



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

DANÚBIA MARIA DA SILVA FREITAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES
AROMÁTICOS EM ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

Recife

2024

DANÚBIA MARIA DA SILVA FREITAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES
AROMÁTICOS EM ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil. Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Motteran

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Freitas, Danúbia Maria da Silva.

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos cromatográficos para quantificação de contaminantes aromáticos em estudos de biorremediação / Danubia Maria da Silva Freitas. - Recife, 2024.

85 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologias e Geociências, Programa de Pós-Graduação Engenharia Civil, 2024.

Orientação: Sávia Gavazza.

Coorientação: Fabrício Motteran.

Inclui referências.

1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); 2. Detector de Arranjo de Diodos (DAD); 3. Amina aromática; 4. Nitroaromático; 5. Subprodutos de degradação. I. Gavazza, Sávia. II. Motteran, Fabrício. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

DANÚBIA MARIA DA SILVA FREITAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES
AROMÁTICOS EM ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil, Área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em 01/08/2024

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos – UFPE

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Motteran – UFPE

BANCA EXAMINADORA

participação por videoconferência

Prof.^a Dr.^a Bruna Scandolaro Magnus (examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Dr.^a Maria Ângela Tallarico Adorno (examinadora externa)
Universidade de São Paulo

participação por videoconferência

Dr. Iago José Santos da Silva (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof.^a Dr.^a Ester Ribeiro de Andrade (examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof. Dr. Osmar Luiz Moreira Pereira Fonseca de Menezes (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Telma e Daniel

Ao meu marido, Wescre

À minha filha, Rebeca

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, minha fonte inesgotável de amor e força, por guiar meus passos e me conceder a graça de concluir esta etapa tão importante da minha vida acadêmica. Toda honra e glória sejam dadas a Ele.

Aos meus pais Telma e Daniel, pela educação que me proporcionaram, pelo empenho e amor nos cuidados e por serem a base sólida sobre a qual eu construí meu caráter.

Ao meu marido, Wescre de Freitas, com quem tenho o privilégio de partilhar a vida. Suas palavras de encorajamento e suporte emocional foram fundamentais, principalmente nos momentos que eu achava que não daria conta. Obrigada por todo o suporte, carinho, amor e paciência.

À minhas irmãs Tânia e Ana, pelo amor e companheirismo de uma vida inteira.

À minha orientadora, Professora Sávia Gavazza, gratidão por sua orientação e por ter me encorajado a ingressar no doutorado. Agradeço a oportunidade de fazer parte de seu time de orientandos, onde pude aprender e crescer não apenas como pesquisadora, mas também como indivíduo. Seu compromisso e dedicação com a educação são inspiradores.

Ao meu coorientador, Fabrício Motteran, por ser sempre tão solícito. Obrigada pelas excelentes contribuições na correção da qualificação, desta tese e do nosso artigo científico.

Ao Professor Mário Kato, meu maior incentivador na jornada rumo ao doutorado. Suas palavras e constante encorajamento conseguiram despertar em mim o desejo de continuar minha jornada acadêmica, que estava adormecida desde 2014, quando concluí meu mestrado.

À professora Lourdinha Florêncio, que junto com o professor Mário dedicaram suas vidas para construir um laboratório com uma excelente infraestrutura.

Ao professor Osmar Menezes, pela grande contribuição nos trâmites para a entrega e marcação da defesa desta tese, pela amizade e parceria em artigos científicos.

Aos professores Bruna Magnus e Wanderli Leite, que junto com os demais professores, se dedicam continuamente para proporcionar os recursos necessários e melhorar as condições de pesquisa no LSA. Agradeço também pelos aconselhamentos e boas conversas, especialmente nesta etapa tão especial de minha vida.

À Professora Ana Paula Paim, que deu excelentes contribuições no início do doutorado.

Aos colegas de trabalho Ronaldo Fonseca e Iago José, agradeço pela troca de conhecimentos, pela camaradagem e pelo ambiente colaborativo que construímos juntos. Agradeço a Iago também pelas excelentes contribuições na minha qualificação de doutorado.

À doutora Maria Ângela que também fez parte da minha banca de qualificação. Obrigada pelas excelentes sugestões para a melhoria da minha tese.

A Luiz Galdino, que tem um papel tão importante em minha trajetória no laboratório de cromatografia. Obrigada por partilhar seu conhecimento, amigo.

À Júlia Dias, nossa adorável aluna de iniciação científica, que foi por muitos anos o meu “braço direito” no LABIOTA. Que muitas vezes segurou a barra para mim no laboratório, quando precisei estar no 6º andar me dedicando à escrita desta tese.

Aos alunos de iniciação científica, mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e bolsistas DTI do LSA. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e a alegria partilhada no laboratório.

À Andrea e demais meninas da secretaria da pós-graduação, por serem sempre tão gentis e prestativas.

RESUMO

Aminas aromáticas e compostos nitroaromáticos são contaminantes ambientais de difícil degradação. A anilina, uma amina aromática encontrada em resíduos de diversas indústrias, degrada-se formando catecol em condições aeróbias e os ácidos benzoico e 4-aminobenzoico em condições anaeróbias. O 2,4-dinitroanisol (DNAN), um composto nitroaromático poluente da indústria de munições, pode ser reduzido a 2,4-diaminoanisol (DAAN) por consórcios microbianos anaeróbios, passando pelos intermediários 2-metóxi-5-nitroanilina (MENA) e 4-metóxi-3-nitroanilina (iMENA). Esses compostos (catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, MENA, iMENA e DAAN) podem ser considerados indicadores de degradação de anilina e DNAN, essenciais para estudos de remediação ambiental. Este estudo desenvolveu e validou três métodos analíticos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): um para a anilina, outro para o catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico, e um terceiro para o DNAN, MENA, iMENA e DAAN em amostras de biorreatores destinadas a estudos de biorremediação. Por meio dos resultados da validação foi possível verificar que os métodos foram seletivos, devido à inexistência de picos interferentes, evidenciada pela comparação dos cromatogramas e comprovada pelos espectros de UV-visível. O método analítico para catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico apresentou efeito matriz, evidenciado pela pequena supressão do sinal analítico nestes compostos. As curvas analíticas se apresentaram lineares, com coeficiente de correlação acima de 0,99 para todos os compostos. Por meio do teste de variância e gráficos dos resíduos foi possível demonstrar que os modelos não apresentaram falta de ajuste. Os métodos possuíram limites de quantificação de 0,0064 mg/L; 0,14 mg/L; 0,17 mg/L; 0,020 mg/L; 0,31 mg/L; 0,15 mg/L; 0,23 mg/L e 0,089 mg/L para a anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN, respectivamente. Os métodos também foram precisos, apresentando valores de coeficiente de variação de até 5%, tanto intra quanto inter-dias. Além disso, foram exatos, o que foi comprovado por valores de recuperação entre 83% e 99%, demonstrando que os métodos propostos em CLAE são analiticamente confiáveis para monitorar anilina, DNAN e seus subprodutos de degradação em reatores biológicos.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); detector de arranjo de diodos (DAD); amina aromática; nitroaromático; subprodutos de degradação.

ABSTRACT

Aromatic amines and nitroaromatic compounds are environmental contaminants, notable for their resistance to degradation and harmful effects on ecosystems. Aniline, an aromatic amine found in waste from various industries, degrades aerobically to form catechol and anaerobically to form benzoic and 4-aminobenzoic acids. 2,4-Dinitroanisole (DNAN), a nitroaromatic compound polluting the munitions industry, can be reduced to aromatic amines such as 2,4-diaminoanisole (DAAN) by anaerobic microbial consortia, passing through the intermediates 2-methoxy-5-nitroaniline (MENA) and 4-methoxy-3-nitroaniline (iMENA). These compounds (catechol, benzoic, and 4-aminobenzoic acids, MENA, iMENA, and DAAN) can be considered as indicators of aniline and DNAN degradation, essential for environmental remediation studies. This study developed and validated three analytical methods using high-performance liquid chromatography (HPLC): one for aniline, another for catechol, benzoic acid, and 4-aminobenzoic acid, and a third for DNAN, MENA, and DAAN in bioreactor samples intended for bioremediation studies. The validation results showed that the methods were selective due to the absence of interfering peaks, as evidenced by the comparison of the chromatograms and confirmed by the UV-visible spectra. The analytical method for catechol and benzoic and 4-aminobenzoic acids showed a matrix effect, evidenced by the slight suppression of the analytical signal in these compounds. The analytical curves were linear, with a correlation coefficient above 0.99 for all the compounds. The variance test and residual plots showed that the models were not ill-fitting. The methods had quantification limits of 0.0064 mg/L; 0.14 mg/L; 0.17 mg/L; 0.020 mg/L; 0.31 mg/L; 0.15 mg/L; 0.23 mg/L and 0.089 mg/L for aniline, catechol, benzoic acid, 4-aminobenzoic acid, DNAN, MENA, iMENA and DAAN, respectively. The methods were also accurate, with a coefficient of variation values of up to 5%, both intra- and inter-day. In addition, they were accurate, as evidenced by recovery values between 83% and 99%, demonstrating that the proposed HPLC methods can be used safely to monitor aniline and DNAN and their degradation by-products in biological reactors.

Keywords: high-performance liquid chromatography (HPLC); diode array detector (DAD); aromatic amine; nitroaromatic; degradation by-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fórmula estrutural da anilina.....	21
Figura 2 –	Fórmulas estruturais dos compostos intermediários da degradação da anilina.....	23
Figura 3 –	Fórmulas estruturais do DNAN e seus produtos MENA, iMENA e DAAN.....	26
Figura 4 –	Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico por CLAE.....	29
Figura 5 –	Representação de um pico cromatográfico genérico, ilustrando os parâmetros para cálculo do fator de assimetria.....	31
Figura 6 –	Cromatograma de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, utilizando metanol e água como fase móvel.....	49
Figura 7 –	Cromatogramas de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 8 e 15 min (b).....	50
Figura 8 –	Cromatogramas de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 9 e 17 min (b).....	52
Figura 9 –	Cromatograma de uma solução padrão contendo catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico no método utilizando acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico pH 3,5.....	53
Figura 10 –	Cromatograma de uma solução padrão de anilina no método utilizando acetonitrila e água com ácido acético e trietilamina.....	54
Figura 11 –	Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 16 e 27 min (b) utilizando acetonitrila e água como fase móvel.....	55
Figura 12 –	Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 16 e 35 min (b) utilizando metanol e água como fase móvel.....	56

Figura 13 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 8 e 27 min (b) utilizando acetonitrila e tampão fosfato 5 mM como fase móvel.....	56
Figura 14 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN, utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel.....	58
Figura 15 – Cromatograma de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN, utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel no modo de eluição isocrático.....	59
Figura 16 – Cromatogramas em três dimensões relacionando intensidade de sinal analítico (mAU) versus tempo de corrida (min) versus comprimento de onda (nm) de a) método da anilina e b) método do catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico.....	60
Figura 17 – Cromatogramas em três dimensões relacionando intensidade de sinal analítico (mAU) versus tempo de corrida (min) versus comprimento de onda (nm) do método de DNAN, MENA, iMENA e DAAN.....	60
Figura 18 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem anilina; b) amostra com adição de anilina e c) solução padrão de anilina.....	62
Figura 19 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem catecol e ácidos; b) amostra com adição de catecol e ácidos e c) solução padrão de catecol e ácidos.....	63
Figura 20 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem <i>IMCs</i> ; b) amostra com adição de <i>IMCs</i> e c) solução padrão de <i>IMCs</i>	64
Figura 21 – Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de anilina e solução padrão de anilina.....	65
Figura 22 – Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de catecol (a), ácido benzoico (b) e ácido 4-aminobenzoico (c) e da solução padrão destes compostos.....	65

Figura 23 –	Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de DNAN (a), MENA (b), iMENA (c) e DAAN (d) e da solução padrão destes compostos.....	66
Figura 24 –	Curvas analíticas de a) anilina, b) catecol, c) ácido benzoico e d) ácido 4-aminobenzoico.....	68
Figura 25 –	Curvas analíticas de a) DNAN, b) MENA, c) iMENA e d) DAAN.....	69
Figura 26 –	Gráficos dos resíduos gerados pelos modelos de calibração: a) da anilina; b) do catecol; c) ácido benzoico e d) ácido 4-aminobenzoico.....	70
Figura 27 –	Gráficos dos resíduos gerados pelos modelos de calibração de: a) DNAN; b) MENA; c) iMENA e d) DAAN.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características físico-químicas da anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico.....	24
Tabela 2 –	Técnicas de quantificação de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico em diversas matrizes relatadas na literatura.....	25
Tabela 3 –	Características físico-químicas do DNAN, MENA, iMENA e DAAN.....	26
Tabela 4 –	Métodos de quantificação de DNAN, MENA, iMENA e DAAN relatados na literatura.....	27
Tabela 5 –	Composição do meio mineral na matriz utilizada na validação dos métodos de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico.....	40
Tabela 6 –	Composição do meio basal na matriz utilizada na validação do método dos <i>IMCs</i>	40
Tabela 7 –	Programas de eluição testados para o método da anilina e seus derivados.....	42
Tabela 8 –	Programas de eluição testados para o método do DNAN e seus derivados.....	43
Tabela 9 –	Concentrações das soluções de trabalho da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN.....	45
Tabela 10 –	Aplicação com adaptações dos métodos para a determinação de anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em amostras ambientais.....	48
Tabela 11 –	Valores de resolução e fator de assimetria para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico utilizando acetonitrila e água como fase móvel.....	50
Tabela 12 –	Valores de resolução e fator de assimetria para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico utilizando acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,5) como fase móvel.....	52
Tabela 13 –	Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e água como fase móvel.....	55

Tabela 14 –	Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e tampão fosfato 5 mM como fase móvel.....	57
Tabela 15 –	Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel.....	58
Tabela 16 –	Comparação dos coeficientes angulares das retas obtidas das curvas analíticas na matriz e em solução pelo teste T.....	67
Tabela 17 –	Equações das retas, coeficientes de determinação e faixas lineares de trabalho.....	69
Tabela 18 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para a anilina.....	71
Tabela 19 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o catecol.....	72
Tabela 20 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o ácido benzoico.....	72
Tabela 21 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o ácido 4-aminobenzoico.....	72
Tabela 22 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o DNAN.....	72
Tabela 23 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o MENA.....	72
Tabela 24 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o iMENA.....	73
Tabela 25 –	Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o DAAN.....	73
Tabela 26 –	Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para os métodos da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN.....	74
Tabela 27 –	Resultados da recuperação (%) para os métodos da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em três níveis de concentração.....	76
Tabela 28 –	Estudo da estabilidade da anilina, catecol, ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em três níveis de concentração em solução e na matriz.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-NPA	1- naftilamina
3,4-DCA	3,4-dicloroanilina
4-4'MDA	4,4'-metilenodianilina
ACN	Acetonitrila
ADNT	2-amino-4,6-dinitrotolueno
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APL	Arranjo Produtivo Local
A _s	fator de assimetria de picos
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
DAAN	2,4-diaminoanisol
DAD	<i>diode array detector</i>
DNAN	2,4-dinitroanisol
DPR	desvio padrão relativo
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FR	fase reserva
GC	cromatografia gasosa
HMX	octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IMC	<i>insensitive munitions compounds</i>
iMENA	4-metóxi-3-nitroanilina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MENA	2-metóxi-5-nitroanilina
MeOH	Metanol
MS	espectrometria de massas

N	número de pratos
NG	Nitroguanidina
PCA	Polo de Confeção do Agreste
PETN	pentaeritritol tetranitrato
pH	potencial hidrogeniônico
RDX	1,3,5-trinitroper-hidro-1,3,5-triazina
R _s	Resolução
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
TR	tempo de retenção
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo geral.....	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	ANILINA E SEUS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO.....	21
2.1.1	Métodos de identificação e quantificação de anilina e seus compostos intermediários de degradação.....	24
2.2	COMPOSTOS DE MUNIÇÕES INSENSÍVEIS.....	24
2.2.1	Métodos de identificação e quantificação de DNAN e seus compostos de degradação.....	27
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	28
2.4	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE.....	29
2.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
2.5.1	Seletividade.....	31
2.5.2	Linearidade e faixa de trabalho.....	32
2.5.3	Limite de detecção.....	34
2.5.4	Limite de quantificação.....	34
2.5.5	Precisão.....	34
2.5.5.1	Repetibilidade.....	35
2.5.5.2	Precisão intermediária.....	35
2.5.5.3	Reprodutibilidade.....	35
2.5.6	Exatidão.....	36
2.5.7	Estabilidade.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.1.1	Equipamento.....	38
3.1.2	Reagentes.....	38
3.1.3	Limpeza das vidrarias.....	39
3.1.4	Descrição das matrizes.....	39
3.1.5	Preparação das soluções padrão.....	41
3.1.5.1	Soluções estoque.....	41

3.1.6	Condições cromatográficas dos métodos analíticos.....	41
3.1.6.1	Detector.....	41
3.1.6.2	Fase móvel e modo de eluição.....	41
3.1.6.3	Fluxo da fase móvel, temperatura do forno e volume de injeção.....	42
3.1.6.4	Fase estacionária.....	43
3.2	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	43
3.2.1	Seletividade.....	44
3.2.2	Linearidade e faixa de concentração.....	44
3.2.3	Limites de detecção e quantificação.....	44
3.2.4	Precisão.....	45
3.2.5	Exatidão.....	46
3.2.6	Estabilidade.....	46
3.3	SOFTWARES UTILIZADOS.....	46
3.3.1	Microsoft Excel (versão 365).....	46
3.3.2	LabSolution CS.....	47
3.3.3	OriginLab 2024.....	47
3.4	APLICAÇÃO DOS MÉTODOS.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	49
4.1.1	Escolha da fase móvel.....	49
4.1.1.1	Anilina e seus derivados.....	49
4.1.1.2	DNAN e seus derivados.....	54
4.1.2	Comprimento de onda.....	59
4.1.3	Fluxo da fase móvel e volume de injeção.....	61
4.2	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
4.2.1	Seletividade.....	62
4.2.2	Linearidade, faixa de concentração, LD e LQ.....	68
4.2.3	Precisão.....	74
4.2.4	Exatidão.....	75
4.2.5	Estabilidade.....	76
5	CONCLUSÕES.....	78
6	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Boa parte das águas subterrâneas no mundo inteiro estão contaminadas por compostos aromáticos, oriundos de atividades industriais. Dentre os compostos aromáticos, as aminas aromáticas e compostos nitroaromáticos aparecem como importantes agentes de contaminação ambiental, destacando-se sua resistência à degradação microbiana e os seus efeitos deletérios provocados nos sistemas ecológicos contaminados (MUZ et al., 2017; BILAL et al., 2021; CHEN et al., 2022).

Aminas aromáticas como a anilina podem ser encontradas nos resíduos das cadeias de produção das indústrias têxteis e das indústrias de fabricação de polímeros, plásticos, borrachas, pesticidas e produtos farmacêuticos. A anilina pode ser despejada no meio ambiente por meio da falta de tratamento adequado de efluentes industriais ou por desastres de derramamento de resíduos (SANG et al., 2019; MOHAMMED et al., 2020).

Em julho de 2012, houve o rompimento de uma tubulação de descarte de efluentes na empresa de produtos têxteis Döhler, em Joinville/SC, provocando a contaminação do rio Cachoeira com corante vermelho (VILELA, 2012). Em dezembro deste mesmo ano, a indústria de fertilizantes *Tianji Coal Chemical Industry* lançou, acidentalmente, mais de 39 toneladas de anilina no rio Zhuo Zhang, na China (SUN et al., 2015). No início de 2013, a indústria produtora de intermediários de corantes, *Hebei Jianxin Chemicals*, foi responsável pelo vazamento de anilina, que atingiu as águas de abastecimento da província de Hebei, também na China (CHINADAILY, 2013).

Outro grupo de compostos potencialmente poluentes são aqueles provenientes da indústria de munições. O 2,4-dinitroanisol (DNAN) é considerado um dos compostos mais abundantes em formulações de munições insensíveis e um importante substituto do explosivo convencional 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (DAVIES e PROVATAS, 2006; TAYLOR et al., 2015; MENEZES et al., 2021). A contaminação ambiental por DNAN pode ocorrer por meio de detonações incompletas em campos de treinamento, por efluentes industriais contaminados ou vazamentos de indústrias de produção de explosivos (SCHROER, 2018; MELO et al., 2021).

Estudos sobre a remediação de áreas contaminadas com aminas aromáticas e compostos nitroaromáticos são extremamente importantes para a proteção da saúde humana e preservação do meio ambiente. Microrganismos têm sido cada vez mais estudados e usados para degradação destes compostos, apresentando a vantagem de formação de produtos mineralizados como CO₂, água e sais inorgânicos.

Aerobiamente, a anilina pode ser degradada formando catecol como composto intermediário e, anaerobiamente, a degradação da anilina envolve a formação dos ácidos 4-aminobenzoico e benzoico como subprodutos (ALEXANDRA DE et al., 1994; KAHNG, KUKOR e OH, 2000; FUCHS, BOLL e HEIDER 2011; CARVALHO, 2020).

