolizado rapidamente, conjugado e incorporado aos constituintes naturais da planta. O metabolismo da bentazona envolve a

hidroxilação do carbono na posição 6 e 8 (C6 e C8) e subsequente conjugação com hidratos de carbono e incorporação em componentes naturais tais como proteínas e frações de polissacarídeos (amido, pectina, hemicelulose e celulose). A Fig. 2 ilustra os principais produtos da degradação do bentazona (Macedo et al., 2008).

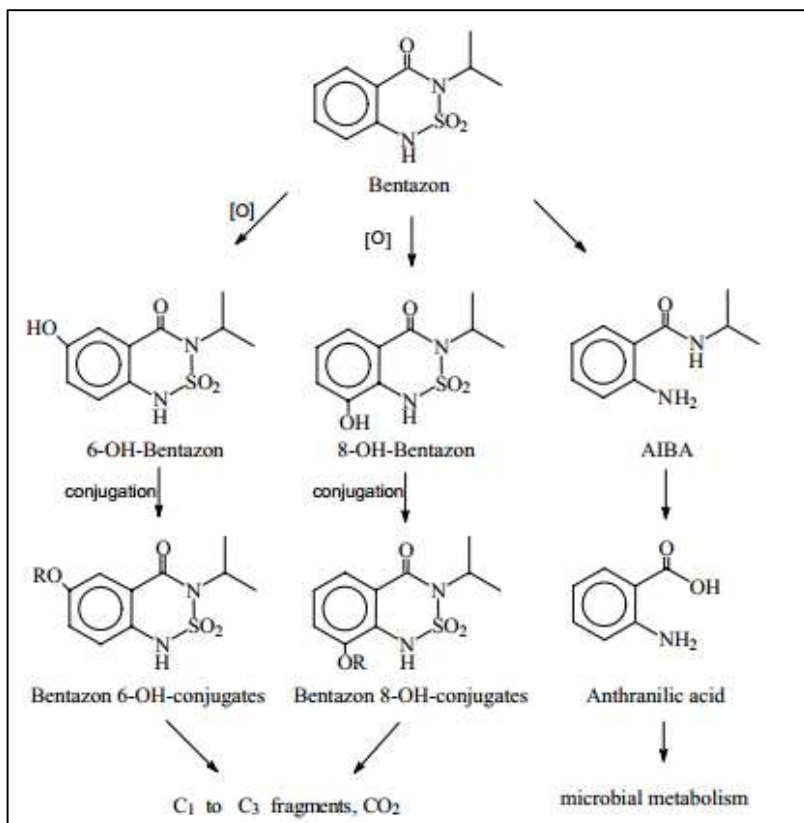


Fig. 2. Bentazona e seus principais metabolitos e produtos de degradação
Fonte: Macedo et al, 2008 adaptado de Huber e Otto, 1994.

No ambiente, mais precisamente no solo, a dissipação do bentazona é dependente de fenômenos como: degradação por micro-organismos, lixiviação e escoamento superficial. A capacidade de contaminar águas superficiais está diretamente associada ao baixo coeficiente de adsorção no solo (K_d 0,176 a 3,056) contribuindo para que resíduos do herbicida sejam facilmente arrastados para mananciais, águas superficiais e subterrâneas (Macedo et al., 2008).

Validação de método cromatográfico desenvolvido para detecção e quantificação de bentazona

Quando se pensa em detectar e quantificar analitos que podem estar presente em uma determinada matriz em níveis traços, por exemplo, fármacos, hormônios e pesticidas em água, há a necessidade de demonstrar a qualidade

das medições químicas, por meio da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade do método que está sendo empregado na análise. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, esse deve sofrer uma avaliação denominada validação (Ribani et al., 2004).

A validação de um determinado método analítico é uma etapa obrigatória para verificar se o método que está sendo desenvolvido é capaz de fornecer resultados precisos para a sua aplicação de rotina, assegurando, resultados de qualidade e confiabilidade adequada para tomada de decisões (Rozet et al., 2011).

O processo de validação, uma vez bem definido e documentado, oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. Assim, para o registro de novos produtos, os órgãos reguladores, do Brasil e de outros países, exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais. Estes documentos são diretrizes a serem adotadas no processo de validação, tais como, o guia Codex Alimentarius, Comissão sobre métodos de análise e amostragem; Critérios para avaliação de métodos aceitáveis de análise para fins Codex, da Comissão Europeia; guia de orientação de métodos analíticos sobre resíduos de métodos analíticos, SANCO/825/00; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), entre outros.

Os conceitos que definem validação de métodos estão em constante evolução e algumas definições podem ser transcritas como:

- Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2011);
- A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2012);

- Validação do método é basicamente o processo de definição de uma exigência analítica, e confirmatório de que o método em questão tem capacidades consistentes com o que é requerido (EURACHEM, 2014).

Há duas abordagens principais para a validação de métodos, a primeira, chamada de validação no laboratório (in house validation), que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou, para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliados todos os parâmetros de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

A segunda abordagem, denominada interlaboratorial, além de avaliar todas as características de desempenho, está compreendida ainda, com a realização de um estudo interlaboratorial. Esse estudo é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e, a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Somente assim, a metodologia poderá ser aceita como oficial para uma aplicação específica. No Brasil, os estudos de comparações interlaboratoriais são coordenados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química (Ribani et al., 2004; Thompson; Ellison; Wood, 2002).

Características de desempenho do método

Durante a validação de um método alguns parâmetros analíticos são normalmente estudados como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, sensibilidade analítica, precisão, exatidão e robustez. Esses termos são denominados como parâmetros de desempenho analítico e, algumas vezes como, figuras analíticas de mérito. Esses critérios foram definidos e especificados pela Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) e agências regulatórias em todo o mundo (Araujo, 2009).

Seletividade

Qualquer método analítico pode estar sujeito a sofrer interferências analíticas. Assim, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e, subsequente uso do método (Rozet et al., 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma matriz. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como, a presença de outro I.A, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como, outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes na matriz (Ribani et al., 2004).

É crucial estabelecer que a propriedade medida, por exemplo, o pico de resposta, é exclusivamente devido ao analito de interesse e não de algo químico e/ou fisicamente semelhante, que causaria um viés no resultado mensurado (EURACHEM, 2014). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (Vessman et al., 2001 apud Ribani et al., 2004).

Interferências podem causar desvios, efeitos, que podem aumentar ou diminuir o sinal que é atribuído ao analito. Estes efeitos podem ser chamados de “proporcional ou rotacional” e “translacional ou fixo”. O primeiro é caracterizado quando o tamanho do efeito para uma dada matriz é geralmente proporcional ao sinal obtido, ocasionando mudança na inclinação da curva de calibração, sem alterar a sua interceptação. O segundo, “translacional ou fixo”, é devido a interferências presentes na solução de ensaio, sendo, no entanto, independente da concentração da substância a analisar. É referido como um “background” ou, interferência de “linha base” e atua afetando a interceptação da curva de calibração, mas não altera a inclinação (EURACHEM, 2014).

A seletividade pode ser obtida por meio de vários procedimentos analíticos, pode-se avaliar comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz com esta substância (padrão) presente. Nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de

interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (Thompson; Ellison; Wood, 2002). Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão (Ribani et al., 2004; Thompson; Ellison; Wood, 2002).

Algumas vezes não é possível obter a matriz isenta do analito de interesse. Então, a seletividade é obtida através do método de adição de padrão. É construída duas curvas analíticas, uma com a adição da substância de interesse na amostra e, outra sem a presença da matriz. Ao comparar as duas curvas analíticas, caso as inclinações sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, garantindo a seletividade do método (Ribani et al., 2004).

Limite de detecção e Limite de quantificação

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada. Porém, sem, no entanto quantificar, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD é estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível detectável (ANVISA, 2010).

Em cromatografia, o LD, é a quantidade de analito injetada que resulta na obtenção e um pico cromatográfico com uma altura, pelo menos, duas ou três vezes maior que o ruído de linha base do cromatografo. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: pelo método visual, método sinal/ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (Green et al., 2011).

No método visual, o LD é determinado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo, que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento, utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

O método de relação sinal/ruído pode ser aplicado somente em equipamentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é realizada a comparação entre a medição dos

sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do analito) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do LD (Green et al., 2011; Ribani et al., 2004).

No método baseado em parâmetros da curva analítica, o LD pode ser expresso pela Equação 1, onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou, do coeficiente linear da equação e, S é a inclinação (slope) ou coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004).

$$LD = \frac{3,3 \times s}{S} \quad \text{Equação (1)}$$

Frequentemente, o LD é confundido com a sensibilidade do método analítico. A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir pequenas diferenças na concentração ou massa do analito teste. Em termos práticos, a sensibilidade é o declive da curva de calibração que é obtido através da representação gráfica da resposta em função da concentração de analito (Green et al., 2011).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, sob condições experimentais estabelecidas (EURACHEM, 2014). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco de 6 a 15 replicatas mais 5, 6 ou 10 vezes os desvios-padrão (Inmetro, 2011).

Ribani e colaboradores (2004) e Rozet et al., (2011), relatam que os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1. Ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou, ainda, a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta(s) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da Equação 2:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \div S \quad \text{Equação (2)}$$

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) determina um valor padrão para o fator multiplicador, k_Q , igual a 10 e, se o desvio padrão é aproximadamente constante em baixas concentrações, este fator aceita um desvio padrão relativo (RSD) igual a 10%. Fatores multiplicadores correspondentes a 5 ou 6 algumas vezes são utilizados com RSD igual a 20 e 17%, respectivamente (EURACHEM, 2014). Figura 3, ilustra a relação sinal/ruído para o LD e LQ.

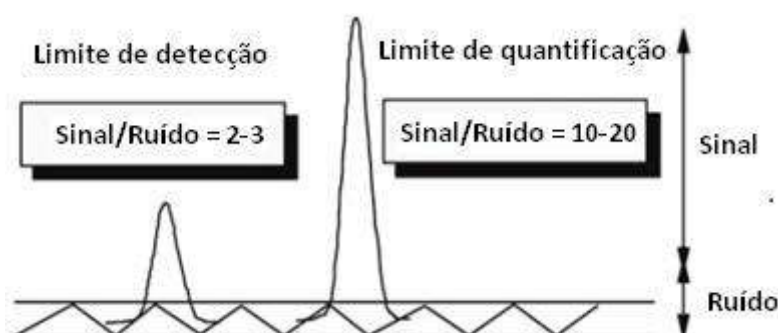


Fig. 3. Relação sinal/ruído para limite de detecção e quantificação
Fonte: Green et al., 1996

Linearidade e Faixa de trabalho

A capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado é definido como linearidade (ANVISA, 2010). A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A linearidade pode ser obtida por meio da padronização interna ou externa e formulada matematicamente para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011). A regressão linear, Equação 3, relaciona duas variáveis, onde “x” é a concentração e “y” a resposta medida (absorvância, altura ou área do pico, etc). O parâmetro “a” representa a inclinação da curva de calibração e “b” significa a interseção com o eixo y, quando $x = 0$.

$$y = ax + b \quad \text{Equação (3)}$$

Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação “ r ”. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo da unidade, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2004).