Embora persistente à biodegradação aeróbia, o DNAN é reduzido a aminas aromáticas como o 2,4-diaminoanisol (DAAN) por consórcios de microrganismos anaeróbios (FIELD et al., 1995; LIANG et al., 2013). Inicialmente, o DNAN pode ser reduzido a 2-metóxi-5-nitroanilina (MENA) ou 4-metóxi-3-nitroanilina (iMENA), dependendo da posição do grupo nitro reduzido e então é reduzido a DAAN. Além disso, minerais reativos como monossulfeto de ferro (II) podem reduzir o DNAN às suas aminas (MENEZES et al., 2021).

Assim, os compostos catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, MENA, iMENA e DAAN podem ser considerados indicadores da degradação da anilina e DNAN, portanto sua identificação e quantificação são importantes em estudos de remediação de áreas contaminadas com estes compostos.

Há alguns métodos analíticos propostos na literatura para a quantificação de anilina, catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico em diferentes matrizes. Por exemplo, ácido benzoico presente em sucos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – UV) (TIMOFEEVA et al., 2018), catecol em águas de rio utilizando um sensor seletivo e fluorescência (XU et al., 2022), anilina em corante (CORDIN, BECHTOLD e PHAM., 2021), águas residuárias (BOULAHLIB et al., 2016) e sedimento de reator biológico por CLAE-UV (SUN et al., 2015) e ácido 4-aminobenzoico em urina humana por CLAE com detector eletroquímico (WANG, HUANG e TAI, 2007). No entanto, ainda não foram relatados métodos que abrangessem os quatro compostos em amostras aquosas provenientes de estudos de biorremediação.

Quanto ao DNAN e seus subprodutos de degradação, o método padrão atual para análise de explosivos propulsores (método 8330B da *Environmental Protection Agency* - EPA) não trata destes compostos em matrizes ambientais (EPA, 2006). Devido a isso, os laboratórios de pesquisa usam métodos para compostos parecidos ou métodos originalmente desenvolvidos para materiais puros individuais, podendo levar a imprecisões analíticas, ou com grande efeito de matriz quando submetidos a matrizes mais complexas (CROUCH et al., 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho de pesquisa visa desenvolver e estabelecer metodologias analíticas validadas, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, capazes de identificar e quantificar a anilina, e seus intermediários de degradação – catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico – bem como o 2,4-dinitroanisol (DNAN), um

composto insensível de munição, e seus intermediários de biotransformação – 2-metóxi-5-nitroanilina (MENA), 4-metóxi-3-nitroanilina (iMENA) e 2,4-diaminoanisol (DAAN) – para aplicação em estudos de biorremediação em matrizes complexas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver, validar e aplicar metodologias cromatográficas, utilizando CLAE, para identificar e quantificar contaminantes e seus subprodutos metabólicos oriundos das indústrias de munições e têxtil.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia analítica para identificação e quantificação de anilina, catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico por CLAE;
- Desenvolver metodologia analítica para identificação e quantificação dos compostos 2,4-dinitroanisol (DNAN), 2-metóxi-5-nitroanilina (MENA), 4-metóxi-3-nitroanilina (iMENA) e 2,4-diaminoanisol (DAAN) por CLAE;
- Validar as metodologias desenvolvidas em amostras de biorreatores para estudos de biorremediação;
- Aplicar as metodologias desenvolvidas na determinação dos compostos estudados em amostras de biorreatores para estudos de biorremediação realizados em laboratório.

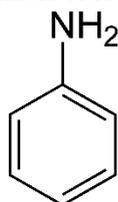
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Este capítulo apresenta a revisão bibliográfica sobre os compostos contaminantes anilina e 2,4-dinitroanisol (DNAN) e seus subprodutos de (bio) transformação, bem como o levantamento sobre os métodos de identificação e quantificação destes compostos. Além disso, os fundamentos da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvimento e validação de métodos analíticos são relatados.

2.1 ANILINA E SEUS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO

A anilina é uma substância base para produção de diversos compostos em diferentes segmentos produtivos (Figura 1). A partir dela são gerados alguns derivados como 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), 4,4'-metilenodianilina (4-4'MDA), e o 1-naftilamina (1-NPA) (BHUIYAN et al., 2019; CARVALHO, 2020).

Figura 1 – Fórmula estrutural da anilina



Fonte: A autora (2024).

A anilina e seus derivados são importantes substâncias químicas utilizadas na produção de solventes, cosméticos, antioxidantes, borrachas, corantes, produtos farmacêuticos, pesticidas e herbicidas, dentre outros segmentos (JEN, CHANG e YANG, 2001; SZCZEPANIK e SŁOMKIEWICZ, 2016). Esses compostos são frequentemente encontrados em efluentes industriais e águas superficiais devido ao seu uso na fabricação industrial e como resultado da biodegradação de compostos xenobióticos, incluindo corantes azo e herbicidas (EMTIAZI, SATARI e MAZAHERION, 2001).

A anilina pode contaminar o meio ambiente por meio da disposição indevida dos efluentes nos corpos hídricos, bem como por meio de desastres ambientais. Dois grandes derramamentos acidentais na China liberaram grandes quantidades de anilina no ambiente e contaminaram os ecossistemas aquáticos, representando grave perigo para a saúde humana e de outros seres vivos (SUN et al., 2015; SILI et al., 2019).

O derramamento químico da indústria de fertilizantes *Tianji Coal Chemical Industry*, em dezembro de 2012, introduziu mais de 39 toneladas de anilina no rio Zhuo Zhang e causou crise hídrica para mais de um milhão de pessoas que viviam em cidades a jusante (SUN et al., 2015). No início de 2013, a indústria produtora de intermediários de corantes, *Hebei Jianxin Chemicals*, foi responsável pelo vazamento de anilina, que atingiu as águas de abastecimento da província de Hebei, também na China, e causou a morte de centenas de animais (CHINADAILY, 2013).

No Agreste de Pernambuco (nordeste brasileiro), a anilina presente em efluentes industriais está ligada à indústria têxtil. O Polo de Confecção do Agreste (PCA) é um dos polos de desenvolvimento da economia do estado de Pernambuco, estruturado como um Arranjo Produtivo Local (APL) e engloba as cidades de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe. Juntas, estas cidades possuem 14.517 unidades têxteis, desde lavanderias de jeans a fábricas de tecido bruto (SEBRAE, 2013).

A indústria têxtil gera, inevitavelmente, grande volume de efluentes contendo corantes, aditivos e produtos químicos recalcitrantes, que acarretam cor forte, baixa biodegradabilidade, alta salinidade e demanda química de oxigênio (TU et al., 2022).

O uso de corantes do tipo azo, caracterizados pela presença de dupla ligação entre átomos de nitrogênio ($-N=N-$), representa de 60% a 80% dos corantes usados na indústria têxtil. Esses corantes geram aminas aromáticas quando degradados anaerobiamente, por meio da clivagem redutiva da ligação azo. As aminas aromáticas formadas, como a anilina, são compostos ainda mais tóxicos (CARVALHO, 2020) devido às suas propriedades cancerígenas e mutagênicas, bem como de seus derivados. Por esta razão, a remoção da anilina das águas residuais é importante em termos de proteção da saúde pública e do meio ambiente (BHUIYAN et al., 2019). No entanto, devido a sua complexa estrutura molecular, a anilina e seus derivados não são completamente degradados em estações de tratamento de esgotos convencionais (MOHAMMED et al., 2020), sendo assim considerados compostos recalcitrantes e com elevada relevância ambiental.

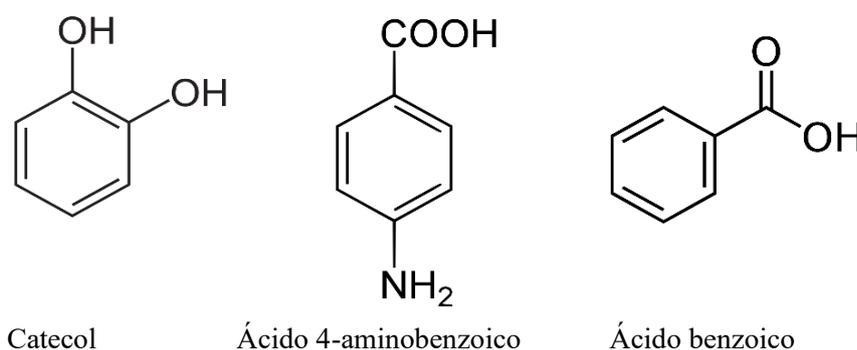
Os processos de tratamento físico-químicos de efluentes como adsorção, filtração, eletrólise, coagulação e oxidação química são, em geral, eficientes quanto à remoção dos compostos complexos (POURAN et al., 2015; GANG et al., 2019; XU et al., 2022). Entretanto, eles não são amplamente aplicados nas indústrias têxteis devido ao alto custo de operação e a grande geração de lodo químico, ocasionando problemas de descarte dos resíduos tóxicos no ambiente (POURAN et al., 2015; CUI et al., 2017; MAHMOUD et al., 2017).

Microorganismos têm sido cada vez mais estudados e usados para degradação de compostos aromáticos e xenobióticos como a anilina (ALEXANDRA DE et al., 1994; WANG et al., 2011; TAKEO et al., 2013; SUN et al., 2015; CUI et al., 2017) devido às vantagens apresentadas em relação aos tratamentos físico-químicos. A principal vantagem é a biodegradação de compostos tóxicos e recalcitrantes em produtos mineralizados como CO₂, água e sais inorgânicos. Microorganismos podem degradar a anilina por processos aeróbios e anaeróbios, seguindo diferentes rotas metabólicas.

A degradação aeróbia da anilina envolve a formação do composto intermediário central catecol (Figura 2). O catecol é geralmente formado a partir da ação das enzimas monoxigenases e dioxigenases, que utilizam o oxigênio molecular disponível para atacar a estrutura aromática adicionando grupos hidroxila. Assim, a energia de ressonância do anel aromático é diminuída, permitindo a sua clivagem (FUCHS, BOLL e HEIDER, 2011).

A degradação anaeróbia da anilina envolve a formação dos ácidos 4-aminobenzoico e benzoico (Figura 2). A anilina primeiramente é carboxilada a ácido 4-aminobenzoico e então ocorre a desaminação reductiva, liberando íons amônio para o meio e resultando no ácido benzoico, que entra na rota do benzoato e produz 3 acetil-CoA (ALEXANDRA DE et al., 1994; KAHNG, KUKOR e OH, 2000; CÂMARA, 2021).

Figura 2 – Fórmulas estruturais dos compostos intermediários da degradação da anilina



Fonte: A autora (2024).

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas da anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico.

Tabela 1 – Características físico-químicas da anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico

Nome da substância	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Nº - CAS	pKa
Anilina	$C_6H_5NH_2$	93,13	62-53-3	4,62
Catecol	$C_6H_4(OH)_2$	110,11	120-80-9	9,5
Ácido benzoico	C_6H_5COOH	122,12	65-85-0	4,21
Ácido 4-aminobenzoico	$NH_2C_6H_4COOH$	137,14	150-13-0	2,38 e 4,98

CAS - *Chemical Abstracts Service*

Fonte: A autora (2024).

2.1.1 Métodos de identificação e quantificação de anilina e seus compostos intermediários de degradação

O método padrão estipulado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) para determinação da anilina é o 8131 (EPA, 1996). Este método é aplicado a anilina e alguns de seus compostos derivados em extratos preparados a partir de amostras ambientais, por cromatografia a gás. Além deste, o método 8270E da EPA (EPA, 2018) trata de inúmeros compostos orgânicos semivoláteis, incluindo a determinação da anilina e o ácido benzoico por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Entretanto, esses dois métodos não incluem a determinação dos produtos intermediários como o catecol e ácido 4-aminobenzoico.

Foram relatados na literatura científica, vários estudos em que os compostos de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico foram quantificados em diferentes matrizes. No entanto, não foram encontradas metodologias que abrangessem os quatro compostos em um único método para matrizes ambientais por CLAE. A Tabela 2 sumariza algumas técnicas relatadas.

2.2 COMPOSTOS DE MUNIÇÕES INSENSÍVEIS

O desenvolvimento de munições de baixa vulnerabilidade, conhecidas como munições insensíveis, é uma força motriz fundamental por trás da pesquisa moderna de explosivos (DAVIES e PROVATAS, 2006).

Como esforço para melhorar a segurança dos profissionais da área militar, os componentes de munições convencionais passaram a ser substituídos por compostos de munições insensíveis (*Insensitive munitions compounds, IMC*, em inglês) devido à sua maior estabilidade e menor propensão a explosões acidentais (BODDU et al., 2009; MENEZES et al., 2021). Os *IMCs* exigem uma temperatura de detonação mais alta e são menos suscetíveis a

choques mecânicos, exibindo assim menor risco de detonação acidental comparados aos explosivos convencionais e garantindo maior segurança durante o uso, transporte e armazenamento (POWELL, 2016).

Tabela 2 – Técnicas de quantificação de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico em diversas matrizes relatadas na literatura

Composto	Matriz	Método	Referência
Anilina	Águas residuárias	CLAE-DAD	BOULAHLIB et al., 2016
Anilina	Meios de cultura	CLAE-UV	ALEXANDRA DE et al., 1994
Anilina	Sedimento de reatores biológicos	CLAE-UV	SUN et al., 2015
Anilina	Corante índigo	CLAE-UV	CORDIN, BECHTOLD e PHAM, 2021
Anilina e catecol	Amostras de eletrólise	CLAE ¹	SANTOS et al., 2010
Anilina, catecol e ácido benzoico	Meio de cultura	GC-MS	KAHNG, KUKOR e OH, 2000
Catecol	Água fluvial	CLAE-UV	XU et al., 2022
Ácido benzoico	Sucos	CLAE-UV	TIMOFEEVA et al., 2018
Ácido benzoico	Queijos	CLAE-UV	GUARINO et al., 2011
Ácido 4-aminobenzoico	Urina de humanos	CLAE-UV	WANG, HUANG e TAI, 2007

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos;

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ultravioleta-visível;

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;

1 - Condições cromatográficas distintas para os dois compostos.

Fonte: A autora (2024).

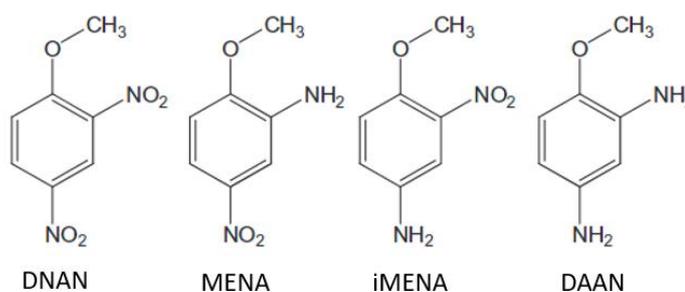
O 2,4-dinitroanisol (DNAN) é um dos compostos mais abundantes em formulações de munições insensíveis. É um importante substituto do explosivo convencional 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) e um componente das formulações de munições insensíveis IMC101, IMC104 e PAX21, com percentuais variando de 32% a 43% em peso (DAVIES e PROVATAS, 2006; TAYLOR et al., 2015).

Compostos nitroaromáticos sintéticos como o DNAN e os seus subprodutos de (bio)transformação são tóxicos e potencialmente mutagênicos, representando ameaça ao meio ambiente e aos seres vivos (OLIVARES et al., 2016; MENEZES, 2020). A contaminação ambiental por DNAN pode ocorrer pela dissolução e infiltração de pedaços não detonados no solo dos campos de treinamento e por águas residuárias ou vazamentos de indústrias de produção de explosivos. Portanto, a remediação desse poluente é necessária para a proteção ambiental (WALSH et al., 2013; MELO et al., 2021).

Diferentes estratégias de remediação para contaminação com DNAN foram relatadas na literatura, como por exemplo, processo combinado de redução de ferro e oxidação fenton como pré-tratamento (SHEN et al., 2013); adsorção com carvão ativado (BODDU et al., 2009); hidrólise alcalina (SVIATENKO et al., 2014); fotólise (HALASZ, HAWARI e PERREAULT, 2018); fotocatalise (WANG et al., 2021); redução por minerais (KHATIWADA et al., 2018); e biotransformação (OLIVARES et al., 2017; MELO et al., 2021; MENEZES et al., 2021).

Compostos aromáticos com grupos nitro são persistentes à biodegradação por bactérias aeróbias, mas são facilmente reduzidos por consórcios anaeróbios a amins aromáticas (FIELD et al., 1995). A redução do grupo nitro do DNAN na posição orto gera o composto 2-metóxi-5-nitroanilina (MENA). Já a redução do grupo nitro na posição para gera o 4-metóxi-3-nitroanilina (iMENA). O 2,4-diaminoanisol (DAAN) é formado quando ambos os grupos nitro do DNAN são reduzidos a grupos amino (LIANG et al., 2013; MENEZES et al., 2021). A Figura 3 apresenta as fórmulas estruturais destes compostos.

Figura 3 – Fórmulas estruturais do DNAN e seus produtos MENA, iMENA e DAAN



DNAN - 2,4-dinitroanisol; MENA - 2-metóxi-5-nitroanilina; iMENA - 4-metóxi-3-nitroanilina; DAAN - 2,4-diaminoanisol

Fonte: Hawari et al. (2015).

A Tabela 3 apresenta as características físico-químicas do DNAN, MENA, iMENA e DAAN.

Tabela 3 – Características físico-químicas do DNAN, MENA, iMENA e DAAN

Nome da substância	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	Nº - CAS	pKa
DNAN	C ₇ H ₆ N ₂ O ₅	198,13	119-27-7	-
MENA	C ₇ H ₈ N ₂ O ₃	168,15	99-59-2	2,55
Imena	C ₇ H ₈ N ₂ O ₃	168,15	577-72-0	3,50
DAAN	C ₇ H ₁₀ N ₂ O	138,17	615-05-4	5,19

DNAN - 2,4-dinitroanisol; MENA - 2-metóxi-5-nitroanilina; iMENA - 4-metóxi-3-nitroanilina; DAAN - 2,4-diaminoanisol, CAS - *Chemical Abstracts Service*.

Fonte: A autora (2024).

2.2.1 Métodos de identificação e quantificação de DNAN e seus compostos de degradação

O método padrão atual para análise de explosivos propulsores é o método 8330B da EPA, que trata de alguns explosivos, como por exemplo, 2,4,6-Trinitrotolueno (2,4,6-TNT), Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), nitroglicerina (NG), mas não menciona o DNAN e seus compostos de degradação em matrizes ambientais (EPA, 2006).

Na falta de métodos estabelecidos para determinações destes compostos, laboratórios de pesquisa costumam: usar os métodos desenvolvidos para compostos de outras munições, mais antigas, podendo levar a imprecisões para certos *IMCs* e seus produtos de degradação (FELT et al., 2016); ou usar métodos originalmente desenvolvidos para materiais puros individuais, sem métricas de desempenho comprovadas em matrizes complexas, como matrizes ambientais (CROUCH et al., 2020). A Tabela 4 apresenta trabalhos encontrados na literatura em que foram determinados DNAN e seus compostos de degradação.

Tabela 4 – Métodos de quantificação de DNAN, MENA, iMENA e DAAN relatados na literatura

Composto	Matriz	Método de quantificação	Referência
DNAN	Superfície de carvão ativado	CLAE – UV	BODDU et al., 2009
DNAN e MENA	Água de lagos	CLAE – DAD	CHOW et al., 2009
DNAN, NG, HMX, RDX, TNT, ADNT e PETN	Água de rio e sedimento	LC-MS-MS	MU et al., 2012
DNAN, MENA e DAAN	Solo e lodo	UHPLC-DAD	OLIVARES et al., 2016
DNAN, MENA e DAAN	Águas superficiais	CLAE-DAD	WANG et al., 2021
DNAN, MENA e DAAN	Solo	CLAE	HAWARI et al., 2015

DNAN - 2,4-dinitroanisol; MENA - 2-metóxi-5-nitroanilina; iMENA - 4-metóxi-3-nitroanilina; DAAN - 2,4-diaminoanisol; NG – nitroguanidina; HMX – octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina; RDX - 1,3,5-trinitroper-hidro-1,3,5-triazina; TNT – 2,4,6-trinitrotolueno; ADNT – 2-amino-4,6-dinitrotolueno; PETN – pentaeritritol tetranitrato.

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ultravioleta-visível; CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas; LC-MS-MS – *Liquid chromatography – tandem mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem). UHPLC-DAD – *Ultra high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de ultra alta eficiência) com detector de arranjo de diodos.

Fonte: A autora (2024).