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados testes como o ajuste do modelo linear. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A Anvisa recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2012; INMETRO, 2007; Ribani et al., 2004).

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de t empregando a Equação 4.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r/\sqrt{n}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde, $\text{resíduo} = |x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$ s_r = desvio padrão dos resíduos n = número de pontos. Se o valor de t calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t unilateral, para a confiança desejada e $(n-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear: (RIBANI et al., 2004). O teste de significância deve ser avaliado em conjunto com o gráfico residual e a homocedasticidade deve ser assegurada (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

Após um ajuste exploratório, com regressão linear simples, os resíduos devem ser examinados. A heterocedasticidade é bastante comum em uma calibração analítica sugerindo que os dados da calibração são melhor tratados por um regressão linear ponderada e a não utilização desta poderá ocasionar

erros exagerados na porção inferior da curva de calibração (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

As diretrizes da ICH, ANVISA e GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) especificam que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes que não incluam o ponto zero da curva que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa de RSD entre as injeções inferior a 5%. Os guias (EURACHEM, 2014) e (INMETRO, 2011) mencionam que as injeções devem ser realizadas de maneira randômicas.

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. A extremidade inferior da faixa de concentração é limitado pelo LQ e a extremidade superior dependerá do sistema de resposta do equipamento de medição. Durante a validação do método analítico é necessário confirmar que o método pode ser utilizado ao longo deste intervalo (EURACHEM, 2014).

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito, no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante (INMETRO, 2011).

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é vista como uma alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na quantidade mensurada, por exemplo, na concentração do analito. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. A sensibilidade é influenciada pela natureza do analito e pela técnica de detecção que está sendo utilizada. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração,

conforme a Equação 5 e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

$$S = \frac{dx}{dc} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, S representa a sensibilidade analítica, dx a variação da resposta e dc a variação da concentração.

Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas. Mede o erro aleatório ligado ao procedimento analítico, isto é, a dispersão dos resultados em torno do seu valor médio. (Rozet et al., 2011). É normalmente especificado em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV) que é calculado a partir dos resultados obtidos por meio da realização de medições repetidas, normalmente maior que 20 (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

Geralmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2% e métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas (Ribani et al., 2004).

A replicação é essencial para a obtenção de estimativas confiáveis de características de desempenho do método, tal como precisão. Experimentos envolvendo análise de replicação devem ser realizados para possibilitar avaliar as variações nas condições operacionais que podem ser esperados durante o uso rotineiro do método. O objetivo deve ser o de determinar a variabilidade típica e não variabilidade mínima (EURACHEM, 2014).

Para a validação analítica a precisão é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade. (INMETRO, 2007).

A repetitividade é uma maneira de medir o grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado efetuadas sob as

condições de repetitividade. Ou seja, a variabilidade dos resultados obtidos sob as mesmas condições de medição, realizadas pelo mesmo analista, no mesmo local e equipamento e durante um curto espaço de tempo (EURACHEM, 2014).

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrida (Thompson; Ellison; Wood, 2002). Recomenda-se sete ou mais repetições para estimar o desvio padrão.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é o de verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004). Para determinar a precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar (ANVISA, 2012).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamento, etc). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc (ANVISA, 2010). A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual (Ribani et al., 2004).

Exatidão

A exatidão do método é definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão é afirmada quantitativamente em termos de "polarização", com viés menor indicando maior veracidade (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão).

Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. A definição de exatidão algumas vezes confunde-se com o conceito de precisão, mas isto deve ser evitado. É essencial distinguir a diferença entre um resultado e o valor médio, onde este, concede a localização central da distribuição dos resultados e não a posição de cada resultado individual. Por definição o viés ou recuperação irá fornecer o centro da distribuição dos resultados produzidos pelo método analítico em relação ao valor verdadeiro aceito (Rozet et al., 2011). Fig. 4.

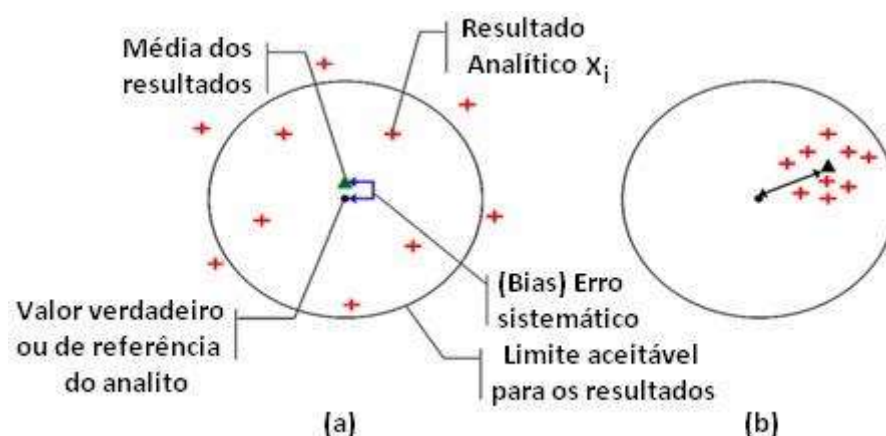


Fig. 4. Ilustração de erros sistemáticos (a) situação de pequeno erro sistemático com resultados fora da meta (b) situação de erro sistemático maior com resultados dentro da meta Fonte: Adaptado de Rozet et al., 2011.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (CRM), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2007).

Os CRM são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST ("National Institute of Standards and Technology" - USA), LGC ("Laboratory of the Government Chemist" - UK), USP, FAPAS ("Food Analysis Performance Assessment Scheme" - UK), etc. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas)

da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método (Ribani et al., 2004).

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da região de aceitação para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e procurar eliminá-las (INMETRO, 2007).

A avaliação dos métodos consiste na comparação dos resultados obtidos empregando um método em desenvolvimento e os resultados obtidos por meio de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida.

A recuperação (ou fator de recuperação), R , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

O analito deve ser adicionado a amostra em pelo menos três níveis diferentes de concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises a nível de resíduos o (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) GARP recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação. Para componentes em maiores concentrações, os níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150% do nível esperado para a substância (Ribani et al., 2004).

A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está, necessariamente, na mesma forma que o presente na amostra (INMETRO, 2007). Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (Ribani et al., 2004)

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004).

Robutez

A robustez de um procedimento analítico mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método é considerado robusto se revelar ser praticamente insensível quando é submetido a pequenos desvios em seus parâmetros no momento em que está sendo executado (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

O teste de robustez envolve fazer mudanças no método e verificar o efeito sobre o desempenho do mesmo. É possível identificar as variáveis do método que exibem um efeito mais significativo na eficácia do método e assim garantir que estas variáveis sejam estritamente controladas (EURACHEM, 2014).

A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.

Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (Ribani et al., 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de estudo

A dinâmica da plantação de arroz irrigado é observada no município de Canas que localiza-se a uma latitude 22°42'13" sul e longitude 45°03'19" oeste, às margens do RPS.

As amostras de água foram coletadas semanalmente durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015, no Rio Canas, localizado no município de Canas/SP. Este rio, após atravessar o município, contorna extensas áreas de cultivo de arroz localizadas na Rua do Meio (Fig. 5), mantendo-as inundadas, com lâmina d'água de aproximadamente 15 cm, continuamente ao longo do ciclo do arroz. Desta maneira, a captação da água para o alagamento das quadras de arroz e sua posterior drenagem ocorrem diretamente no Rio Canas.

Foram realizadas duas coletas por semana, totalizando dezesseis amostras durante estes três meses. A coleta e preservação das amostras foram realizadas seguindo o guia nacional de coleta e preservação de amostras, publicado pela Agência Nacional de Águas (ANA), em conjunto com a CETESB (AGÊNCIA, 2011).

Em campo, a amostragem foi realizada com precaução e técnica para evitar todas as fontes possíveis de contaminação, retardar a ação biológica e a alteração do composto químico. No momento da coleta os frascos âmbar, previamente limpos, foram ambientados tomando-se o cuidado de que, no momento da coleta, partículas e detritos não fossem acidentalmente armazenados junto às amostras. Os frascos âmbar contendo as amostras foram transportados em bolsas térmicas, previamente refrigeradas. Realizada a coleta, as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz solar e mantidas refrigeradas a 4°C.



Fig. 5. Principais cultivos de arroz irrigado localizados no município de Canas
Fonte: Google Earth

Estudo das condições cromatográficas e extração em fase sólida para detecção e quantificação do herbicida bentazona

Visando a determinação do herbicida em água a metodologia analítica foi desenvolvida e validada empregando a cromatografia líquida de fase reversa. Foi utilizado o cromatografo líquido de alta eficiência da Metrohm®, equipado com o módulo 850 Professional IC, 858 Injetor Professional Sample Processor, 887 Detector Professional UV- VIS. Uma coluna Prontosil 120-5-C18 AQ – 150/4.0, substrato sílica gel C-18, porosidade de 5 µm foi utilizada neste método.

Preparo das soluções

A solução estoque de bentazona foi preparada em metanol (MEOH) PA – 99,9% na concentração de 1000 mg L⁻¹. A partir desta, soluções de trabalho nas concentrações de 100 e 10 mg L⁻¹ foram preparadas, estocadas em frascos âmbar e reservadas a temperatura de 4°C na ausência de luz.

No método para detecção e quantificação de bentazona foi empregado um gradiente de eluição, composto por duas fases móvel constituída por (MEOH) PA – 99,9% e água mili-q nas proporções 35:65 e 90:10. O pH destas soluções foi ajustado em 2.4, utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄) (Pinto; Jardim, 1999; Zanella et al., 2003).

Todas as soluções utilizadas no desenvolvimento deste estudo foram filtradas em membrana de vidro com porosidade 1,2 e 0,45 μm e as soluções de fases móveis foram degaseificadas utilizando o equipamento de ultrason.

Seleção do comprimento de onda da Bentazona

Foi realizado um estudo a fim de avaliar o comprimento de onda em que a bentazona apresenta maior absorvidade. Para tanto estudou-se o comprimento de onda na faixa UV-VIS, utilizando padrão de bentazona, 1 mg L⁻¹. Foi empregado um espectrofotômetro, marca FEMTO; modelo 800 XL.

Preparo da amostra e Procedimento de extração em fase sólida (SPE)

As amostras, uma vez coletadas e corretamente armazenadas no laboratório foram processadas em um intervalo de 24 a 36 horas, garantindo a manutenção de suas características físicas e químicas. Inicialmente foi realizada a filtração da amostra com membrana de vidro de porosidade 1,20 e 0,45 μm . Em seguida, o pH das amostras foi ajustado a 2 empregando H₃PO₄. Neste ponto as amostras encontravam-se prontas para o procedimento de SPE.

A SPE foi realizada conforme Jardim et al. (1999) e Zanella et al. (2003) com algumas modificações/adaptações, visando a otimização do método. Neste procedimento foi utilizado cartucho de extração EuroAnalytical LTDA, fase C18 sílica octadecila, 500 mg de sorvente, capacidade para 3 mL e, um manifold vac elut da Agilent Technologies®.

Primeiramente, foi realizado o condicionamento do cartucho de extração passando 10 mL de metanol e 10 mL de água mili-q, pH 2, previamente acidificado com H₃PO₄. Em seguida, foi realizada a percolação da amostra, 1 L, através do cartucho com o auxílio de uma bomba de vácuo, controlando a vazão (3 mL Min⁻¹). Após a percolação de todo o volume de amostra, foi realizado a etapa de clean up passando pelo cartucho 5 mL de água mili-q. O eluato foi descartado, secou-se o leito sorvente com a passagem de ar por 5 a 10 minutos. O analito foi eluído (ação da gravidade) com 1 mL de metanol. O eluato foi evaporado utilizando nitrogênio gasoso. Finalmente, o resíduo foi ressuspenso em 1 mL de água mili-q e, injetado no cromatógrafo.

Validação do método para determinação do herbicida em água

A validação do método desenvolvido para determinação da bentazona em água foi realizada seguindo alguns guias dentre estes, o Guia EURACHEM, INMETRO, ANVISA, IUPAC e, referências literárias, Zanella et al. (2003), Pinto et al. (1999), Green et al. (1996) e Ribani et al. (2004).

Uma vez estabelecido, as condições operacionais do método analítico, foi realizado o procedimento de validação onde foi verificado as seguintes figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, sensibilidade analítica, precisão, exatidão, e robustez. Com os parâmetros de validação e critérios de aceitação definidos, foi realizado o planejamento experimental da validação seguido de sua execução.

Após a validação do método, esse foi aplicado para detectar e quantificar bentazona em amostras de água do Rio Canas próximo ao deságue das culturas de arroz irrigado.

Limite de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pelo método da relação sinal-ruído (S/R), onde foi realizado a comparação entre, a medição dos sinais obtidos referente as concentrações conhecidas de bentazona em água deionizada e, um branco analítico. A relação sinal-ruído, geralmente aceitas, como estimativas para LD e LQ é de 3:1 e 10:1, respectivamente. Abaixo destes níveis a detecção e quantificação do analito tornam-se problemáticas e imprecisas.

Primeiramente foi realizada a injeção, em triplicata, do padrão de bentazona, concentração de 1 mg L^{-1} , para analisar qual seria a relação S/R. Após o tempo de corrida da amostra a relação S/R foi verificada e, a partir desta, injeções de amostras nas concentrações de 0,14; 0,12; 0,11 e 0,08 mg L^{-1} de bentazona foram realizadas, em triplicata e, os LD e LQ determinados.

Linearidade e Efeito Matriz

Para avaliação da linearidade as curvas analíticas foram preparadas de maneira independente, com solução padrão em diferentes níveis de

concentração, igualmente espaçados (0,12 a 6,00 ppm). O ponto zero (branco da curva analítica) foi utilizado como ferramenta de controle de qualidade e para ajustar o “zero instrumental”.

As curvas analíticas foram preparadas em triplicata, em balões volumétricos de 10 mL, adicionando o padrão bentazona em água deionizada de acordo com a concentração referente a cada nível pré-determinado. As injeções das amostras foram realizadas aleatoriamente no sentido de evitar o comportamento de tendência.

No estudo para avaliação do efeito matriz, curvas analíticas foram preparadas em água do Rio Canas e água de uma nascente localizada no município de Piquete/SP. Foram utilizados os mesmos níveis de concentração, espaçamento e, condições mencionadas acima. As inclinações das três curvas analíticas foram comparadas para avaliação de possíveis interferentes.

Uma vez definida a faixa linear, ao longo de todas as análises cromatográficas da validação analítica, assim como, da aplicação do método validado foram construídas curvas analíticas acatando todos os pontos da linearidade.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, logo pode ser determinada simultaneamente com os testes de linearidade, sendo expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme Equação 6.

Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em três níveis de concentração diferentes, 1, 2 e 10 vezes o LQ, estimado anteriormente. O padrão de bentazona foi adicionado a 250 mL água deionizada, pH 2, nas concentrações 0,12; 0,24 e 1,20 mg L⁻¹. O procedimento foi realizado em 7 replicatas para cada nível, totalizando 21 determinações. As replicatas foram filtradas em membranas de vidro, 1,2 e 0,45 µm, seguido pelo procedimento de SPE, já descrito anteriormente (item 2.2.6).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica, conforme Equação 6.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Seguindo os guias de validação analítica, ANVISA (2010); INMETRO (2011); ICH (2001), os intervalos geralmente aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 90 e 110%, com precisão de até $\pm 10\%$.

Precisão

A precisão foi estudada considerando dois níveis, a repetitividade/repetibilidade e a reprodutibilidade, que são precisão intra-corrida e a inter-corrida, respectivamente.

Os ensaios de repetitividade foram realizados em 3 níveis de concentração, adicionando o padrão a 250 mL de água deionizada, pH 2, nos níveis de concentração 1; 2 e 10 vezes o LQ. Foram realizadas 7 repetições para cada nível, totalizando 21 determinações. As repetições ocorreram em um curto espaço de tempo, no mesmo local, com mesmo analista e pelo mesmo procedimento.

A reprodutibilidade interna foi realizada seguindo o ensaio de repetitividade, adicionando a variante tempo, onde os níveis de concentração de bentazona, 0,12; 0,24 e 1,20 mg L⁻¹ foram preparados e analisados em 3 dias diferentes.

Nos ensaios para avaliar a precisão foram realizados os procedimentos de prepare da amostra e de SPE, conforme já descrito nos itens 2.2.1 e 2.2.3.

A precisão foi expressa por meio da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), ou seja, pelo coeficiente de variação (CV), conforme Equação 7, onde: s é o desvio padrão absoluto; \bar{x} a média aritmética do número de medições.

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

O RSD geralmente aceitável depende dos níveis de concentração da amostra. Quando se quantifica substâncias em macro quantidades, é requerido um RSD variando de 1 a 2 % e, em determinação de análises traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%. Porém, é sabido que quanto menor for o RSD mais criterioso e preciso será o método analítico (Ribani et al., 2004). Neste estudo trabalhou-se com CV de até $\pm 10\%$.

Robustez

Para avaliar a robustez do método alguns parâmetros analíticos foram selecionados para sofrerem pequenas variações, como, a proporção da composição da fase móvel, o pH da fase móvel e a temperatura da coluna.

No método desenvolvido é utilizado um gradiente composto pelas fases móvel A e B (MEOH : H₂O), nas proporções 35:65 e 90:10, respectivamente, pH 2,4 e, coluna Prontosil C18 na temperatura de 45 °C. Com a finalidade de observar quais seriam, os efeitos ocasionados em decorrência a alteração na proporção da composição da fase móvel, no pH das fases e na temperatura da coluna, foram realizados os seguintes experimentos em triplicata:

- A fase móvel (MEOH : H₂O) foi avaliada nas proporções 30:70/85:15 e 40:60/95:5;
- pH 2,3 e 2,5;
- Temperatura da coluna 42 e 48 °C.

O preparo das amostras e o procedimento de SPE (itens 2.2.1 e 2.2.3) foi realizado previamente as injeções das mesmas no equipamento. Nesta etapa trabalhou-se com bentazona na concentração 1 mg L⁻¹, em 250 mL de água deionizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método cromatográfico desenvolvido

O método desenvolvido para determinação cromatográfica de bentazona em água foi validado seguindo alguns guias específicos para validação de métodos analíticos como, o guia ANVISA (2010), INMETRO (2011), guia harmonizado pela IUPAC (2002) e o EURACHEM (2014), e

algumas referências literárias, dentre as principais, Green et al. (1996), Pinto et al. (1999), Zanella et al. (2003) e Ribani et al. (2004).

Na literatura são mencionados alguns comprimentos de onda (λ) em que o bentazona apresenta absorvidade, 220; 230 e 250 nm (Pinto; Jardim, 1999; Zanella et al., 2003). Após verificar a absorvidade do composto nos λ da região UV-VIS, selecionou-se o λ referente a 230 nm para o desenvolvimento do método para determinação de bentazona em água, conforme Pinto et al. (1999). Uma vez que o detector UV-VIS é sensível a concentração do analito presente na amostra, a resposta detectada será proporcional a concentração de bentazona contida no meio. Assim, selecionando o λ de 230 nm aumenta-se a sensibilidade do método desenvolvido, pois a molécula de bentazona apresenta maior absorvidade molecular neste λ .

O metanol apresenta absorvidade no λ de 220 nm (Fig. 6), assim este λ não poderia ser selecionado, uma vez que o metanol é componente das fases móvel utilizadas no gradiente de eluição do método desenvolvido, podendo ocasionar um viés na resposta a ser mensurada.

Para o bom desenvolvimento de um procedimento de validação é preciso assegurar que, todo o sistema selecionado para o processo de análise, está apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Esta é a etapa inicial a ser estabelecida e é obtida, para os métodos cromatográficos, a partir de testes experimentais de conformidade do sistema (system suitability), que inclui a avaliação dos seguintes parâmetros: fator de retenção (k), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s) (Ribani et al., 2004).

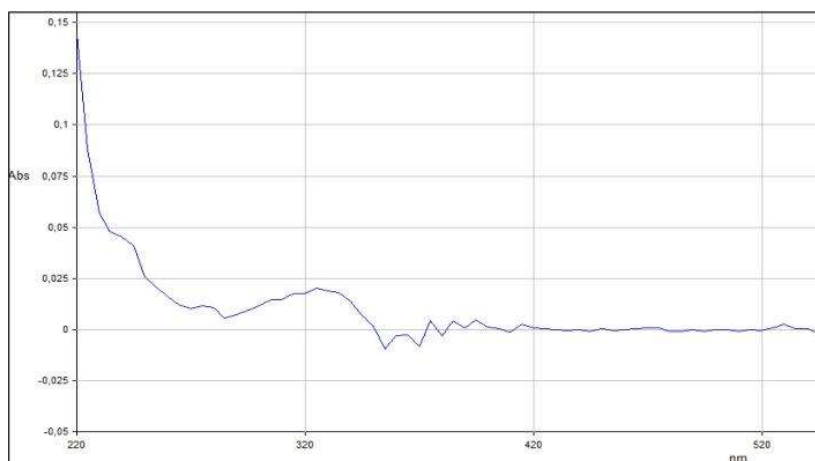


Fig. 6. Espectro referente a absorbância do bentazona, 1,00 mg L⁻¹, na região do UV-VIS. Fonte: Arquivo próprio

A adequação do sistema foi avaliada durante a análise cromatográfica e os parâmetros observados foram N, As, K e a repetitividade avaliando o RSD. Realizou-se injeção do padrão, 1 mg L⁻¹, respeitando um tempo de análise de 50 minutos.