Pesquisas têm sido desenvolvidas na área de tecnologia ambiental, buscando o entendimento e aperfeiçoamento de técnicas de remediação de ambientes contaminados. Por essa razão, são necessários métodos analíticos confiáveis para identificar e quantificar estes contaminantes e seus produtos de biodegradação.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Dentre as técnicas de análise, a cromatografia é bastante utilizada devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de uma mistura que se distribuem em duas fases imiscíveis: fase estacionária e fase móvel. A separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária (CIOLA, 1998; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente ou mistura de solventes. É uma técnica antiga, mas foi a partir dos anos 70 do século XX que teve um avanço considerável, quando se tornou possível recheiar colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução. Além disso, só a partir dessa época foram adquiridos equipamentos que funcionavam nas altas pressões necessárias para obter satisfatória velocidade de eluição, como na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida pela sigla HPLC (do inglês: *high performance liquid chromatography*) (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

Na cromatografia líquida por fase reserva (FR), a fase móvel é constituída por solventes mais polares, como água, metanol e acetonitrila, e as fases estacionárias empregadas constituem-se de uma camada orgânica menos polar ligada quimicamente, imobilizada ou sorvida a um suporte cromatográfico, que forma superfícies porosas e hidrofóbicas. O suporte mais empregado é a sílica (SiO_2) quimicamente modificada, C18, por esta apresentar um padrão de partículas porosas esféricas com precisão e coerência na distribuição de tamanho e poros (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Os detectores usados em cromatografia têm a função de converter o sinal químico ou físico que seja mensurável para ser registrado, e geralmente esse sinal corresponde à concentração ou identificação do componente (CIOLA, 1998). Os detectores por absorvância

na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS) são amplamente utilizados devido ao fato de que muitos compostos possuem grupos cromóforos. O seu funcionamento é baseado na absorção de luz pela amostra, ao passar por uma radiação eletromagnética (CASS e DEGANI, 2010). O detector de arranjo de diodos, conhecido como DAD (do inglês: *diode array detector*) é uma das configurações dos detectores de UV-visível. O DAD permite determinar os espectros dos componentes da amostra em diferentes comprimentos de onda durante a análise cromatográfica.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE

As técnicas cromatográficas são de grande importância nas diferentes áreas acadêmicas e industriais. Dentre os tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência se destaca como uma das técnicas mais versáteis e de maior aplicação. No entanto, para se obter boas condições de identificação e determinação dos compostos pretendidos, os métodos de CLAE necessitam de prévio estudo e desenvolvimento (Figura 4). Para permitir a separação eficiente e quantificação exata e precisa, parâmetros como tipo de fase estacionária, fase móvel, volume de injeção, tipo de detector, entre outros, precisam ser bem definidos (PINTO, 2021).

Figura 4 – Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico por CLAE



Fonte: Adaptado de Cass e Degani (2010).

Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico como, número de pratos (N), resolução (R_s) e fator de assimetria de picos (A_s), fornecem resultados que permitem ajustar as condições cromatográficas a fim de gerar um método otimizado e adequado à finalidade proposta (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

O número de pratos é normalmente utilizado para avaliar a performance da coluna, admitindo-se uma escolha adequada das condições (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). Quanto maior o valor de N, maior o número de estágios de equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária, promovendo assim uma separação mais eficiente. Esse valor é influenciado pelo tipo de amostra, composição das fases, temperatura, partículas constituintes da coluna e comprimento da coluna cromatográfica (CIOLA, 1998).

O número de pratos teóricos, pode ser calculado pela Equação 1.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad \text{Equação 1}$$

Onde t_R é o tempo de retenção do analito e $w_{h/2}$ é a largura do pico à metade da altura do pico cromatográfico.

A resolução entre picos adjacentes, R_s , mede a qualidade da separação. Consiste na razão entre a distância entre os dois picos e a largura média desses picos (medido na linha de base) (CIOLA, 1998). A resolução cromatográfica pode ser calculada como mostrado na Equação 2.

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde t_R é o tempo de retenção do composto e W a largura do pico na base, ambos em minutos. R_s é amplamente utilizado como critério de adequação do sistema na análise cromatográfica. Maiores valores de resolução indicam melhor separação (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006):

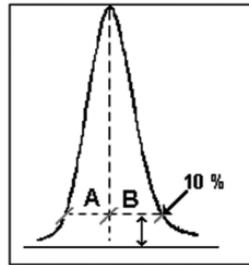
- $R_s = 1$, os dois picos são razoavelmente separados;
- $R_s = 1,25$, é suficiente para fins quantitativos;
- $R_s > 1,5$, indica separação completa.

O fator de assimetria (A_s) também é um parâmetro importante para avaliar a adequabilidade do sistema cromatográfico. As caudas representam baixo desempenho, mostrando um desvio do comportamento gaussiano. Podem ser ocasionadas por: mistura dos mecanismos de retenção, incompatibilidade da amostra com a fase móvel e/ou estacionária,

entre outras causas. Valores de $A_s = 1$, equivalem a picos perfeitamente simétricos, o que na prática é muito difícil de ser observado (CIOLA, 1998).

Esse fator pode ser calculado utilizando-se a razão entre as larguras B e A a 10% da altura do pico, conforme Figura 5.

Figura 5 – Representação de um pico cromatográfico genérico, ilustrando os parâmetros para cálculo do fator de assimetria



Fonte: Jönsson (2002).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um procedimento analítico é o processo de definir os requisitos analíticos e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação exige (EURACHEM, 2014).

Os parâmetros de desempenho são indicadores quantitativos do bom desempenho dos métodos. São eles: seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. A robustez é um procedimento opcional, normalmente realizado previamente à validação do método, na etapa de otimização (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002; RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

2.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse mesmo que estejam na presença de componentes que possam interferir na sua determinação, em uma amostra complexa. Um método seletivo é capaz de gerar respostas para diversos analitos, mas consegue distinguir a resposta de um analito das respostas dos demais. (RIBANI et al. 2004; INMETRO, 2020).

Uma maneira de avaliar a seletividade do método analítico é por meio da comparação da matriz sem o analito e a matriz adicionada com a substância (padrão). Outra forma é por meio da avaliação com detectores modernos, como arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza isto como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN et al., 2001).

A matriz da amostra pode conter compostos que interferem na medição. Os compostos indesejados podem competir pelos sítios ativos na coluna cromatográfica, reduzindo a interação entre os sítios ativos e os analitos, causando supressão ou aumento da resposta cromatográfica. Assim, no estudo da seletividade é necessário também avaliar a existência do efeito matriz na faixa de trabalho (INMETRO, 2020).

2.5.2 Linearidade e faixa de trabalho

Linearidade do procedimento analítico é a sua capacidade em fornecer resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa. A faixa de trabalho do procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002; RIBEIRO et al. 2008; INMETRO, 2020).

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico (variável dependente y_i), é linearmente proporcional à sua concentração (variável independente x_i), e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica (DRAPER e SMITH, 1981).

O ajuste de uma equação matemática normalmente é feito pelo método dos mínimos quadrados. Este fornecerá os coeficientes de regressão, que para um ajuste linear (Equação 3) são os coeficientes linear a_0 e angular a_1 (RIBEIRO et al., 2008).

$$y_i = a_0 + a_1x_i \quad \text{Equação 3}$$

Uma vez conhecidos, estes coeficientes poderão ser utilizados para predizer a concentração da espécie de interesse em amostras desconhecidas a partir do seu sinal analítico.

A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação, r , que é a razão da covariância entre a concentração, x , e o sinal analítico, y , com o produto dos desvios padrões de x e y , conforme descrito na Equação 4.

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2)}} \quad \text{Equação 4}$$

O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre $-1 \leq r \leq 1$. Quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva analítica (DRAPER e SMITH, 1981; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). Um coeficiente de correlação de 0,999 é geralmente considerado como evidência de um ajuste aceitável dos dados à linha de regressão (GREEN, 1996).

O coeficiente de correlação é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo (INMETRO, 2020). Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente (PIMENTEL e BARROS NETO, 1996; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002; INMETRO 2020).

Portanto, para evitar problemas de falta de ajuste, é necessária a análise do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes como, por exemplo, a análise de variância (ANOVA), para determinar a faixa na qual a curva analítica apresenta um comportamento linear. O gráfico dos resíduos pode mostrar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heteroscedasticidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada deve apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante (homoscedasticidade) e ausência de amostras atípicas (PIMENTEL e BARROS NETO, 1996).

A melhor curva analítica será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais (Equação 5) (DRAPER e SMITH, 1981).

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Equação 5}$$

2.5.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas pelo método utilizado ou proposto (EURACHEM, 2014). Este limite pode ser calculado de três formas diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, o LD pode ser expresso como a Equação 6.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 6}$$

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 ou coeficiente angular da curva analítica. Para obter esses parâmetros, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

2.5.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas pelo método utilizado ou proposto (EURACHEM, 2014). Da mesma forma que o LD, o LQ pode ser calculado de três maneiras distintas: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al. 2004).

Pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, o LQ pode ser obtido da mesma forma que o LD, diferenciando apenas a equação utilizada (Equação 7).

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 7}$$

2.5.5 Precisão

A precisão representa a variação de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrão, sob condições definidas. A precisão é estimada pelo valor

do desvio padrão relativo (DPR), conhecido também como coeficiente de variação (CV) e é calculado como descrito na Equação 8 (INMETRO, 2020).

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Em que \bar{x} é a média aritmética das medições e s o desvio padrão absoluto, calculado conforme a Equação 9.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermediária; e reprodutibilidade.

2.5.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade é a precisão intra-corridas. Ela define a concordância entre os resultados obtidos em um mesmo dia, num curto intervalo de tempo, por um mesmo analista e no mesmo equipamento. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições varia de acordo com diferentes guias de validação, mas tipicamente são entre 6 e 15, para os níveis baixos, médios e altos de calibração (INMETRO, 2020).

2.5.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária, ou precisão inter-corridas, define a precisão dentro de um mesmo laboratório para medidas obtidas por diferentes analistas, ou em diferentes dias, ou por equipamentos distintos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda o mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2017).

2.5.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade corresponde à concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, seguindo a mesma metodologia. Embora a reprodutibilidade não seja

um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2020).

2.5.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor aceito como verdadeiro (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência, comparações de métodos, adição padrão e a realização de ensaios de recuperação (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

Para avaliação da exatidão pelo método da recuperação, amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) e então analisadas pelo método proposto. A recuperação é calculada de acordo com a Equação 10.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada; C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

O número de ensaios varia de acordo com a legislação ou diretriz adotada e com as características da pesquisa. A ANVISA recomenda que a exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível de concentração (ANVISA, 2017).

2.5.7 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que tem por objetivo determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado, numa dada matriz, sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (ANVISA, 2017).

Normalmente, rotinas de laboratórios envolvem a análise de muitas amostras, que são muitas vezes realizadas durante a noite com amostradores automáticos. Em certos tipos de amostras, como por exemplo as biológicas, tempos longos de estocagem aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse. Por essa razão, para que sejam gerados resultados confiáveis e reprodutíveis, é necessário o conhecimento da estabilidade dos padrões, amostras e reagentes usados (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

Entretanto, embora seja um parâmetro importante na validação de métodos, não são todos os guias de validação que dão a devida importância para a estabilidade.

De acordo com a ANVISA (2017), as condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Esta resolução estabelece que a estabilidade do analito deve ser avaliada durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas.

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do limite inferior de quantificação, para o qual se aceita desvio de até 20% (ANVISA, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi dividido em três etapas. Na primeira etapa foram desenvolvidos e otimizados os métodos cromatográficos para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico e outro método para os compostos DNAN, MENA, iMENA e DAAN. A segunda etapa consistiu em validar os métodos desenvolvidos, e na terceira etapa os métodos foram aplicados a amostras oriundas de estudos de biorremediação realizados no Laboratório de Saneamento Ambiental.

Todas essas etapas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA), do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), localizado no Instituto de Pesquisa em Petróleo e Energia (iLITPEG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.1 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.1 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Shimadzu, modelo LC20A Prominence, configurado com sistema de bombas quaternárias, modelo LC-20AT, sistema de injeção de amostras automático, com suporte para 101 amostras, modelo SIL-20A HT, compartimento termostaticado para a coluna analítica, CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A.

3.1.2 Reagentes

Os padrões analíticos de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), todos com 99% de pureza. O padrão analítico do DNAN foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Tóquio, Japão), com 98% de pureza, MENA e iMENA foram da Sigma Aldrich, com 98% de pureza e DAAN, na forma de dihidrocloreto de 2,4-diaminoanisol, da TCI Chemicals (Dallas, TX, EUA), com 99% de pureza. Os solventes acetonitrila e metanol, empregados como fase móvel, foram da marca Merck (Darmstadt, Alemanha) e de grau HPLC. O ácido fosfórico, fosfato de sódio monobásico e bibásico e ácido acético, empregados na composição de fase móvel, foram da Sigma Aldrich, com pureza de 99%. A trietilamina foi da marca Neon, com pureza de 99%. O detergente usado

para lavagem das vidrarias foi o detertec faixa neutra, da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Água com resistividade específica de 18,2 MΩ.cm (água ultrapura), por purificação em sistema Merck Millipore, foi utilizada nas preparações das soluções e limpeza das vidrarias.

3.1.3 Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com o detergente de faixa neutra a 20% e enxaguadas exaustivamente com água corrente. Após esta etapa, as vidrarias foram deixadas submersas, por 24 h, em solução de ácido nítrico 10% e, em seguida, enxaguadas exaustivamente com água corrente e, por último, com água ultrapura.

As vidrarias não volumétricas foram levadas à estufa para secagem, e as vidrarias volumétricas secaram à temperatura ambiente.

3.1.4 Descrição das matrizes

A matriz utilizada para validação dos métodos de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico foi proveniente da pesquisa de Lima (2023), na qual foram utilizados reatores biológicos operados em microcosmos para estudar a degradação da anilina. O microcosmo consistiu de um meio mineral contendo os sais descritos na Tabela 5 e inóculo de três culturas microbianas anaeróbias: (i) biomassa proveniente de um sistema de tratamento de efluente têxtil, (ii) biomassa proveniente do efluente petroquímico e (iii) biomassa proveniente do sedimento de um trecho poluído do Rio Capibaribe (Recife - PE, Brasil).

Para a validação do método dos *IMCs*, a matriz utilizada foi proveniente da pesquisa de Souza (2021), na qual foram utilizados reatores biológicos operados em microcosmos para o estudo da combinação de processos microbiológicos redutivos e oxidativos para degradação do DNAN. Souza (2021) utilizou como inóculo a mistura na proporção de 2/1 do lodo anaeróbio granular de um reator UASB de escala real para o tratamento de efluente petroquímico (Porto de Suape, Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho, PE, Brasil) e lodo do reator anaeróbio microaerofílico de batelada sequencial de escala de bancada que tratou efluente têxtil (MENEZES et al., 2019). O meio basal utilizado está descrito na Tabela 6.

Tabela 5 – Composição do meio mineral na matriz utilizada na validação dos métodos de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico

Compostos	Concentração (mg/L)
KH ₂ PO ₄	140
K ₂ HPO ₄	286
NH ₄ Cl	357
CaCl ₂ .6H ₂ O	32
FeCl ₃ .6H ₂ O	16
H ₃ BO ₃	0,4
ZnCl	0,13
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,13
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,99
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,33
CuCl ₂ .4H ₂ O	0,13
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,99
Na ₂ SeO ₃	0,03
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	0,13
MgSO ₄ .7H ₂ O	8,3
Resazurina	0,66
NaHCO ₃	1333,25

Fonte: Lima (2023).

Tabela 6 – Composição do meio basal na matriz utilizada na validação do método dos *IMCs*

Compostos	Concentração (mg/L)
K ₂ HPO ₄	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	100
MgCl ₂ .6H ₂ O	100
NH ₄ Cl	280
NaHCO ₃	160
H ₃ BO ₃	50
FeCl ₂ .4H ₂ O	2000
ZnCl ₂	50
MnCl ₂ .4H ₂ O	2000
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	50
AlCl ₃ .6H ₂ O	90
CoCl ₂ .6H ₂ O	2000
NiCl ₂ .6H ₂ O	50
CuCl ₂ .2H ₂ O	100
EDTA	1000
Resazurina	2000
HCl	HCl 36% (1 mL/L)

Fonte: Souza (2021).

Alíquotas da fração líquida dos reatores foram amostradas e filtradas em microfiltros de celulose regenerada de 0,22 µm da Analítica[®] antes de serem injetadas no CLAE.

3.1.5 Preparação das soluções padrão

3.1.5.1 Soluções estoque

Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas estoque individuais de cada analito. A concentração das soluções estoque individuais de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico foi de 1000 mg/L. Para os compostos DNAN, MENA, iMENA e DAAN a concentração foi de 100 mg/L. Para a completa dissolução do DNAN e seus intermediários de biodegradação foi necessário deixar as soluções em agitação por 24 h. As soluções estoques foram transferidas, individualmente, para frascos âmbar e armazenadas à 4 °C.

3.1.6 Condições cromatográficas dos métodos analíticos

Nesta etapa foram estudadas as melhores condições de análise cromatográfica para os métodos propostos. As condições cromatográficas, tais como comprimentos de onda na detecção (λ), composição da fase móvel, temperatura do forno, fluxo da fase móvel e volume de injeção foram avaliadas visando à melhor resolução dos picos dos analitos no menor tempo de corrida, sem interferências de outros compostos presentes na matriz avaliada.

3.1.6.1 Detector

O detector utilizado nos métodos propostos foi o de arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A. Os comprimentos de onda utilizados para cada um dos compostos, em cada método, foram estabelecidos por meio de varredura espectral na faixa de 190 a 800 nm a fim de obter a máxima absorção. Todos os compostos estudados possuem grupos cromóforos, portanto absorvem em comprimentos de onda de luz UV-Visível.

3.1.6.2 Fase móvel e modo de eluição

Foram realizados vários testes para encontrar a fase móvel mais adequada para separação dos compostos estudados, levando em consideração picos bem resolvidos, com simetria aceitável e menor tempo de análise possível.

Para o método da anilina, catecol e os ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, foram testados os solventes ou combinação de solventes e modos de eluição descritos na Tabela 7.

Esses testes foram realizados com uma solução mista de anilina, catecol, ácido benzoico e 4-aminobenzoico na concentração de 25 mg/L. Os compostos também foram injetados individualmente a fim de obter os tempos de retenção de cada um deles.

Tabela 7 – Programas de eluição testados para o método da anilina e seus derivados

Fase móvel	Tipo de eluição	Programa de eluição
ACN/H ₂ O	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de ACN em 45 min
MeOH/H ₂ O	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de MeOH em 45 min
ACN/H ₂ O acidificada com H ₃ PO ₄ (pH 3,5)	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de ACN em 45 min
ACN/H ₂ O acidificada com H ₃ PO ₄ (pH 3,5)	Isocrático	30% ACN e 70% H ₂ O acidificada em 9 min
ACN/H ₂ O com ácido acético e triethylamina*	Isocrático	40% ACN e 60% de H ₂ O com ácido acético e triethylamina 5,5 min

ACN – Acetonitrila; MeOH – Metanol; H₃PO₄ – Ácido Fosfórico.

* Adaptado de Santos-Neto, 2010.

Fonte: A autora (2024).

Para o método do DNAN, MENA, iMENA e DAAN, foram testados os solventes ou combinação de solventes descritos na Tabela 8. Esses testes foram realizados com uma solução mista de DNAN, MENA, iMENA e DAAN na concentração de 25 mg/L. Os compostos também foram injetados individualmente a fim de obter os tempos de retenção de cada um deles.

3.1.6.3 Fluxo da fase móvel, temperatura do forno e volume de injeção

As condições experimentais de fluxo da fase móvel e volume de injeção, escolhidas para compor os procedimentos analíticos de ambos os métodos, foram estabelecidas em função do tempo de retenção, intensidade, resolução, área e largura dos picos cromatográficos. Foram testados os fluxos de 0,8 mL/min e 1,0 mL/min e volumes de injeções de 10 µL, 20 µL e 50 µL. A temperatura do forno foi fixada em 40 °C.

Tabela 8 – Programas de eluição testados para o método do DNAN e seus derivados

Fase móvel	Tipo de eluição	Programa de Eluição
ACN/H ₂ O	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de ACN em 45 min
MeOH/H ₂ O	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de MeOH em 45 min
ACN/tampão fosfato 5 mM	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de ACN em 45 min
ACN/tampão fosfato 0,05 mM	Gradiente (exploratório)	5 a 95% de ACN em 45 min
ACN/tampão fosfato 0,05 mM	Isocrático	60% ACN e 40% tampão fosfato em 20 min

ACN – Acetonitrila; MeOH – Metanol; H₃PO₄ – Ácido Fosfórico.

Fonte: A autora (2024).

3.1.6.4 Fase estacionária

Foi empregada a coluna analítica em fase reserva Lichrospher[®] RPC18 de 250 mm x 4,6 mm (diâmetro interno) x 5 µm, da Merck, para ambos os métodos. A pré-coluna Lichrospher[®] 100 RPC18 de 5 µm da Merck também foi utilizada.

3.2 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação dos métodos analíticos do presente estudo foi realizada seguindo os critérios e recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020), Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2017), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002) e literatura científica (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008; RAPOSO e IBELLI-BIANCO, 2020). Os parâmetros de desempenho analíticos avaliados foram: seletividade, linearidade e faixa de concentração, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e estabilidade.

3.2.1 Seletividade

A seletividade de cada um dos métodos foi avaliada pela comparação dos cromatogramas e dos espectros de absorção UV-Visível obtidos a partir da injeção de:

- a) Amostra sem adição de padrão (testemunha);
- b) Amostra fortificada com os compostos na concentração de 10 mg/L;
- c) Mistura padrão dos compostos na concentração de 10 mg/L em água ultrapura.