De acordo com o recomendado pelo guia de orientação para procedimentos analíticos e métodos de validação, United States Food and Drug Administration (US-FDA) (2000,) Ribani et al. (2004) e Naves et al. (2014), o N em geral, deve ser > 2000; o k > 2; o As deve estar entre 0,95 e 1,15 e o RSD < 1% para n > 5. Os valores obtidos para os parâmetros avaliados encontraram-se dentro das especificações supracitadas e, o RSD obtido para n = 6 foi de 0,2 %

Faixa Linear e Efeito de Matriz

O primeiro parâmetro avaliado na validação analítica foi a faixa linear. Essa foi estudada por meio da estimativa dos parâmetros pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), inspeção visual dos dados e tratamento de valores discrepantes. O MMQO parte da premissa que os resultados seguem a distribuição normal tem variância constante ao longo do eixo x e, são independentes. Assim, estas premissas devem ser constatadas verdadeiras nos dados trabalhados (Bomfim; Abrantes; Zamith, 2010).

Foram construídos e analisados gráficos de resíduos da regressão para verificar a presença de valores extremos, denominados de *outliers*, que são os pontos fora do intervalo $\pm t(1-\alpha/2; n-2)S_{res}$, sendo S_{res} o desvio

padrão dos resíduos da regressão (Bomfim; Abrantes; Zamith, 2010). Como o MMQO é muito sensível à presença de *outliers*, esses foram identificados e tratados aplicando o teste de resíduos padronizados de Jackknife (Souza; Junqueira, 2005). Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou, até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (Pinheiro et al., 2010).

Na Fig. 7 estão representados os gráficos exploratórios dos resíduos de regressão (resíduos da regressão versus níveis de concentração) de bentazona avaliados em três meios: branco analítico, água do Rio Canas e água da nascente. As linhas em pontilhado nestes gráficos correspondem a $\pm t(1-\alpha/2; n-2)S_{res}$, que é o intervalo de variação aceitável para os resíduos de regressão representados nos gráficos. Os perfis destes gráficos de resíduos mostram que não houve tendências visuais que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade.

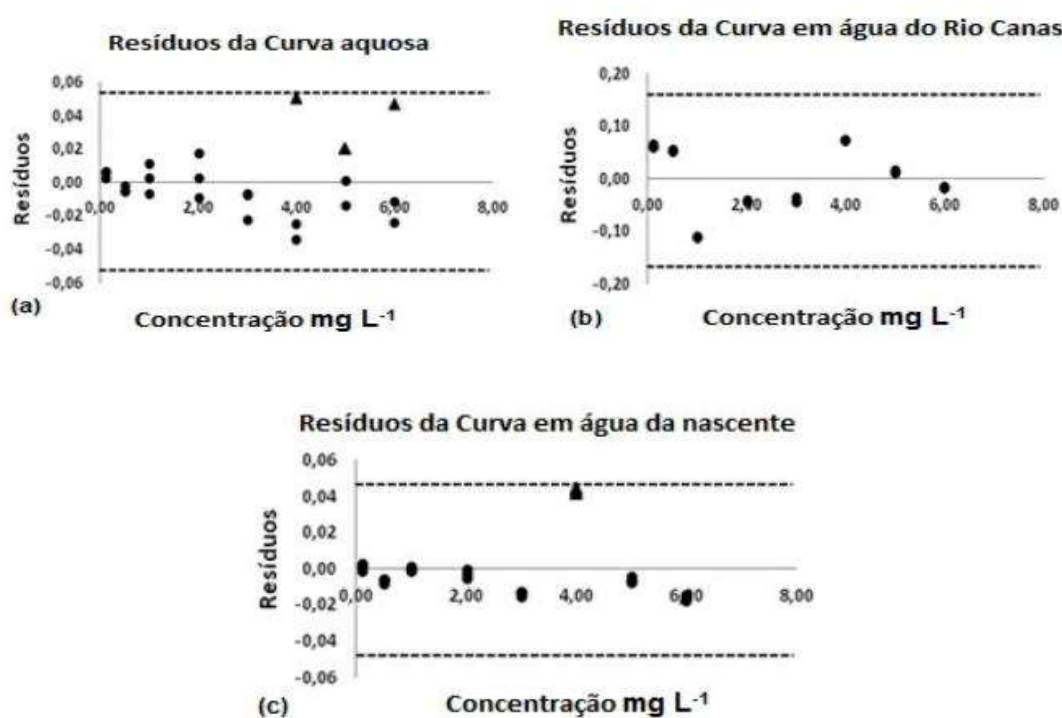


Fig. 7. Gráfico dos resíduos de regressão para bentazona nos três meios estudados ▲ = valores extremos ● = resíduos de regressão. Fonte: Arquivo próprio

Os intervalos de confiança dos resíduos $\pm t(1-\alpha/2; n-2) S_{res}$, observados na Fig. 7, sugerem a presença de três *outlier* em 4, 5 e 6 mg L⁻¹, na curva analítica em meio a água mili-q. Na curva analítica em meio à água da nascente observou-se comportamento similar, com três valores extremos em 4 mg L⁻¹. Já na curva analítica em meio a água do Rio Canas não foi observado qualquer *outlier*. Estes valores extremos indicados no formato de triângulo foram removidos após aplicação do teste de resíduos padronizados de Jackknife, respeitando um limite de 22,2% do número original dos dados (n = 24), conforme Pinheiro et al. (2010).

Realizada a avaliação e tratamento dos *outliers*, as premissas exigidas pelo MMQO, a normalidade (pelo teste de Ryan-Joiner), a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos (pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe) e a independência dos resíduos da regressão (pelo teste de Durbin & Watson) foram avaliadas. O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio de linearidade avaliado contra o erro puro (Bomfim; Abrantes; Zamith, 2010). Os resultados constam na Tab. 2.

O teste de Ryan-Joiner avalia a correlação entre os resíduos de regressão para cada curva e os valores normais teoricamente esperados. É um teste similar ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando a correlação é próxima a 1, assume-se que os dados possuem distribuição normal e, quando o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Req) é menor que o valor crítico apropriado (Rcrit), rejeita-se a hipótese nula de normalidade.

De acordo com este teste ($\alpha = 0,01$), obteve-se um $Req > Rcrit = 0,932$ para as curvas em meio à água mili-q e água da nascente e $Req > Rcrit = 0,939$ para a curva em meio à água do Rio Canas (Tab. 2). Estes valores indicam que há uma correlação significativa entre os resíduos de regressão nos três meios avaliados. Assim, pode-se dizer que não há desvio da normalidade para as três curvas (Reis et al., 2015; Souza; Junqueira, 2005).

Na Fig. 8, estão representados os gráficos da normal QQ dos resíduos de bentazona em água mili-q, água da nascente e em água do Rio Canas, com seus respectivos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner. Pode-se observar que os resíduos de regressão encontram-se centrados na média, apresentando pouca dispersão.

Tab. 2. Resultados das análises estatísticas aplicadas para verificar a normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos de regressão

Parâmetros Curvas	Água Mili-q	Rio Canas	Nascente
R_{eq} para Normalidade	0,989	0,958	0,976
d para Independência	1,91	0,586	1,37
t_L / T_{critic} for Homoscedasticidade	1,38 / 0,185	$3,86 / 8,54 \times 10^{-4}$	2,02 / 0,574
F para significância da Regressão	$1,42 \times 10^6$	$5,20 \times 10^4$	$9,17 \times 10^6$

R_{eq} = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin-Watson.

A estatística de Durbin-Watson analisa a autocorrelação, a dependência entre os resíduos de regressão. De acordo com esta estatística, os resíduos da regressão não apresentaram autocorrelação ($D > dU = 1,16$) ($p < 0,01$) para as curvas em meio à água mili-q e água da nascente, indicando a independência dos resíduos (Tab. 2). A curva obtida em meio à água do Rio Canas apresentou $D < dU = 1,20$, indicando dependência dos resíduos (Reis et al., 2015). Contudo, esse resultado indica apenas que as replicatas foram muito bem reproduzidas apresentando baixo CV, uma vez que são replicatas genuínas e as medidas foram realizadas de maneira aleatória, não inviabilizando assim aplicação do MMQO para estimar os parâmetros de regressão.

O Teste de Levene modificado por Brown & Forsthe analisa a igualdade das variâncias das variáveis de interesse para as populações envolvidas (Almeida; Elia; Nobre, 2008). Na avaliação da homoscedasticidade da variância dos resíduos de regressão por meio desse teste (Bomfim; Abrantes; Zamith, 2010), verificou-se que os resíduos não apresentaram variabilidade significativa para os três meios avaliados ($t_L > T_{crit}$) a um nível de confiança de 95% (Tab. 2). Neste sentido, pode-se inferir que a variabilidade foi constante ao longo das concentrações estudadas, ou seja, confirma-se a homoscedasticidade entre os resíduos de regressão. Este comportamento é

também confirmado nos gráficos dos resíduos (Fig. 8), onde observa-se a distribuição aleatória dos resíduos em torno da curva (Souza; Junqueira, 2005).

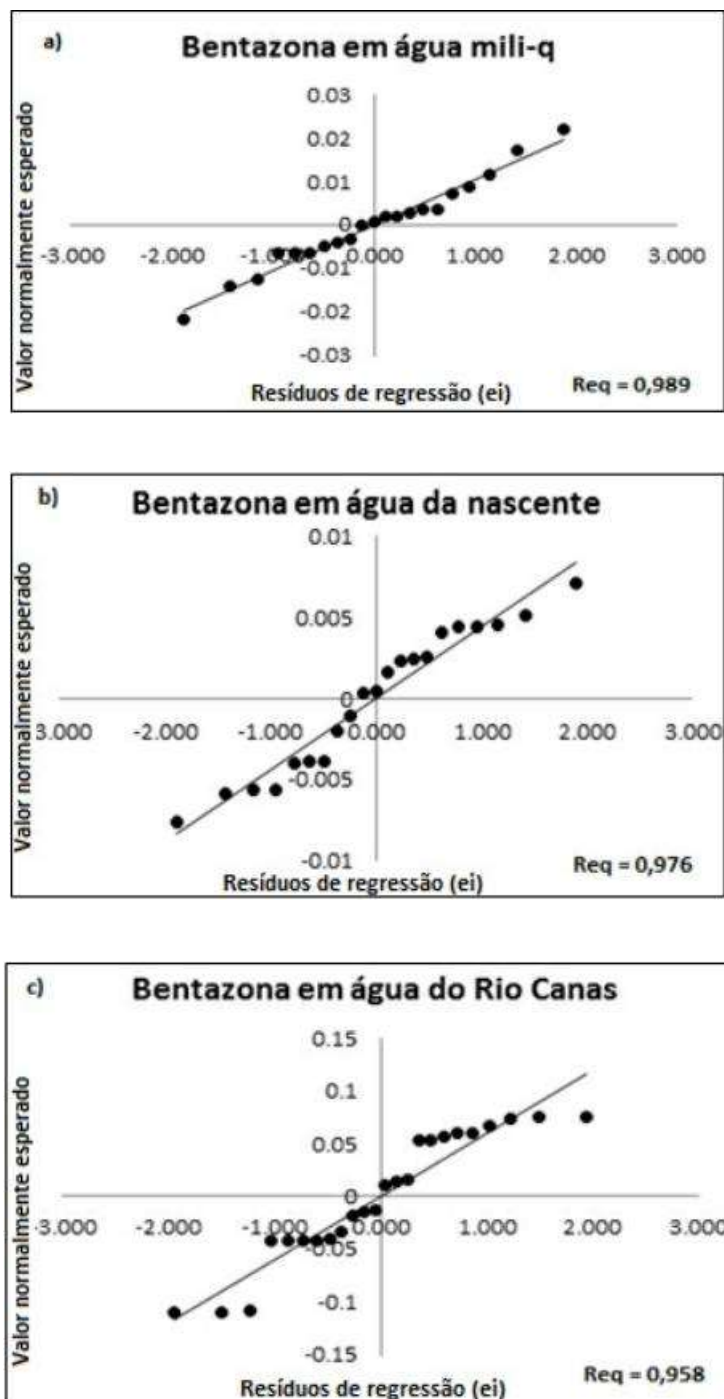


Fig. 8. Gráfico da normal QQ dos resíduos de regressão do bentazona no três meios estudados.