Para garantir a seletividade dos métodos, o efeito matriz também foi avaliado. Para este estudo, foram preparadas duas curvas analíticas em triplicata, uma em matriz e outra em solução aquosa. As curvas foram feitas em 7 níveis de concentração, igualmente espaçadas, na faixa de trabalho desejada para cada método. A avaliação do efeito matriz foi realizada por meio da comparação das inclinações das retas (coeficientes angulares) das curvas analíticas, empregando o teste t (Student).

3.2.2 Linearidade e faixa de concentração

A linearidade dos métodos foi avaliada por meio do método de padronização externa. Para os compostos anilina, catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico, as curvas analíticas foram construídas em sete níveis, em triplicata, uniformemente espaçados na faixa de concentração. Para os compostos DNAN, MENA, iMENA e DAAN, as curvas analíticas foram construídas em nove níveis, em triplicata, também uniformemente espaçados na faixa de concentração. As concentrações das soluções de trabalho são apresentadas na Tabela 9.

Os ajustes das curvas/linearidade para os dois métodos foram avaliados com base nas curvas analíticas e os seus respectivos coeficientes de correlação linear (r). A adequação do modelo matemático (linear) aos dados experimentais foi verificada pela análise da variância (ANOVA) (PIMENTEL e BARROS-NETO, 1996).

3.2.3 Limites de detecção e quantificação

Os Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) dos métodos descritos neste estudo foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, conforme as Equações 6 e 7, descritas na Seção 2.5, utilizando o desvio padrão do menor ponto da curva analítica.

Tabela 9 – Concentrações das soluções de trabalho da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN

Compostos	Concentrações das soluções de trabalho (mg/L)
Anilina	0,05; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 e 12
Catecol	0,5; 2,5; 4,5; 6,5; 8,5; 10,5 e 12,5
Ácido benzoico	0,5; 2,5; 4,5; 6,5; 8,5; 10,5 e 12,5
Ácido 4-aminobenzoico	0,1; 1,7; 3,4; 5,0; 6,7; 8,4 e 10
DNAN	0,5; 7,0; 14; 20; 27; 33; 40; 46 e 53
MENA	0,5; 7,0; 14; 20; 27; 33; 40; 46 e 53
iMENA	0,5; 7,0; 14; 20; 27; 33; 40; 46 e 53
DAAN	0,5; 7,0; 14; 20; 27; 33; 40; 46 e 53

DNAN - 2,4-dinitroanisol; MENA - 2-metóxi-5-nitroanilina; iMENA - 4-metóxi-3-nitroanilina; DAAN - 2,4-diaminoanisol.

Fonte: A autora (2024).

3.2.4 Precisão

A precisão foi verificada por meio da repetibilidade e a precisão intermediária e foi avaliada através do coeficiente de variação. A repetibilidade foi realizada por meio da análise de quinze medições de soluções padrão na presença da matriz em três níveis de concentração da curva analítica, cinco repetições de cada um, conforme descrito a seguir.

Para o método da anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico:

- Cinco repetições no nível mais baixo de concentração de cada um dos compostos (0,05 mg/L para a anilina; 0,1 mg/L para o ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mg/L para o catecol e ácido benzoico);
- Cinco repetições no nível médio de concentração de cada um dos compostos (6,0 mg/L para a anilina; 5,0 mg/L para o ácido 4-aminobenzoico e 6,5 mg/L para o catecol e ácido benzoico);
- Cinco repetições no nível mais alto de concentração de cada um dos compostos (12 mg/L para a anilina; 10 mg/L para o ácido 4-aminobenzoico e 12,5 mg/L para o catecol e ácido benzoico);

Para o método do DNAN, MENA, iMENA e DAAN:

- Cinco repetições no nível mais baixo de concentração (0,5 mg/L);
- Cinco repetições no nível médio de concentração (27 mg/L);
- Cinco repetições no nível mais alto de concentração (53 mg/L).

A precisão intermediária foi avaliada da mesma maneira que a repetibilidade, sob as mesmas condições, no mesmo instrumento, entretanto por três analistas diferentes em dias distintos.

3.2.5 Exatidão

A exatidão dos métodos foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, como descrito na Seção 2.5.6. As amostras foram fortificadas com soluções de trabalho em três níveis de concentração de cada um dos compostos, como na precisão. As amostras foram preparadas conforme descrito na seção 3.1.4 e injetadas no CLAE. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.2.6 Estabilidade

A estabilidade de curta e longa duração para a anilina, catecol, ácidos benzoico e 4-aminobenzoico e *IMCs* foi avaliada na matriz e em solução aquosa. A estabilidade de curta duração foi avaliada após 24 h de congelamento das amostras com três níveis de concentração (baixo, médio e alto) das curvas analíticas de cada um dos compostos, como na precisão. A estabilidade de longa duração foi avaliada após cinco dias de congelamento. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos das análises das soluções recém-preparadas.

3.3 SOFTWARES UTILIZADOS

Para a análise dos dados e a elaboração dos gráficos apresentados nesta tese, foram utilizados os seguintes softwares:

3.3.1 Microsoft Excel (versão 365)

Além de ser utilizado para a organização e análise preliminar de todos os dados, o Excel foi empregado nos cálculos de precisão, exatidão, estabilidade, teste t, limites de detecção e de quantificação, adequação dos modelos e significância estatística da equação de regressão.

3.3.2 LabSolution CS

Neste software foram obtidos os tempos de retenção dos compostos, valores de resolução e fatores de assimetria, espectros de absorção UV-visível e cromatogramas em três dimensões.

3.3.3 OriginLab 2024

Utilizado para os cálculos de ANOVA, obtenção das equações das retas, cromatogramas, gráficos de resíduos e curvas analíticas.

3.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS

Adaptações dos métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras oriundas de reatores biológicos nos estudos de biorremediação realizados no LSA/UFPE, conforme relacionado na Tabela 10.

Tabela 10 – Aplicação com adaptações dos métodos para a determinação de anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em amostras ambientais

Métodos	Tipo de trabalho	Título	Autor
Anilina, catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico	Tese	Degradação anaeróbia de anilina utilizando diferentes culturas microbianas	CARVALHO, 2020
	Dissertação	Influência da microaeração intermitente na degradação anaeróbia da anilina	CÂMARA, 2021
	Dissertação	Avaliação taxonômica de diferentes culturas microbianas, adaptadas à degradação anaeróbia da anilina	LIMA, 2023
DNAN, MENA, iMENA, DAAN	Tese	Biotic and abiotic strategies for insensitive munitions compounds remediation	MENEZES, 2020
	Dissertação	Combinação de processos microbiológicos redutivos e oxidativos para degradação do composto insensível de munição 2,4-dinitroanisol (DNAN)	SOUZA, 2021
	Artigo	The key role of oxygen in the bioremoval of 2,4-diaminoanisole (DAAN), the biotransformation product of the insensitive munitions compound 2,4-dinitroanisole (DNAN), over other electron acceptors	MENEZES et al., 2021
	Artigo	Selecting the best electron donor and operational temperature for the rapid biotransformation of the insensitive munitions compound 2,4-dinitroanisole (DNAN) by anaerobic sludge	MELO et al., 2021

DNAN - 2,4-dinitroanisol; MENA - 2-metóxi-5-nitroanilina; iMENA - 4-metóxi-3-nitroanilina; DAAN - 2,4-diaminoanisol.

Fonte: A autora (2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

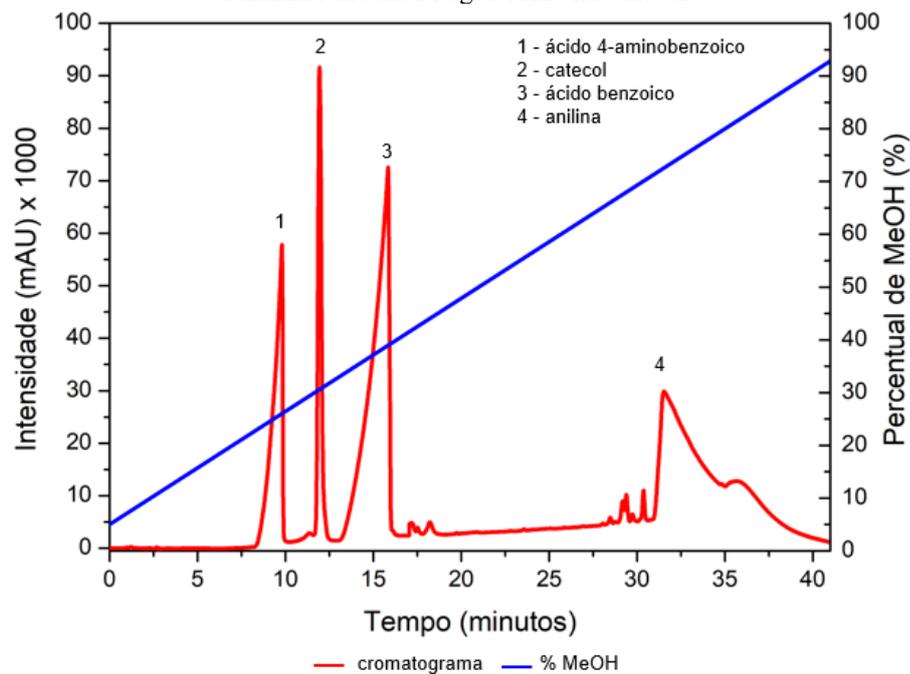
4.1 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.1 Escolha da fase móvel

4.1.1.1 Anilina e seus derivados

A Figura 6 apresenta o cromatograma da solução mista contendo padrões de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico na concentração de 25 mg/L em gradiente exploratório, utilizando metanol e água como fase móvel. O percentual de metanol na fase móvel variou de 5% a 95% em 45 min. O cromatograma mostra os picos do ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico e anilina bastante assimétricos.

Figura 6 – Cromatograma de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, utilizando metanol e água como fase móvel

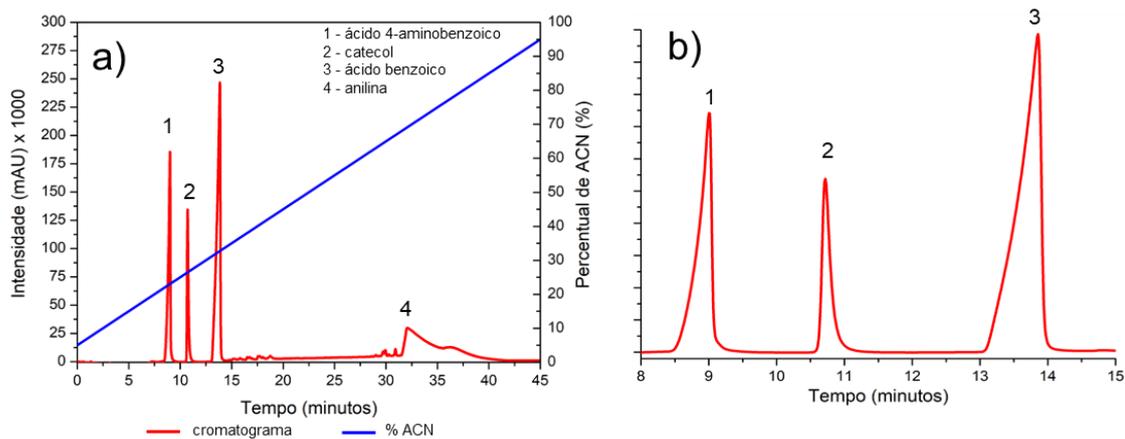


Fonte: A autora (2024).

Como os picos dos ácidos 4-aminobenzoico e benzoico e anilina apresentaram caldas bastante pronunciadas, optou-se por substituir o metanol por acetonitrila, pois o metanol tem maior viscosidade e pode reduzir a eficiência da separação, resultando em picos mais largos e assimétricos.

A Figura 7 apresenta o cromatograma da solução mista contendo padrões de anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico na concentração de 25 mg/L em gradiente exploratório, utilizando acetonitrila e água como fase móvel. O percentual de acetonitrila na fase móvel variou de 5% a 95% em 45 min. A Tabela 11 apresenta os valores de resolução e fator e assimetria para os quatro compostos estudados.

Figura 7 – Cromatogramas de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 8 e 15 min (b)



Fonte: A autora (2024).

Tabela 11 – Valores de resolução e fator de assimetria para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico utilizando acetonitrila e água como fase móvel

Composto	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria
Ácido 4-aminobenzoico	8,8	-	0,62
Catecol	10,8	5,82	1,73
Ácido benzoico	13,7	7,55	0,58
Anilina	33	9,58	3,52

Fonte: A autora (2022).

Observa-se na Figura 7a que o ácido 4-aminobenzoico (pico 1), o catecol (pico 2) e o ácido benzoico (pico 3) eluíram entre 8 e 15 min, com percentual de acetonitrila de 20% a 40%, aproximadamente, e a anilina (pico 4) eluiu em 33 min, com percentual de acetonitrila de 70%.

Os quatro picos apresentaram valores satisfatórios de resolução (5,82, 7,55 e 9,58 para catecol, ácido benzoico e anilina, respectivamente) como demonstrado na Tabela 11, mas os ácidos 4-aminobenzoico e benzoico exibiram assimetria frontal (Figura 7b) e a anilina apresentou calda bem pronunciada. Os fatores de assimetria para o ácido 4-aminobenzoico, ácido benzoico e anilina foram 0,62; 0,58 e 3,52, respectivamente. Estes valores são considerados inaceitáveis de acordo com a literatura (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997; CIOLA, 1998; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SANTOS-NETO, 2010). Valores

de fator de assimetria considerados satisfatórios são aqueles próximos à unidade. A assimetria dos picos do ácido 4-aminobenzoico, ácido benzoico e anilina pode estar relacionada ao pH inadequado da fase móvel para estes compostos.

Como o pH da fase móvel (neutro) está acima do pKa dos analitos ácido benzoico (pKa = 4,21) e ácido 4-aminobenzoico (pKa = 4,98), essas espécies encontram-se dissociadas. Na prática, as formas molecular e iônica coexistem em equilíbrio químico, fazendo com que apareçam picos alargados e assimétricos, que levam a baixa reprodutibilidade nos tempos de retenção e nas áreas dos picos, inviabilizando a quantificação dos compostos (BORGES, GORAIEB e COLLINS, 2012).

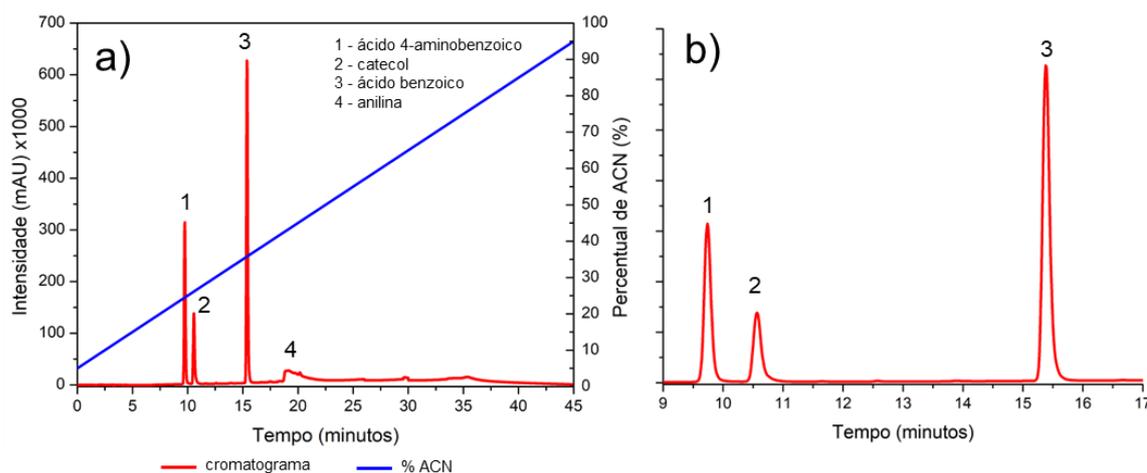
Vale ressaltar que o ácido 4-aminobenzoico possui em sua estrutura um grupo com caráter ácido (COOH) com valor de pKa = 4,98 e um grupo com caráter básico (NH₂) com pKa = 2,35 (ANNUR et al., 2017). Com o pH da fase móvel maior que ambos os pKa, o grupamento COOH encontra-se ionizado e o NH₂ não ionizado, tendo em vista que grupos com caráter ácido perdem um próton e se ionizam com o aumento do pH da fase móvel e grupos com caráter básico ganham um próton e se ionizam com a diminuição do pH da fase móvel (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

O catecol apresentou um pico bem definido, sem problemas de assimetria, provavelmente devido ao seu alto valor de pKa (9,5). Em meio com pH neutro o catecol encontra-se na sua forma molecular, consequentemente apresentando boa retenção em cromatografia por fase reversa (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

O alto tempo de retenção e a calda bastante acentuada da anilina evidenciam que este composto ficou muito retido na coluna analítica. A alta retenção pode ser explicada por interações da anilina com silanóis residuais presentes na superfície da sílica. Solutos podem ser retidos por interações puramente iônicas com os silanóis residuais ionizados, por interações puramente hidrofóbicas com as cadeias hidrofóbicas covalentemente ligadas à sílica ou por interações em sítios que combinam interações hidrofóbicas e iônicas de maneira sinérgica, formando sítios altamente retentivos (BORGES, GORAIEB e COLLINS, 2012). Os compostos que apresentam maior afinidade pela coluna são os mais afetados, ou seja, aqueles mais retidos geralmente apresentam caudas mais acentuadas (SANTOS-NETO, 2010).

Ao utilizar uma fase móvel acidificada com ácido fosfórico pH 3,5, observou-se melhora significativa na simetria dos picos dos ácidos 4-aminobenzoico e benzoico, como mostrado na Figura 8 e Tabela 12.

Figura 8 – Cromatogramas de uma solução mista contendo anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 9 e 17 min (b)



Fonte: A autora (2024).

Tabela 12 – Valores de resolução e fator de assimetria para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico utilizando acetoneitrila e água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,5) como fase móvel

Composto	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria
Ácido 4-aminobenzoico	9,8	-	1,11
Catecol	10,6	3,43	1,22
Ácido Benzoico	15,4	19,58	1,17
Anilina	19,1	8,47	2,22

Fonte: A autora (2024).

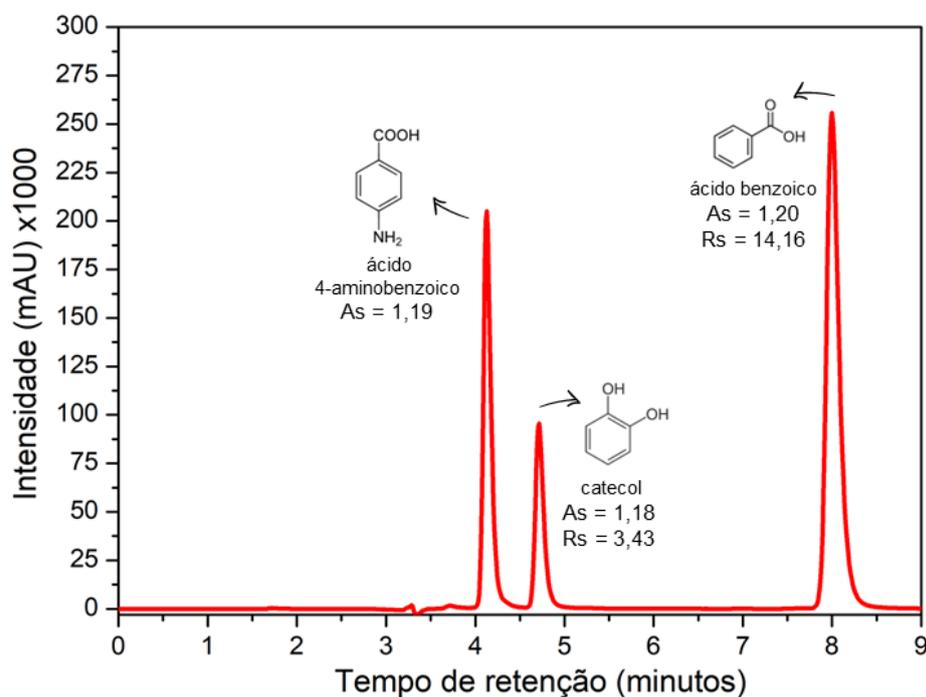
A adição de ácido na fase móvel desloca o equilíbrio para a forma não ionizada dos compostos com caráter ácido. Provavelmente esta é a razão dos picos serem finos e intensos nessa composição de fase móvel.

Entretanto, a acidificação da fase móvel não agiu de forma positiva para a anilina. Possivelmente por esse composto possuir caráter básico (devido ao grupo NH_2), estará em sua forma protonada em pH menor que o seu valor de pK_a (4,62), portanto não terá retenção efetiva em cromatografia por fase reversa. Não sendo possível detectar a anilina no mesmo método do catecol e ácidos, optou-se por desenvolver um método para este analito com outra composição de fase móvel.

Com as informações obtidas do gradiente exploratório contendo acetoneitrila e água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,5) como fase móvel, foi possível otimizar a composição desta a fim de obter um método com menor tempo de análise possível para o catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico. A Figura 9 apresenta o cromatograma do método do catecol e

ácidos escolhido para ser validado. O modo de eluição isocrático foi realizado, utilizando 30% de acetonitrila e 70% de água acidificada por 9 min.