Depois de verificadas e confirmadas as premissas do MMQO, obteve-se as seguintes equações de regressão: Área = 1,4083 [Bentazona] – 0,0227

($R^2 = 1$) para a curva em água mili-q, Área = 1,4235 [Bentazona] – 0,0875 ($R^2 = 0,9996$) para a curva em meio a água do Rio Canas e Área = 1,4107 [Bentazona] – 0,0249 ($R^2 = 1$) para a curva em meio a água da nascente (Figs. 9 a 11). De acordo com a ANOVA, as regressões para os três meios avaliados foram significativas com $p < 0,01$ ($F > F_{crit} = 8,2$ para água mili-q e água da nascente e $F > F_{crit} = 7,9$ para Rio Canas). Assim, pode-se dizer que o método desenvolvido para determinação de bentazona em água apresenta linearidade ou, faixa linear, compreendida entre 0,12 a 6 mg L⁻¹. O cromatograma referente à linearidade obtida para bentazona pode ser observado na Fig. 12.

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre as inclinações das curva em meio à água mili-q e em meio à água da nascente, indicando a ausência de efeito de matriz. O mesmo comportamento foi observado ao comparar as inclinações da curva em meio à água mili-q e em meio à água do Rio Canas. Entretanto, pode-se observar que as intercessões são diferentes, indicando, possível efeito de matriz (Souza et al., 2014).

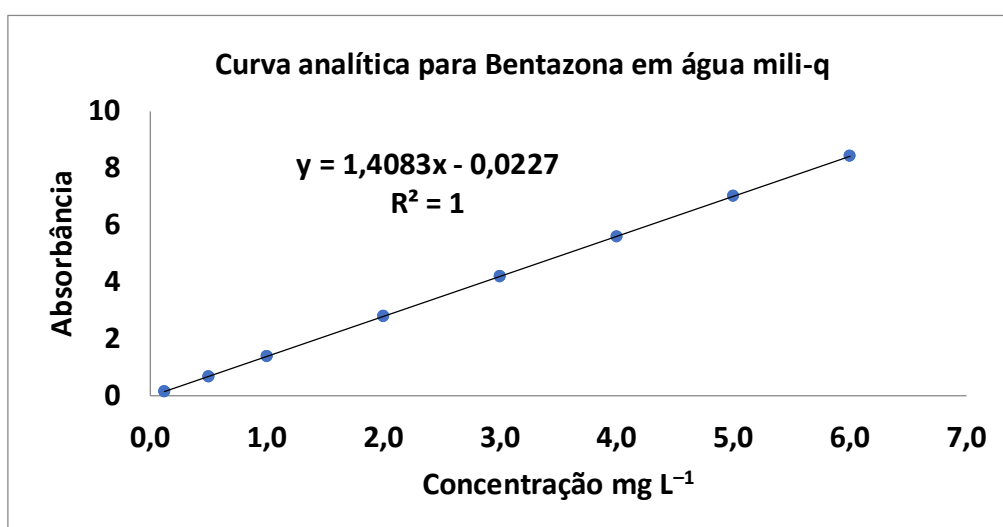


Fig. 9. Curva analítica para bentazona em água mili-q.

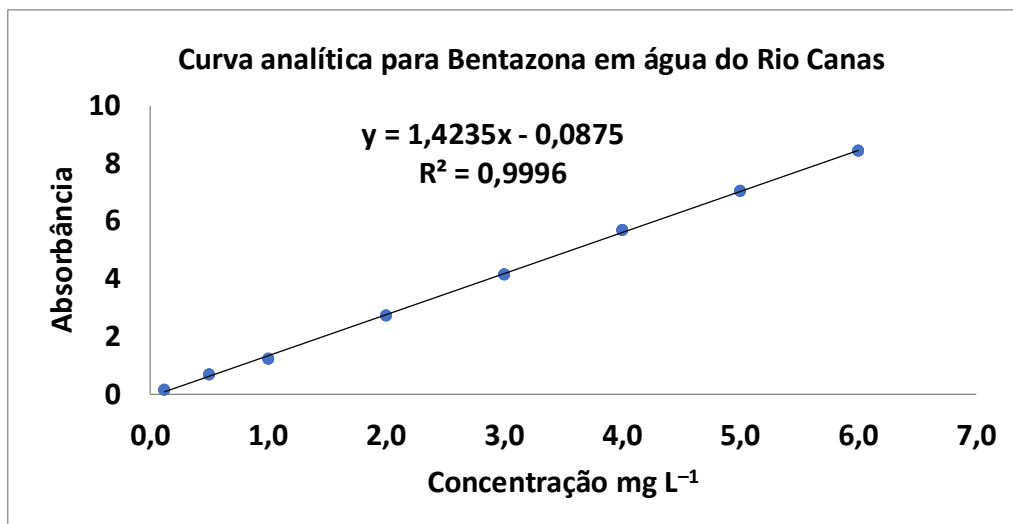


Fig. 10. Curva analítica para bentazona em água do Rio Canas

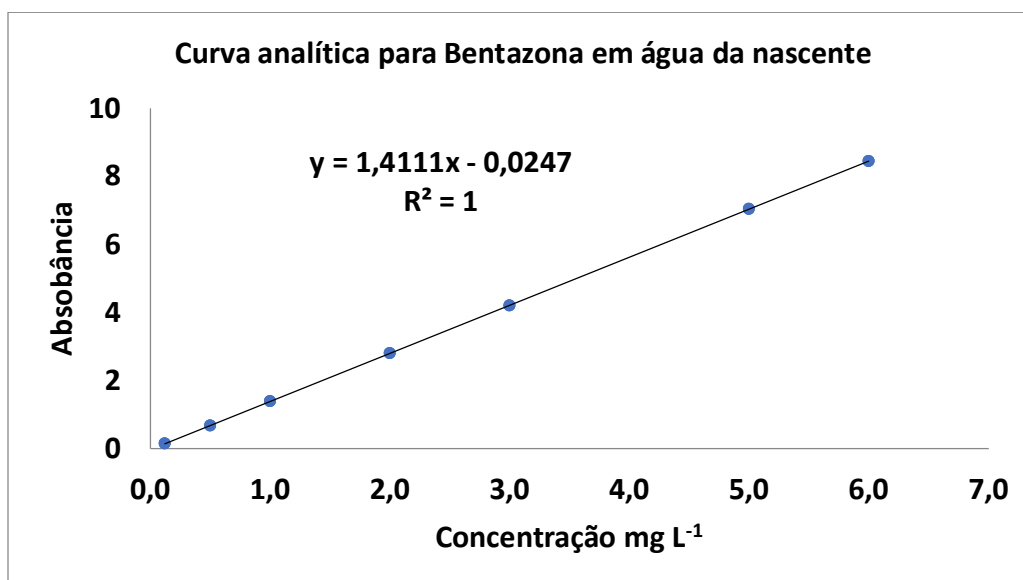


Fig. 11. Curva analítica para bentazona em água da nascente

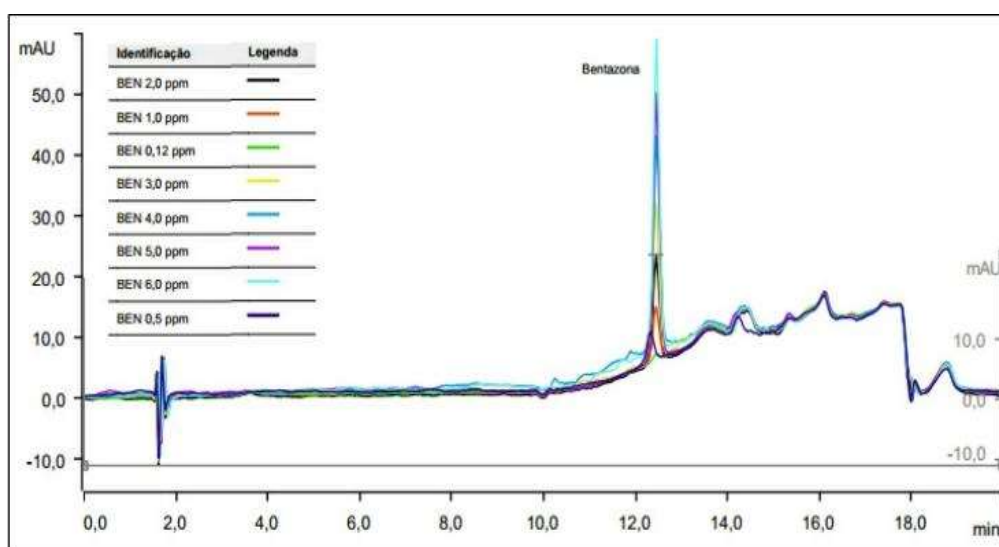


Fig. 12. Cromatograma referente a linearidade obtida para bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1

Neste sentido, cromatogramas foram obtidos a partir das injeções, em triplicata, de amostras de água mili-q, do Rio Canas e da nascente fortificadas (1 mg L^{-1}) e não fortificadas. Foi possível observar que, nos cromatogramas referente as amostras não fortificadas, não houve nenhum pico de resposta cromatográfica no tempo de retenção (tR) do bentazona (12,45 minutos), não havendo evidências de que interferentes e contaminantes, possam coeluir com o analito no tR determinado. Nos cromatogramas referente as amostras fortificadas, observou-se um pico cromatográfico no tR de 12,45 minutos, referente a concentração de 1 mg L^{-1} de bentazona, conforme Figs. 13 a 15.

Comparando as áreas dos picos cromatográficos obtidos, ($\mu = \text{média} \pm \text{DP} = \text{desvio padrão, } n = 3$), $1,034 \pm 0,001$; $1,035 \pm 0,001$ e $1,034 \pm 0,001$, em água mili-q, Rio Canas e nascente, respectivamente, observou-se que a pequena diferença verificada nos interceptos das curvas, não proporcionaram erros significativos na determinação do bentazona nos três meios avaliados. Uma vez que as áreas referente aos picos cromatográficos foram semelhantes, o tR do bentazona não sofreu alteração nos meios analisados e, houve adequada precisão ($\text{CV} < 10\%$) e recuperação analítica (100%).

Desta maneira foi certificada a seletividade do método cromatográfico desenvolvido para determinação de bentazona em água, pois a resposta

mensurada, pico de resposta, é única e exclusivamente do analito de interesse, bentazona, e não de algum composto químico ou fisicamente semelhante, o que resultaria em um viés na resposta a ser mensurada.

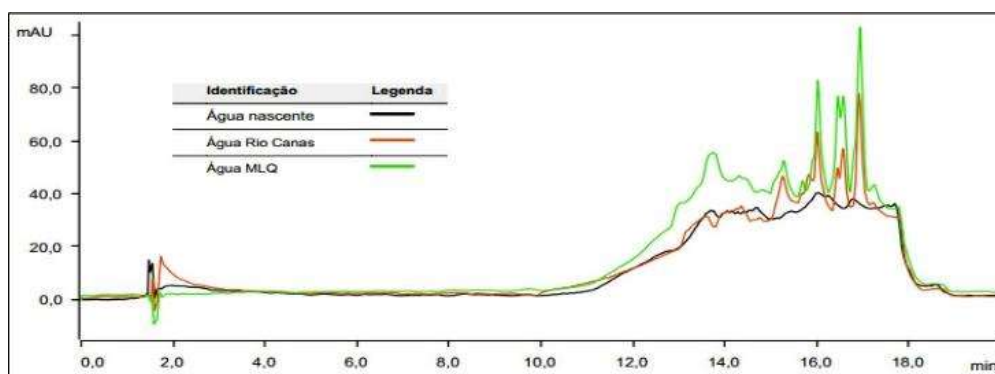


Fig. 13. Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente não fortificadas com bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1

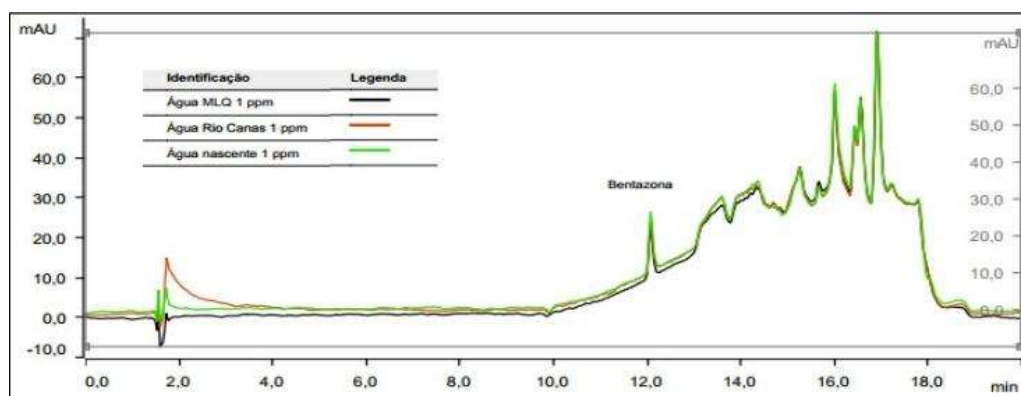


Fig. 14. Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente, fortificadas na concentração de 1 mg L-1 de bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1

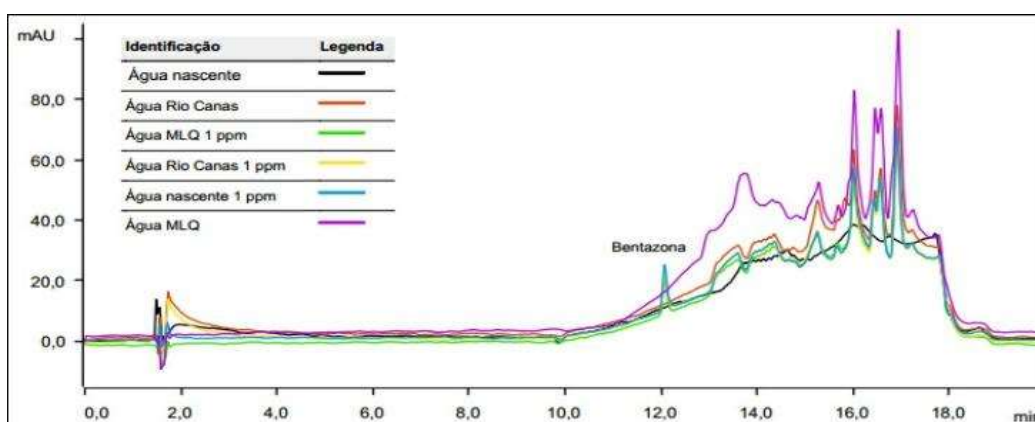


Fig. 15. Cromatograma referente a sobreposição das injeções de bentazona, 1 mg L⁻¹, nos três meios analisados, com relação sinal/ruído acima de 3:1

Limites de Detecção e Limites de Quantificação

Os Limites de Detecção e os Limites de Quantificação foram estimados a partir das relações sinal/ruído das seguintes concentrações de bentazona: 1,00; 0,14; 0,12; 0,11; 0,08 mg L⁻¹, respectivamente.

Padrões de bentazona foram injetados, em triplicata, no HPLC em ordem decrescente de concentração. Para cada amostra obteve-se um sinal, indicando a área ocupada pelo pico cromatográfico, e um ruído (linha base). Por meio destes, a relação sinal/ruído foi calculada e consta na Tab. 3.

Tab. 3. Limites de detecção e de quantificação para bentazona

Concentração (mg L ⁻¹)	Sinal (μ) / DP	Ruído (μ) / DP	Relação Sinal / Ruído
1	7,483 / 0%	0,108 / 0%	69,29 / 1%
0,14	1,307 / 1%	0,111 / 1%	11,82 / 7%
0,12	0,852 / 1%	0,102 / 1%	8,42 / 3%
0,11	0,636 / 1%	0,104 / 1%	6,17 / 3%
0,08	0,338 / 1%	0,110 / 1%	3,07 / 3%

μ = média da triplicada; DP = desvio padrão

As proporções sinal-ruído geralmente aceitas na validação de métodos analíticos para LD e LQ são de 3:1 e 10:1, respectivamente (INMETRO, 2007; Ribani et al., 2004). Nesse sentido, observando as relações sinal-ruído obtidas para cada uma das concentrações estudadas, determinou-se os valores de LD e LQ, 0,08 mg L⁻¹ e 0,12 mg L⁻¹, respectivamente.

Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária) e Exatidão (recuperação)

Devido à inexistência de materiais de referência devidamente certificados para bentazona, os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e precisão intermediária) foram pesquisados em ensaios com formulações em três níveis de concentração, 0,12; 0,24 e 1,20 mg L⁻¹, sendo sete replicatas independentes em cada nível.

A precisão foi obtida sob condições de repetitividade e precisão intermediária, expressa em termos de RSD e estimada por análise de

variância dos resultados de recuperação, obtidos para as sete replicatas de cada nível de concentração avaliado (INMETRO, 2011).

A exatidão do método foi investigada por meio da média de recuperação, obtida para as sete replicatas nos níveis de concentração avaliado. O critério de aceitabilidade adotado foi de média de recuperação entre 90 e 110%, conforme previsto pela ANVISA para análise de elementos a níveis traços (ANVISA, 2010).

Na Tab. 4, consta os resultados obtidos. Observa-se que a recuperação variou de 97 a 100% para o nível 0,12 mg L⁻¹; de 96 a 98% para o nível 0,24 mg L⁻¹; de 92 a 100% para o nível de 1,20 mg L⁻¹ e de 95 a 100% para a recuperação intra-dia. Estas porcentagens de recuperação obtidas encontram-se dentro do intervalo estipulado de recuperação para análise de resíduos. Os CV obtidos em todos os níveis foram inferiores a 6%, garantindo boa concordância das análises realizadas (ANVISA, 2010; INMETRO, 2007; Ribani et al., 2004). Os resultados obtidos, por meio da avaliação da repetitividade, precisão intermediária e recuperação, indicaram adequada precisão e exatidão do método analítico desenvolvido.

Tab.4. Resultados obtidos para repetitividade e precisão intermediária para bentazona

Concentração mg L ⁻¹	Média ± Desvio	Recuperação (%)	CV (%)
0,120 1º Dia	0,117 ± 0,006	97,30	5,40
0,120 2º Dia	0,120 ± 0,007	99,80	5,50
0,120 3º Dia	0,121 ± 0,002	100,80	1,70
0,240 1º Dia	0,236 ± 0,016	98,20	5,30
0,240 2º Dia	0,232 ± 0,004	96,50	1,80
0,240 3º Dia	0,231 ± 0,011	96,10	4,60
1,20 1º Dia	1,108 ± 0,014	92,30	1,20
1,20 2º Dia	1,206 ± 0,027	100,5	2,20
1,20 3º Dia	1,184 ± 0,048	98,70	4,00
0,120 - Intra-dia	0,120 ± 0,01	100,00	4,54
0,240 - Intra-dia	0,230 ± 0,01	95,83	4,00
1,20 - Intra-dia	1,16 ± 0,05	95,83	4,59

Robustez do Método

A avaliação da robustez do método foi conduzida sob a variação da temperatura da coluna (± 3 °C) e composição da fase móvel (MeOH: H₂O e

pH), utilizando padrão 1 mg L⁻¹ de bentazona. Os dados obtidos podem ser observados na Tab. 5. A partir destes resultados verificou-se que, as áreas dos picos cromatográficos correspondente a cada injeção de bentazona não apresentaram variação significativa, a um nível de confiança de 95%. O percentual de recuperação foi superior a 90%, encontrando-se dentro do intervalo de recuperação para análise de resíduos. A conformidade do sistema, avaliando os parâmetros, K, N e As, encontraram-se dentro das especificações, conforme Ribani et al. (2004). Essas observações indicam que o método desenvolvido apresentou-se robusto diante das variações a que foi submetido.

Tab. 5. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método para detecção e quantificação de bentazona (média ± desvio padrão relativo, n = 3)

Parâmetros	Nível	Recuperação (%) ± RSD
Temperatura	42 °C	102,8 ± 0,7
	45 °C	99,9 ± 1,1
	48 °C	102,4 ± 0,1
Composição da Fase móvel (Metanol:água)	30:70 / 85:15 pH = 2,3	98,1 ± 4,5
	30:70 / 85:15 pH = 2,5	93,1 ± 0,2
	35:65 / 90:10 pH = 2,3	99,6 ± 1,4
	35:65 / 90:10 pH = 2,5	93,1 ± 0,2
	40:60 / 95:5 pH = 2,3	100,0 ± 0,4
	40:60 / 95:5 pH = 2,5	97,4 ± 3,1

Aplicação do método desenvolvido para a determinação de Bentazona

O método foi desenvolvido e validado nas seguintes condições cromatográficas: sistema gradiente de eluição composto por duas fases

móvel, constituídas por MEOH : H₂O nas proporções 35:65 e 90:10, pH 2.4 ajustado com H₃PO₄. Tempo total de análise cromatográfica de 20 minutos, volume de injeção 90 µL, fluxo variando em 1,00 e 1,20 mL Min⁻¹ e, t_R do analito definido em 12,45 minutos. A Fig. 16 é referente ao cromatograma obtido para bentazona após desenvolvimento e validação das condições operacionais do método.

Após desenvolvimento e validação, o método foi empregado para a determinação de bentazona em 16 amostras de água, coletadas semanalmente no Rio Canas durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015. As amostras foram previamente preparadas conforme procedimentos descritos nos itens 4.2.3 e 4.2.4, empregando 1 L de água do Rio Canas em cada análise realizada.