Figura 9 – Cromatograma de uma solução padrão contendo catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico no método utilizando acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico pH 3,5

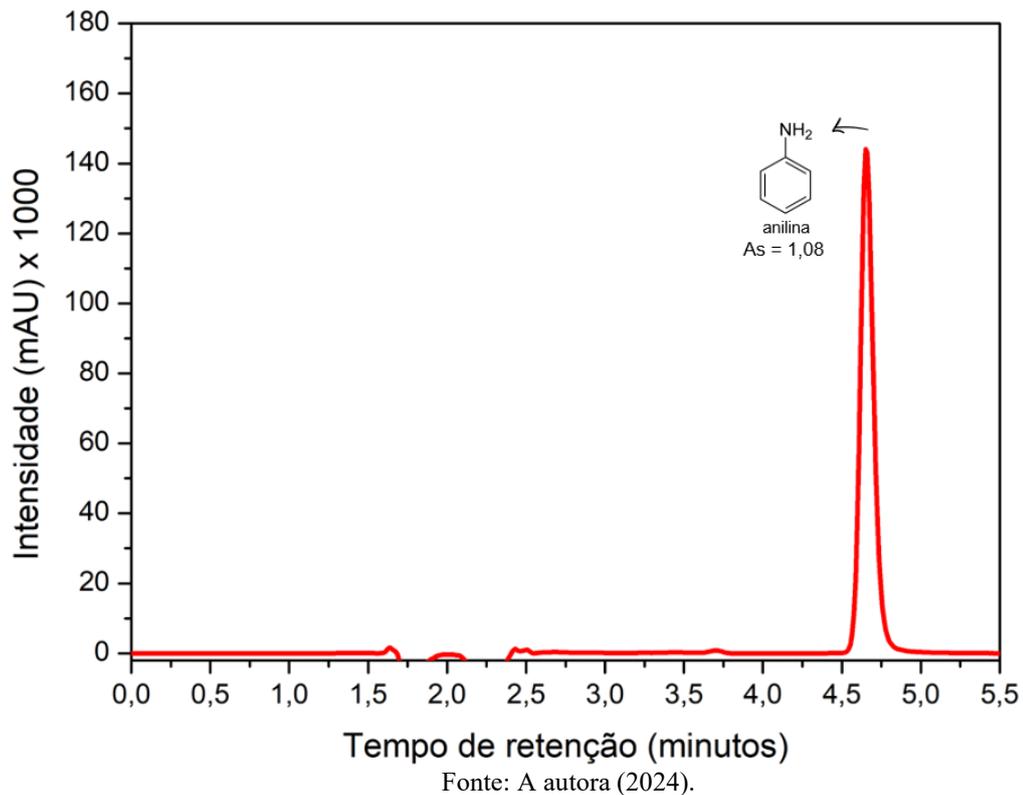


Fonte: A autora (2024).

O tempo de corrida de 9 min foi suficiente para eluição dos três compostos. Os picos foram bem resolvidos, com valores de resolução de 3,43 para o catecol e 14,16 para o ácido benzoico. Os picos dos três compostos foram simétricos, como pode ser observado no cromatograma e pelos valores dos fatores de assimetria.

Para resolver o problema da anilina, foi utilizada a solução contendo ácido acético e trietilamina com pH 5,33. Neste pH, a anilina encontra-se na sua forma molecular, tendo em vista que seu valor de pKa é 4,62, e possui boa retenção em fase reversa. Para corrigir problemas com interação com grupos silanóis residuais que possam estar presentes na coluna, a literatura aponta o uso de modificadores (SANTOS-NETO, 2010). Como modificadores para compostos básicos, geralmente são usadas aminas terciárias com cadeias alquílicas curtas, as quais se encontram protonadas na fase móvel. Santos-Neto (2010) utilizou o modificador trietilamina para melhorar a simetria de picos de compostos básicos. A Figura 10 apresenta o cromatograma da anilina no método que foi definido e validado.

Figura 10 – Cromatograma de uma solução padrão de anilina no método utilizando acetonitrila e água com ácido acético e trietilamina

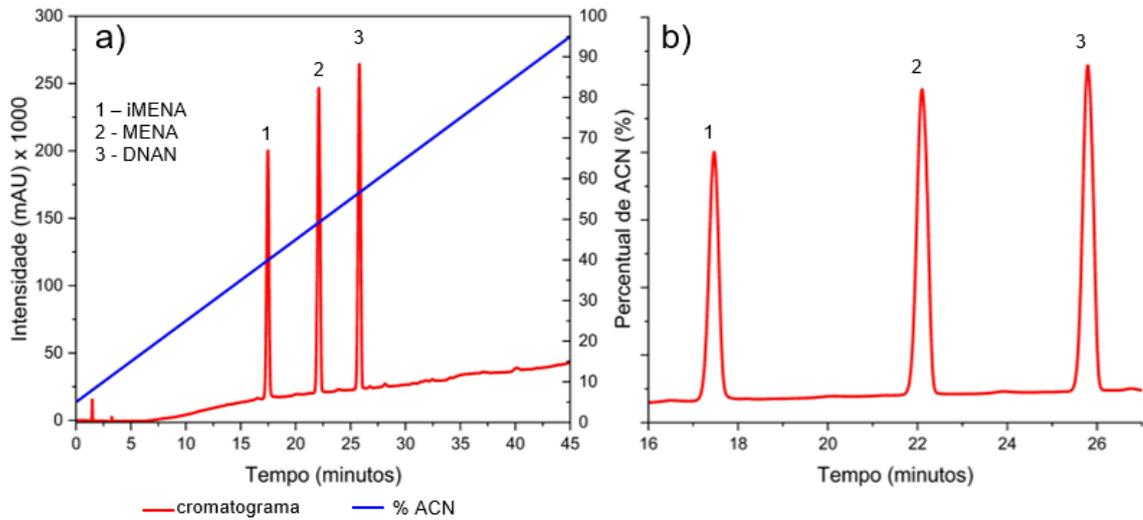


Observa-se na Figura 10 que a anilina eluiu em 4,6 min, apresentando um pico com simetria adequada.

4.1.1.2 DNAN e seus derivados

A Figura 11 apresenta o cromatograma da solução mista contendo padrões de DNAN, MENA, iMENA e DAAN na concentração de 25 mg/L em gradiente exploratório, utilizando acetonitrila e água como fase móvel. O percentual de acetonitrila na fase móvel variou de 5% a 95% em 45 min. A Tabela 13 apresenta os valores de resolução e fator e assimetria para estes compostos.

Figura 11 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 16 e 27 min (b) utilizando acetonitrila e água como fase móvel



Fonte: A autora (2024).

Tabela 13 – Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e água como fase móvel

Composto	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria
iMENA	17,5	-	0,93
MENA	22,0	10,59	0,98
DNAN	25,8	8,15	0,99

Fonte: A autora (2024).

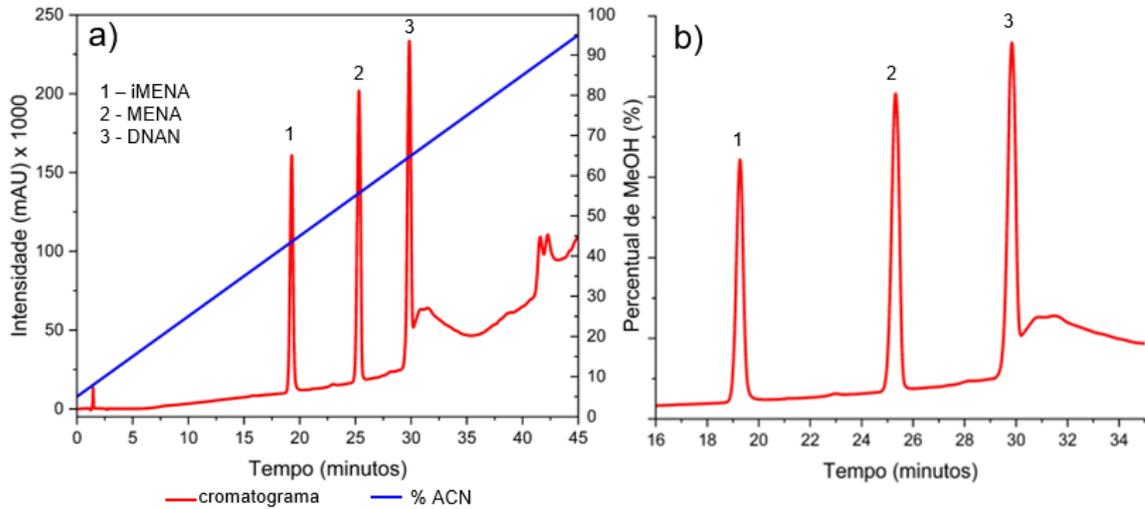
Observa-se na Figura 11a que o iMENA (pico 1), o MENA (pico 2) e o DNAN (pico 3) eluíram entre 17 e 26 min, com percentual de acetonitrila de 40% a 60%, aproximadamente.

Os compostos MENA e DNAN apresentaram valores de resolução aceitáveis, 10,59 e 8,15, respectivamente, como mostra a Tabela 13, e os três compostos apresentaram picos bem simétricos. Os fatores de assimetria para iMENA, MENA e DNAN foram 0,93; 0,98 e 0,99, respectivamente (Tabela 13).

No entanto, o pico do DAAN não foi visualizado no cromatograma, provavelmente por ele estar na forma de dihidrocloreto de 2,4-diaminoanisol, conforme descrito na Seção 3.1.2, e não haver nenhuma retenção deste composto na fase estacionária utilizando apenas acetonitrila e água como fase móvel. Por esta razão, outras composições de fase móvel foram testadas.

Ao utilizar metanol e água como fase móvel, em um percentual de metanol variando entre 5% a 95% em 45 minutos, observou-se que o DAAN também não apareceu (Figura 12). Além disso, observou-se uma elevação da linha de base, logo após o pico do DNAN.

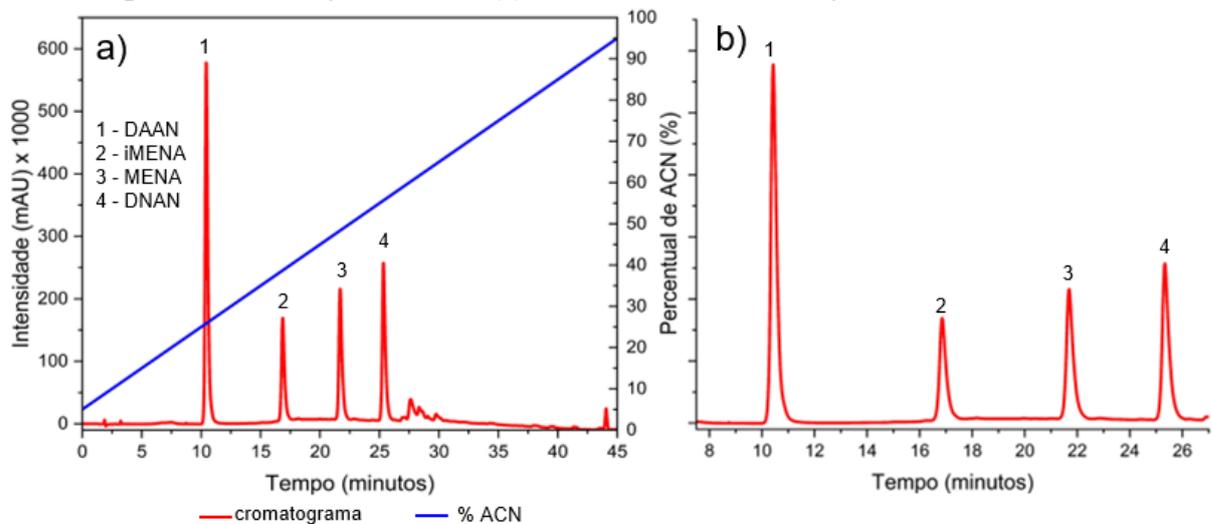
Figura 12 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 16 e 35 min (b) utilizando metanol e água como fase móvel



Fonte: A autora (2024).

Ao utilizar acetonitrila e uma solução de tampão fosfato 5 mM como fase móvel, com um percentual de acetonitrila variando de 5% a 95% em 45 minutos, observou-se os picos dos quatro compostos, DNAN, MENA, iMENA e DAAN, conforme mostra a Figura 13. A Tabela 14 apresenta os valores de resolução e fator e assimetria para estes compostos.

Figura 13 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN (a) e ampliação do cromatograma entre os tempos 8 e 27 min (b) utilizando acetonitrila e tampão fosfato 5 mM como fase móvel



Fonte: A autora (2024).

Tabela 14 – Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e tampão fosfato 5 mM como fase móvel

Composto	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria
DAAN	10,4	-	1,38
iMENA	16,8	14,66	1,37
MENA	21,7	10,39	1,40
DNAN	25,3	7,80	1,31

Fonte: A autora (2024).

Observa-se na Figura 13 que o DAAN (pico 1), iMENA (pico 2), o MENA (pico 3) e o DNAN (pico 4) eluíram entre 10 e 25 min, com percentual de acetonitrila de 20% a 45%, aproximadamente.

Os compostos iMENA, MENA e DNAN apresentaram valores de resolução aceitáveis, 14,66, 10,39 e 7,80, respectivamente (Tabela 14), e todos os compostos apresentaram picos bem simétricos, com valores de assimetria variando entre 1,31 e 1,40, conforme mostra a Tabela 14.

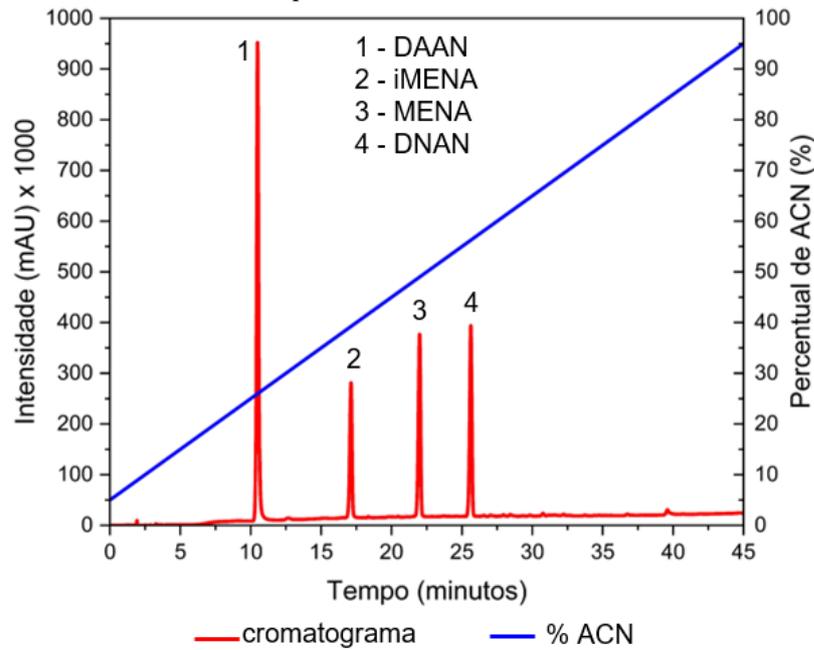
A eluição do DAAN nesta composição de fase móvel pode ser explicada pela influência do tampão fosfato nas propriedades químicas e de ionização do analito. A presença de íons fosfato na fase móvel pode formar pares iônicos com o 2,4-diaminoanisol, modificando suas propriedades de retenção. Isso pode aumentar a interação do analito com a fase estacionária hidrofóbica, melhorando a retenção (BORGES, GORAIEB e COLLINS, 2012).

Apesar de serem resultados satisfatórios, o uso de tampões como o tampão fosfato, com o uso contínuo, pode ocasionar problemas de entupimento no sistema cromatográfico devido a precipitação do sal.

A fim de evitar possíveis problemas, uma solução tampão fosfato mais diluída, na concentração de 0,05 mM, também foi testada.

A Figura 14 apresenta o cromatograma da solução mista contendo padrões de *IMCs* em gradiente exploratório, utilizando acetonitrila e tampão fosfato na concentração de 0,05 mM como fase móvel. Os valores de resolução e assimetria são apresentados na Tabela 15.

Figura 14 – Cromatogramas de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN, utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel



Fonte: A autora (2024).

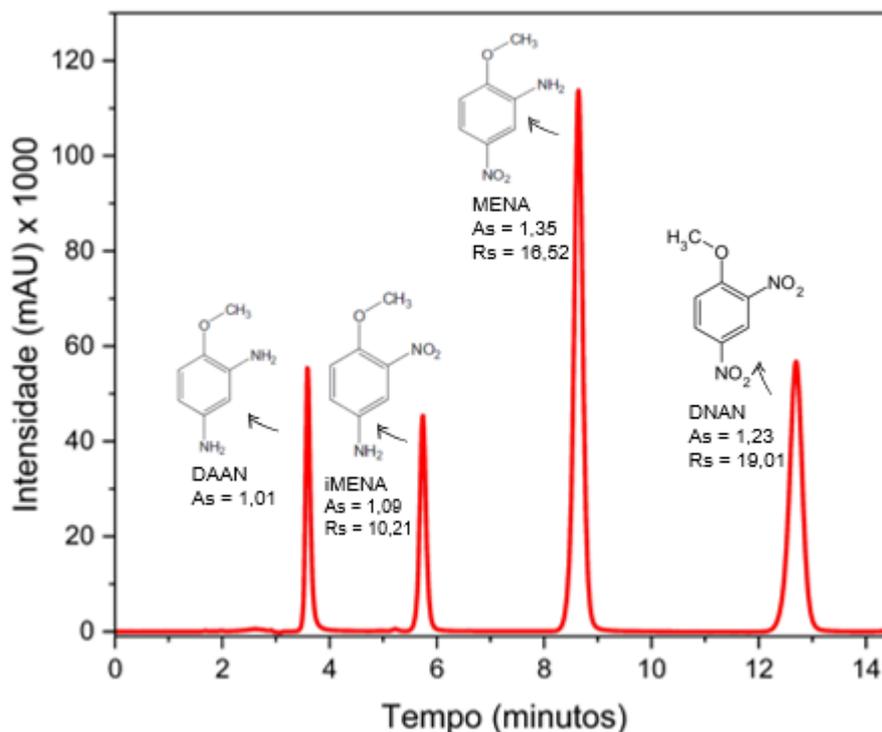
Tabela 15 – Valores de resolução e fator de assimetria para DNAN, MENA e iMENA utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel

Composto	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria
DAAN	10,5	-	1,12
iMENA	17,1	23,61	0,99
MENA	21,9	16,55	0,98
DNAN	25,6	12,32	0,99

Fonte: A autora (2024).

Com as informações obtidas do gradiente exploratório contendo acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel, foi possível otimizar a composição desta a fim de obter um método com menor tempo de análise possível para os *IMCs*. A Figura 15 apresenta o cromatograma do método escolhido para ser validado. O modo de eluição isocrático foi realizado, utilizando 60% de acetonitrila e 40% de tampão fosfato 0,05 mM por 20 min.

Figura 15 – Cromatograma de uma solução mista contendo DNAN, MENA, iMENA e DAAN, utilizando acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mM como fase móvel no modo de eluição isocrático



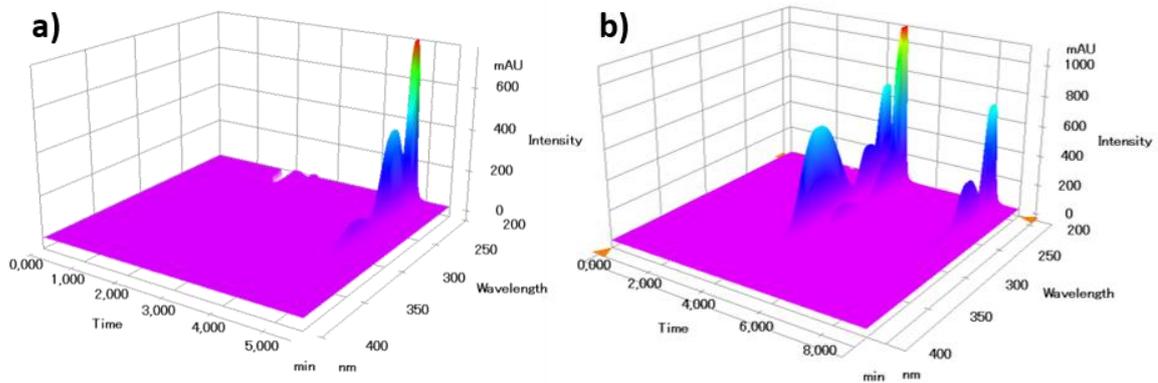
Fonte: A autora (2024).

Os quatro compostos eluíram em um tempo de corrida de 15 min. Os picos foram bem resolvidos, com valores de resolução de 10,21 para o iMENA, 16,52 para o MENA e 19,01 para o DNAN, e simétricos, como pode ser observado no cromatograma e pelos valores dos fatores de assimetria, que variaram de 1,01 a 1,35 (Figura 15).