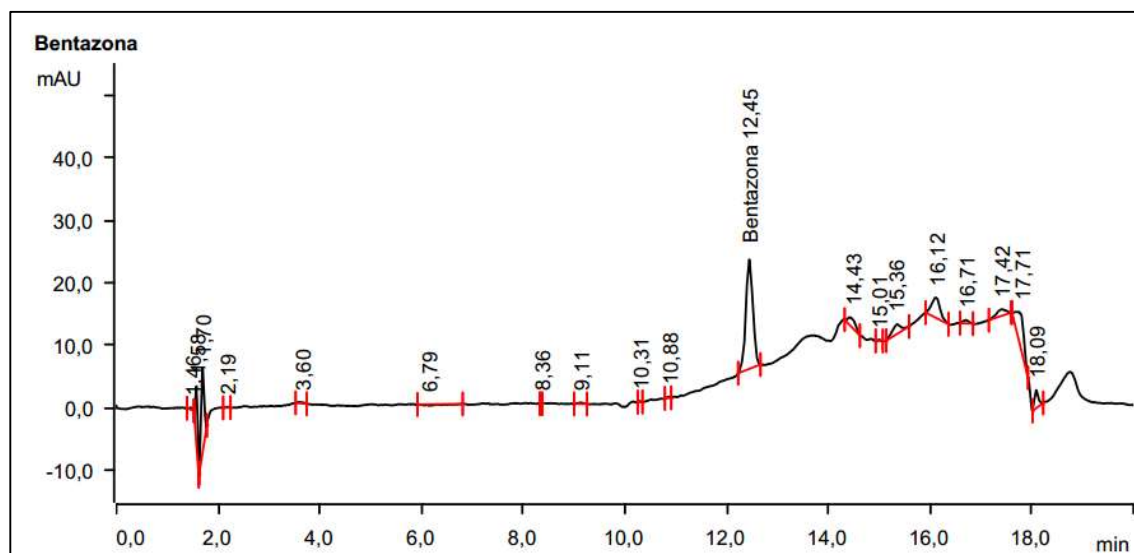


Fig. 16. Cromatograma referente a injeção de bentazona, 1 mg L⁻¹, com relação sinal/ruído acima de 3:1.

As coletas de amostras de água realizadas no Rio Canas ocorreram sob condições climáticas chuvosas (amostras 2; 13; 14; 15 e 16) e ensolaradas, demais amostras. Os teores de bentazona quantificados encontram-se na Tab. 6. As Figs 17 a 19, são referentes a cromatogramas obtidos das amostras 2, 7, e 9, respectivamente.

Tab. 6. Teores de bentazona obtidos em amostras de água coletadas no Rio Canas durante os meses outubro, novembro e dezembro de 2015 (média \pm desvio padrão, n = 3)

Amostras	Concentração (mg L ⁻¹)	Mês	Clima
1	2,166 \pm 0,006	Outubro	Sol
2	0,199 \pm 0,002	Outubro	Chuva
3	3,606 \pm 0,005	Outubro	Sol
4	3,642 \pm 0,005	Outubro	Sol
5	3,423 \pm 0,004	Novembro	Sol
6	3,415 \pm 0,015	Novembro	Sol
7	3,560 \pm 0,007	Novembro	Sol
8	3,717 \pm 0,002	Novembro	Sol
9	5,542 \pm 0,002	Novembro	Sol
10	4,886 \pm 0,002	Novembro	Sol
11	2,608 \pm 0,002	Novembro	Sol
12	3,597 \pm 0,003	Novembro	Sol
13	D/NQ	Dezembro	Chuva
14	D/NQ	Dezembro	Chuva
15	D/NQ	Dezembro	Chuva
16	D/NQ	Dezembro	Chuva

D = Detectado NQ = Não Quantificado

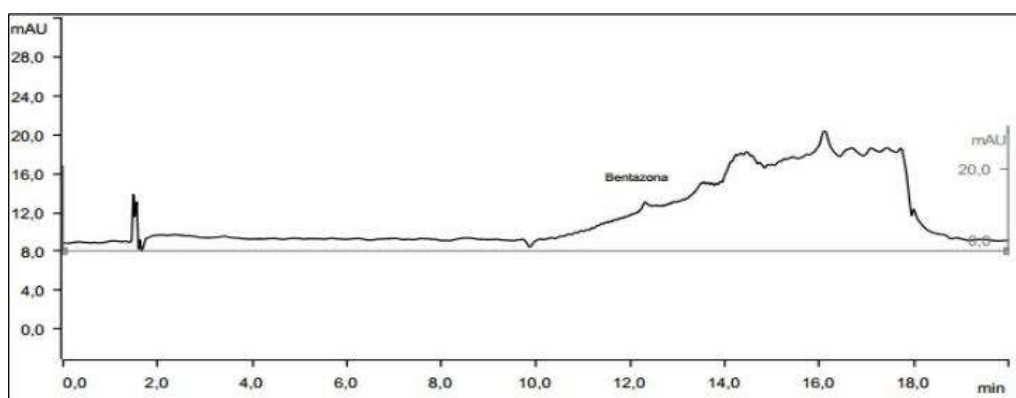


Fig. 17. Cromatograma referente a amostra 2, bentazona 0,199 mg L⁻¹, coletada no Rio Canas no mês de outubro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1

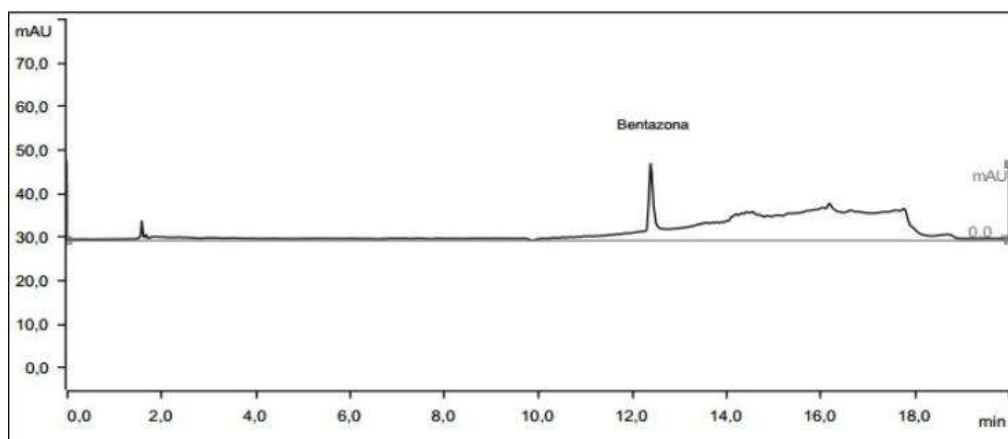


Fig. 18. Cromatograma referente a amostra 7, bentazona 3,560 mg L⁻¹, coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1

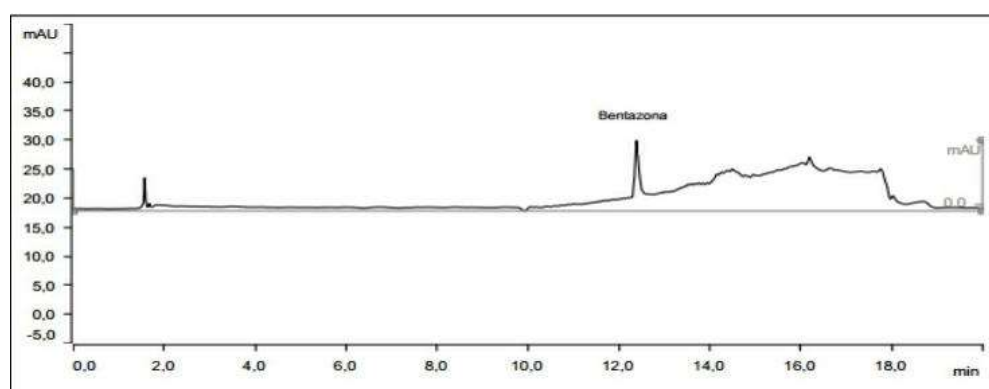


Fig. 19. Cromatograma referente a amostra 9, bentazona 5,524 mg L⁻¹, coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1

Ao realizar a análise estatística pelo Teste de Tukey, observou-se que as concentrações de bentazona variaram significativamente a cada coleta realizada, exceto entre as amostras 3 e 12, realizadas nos meses de outubro e novembro, respectivamente, e entre as amostras 5 e 6, realizadas no mês de novembro.

O método predominante de aplicação do herbicida nas culturas de arroz no município de Canas é por via líquida. Nesta aplicação, uma formulação é geralmente diluída em água, formando a calda que, via de regra, é aplicada na forma de gotas através de pulverização. Durante o 2º semestre de 2015, a aplicação de bentazona nas culturas ocorreu nos meses de setembro e novembro.

Após a aplicação do pesticida em uma cultura, por meio de diferentes métodos, vários processos, físicos, químicos e biológicos, determinam eu

comportamento. O destino dos pesticidas no ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) (Spadotto, 2006). Sob influência da temperatura e luz solar, os pesticidas estão sujeitos a degradação química, bacteriana e a fotodegradação. A ocorrência desses processos podem ter contribuído para que diferentes concentrações de bentazona fossem obtidas durante as coletas realizadas nestes meses.

Spadotto (2006) menciona que as condições meteorológicas, localização da área na topografia e práticas de manejo agrícola podem, entre outros, afetar o destino dos pesticidas no ambiente. O volume, a intensidade e a frequência das chuvas têm grande influência no transporte e na perda de pesticidas, através do escoamento superficial e da percolação da água no solo.

A baixa concentração de bentazona obtida na amostra 2 (0,199 mg L⁻¹) e a não quantificação (somente detecção) de bentazona nas amostras 13 a 16, pode ser em decorrência ao período chuvoso observado nestas semanas dos meses de outubro e dezembro/2015. Além da chuva intensificar os processos supracitados, o aumento do volume de água favorece a diluição dos pesticidas e, conseqüentemente, menores concentrações foram quantificadas.

No período de chuva, grande parte da matéria orgânica presente no solo pode sofrer escoamento superficial. Esta matéria orgânica contida no solo e em águas naturais encontram-se como substâncias húmicas (SH). Essas substâncias são uma mistura complexa de moléculas, semelhantes entre si e formadas pela decomposição biológica e enzimática de vegetais no solo. São transportadas às águas naturais por processos de lixiviação, escoamento e/ou podem, também, ser formadas diretamente no meio aquático por decomposição de plantas e organismos aquáticos (Toscano; Ribeiro; Rocha, 2000).

As interações destas SH com compostos orgânicos antropogênicos, como os pesticidas, estão relacionadas com efeitos de adsorção, solubilidade, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes. O efeito solubilizante do material húmico sobre compostos orgânicos pode

desempenhar importante papel na dispersão, mobilidade e transporte desses produtos no ambiente aquático (Toscano; Ribeiro; Rocha, 2000).

O pesticida pode ser transportado pela água da chuva que escoar superficialmente e pelo solo erodido, sendo levado às partes mais baixas da topografia, podendo chegar até os rios, córregos, lagos e açudes. O pico de concentração de pesticidas em águas superficiais é registrado logo após períodos de chuva (Spadotto, 2006). Pode-se dizer que esse evento é observado quando se analisa a diferença entre as concentrações de bentazona quantificadas nas amostras 2 e 3 (0,199 e 3,606 mg L⁻¹), respectivamente.

Entende-se que, possivelmente, no período pós-chuva, há um aumento na concentração de pesticidas em rios localizados próximo às plantações que recebem a água drenada das culturas. Assim, é possível inferir que a diferença não significativa (Teste de Tukey), obtida entre as concentrações de bentazona das amostras 3 e 12, seja em decorrência ao escoamento superficial. A chuva pode ter carreado uma maior quantidade de herbicida para o rio, aumentando a concentração de bentazona quantificada na amostra 3.

A aplicação do bentazona na cultura de arroz durante a 1ª semana de novembro de 2015, pode ter influenciado na obtenção de concentrações similares desse herbicida (amostras 5 e 6) e, no posterior aumento das concentrações obtidas (amostras 7; 8; 9; e 10). É recomendado manter estática a lâmina de água do cultivo, por um período mínimo de duas semanas após a aplicação do pesticida (Copatti; Garcia; Baldisserotto, 2009).

Nas culturas de arroz irrigado no município de Canas, a lâmina de água é mantida estática por aproximadamente 10 dias. Durante este período, a vazão de drenagem da água nas quadras de arroz diminui significativamente, aumentando a concentração do herbicida no interior das mesmas e, conseqüentemente, diminuindo-a ou mantendo-a constante na água do Rio Canas. Assim, quando a lâmina de água encontrava-se estática, obteve-se concentrações de bentazona similares (amostras 5 e 6) e, quando a vazão de drenagem da água foi normalizada nas quadras de arroz, obteve-se valores maiores de bentazona nas amostras coletadas posteriormente (amostras 7; 8; 9 e 10).

Conforme já mencionado, o Brasil carece de uma legislação mais eficiente que determine os limites de concentração máxima para a maioria dos

pesticidas comercializados. A legislação anterior, Portaria MS nº 518/2004, a Portaria atual do MS nº 2.914/2011, define VMP para bentazona sendo como 0,300 mg L⁻¹. Nesse sentido, o método desenvolvido neste estudo, pode ser aplicado para vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de qualidade, uma vez que atende ao VMP para bentazona estabelecido pelo ministério da saúde.

Ao analisar as concentrações de bentazona obtidas nas amostras de água coletadas no Rio Canas, foi possível observar que todos estes valores (Tab. 6) foram superiores ao VMP, exceto amostra 2, onde bentazona foi quantificado na concentração referente a 0,199 mg L⁻¹.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do estudo realizado foi possível obter um levantamento das áreas de cultivo de arroz irrigado localizada no município de Canas, selecionando o Rio Canas localizado próximo a essas culturas, assim como, o herbicida bentazona, que nestes cultivos são aplicados no controle às ervas daninhas.

O método desenvolvido para detecção e quantificação de bentazona em água foi validado após a verificação e certificação de todas as figuras de mérito e premissas que são sugeridos na validação de um método analítico laboratorial (faixa linear e efeito matriz, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez).

No estudo das figuras de mérito foram obtidos níveis de recuperação do analito superiores a 90 %. Os CV observados em todas as análises foram inferiores a 6%, garantindo concordância entre os procedimentos realizados, indicando que o método desenvolvido apresentou adequada precisão e exatidão. Após a verificação e certificação de todas as premissas, foi possível validar o método para determinação de bentazona em água.

Aplicando o método desenvolvido foi possível quantificar resíduos de bentazona em amostras de água do Rio Canas, durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015. As concentrações de bentazona em água variaram de 0,199 a 5,524 mg L⁻¹, valores são superiores ao VMP, 0,3 mg L⁻¹,

estabelecido pelo Ministério da Saúde para estar presente em água de consumo humano.

A legislação, no que diz respeito à validação de metodologias, tem algumas vertentes e diferentes interpretações. A legislação brasileira tem sido mais bem definida por meio de resoluções e recomendações do INMETRO e ANVISA, inspiradas em diretrizes da ICH e do grupo EURACHEM. Para que um estudo de validação seja conduzido com sucesso é necessário que se tenha amplo conhecimento da legislação referente às substâncias em estudo (pesticidas) e das diretrizes propostas pelas agências reguladoras que atuam na(s) área(s) em questão.

Devido importância de se conhecer e determinar as concentrações de pesticidas em águas, mais estudos são necessários para determinar e entender os processos de dispersão, transporte, degradação, adsorção, hidrólise, entre outros, no ambiente. Novos métodos analíticos mais sensíveis e robustos que correlacionem o desenvolvimento e a otimização de maneira lógica e organizada devem ser desenvolvidos e validados a fim de facilitar a detecção e quantificação destes compostos em diferentes matrizes, como água e alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANA - Agência Nacional de Águas; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras, Brasil, 2011.

Ali, U. et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in south asian region: A review. *Science of The Total Environment*, v. 476-477, p. 705–717, abr. 2014.

Almeida, A.D.E., Elian, S., Nobre, J. Modifications and alternatives to the tests of Levene and Brown & Forsythe for equality of variances and means. *Revista Colombiana de Estadística*, v. 31, n. 2, p. 241–260, 2008.

Andrade, A. S. et al. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em município do Alto Paranaíba - MG. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1129–1135, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A Resolução RDC no 27 de 17 de maio de 2012 - *Diário Oficial da União*, 2012.

ANVISA - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U - *Diário Oficial da União*, Brasil, p. 1-15, 2010.

APHA - American public health association (AWWA), Water environmental federation (WEF). Standart methods for the examination of water and wastewater, 20 ed. Washington, 1999.

Araujo, P. Key. Aspects of analyticas method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography B, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, ago. 2009.

Asada, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. Plant Physiology, v. 141, n. 2, p. 391–396, 1 jun. 2006.

Avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) - Qualidade ambiental. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa>>. Acesso em: 13 out. 2015.

Barber, J. Photosytem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1365, n. 1-2, p. 269–277, jun. 1998.

Bomfim, M.V.J., Abrantes, S.M.P., Zamith, H.P.S. Validação de método analítico para determinar a migração de ϵ -caprolatama das embalagens para alimentos gordurosos. Química Nova, v. 33, n. 5, p. 1114–1118, 2010.

Cerejeira, M. et al. Pesticides in portuguese surface and ground waters. Water Research, v. 37, n. 5, p. 1055–1063, mar. 2003.

Copatti, C. E., Garcia, L.D.O., Baldisserotto, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. Biota Neotropica, v. 9, n. 4, p. 235–242, dez. 2009.

EURACHEM. Euachem guide: The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide, 2014. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. Acesso 17 nov. 2015.

Green, J. et al. Analytical method validations. In: Analytical Chemistry News and Features. 2a ed. Amsterdam, NL, p. 1–532, July, 2011.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente Recursos Naturais e Renováveis. Requisito legal e competência do Ibama Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2015.

INMETRO - Instituto Nacioanal de Metrologia Qualidade e Tecnologia - Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2015.

Macedo, R.S. et al. Effects of the herbicide bentazona on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. Toxicology in Vitro, v. 22, n. 3, p. 716–722, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Consultas Pública. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacaoconsultas-publicas>>. Acesso em: 13 out. 2015. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. Acesso 17 nov. 2015.

MONSANTO. Ficha de informações de segurança de produtos químicos, 2014. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/globalbr/produto/documents/roundup-original-disfispq.pdf>>. Acesso em 23 ago. 2015.

Moraes, P.V.D., Rossi, P. Comportamento ambiental dos agrotóxicos. Scientia Agraria Paranaensis, v. 9, n. 3, p. 22–35, 2010.

Nogueira, E. N. et al. Currently used pesticides in water matrices in central-western Brazil. Journal Braz. Chem. Soc, v. 23, n. 8, p. 1476–1487, 2012.

Pinto, G.M.F., Jardim, I.C.S.F. Determination of bentazon residues in water by high-performance liquid chromatography. Validation of the method. Journal of chromatography A, v. 846, n. 1-2, p. 369–374, 1999.

Pourata, R. et al. Removal of the herbicide Bentazon from contaminated water in the presence of synthesized nanocrystalline TiO₂ powders under irradiation of UV-C light. Desalination, v. 249, n. 1, p. 301–307, nov. 2009.

Primel, E.G. et al. Poluição da água por herbicidas utilizados nos cultivos de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul: Predição teórica e monitoramento. Química Nova, v. 28, n. 4, p. 605–609, ago. 2005.

Reis, M. A. et al. Determination of fenofenadine in hank's balanced salt solution by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: Application to caco-2 cell permeability studies. Biomedical chromatography : BMC, v. 29, n. 4, p. 537–544, abr. 2015.

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

Ribeiro, M.L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Avaliação preliminar. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.

Rozet, E. et al. Advances in validations, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 55, n. 4, p. 848–858, jun. 2011.

Scorza, R.P. Pesticidas, Agricultura e Recursos Hídricos. Embrapa Meio Ambiente, p. 1–9, 2006.

Sharma, B.M. et al. Environment and human exposure to persistent organic pollutants (POPs) in India: A systematic review of recent and historical data. *Environment International*, v. 66, p. 48–64, maio 2014.

Silva, M.R., Campos, A.C.E., Bohm, F.Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 8, n. 2, p. 46–58, 2013.

Silva, E., Cerejeira, M.J. Avaliação do risco de pesticidas individuais e suas misturas em águas de superfície. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 32–42, 2012.

Silva, I.P.D.F.E. et al. Photosystem II inhibitor herbicides. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, v. 7, n. 1, p. 12–22, 2013.

Silva, M.F.D.O.E., Costa, L.M. A indústria de defensivos agrícolas. *BNDS Setorial*, v. 35, p. 233–276, 2010.

Souza, J.F. et al. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of bromodine into ocular implants. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 927–941, 2014.

Souza, S.V.C., Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, n. 1-2, p. 25–35, nov. 2005.

Spadotto, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*, v. 2, n. January, p. 1–9, 2006.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Disponível em: <<http://www.degryter.com/view/j/pac.2002.74.issue-5/pac200274050835/pac200274050835.xml>>. Acesso em 02 dez. 2015.

Toscano, I. A., Ribeiro, M.L., Rocha, J.C. Determination of carbaryl by elisa (enzym-linked immunosorbent assay) and HPLC with photodiode array detection. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 466–471, 2000.

Veiga, C.M.M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. *Cad.Saúde Pública*, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

Yadav, I.C. et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment*, v. 511, p. 123–137, abr. 2015.

Zanella, R. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. *Journal of Separation Science*, v. 26, n. 9-10, p. 935–938, 1 jul. 2003.

Zanella, R. et al. Herbicides persistence in rice paddy water in southern Brazil.. In: Hasaneen, M. N. A. E. Herbicides - Mechanism and Mode of Action. 1^a ed; Rijeka, Croacia. p. 183–204, dez, 2011.