4.1.2 Comprimento de onda

Os comprimentos de onda de máxima absorção para cada um dos compostos foram estabelecidos por meio da varredura espectral na faixa de 190 a 800 nm. Os comprimentos de onda de máxima absorção podem ser estabelecidos a fim de aumentar a sensibilidade da análise e evitar interferências de compostos indesejáveis na detecção/quantificação. O detector DAD tem a vantagem de permitir monitorar simultaneamente a absorbância dos solutos em diferentes comprimentos de onda. A Figura 16 apresenta o gráfico em 3D dos métodos da anilina (Figura 16a) e catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico (Figura 16b).

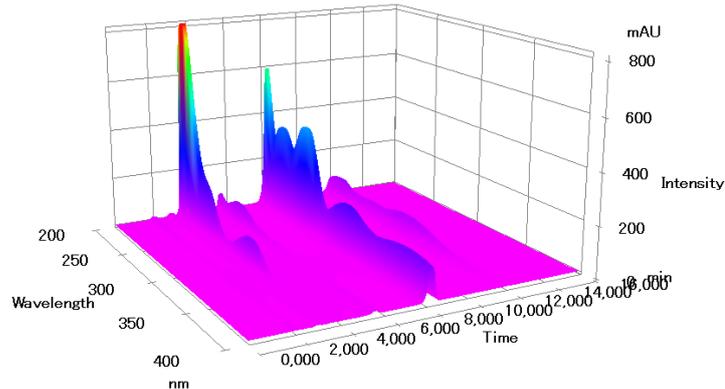
Figura 16 – Cromatogramas em três dimensões relacionando intensidade de sinal analítico (mAU) versus tempo de corrida (min) versus comprimento de onda (nm) de a) método da anilina e b) método do catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico



Fonte: A autora (2024).

A Figura 17 apresenta o gráfico em 3D do método de DNAN, MENA, iMENA e DAAN.

Figura 17 – Cromatogramas em três dimensões relacionando intensidade de sinal analítico (mAU) versus tempo de corrida (min) versus comprimento de onda (nm) do método de DNAN, MENA, iMENA e DAAN



Fonte: A autora (2024).

Cass e Degani (2010) recomendam a utilização do comprimento de onda de máxima absorção do analito, desde que este seja superior a 200 nm, pois abaixo deste valor geralmente observa-se interferência da fase móvel. E de fato, a acetonitrila, que faz parte da composição da fase móvel, possui transição do tipo par de elétron (devido ao nitrogênio) e ligação *pi* antiligante (devido a ligação tripla). Portanto, sua molécula absorve no UV, na região perto de 200 nm.

Assim, os comprimentos de onda escolhidos para os métodos da anilina e seus derivados foram: 230 nm para a anilina (Figura 16a) e 287, 276 e 228 nm para o ácido 4-aminobenzoico, catecol e ácido benzoico, respectivamente (Figura 16b). Para o método dos compostos de munições insensíveis, os comprimentos de onda escolhidos foram: 213 nm para o DNAN, 257 nm para o MENA, 230 nm para o iMENA e 210 nm para o DAAN (Figura 17).

4.1.3 Fluxo da fase móvel e volume de injeção

Foram testados os fluxos da fase móvel de 0,8 mL/min e 1,0 mL/min. Foi observado que o fluxo influencia no tempo de retenção dos compostos. Quanto maior o fluxo, mais rápido os picos eluem da coluna cromatográfica. No entanto, deve-se ter cuidado com o volume morto da coluna. Busca-se o menor tempo de retenção desde que este não seja tão próximo do volume morto. Além disso, em amostras complexas, normalmente há picos interferentes que eluem nos três primeiros minutos de análise. Assim, os fluxos escolhidos foram 1,0 mL/min para o método da anilina (TR = 4,6 min) e 0,8 mL/min para o catecol, ácidos (TR do 4-aminobenzoico = 4,1 min) e compostos de munições insensíveis (TR do DAAN = 3,6 min).

O volume de injeção foi escolhido levando em consideração a capacidade da coluna cromatográfica e faixa de concentração pretendida para os métodos. Normalmente, se usa como o volume de injeção máximo, 1% do volume da coluna analítica vazia, que pode ser calculado pela Equação 11 (PINTO, 2021).

$$V = \pi \times r^2 \times L \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

π equivale a 3,14

r é o raio da coluna

L é a largura

Como a coluna utilizada possui 4,6 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento, o volume máximo de injeção seria 42 μ L. Na prática, volume maiores que 1% do volume da coluna são aceitáveis se os picos são ainda simétricos. Assim têm-se a vantagem de permitir melhores sensibilidades (PINTO, 2021).

Foram testadas concentrações mínimas e máximas das faixas das curvas analíticas utilizando 10 μ L, 20 μ L e 50 μ L de injeção. O volume definido para os métodos da anilina e do catecol e ácidos foi de 50 μ L, e para os compostos de munições insensíveis foi de 20 μ L,

nem tão pequeno que não fosse possível detectar as concentrações baixas, nem tão alto que pudesse comprometer a eficiência da coluna ou saturar o detector.

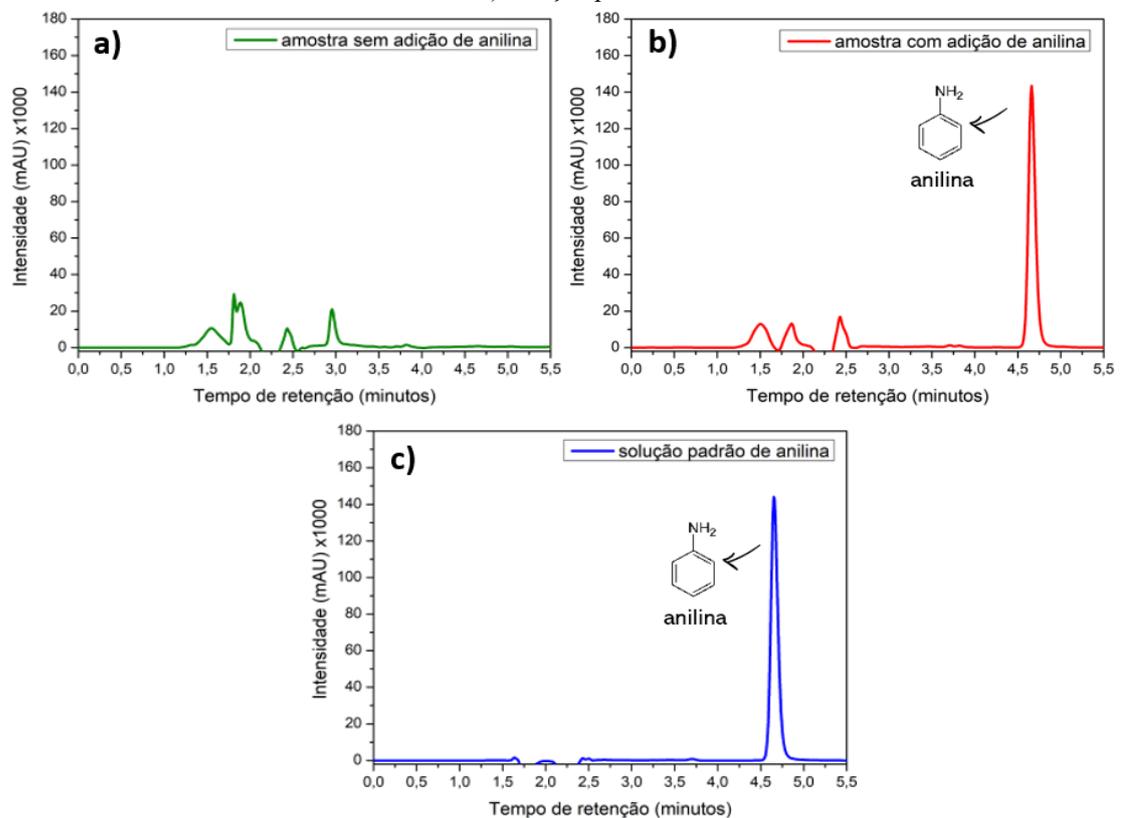
Com todas as condições cromatográficas definidas, os métodos foram então validados.

4.2 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Seletividade

Na Figura 18 estão apresentados os cromatogramas de uma amostra de reator biológico (descrita na seção 3.1.4) sem adição de padrão (a), adicionada de padrão de anilina (b) e de solução aquosa do padrão analítico da anilina (c).

Figura 18 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem anilina; b) amostra com adição de anilina e c) solução padrão de anilina



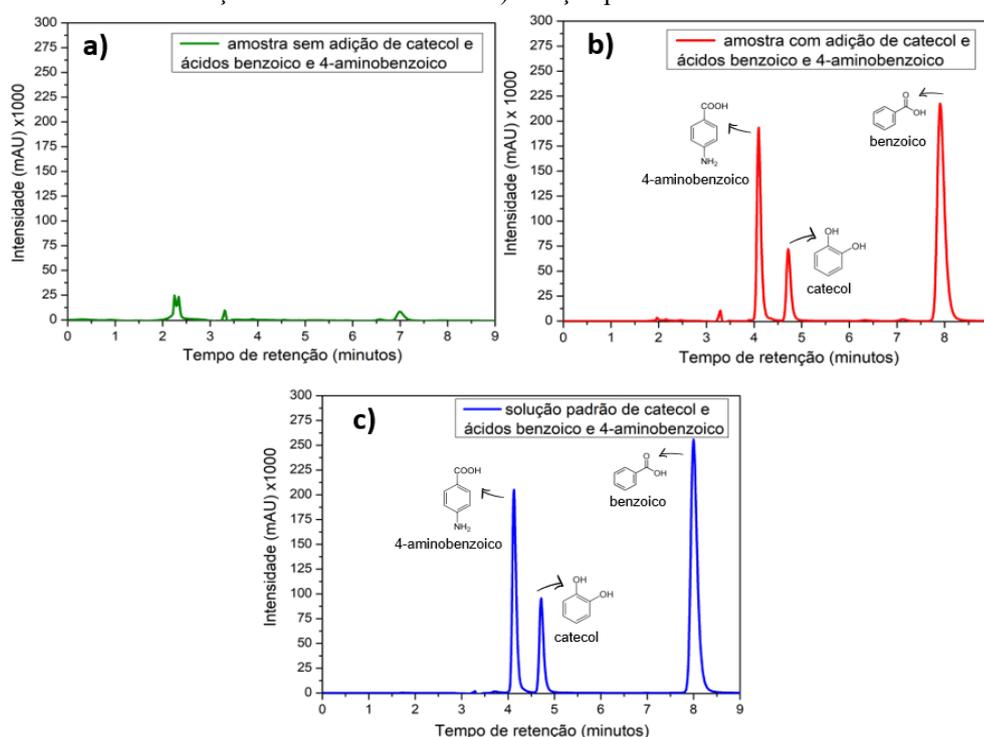
Fonte: A autora (2024).

No cromatograma da amostra sem adição da anilina (Figura 18a) observa-se que nenhum pico aparece no tempo de retenção deste composto (4,6 min). No cromatograma da amostra com a anilina (Figura 18b), o pico referente à anilina eluiu sem interferentes, o que pode ser comprovado, inicialmente, pela sua similaridade com o cromatograma da solução padrão

(Figura 18c). Também é possível ver no cromatograma da amostra (Figura 18b), que outros compostos presentes na matriz eluem antes ou depois do pico da anilina, com tempos de retenção bem diferentes. Tais resultados indicam que o método é seletivo.

Na Figura 19 são apresentados os cromatogramas referentes ao método analítico do catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico. O cromatograma de uma amostra de reator biológico (descrita na seção 3.1.4) sem adição dos padrões é mostrado na Figura 19a, uma amostra de reator biológico com a adição da mistura dos padrões analíticos destes três compostos é mostrada na Figura 19b, e de uma solução aquosa do padrão contendo os três compostos, na Figura 19c.

Figura 19 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem catecol e ácidos; b) amostra com adição de catecol e ácidos e c) solução padrão de catecol e ácidos

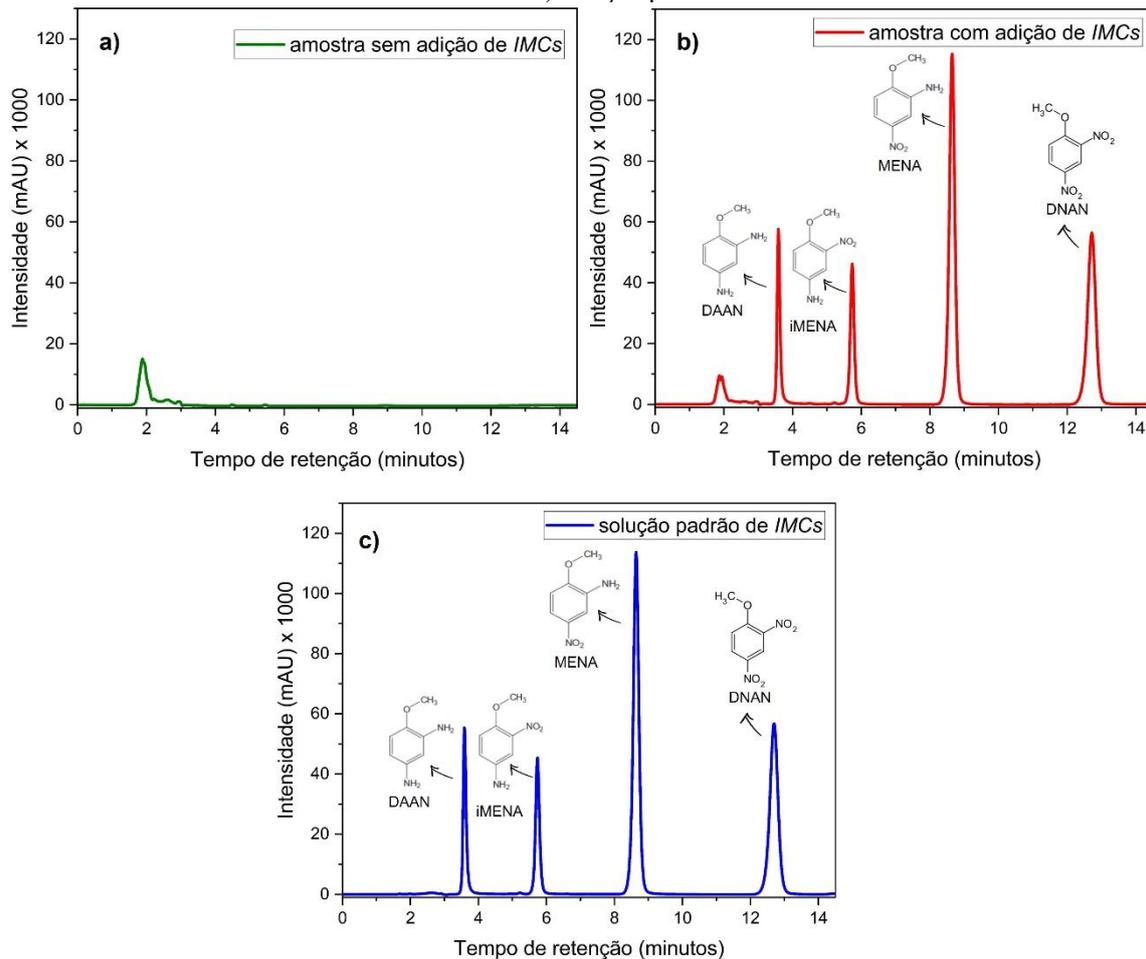


Fonte: A autora (2024).

Observa-se que também não há evidências de picos interferentes eluindo no mesmo tempo dos compostos de interesse: catecol (4,7 min), ácido benzoico (8,0 min) e ácido 4-aminobenzoico (4,1 min). Com isso tem-se a indicação de suficiente seletividade para distinguir os analitos dos compostos possivelmente interferentes da matriz.

Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas referentes ao método analítico dos *IMCs*. A Figura 20a é referente ao cromatograma de uma amostra sem adição dos padrões; a Figura 20b, uma amostra com a adição da mistura dos padrões analíticos de DNAN, MENA, IMENA e DAAN, e a Figura 20c, uma solução padrão contendo os quatro compostos.

Figura 20 – Cromatogramas resultantes do ensaio de seletividade: a) amostra sem *IMCs*; b) amostra com adição de *IMCs* e c) solução padrão de *IMCs*

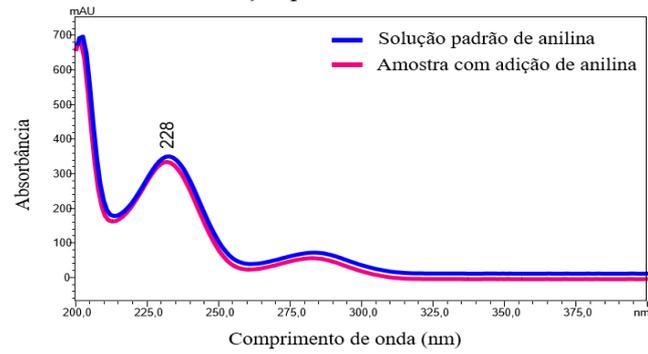


Fonte: A autora (2024).

Verifica-se também a ausência de picos interferentes que eluem no mesmo tempo que os compostos de interesse: DNAN (12,9 min), MENA (8,7 min), iMENA (5,8 min) e DAAN (3,6 min). Isso sugere que este método também apresenta uma seletividade adequada para diferenciar os analitos dos compostos presentes na matriz que poderiam causar interferências.

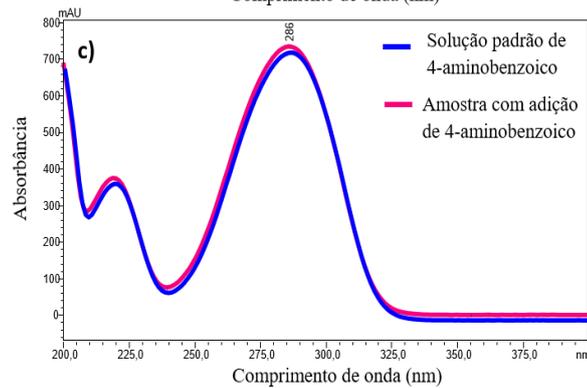
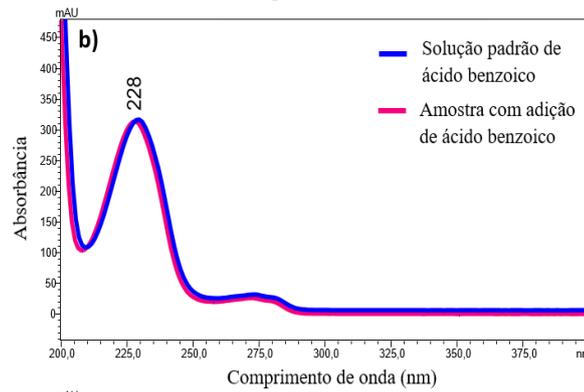
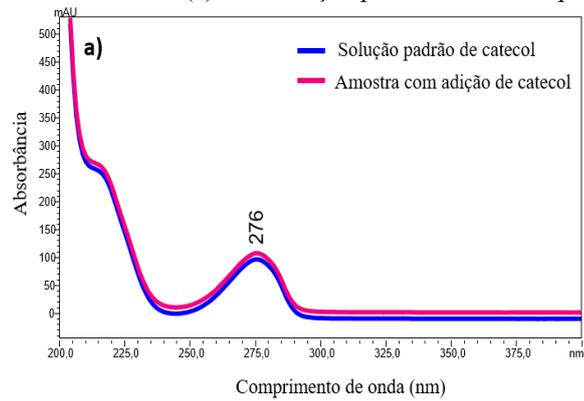
A fim de comprovar a seletividade dos métodos, foi feita a comparação dos espectros UV-visível dos compostos de interesse nas soluções padrões com os das amostras adicionadas dos padrões (nas menores concentrações das curvas analíticas), na região de 200 nm a 400 nm. A Figura 21 é referente ao método da anilina, a Figura 22, ao método do catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico e a Figura 23, ao método dos *IMCs*.

Figura 21 – Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de anilina e solução padrão de anilina



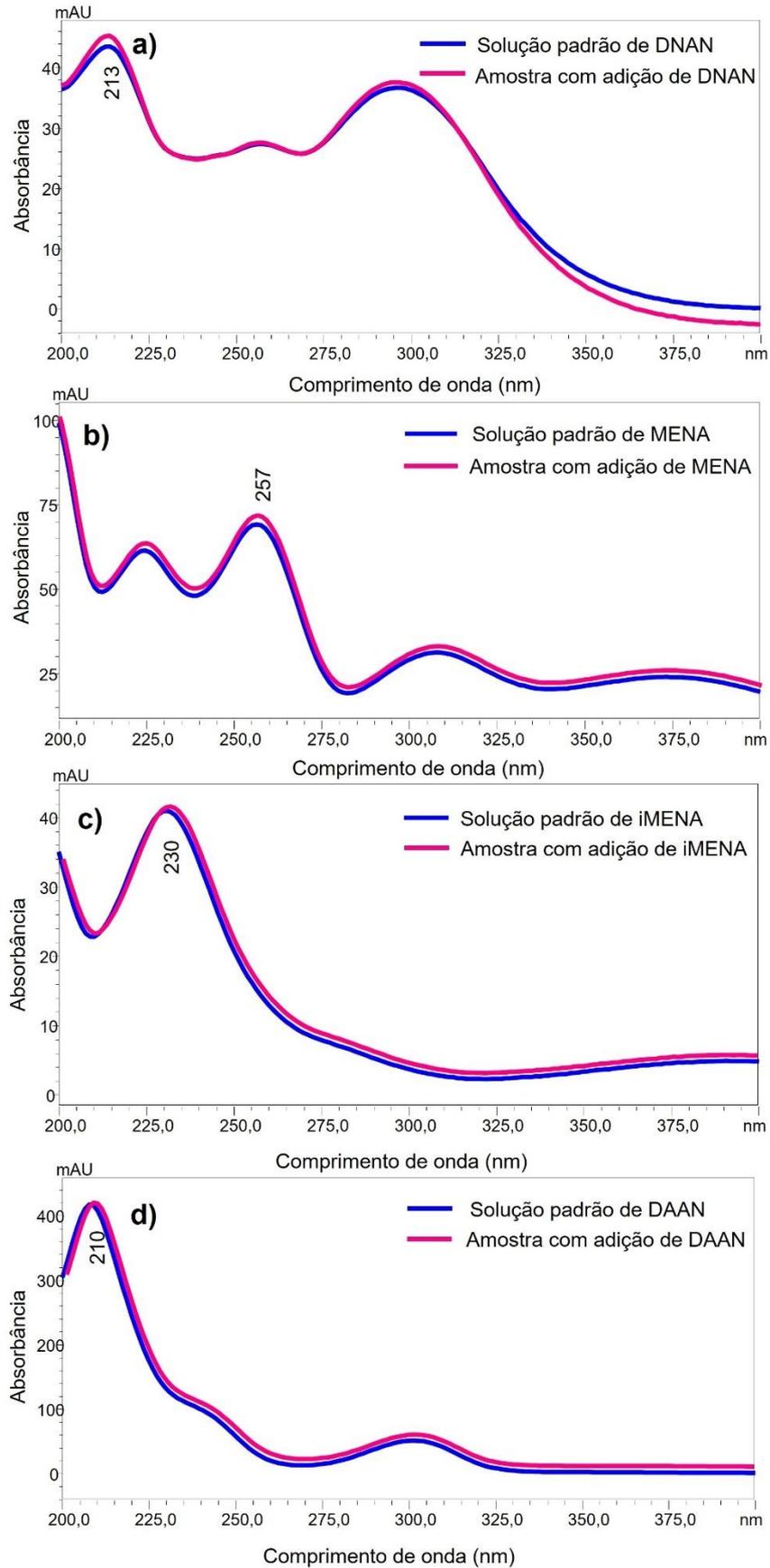
Fonte: A autora (2024).

Figura 22 – Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de catecol (a), ácido benzoico (b) e ácido 4-aminobenzoico (c) e da solução padrão destes compostos



Fonte: A autora (2024).

Figura 23 – Espectros de absorção UV-visível da amostra com adição de DNAN (a), MENA (b), iMENA (c) e DAAN (d) e da solução padrão destes compostos



Fonte: A autora (2024).

Observa-se a similaridade das bandas de absorção (perfil do espectro UV-Vis) entre as amostras adicionadas do padrão e as soluções padrão de todos os compostos, corroborando com a afirmação de que não houve coeluição dos compostos de interesse e outros compostos interferentes, garantindo a seletividade dos métodos.

Com relação aos estudos de efeito matriz, a Tabela 16 apresenta os valores médios dos coeficientes angulares das retas obtidas das curvas analíticas na matriz e em solução aquosa para os compostos estudados.

Tabela 16 – Comparação dos coeficientes angulares das retas obtidas das curvas analíticas na matriz e em solução pelo teste t

Compostos	Média do coeficiente angular da curva na matriz	Média do coeficiente angular da curva em solução aquosa	p-valor (Teste t)
Anilina	235138±1525	234187±1857	0,27
Catecol	70989±108	69887±339	0,0029
Ácido benzoico	316783±1083	314579±1017	0,031
Ácido 4-aminobenzoico	444299±1335	434129±803	0,00020
DNAN	58531±489	58440±101	0,38
MENA	51663±234	51687±316	0,46
iMENA	39601±133	39814±188	0,092
DAAN	197655±399	198544±438	0,055

Fonte: A autora (2024).

O p-valor é maior que 0,05 para a anilina, DNAN, MENA, iMENA e DAAN, indicando que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares das equações das retas sem matriz (em solução) e com matriz, comprovando estatisticamente a inexistência de efeito matriz para esses analitos.

Por outro lado, os p-valores são menores que 0,05 para o catecol (0,0029) e ácidos benzoico (0,031) e 4-aminobenzoico (0,0002). Estes resultados indicam que a matriz da amostra contém compostos que interferem na medição. Conforme mencionado na Seção 2.5.1, estes compostos interferentes podem competir pelos sítios ativos na coluna cromatográfica, reduzindo a interação entre os sítios ativos e os analitos, causando supressão ou aumento da resposta cromatográfica.

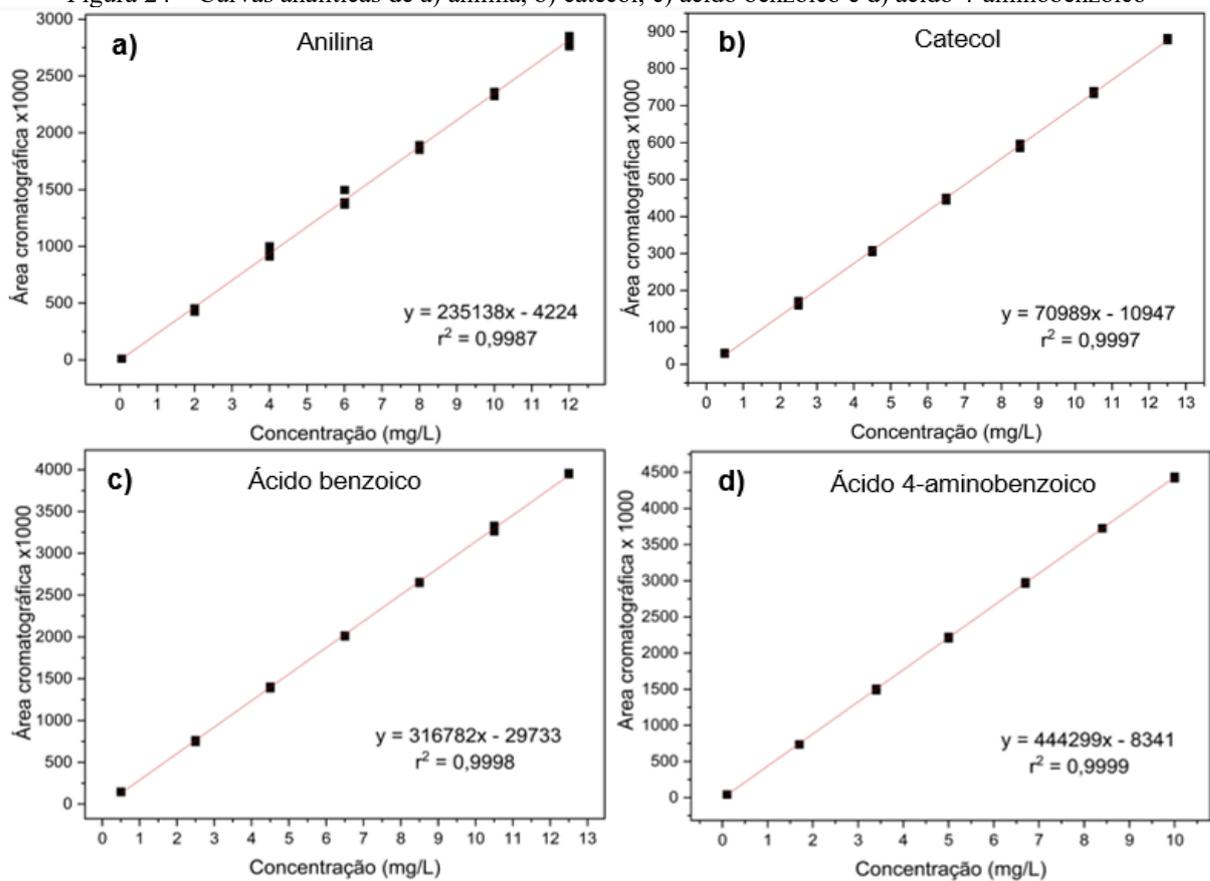
Ao comparar a Figura 19b e 19c, observa-se que os picos dos compostos na amostra têm intensidades um pouco menores que aquelas observadas em solução aquosa, corroborando

com os resultados da Tabela 16. Para contornar este problema, a curva analítica utilizada na medição dos analitos nas amostras deve ser aquela realizada na matriz.

4.2.2 Linearidade, faixa de concentração, LD e LQ

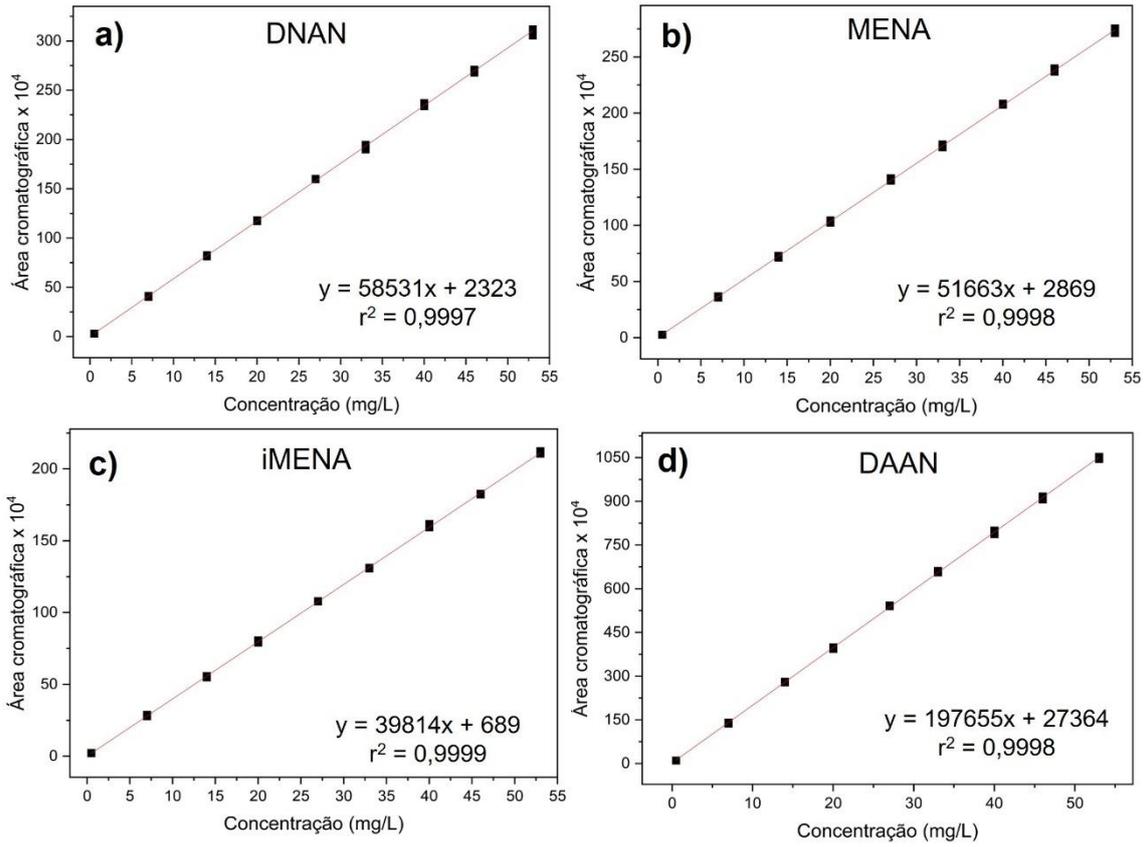
As curvas analíticas dos compostos estudados (anilina, catecol, ácidos benzoico e 4-aminobenzoico e *IMCs*) foram obtidas a partir de modelos de calibração, relacionando a concentração dos compostos estudados e as áreas dos picos cromatográficos. Tais curvas estão apresentadas nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 – Curvas analíticas de a) anilina, b) catecol, c) ácido benzoico e d) ácido 4-aminobenzoico



Fonte: A autora (2024).

Figura 25 – Curvas analíticas de a) DNAN, b) MENA, c) iMENA e d) DAAN



Fonte: A autora (2024).

Os modelos lineares de calibração foram obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, usando sete níveis de concentração em triplicata, para os métodos da anilina, catecol e ácidos e nove níveis de concentração em triplicata, para o método dos *IMCs*. A Tabela 17 apresenta as equações das retas, as faixas lineares de concentração e os coeficientes de determinação das curvas analíticas, além dos LD e LQ.

Tabela 17 – Equações das retas, coeficientes de determinação e faixas lineares de trabalho

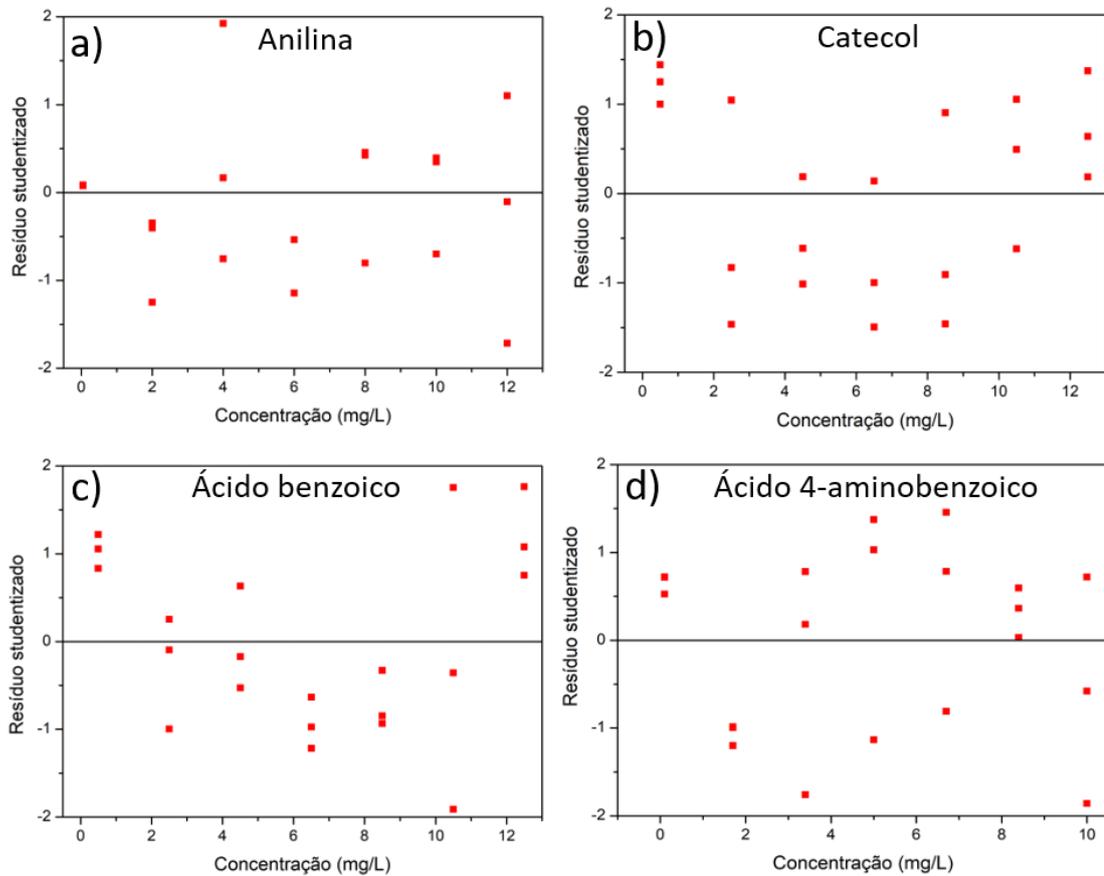
Composto	Equação da reta	r^2	Faixa linear de concentração (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Anilina	$Y = 235138X - 4224$	0,9987	0,05 a 12,0	0,0021	0,0064
Catecol	$Y = 70989X - 10947$	0,9997	0,5 a 12,5	0,047	0,14
Ácido benzoico	$Y = 316782X - 29733$	0,9998	0,5 a 12,5	0,060	0,17
Ácido 4-aminobenzoico	$Y = 444299X - 8341$	0,9999	0,1 a 10,0	0,0080	0,020
DNAN	$Y = 58531X + 2323$	0,9997	0,5 a 53,0	0,10	0,31
MENA	$Y = 51663X + 2869$	0,9998	0,5 a 53,0	0,050	0,15
iMENA	$Y = 39814X + 689$	0,9999	0,5 a 53,0	0,077	0,23
DAAN	$Y = 197655X + 27364$	0,9998	0,5 a 53,0	0,029	0,089

Fonte: A autora (2024).

Observa-se que os coeficientes de determinação de todos os compostos foram superiores a 0,99, indicando resultados de linearidade satisfatórios na faixa estudada. Dessa forma, os métodos desenvolvidos neste estudo atendem ao INMETRO (INMETRO, 2020) e ANVISA (ANVISA, 20217) para avaliação da linearidade na determinação de anilina, catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico em matrizes complexas.

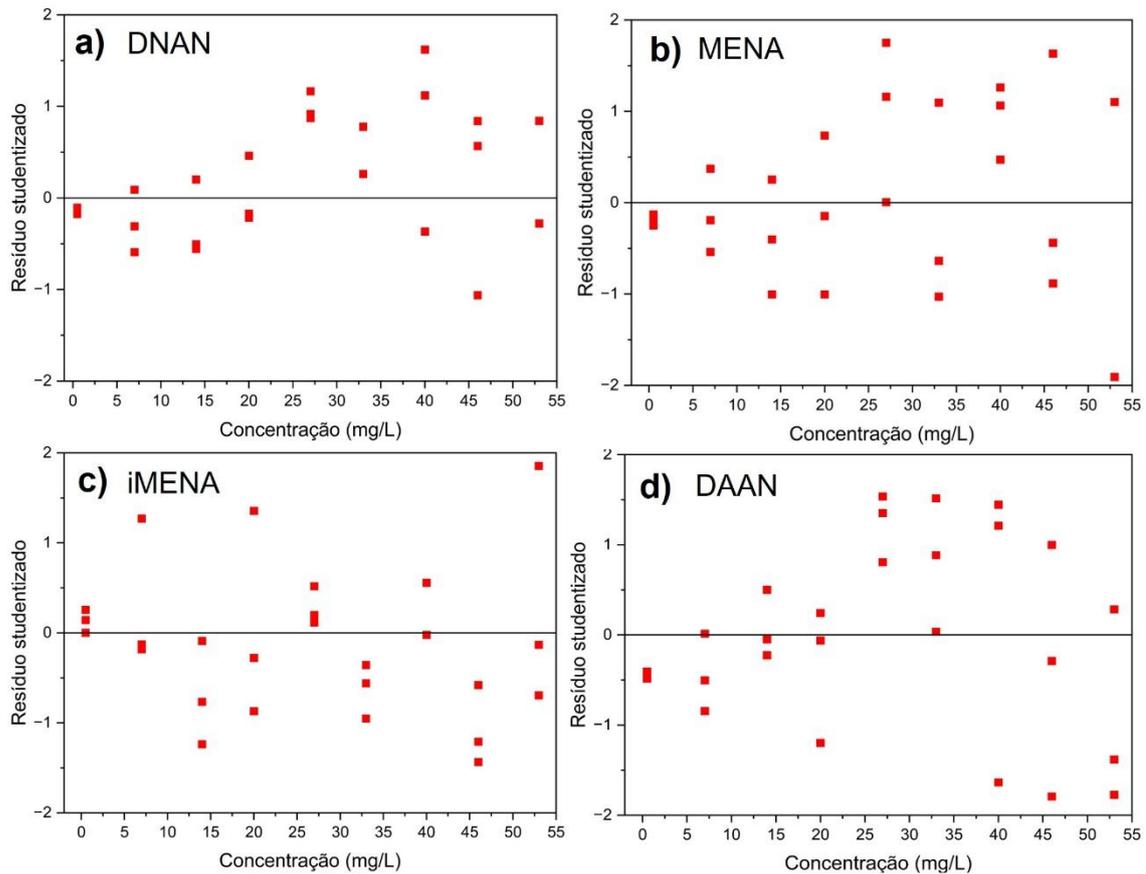
A linearidade das curvas analíticas foi confirmada pela análise dos resíduos gerados pelos modelos de calibração. A Figura 26 apresenta os gráficos dos resíduos gerados pelo modelo de calibração da anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, e a Figura 27 dos *IMCs*.

Figura 26 – Gráficos dos resíduos gerados pelos modelos de calibração: a) da anilina; b) do catecol; c) ácido benzoico e d) ácido 4-aminobenzoico



Fonte: A autora (2024).

Figura 27 – Gráficos dos resíduos gerados pelos modelos de calibração de: a) DNAN; b) MENA; c) iMENA e d) DAAN



Tais gráficos (Figuras 26 e 27) comprovam não haver *outliers* na calibração, que poderiam influenciar os modelos. Além disso, os resíduos não apresentam nenhum padrão evidente, apresentando-se aleatoriamente distribuídos, confirmando a ausência de falta de ajuste e a sua adequação às respostas obtidas.

A adequação do modelo matemático (linear) aos dados experimentais foi verificada pelo teste de variância ANOVA (PIMENTEL e BARROS-NETO, 1996). As Tabelas 18-25 apresentam os resultados desta análise para os modelos de calibração de todos os compostos estudados.

Tabela 18 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para a anilina

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$2,046 \times 10^{13}$	1	$2,046 \times 10^{13}$	16503	4,38
Resíduos	$2,355 \times 10^{10}$	19	$1,240 \times 10^9$		
Falta de ajuste	$2,745 \times 10^9$	5	$5,491 \times 10^8$	0,37	2,96
Erro puro	$2,081 \times 10^{10}$	14	$1,486 \times 10^9$		
Total	$2,048 \times 10^{13}$	20			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,885					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,898					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 19 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o catecol

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$1,896 \times 10^{12}$	1	$1,896 \times 10^{12}$	75439	4,38
Resíduos	$4,776 \times 10^8$	19	$2,514 \times 10^7$		
Falta de ajuste	$2,262 \times 10^8$	5	$4,524 \times 10^7$	2,52	2,96
Erro puro	$2,514 \times 10^8$	14	$1,796 \times 10^7$		
Total	$1,897 \times 10^{12}$	20			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,974					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,986					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 20 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o ácido benzoico

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$3,731 \times 10^{13}$	1	$3,731 \times 10^{13}$	140626	4,38
Resíduos	$5,041 \times 10^9$	19	$2,653 \times 10^8$		
Falta de ajuste	$1,693 \times 10^9$	5	$3,387 \times 10^8$	1,42	2,96
Erro puro	$3,347 \times 10^9$	14	$2,391 \times 10^8$		
Total	$3,731 \times 10^{13}$	20			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,986					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,991					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 21 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o ácido 4-aminobenzoico

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$5,044 \times 10^{13}$	1	$5,044 \times 10^{13}$	464229	4,38
Resíduos	$2,064 \times 10^9$	19	$1,086 \times 10^8$		
Falta de ajuste	$7,184 \times 10^8$	5	$1,437 \times 10^8$	1,49	2,96
Erro puro	$1,346 \times 10^9$	14	$9,613 \times 10^7$		
Total	$5,044 \times 10^{13}$	20			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,995					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,997					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 22 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o DNAN

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$2,643 \times 10^{13}$	1	$2,643 \times 10^{13}$	99840	4,24
Resíduos	$6,617 \times 10^9$	25	$2,647 \times 10^8$		
Falta de ajuste	$2,012 \times 10^9$	7	$2,874 \times 10^8$	1,12	2,58
Erro puro	$4,605 \times 10^9$	18	$2,559 \times 10^8$		
Total	$2,644 \times 10^{13}$	26			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,975					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,983					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 23 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o MENA

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$2,058 \times 10^{13}$	1	$2,058 \times 10^{13}$	131326	4,24
Resíduos	$3,919 \times 10^9$	25	$1,568 \times 10^8$		
Falta de ajuste	$1,372 \times 10^9$	7	$1,960 \times 10^8$	1,38	2,58
Erro puro	$2,547 \times 10^9$	18	$1,415 \times 10^8$		
Total	$2,059 \times 10^{13}$	26			
Variação explicada pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,981					
Variação explicável pelo modelo (r^2 ajustado) (%): 99,988					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 24 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o iMENA

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1,222x 10 ¹³	1	1,222 x 10 ¹³	201489	4,24
Resíduos	1,517 x 10 ⁹	25	6,067 x 10 ⁷		
Falta de ajuste	6,696 x 10 ⁸	7	9,566 x 10 ⁷	2,03	2,58
Erro puro	8,472 x 10 ⁸	18	4,707 x 10 ⁷		
Total	1,223 x 10 ¹³	26			
Variação explicada pelo modelo (r ² ajustado) (%): 99,988					
Variação explicável pelo modelo (r ² ajustado) (%): 99,993					

Fonte: A autora (2024).

Tabela 25 – Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o DAAN

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3,025x 10 ¹⁴	1	3,025 x 10 ¹⁴	183303	4,24
Resíduos	4,126 x 10 ¹⁰	25	1,651 x 10 ⁹		
Falta de ajuste	1,777 x 10 ¹⁰	7	2,538 x 10 ⁹	1,94	2,58
Erro puro	2,349 x 10 ¹⁰	18	1,305 x 10 ⁹		
Total	3,026 x 10 ¹⁴	26			
Variação explicada pelo modelo (r ² ajustado) (%): 99,986					
Variação explicável pelo modelo (r ² ajustado) (%): 99,992					

Fonte: A autora (2024).

A adequação dos modelos lineares ao intervalo de concentração das curvas analíticas foi verificada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}), em que o valor de $F_{tabelado}$ é igual a 2,96, com 5 e 14 graus de liberdade para os métodos da anilina e seus derivados e 2,58, com 7 e 18 graus de liberdade para o método dos *IMCs*, ambos com $p = 0,05$. Para os compostos anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, os valores de $F_{calculado}$ foram 0,37; 2,52; 1,42 e 1,49, respectivamente. Para os compostos DNAN, MENA, iMENA e DAAN, os valores de $F_{calculado}$ foram 1,12; 1,38; 2,03 e 1,94, respectivamente. Todos esses valores são menores que o $F_{tabelado}$, indicando não haver falta de ajuste dos modelos no intervalo de concentração das curvas analíticas. Portanto, pode-se afirmar com 95% de confiança, que os modelos são lineares em todas as suas faixas de concentração aplicadas.

A significância estatística da equação de regressão foi verificada pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos (MQ_R/MQ_r), em que o valor de $F_{tabelado}$ é igual a 4,38, com 1 e 19 graus de liberdade para os métodos da anilina, catecol e ácidos e 4,24, com 1 e 25 graus de liberdade para o método dos *IMCs*, ambos com $p = 0,05$. Os valores de $F_{calculado}$ para todos os compostos foram maiores que o tabelado, indicando, com 95% de confiança, que os modelos lineares foram significativos.

As diferenças entre as variações explicada e explicável pelos modelos de 0,013; 0,012%; 0,005% e 0,002% para anilina, catecol e ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, respectivamente, e de 0,002%; 0,007%; 0,005% e 0,006% para o DNAN, MENA, iMENA e DAAN,

respectivamente, devem-se ao erro puro, possivelmente decorrente da preparação dos padrões analíticos e não da falta de ajuste aos dados experimentais.

4.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados, expressos pelo coeficiente de variação de cinco medições, em três níveis de concentração, são mostrados na Tabela 26.

Tabela 26 – Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para os métodos da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN

Composto	Concentração (mg/L)	Repetibilidade CV (%)	Precisão intermediária CV (%)
Anilina	0,05	1,48	4,50
	6,0	4,92	4,59
	12,0	1,62	0,4
Catecol	0,5	3,37	4,21
	6,5	0,92	3,13
	12,5	0,31	2,79
Ácido benzoico	0,5	3,77	5,02
	6,5	0,76	3,58
	12,5	0,49	1,65
Ácido 4-aminobenzoico	0,1	2,54	3,79
	5,0	0,62	2,56
	10,0	0,28	2,03
DNAN	0,5	4,86	2,84
	27,0	0,23	0,60
	53,0	0,91	3,30
MENA	0,5	2,46	1,35
	27,0	0,96	4,88
	53,0	0,56	0,28
iMENA	0,5	4,31	3,68
	27,0	0,15	1,38
	53,0	0,46	4,20
DAAN	0,5	1,69	3,12
	27,0	0,10	1,20
	53,0	0,45	1,39

CV - Coeficiente de variação

Fonte: A autora (2024).

Não há consenso sobre os critérios de aceitação para a precisão. O INMETRO sugere que sejam seguidas as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades como, por exemplo, meio ambiente. Como não há legislação para os compostos estudados, admitem-se os níveis estabelecidos por outros guias e documentos.

Normalmente os critérios estão atrelados ao nível de concentração. De acordo com Ribani e colaboradores (2004), em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) sugere CV de até 21%, 15%, 11% e 7,3% para concentrações de 0,01 mg/L; 0,1 mg/L; 1 mg/L e 10 mg/L, respectivamente. O guia da IUPAC sugere que a precisão seja aceita arbitrariamente como até 10% (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 26, os métodos dos compostos estudados são considerados precisos, uma vez que os valores de coeficiente de variação variaram apenas entre 0,10% e 5,02%

4.2.4 Exatidão

A exatidão dos métodos foi avaliada em termos de recuperação, como descrito na Seção 3.2.5. Os valores de recuperação obtidos para a anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Resultados da recuperação (%) para os métodos da anilina, catecol, ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em três níveis de concentração

Composto	Concentração (mg/L)	Recuperação (%)
Anilina	0,05	87
	6,0	92
	12,0	99
Catecol	0,5	88
	6,5	94
	12,5	98
Ácido benzoico	0,5	90
	6,5	97
	12,5	98
Ácido 4-aminobenzoico	0,1	89
	5,0	97
	10,0	99
DNAN	0,5	93
	27	98
	53	99
MENA	0,5	87
	27	99
	53	97
iMENA	0,5	89
	27	93
	53	97
DAAN	0,5	83
	27	97
	53	98

Fonte: A autora (2024).

Os valores de recuperação variaram entre 83% e 99%. Da mesma forma da precisão, como não há legislação para os compostos estudados, admitem-se os níveis estabelecidos por outros guias e documentos. Para a faixa de concentração estudada, a AOAC indica aceitação de recuperação entre 80% e 110%, portanto os métodos descritos neste trabalho são considerados exatos. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70% e 120% (RIBANI et al., 2004).

4.2.5 Estabilidade

A Tabela 28 apresenta os resultados dos testes de estabilidade dos compostos estudados em três níveis de concentração, em solução e na matriz sob congelamento. As análises feitas em 24 h e em 5 dias após o preparo das soluções foram comparadas aos resultados obtidos das análises realizadas no mesmo dia de preparo, em termos de coeficiente de variação.

As amostras são consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do limite inferior de quantificação, para o qual se aceita desvio de até 20% (ANVISA, 2017).

De acordo com os dados da Tabela 28, observa-se que 24 h após o preparo das amostras, elas continuaram estáveis, tanto em solução quanto na matriz, evidenciado pelos baixos valores de coeficiente de variação, exceto para o DAAN, na matriz, na concentração de 0,5 mg/L. Após 5 dias de congelamento das amostras, os valores de CV aumentaram, especialmente para a anilina e seus derivados e o DAAN na matriz e em concentrações mais baixas, inviabilizando a quantificação precisa e exata dos compostos.

Tabela 28 – Estudo da estabilidade da anilina, catecol, ácidos benzoico e 4-aminobenzoico, DNAN, MENA, iMENA e DAAN em três níveis de concentração em solução e na matriz

Composto	Meio	Concentração (mg/L)	CV em 24 h (%)	CV em 5 dias (%)
Anilina	Solução	0,05	2,02	11,58
		6,0	5,12	6,93
		12,0	1,71	2,35
	Matriz	0,05	7,24	58,00
		6,0	5,33	22,18
		12,0	1,68	30,37
Catecol	Solução	0,5	0,74	141,0
		6,5	0,84	2,60
		12,5	0,71	2,35
	Matriz	0,5	5,68	68,0
		6,5	3,59	15,63
		12,5	1,98	3,06
Ácido benzoico	Solução	0,5	0,67	14,32
		6,5	0,29	0,32
		12,5	1,22	7,35
	Matriz	0,5	7,18	141,0
		6,5	4,56	125,44
		12,5	4,68	0,617
Ácido 4-aminobenzoico	Solução	0,1	3,09	23,63
		5,0	0,23	2,20
		10,0	0,40	1,49
	Matriz	0,1	5,69	35,54
		5,0	3,96	8,0
		10,0	0,48	1,17
DNAN	Solução	0,5	1,74	12,58
		27,0	0,27	2,19
		53,0	0,10	1,57
	Matriz	0,1	0,97	8,14
		27,0	0,42	2,22
		53,0	0,27	1,02
MENA	Solução	0,5	0,42	5,65
		27,0	0,18	0,65
		53,0	2,21	3,12
	Matriz	0,1	0,56	5,70
		27,0	0,13	1,53
		53,0	0,17	0,58
iMENA	Solução	0,5	3,04	6,31
		27,0	0,45	3,01
		53,0	0,19	1,58
	Matriz	0,1	3,72	10,37
		27,0	1,90	3,15
		53,0	0,58	2,53
DAAN	Solução	0,5	1,80	10,85
		27,0	0,69	6,88
		53,0	0,76	6,24
	Matriz	0,5	40,26	106
		27,0	10,51	66,2
		53,0	9,20	32,19

CV - Coeficiente de variação

Fonte: A autora (2024).

5 CONCLUSÕES

Este estudo alcançou os objetivos propostos ao desenvolver, validar e aplicar métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação de contaminantes e seus subprodutos metabólicos oriundos das indústrias de munições e têxtil.

Um dos métodos desenvolvidos permitiu a separação e quantificação de catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico em uma corrida de 9 minutos, utilizando uma fase móvel com pH 3,5. O ajuste do pH foi essencial para garantir a retenção desses compostos na fase reversa, resultando em picos simétricos e reprodutíveis. No entanto, devido ao caráter básico da anilina, este método não foi adequado para sua análise. Para sua correta separação e quantificação, foi necessária a utilização de uma fase móvel contendo acetonitrila, ácido acético e trietilamina, o que garantiu um ótimo fator de simetria.

O método para a análise dos compostos de munições insensíveis (DNAN, MENA, iMENA e DAAN) foi desenvolvido utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato, permitindo uma separação eficiente e seletiva.

Os métodos desenvolvidos foram validados e demonstraram ser seletivos, conforme evidenciado pela ausência de picos interferentes nos cromatogramas e pela análise dos espectros de UV-visível. As curvas analíticas foram lineares, de acordo com o teste ANOVA, e apresentaram coeficientes de correlação superiores aos estabelecidos pelos órgãos regulatórios ANVISA e INMETRO. Além disso, os métodos apresentaram baixos limites de quantificação, variando de 0,0064 mg/L para anilina a 0,31 mg/L para DNAN.

A precisão e exatidão dos métodos foram confirmadas pelos baixos coeficientes de variação intra e inter-dias e pelos valores de recuperação satisfatórios. No entanto, a análise do efeito matriz demonstrou uma pequena supressão do sinal analítico para catecol, ácido benzoico e ácido 4-aminobenzoico, sendo necessário o uso de curvas analíticas preparadas na própria matriz para garantir a correta quantificação desses compostos.

A estabilidade das soluções e amostras foi satisfatória por até 24 horas, exceto para DAAN, que apresentou coeficientes de variação superiores a 15% após cinco dias. Assim, estudos futuros devem avaliar a estabilidade dos compostos ao longo do tempo, visando garantir a confiabilidade das análises que não podem ser analisadas imediatamente após coleta.

Os métodos desenvolvidos e validados neste estudo representam ferramentas analíticas robustas para o monitoramento de contaminantes ambientais, contribuindo para pesquisas em processos de biorremediação.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos em outras matrizes;
- Avaliar a estabilidade a médio e longo prazo dos analitos, por meio de estudos mais extensivos que considerem diferentes condições de armazenamento e conservação das amostras;
- Verificar a possibilidade do uso de um padrão interno, especialmente no método do catecol, ácido benzoico e 4-aminobenzoico, que apresentou efeito de matriz.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRA DE, M.; O'CONNOR, O. A.; KOSSON, D. S. Metabolism of aniline under different anaerobic electron-accepting and nutritional conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 233–239, 1994.
- ANNUR, S.; SANTOSA, S. J.; APRILITA, N. H.; PHUONG, N. T; PHUOCS, N. V. A preliminary research for selective detection of Cr (III) in water sample. **Asian Journal Environmental Technology**, v. 1, n. 2, 2017.
- ANVISA, Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União em 25/07/2017; Brasília, DF.
- BHUIYAN, M. N. H.; KANG H.; KIM, J. H.; KIM S., KHO Y.; CHOI, K. Endocrine disruption by several aniline derivatives and related mechanisms in a human adrenal h295r cell line and adult male zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 326-332, 2019.
- BILAL, M.; BAGHERI, A. R.; BHATT, P.; CHEN, S. Environmental occurrence, toxicity concerns, and remediation of recalcitrant nitroaromatic compounds. **Journal of Environmental Management**, v. 291, 2021.
- BODDU, V. M.; ABBURI, K.; FREDRICKSEN, A. J.; MALONEY, S. W.; DAMAVARAPU, R. Equilibrium and column adsorption studies of 2,4-dinitroanisoole (DNAN) on surface modified granular activated carbons. **Environmental Technology**, v. 30, n. 2, p. 173-181, 2009.
- BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 993-1003, 2012.
- BOULAHLIB, S.; BOUDINA, A.; SI-AHMED, K.; BESSEKHOUAD, Y.; TRARI, M. Development and validation of a fast and simple HPLC method for the simultaneous determination of aniline and its degradation products in wastewater. **Analytical Methods**, v. 8, n. 30, p. 5949-5956, 2016.
- BRASIL. INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA; Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento orientativo DOQ-CGCRE-008. Revisão 08, 30p. 2020.
- CÂMARA, Isabelle Rodrigues de Mendonça. **Influência da microaeração intermitente na degradação anaeróbia da anilina**. 2021. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.
- CARVALHO, José Roberto Santo de. **Degradação anaeróbia de anilina utilizando diferentes culturas microbianas**. 2020. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, EdUFSCar, 2010.
- CHEN, R.; LU, Y.; ZHANG, E.; CHEN, Z.; HUANGFU, L.; ZUO, Z.; ZHAO, Y.; ZHU, M.; ZHANG, Z.; CHUAN, M.; BU, Q.; HUANG, Q.; WANG, H.; XU, Y.; LI, P.; YAO, Y.; ZHOU, Y.; ZU, C.; YANG, Z. The plant streptolysin S (SLS)-associated gene B confers nitroaromatic tolerance and detoxification. **Journal of Hazardous Materials**, v. 433, p. 128779, 2022.

CHINADAILY. High levels of aniline found in Hebei water supply. 08 de abril de 2013. Disponível em: http://www.chinadaily.com.cn/china/2013-04/08/content_16384273.htm. Acesso em: 03 de agosto de 2022. 2013.

CHOW, T. M.; WILCOXON, M. R.; PIWONI, M. D.; MALONEY, S. W. Analysis of new generation explosives in the presence of U.S. EPA method 8330 energetic compounds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 40-43, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo, Editora Blucher, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, Editora da Unicamp, 2006.

CORDIN, M.; BECHTOLD, T.; PHAM, T. Quantification of aniline and n-methylaniline in Indigo”. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

CROUCH, R. A.; SMITH, J. C.; STROMER, B. S.; HUBLEY, C. T.; BEAL, S.; LOTUFO, G.R.; BUTLER, A. D., WYNTER, M. T.; RUSSELL, A. L.; COLEMAN, J. G.; WAYNE, K. M.; CLAUSEN, J. L.; BEDNAR, A. J. Methods for simultaneous determination of legacy and insensitive munition (IM) constituents in aqueous, soil/sediment, and tissue matrices. **Talanta**, v. 217, 2020.

CUI, D; SHEN, D; WU, C; LI, C; LENG, D; ZHAO, M; Biodegradation of aniline by a novel bacterial mixed culture AC. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 86–96, 2017.

DAVIES, P. J.; PROVATAS, A. **Characterisation of 2, 4-dinitroanisole: an ingredient for use in low sensitivity melt cast formulations**. Edinburgh: Weapons Systems Division, DSTO Defence Science and Technology Organisation, 2006.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. 2nd ed., New York, Ed. John Wiley & Sons, 1981.

EMTIAZI, G.; SATARII M.; MAZAHERION, F. The utilization of aniline, chlorinated aniline, and aniline blue as the only source of nitrogen by fungi in water. **Water Research**, v. 35, n. 5, p. 1219-1224, 2001.

EPA – United States Environmental Protection Agency (1996). Aniline and selected derivatives by gas chromatography. EPA METHOD 8131, 13p.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2006). Nitroaromatics, nitramines, and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC). EPA METHOD 8330B, 60p.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2018). Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry. EPA METHOD 8270E, 64p.

Eurachem Working Group; The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2014.

FELT, D.; GURTOWSKI, L.; NESTLER, C. C.; JOHNSON, J.; LARSON, S. A two-stage extraction procedure for insensitive munition (IM) explosive compounds in soils. **Chemosphere**, v. 165, p. 18-26, 2016.

FIELD, J. A.; STAMS, A. J.; KATO, M.; SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 47-77, 1995.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds- From one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816, 2011.

GANG, X.; WANG, Q.; QIAN, Y.; GAO, P.; SU, Y.; LIU, Z.; CHEN, H.; LI, X.; CHEN, J. Simultaneous removal of aniline, antimony and chromium by ZVI coupled with H₂O₂: Implication for textile wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 840–848, 2019.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation, **Analytical Chemistry** v. 68 p. 305-309, 1996.

GUARINO, C.; FUSELLI, F.; LA MANTIA, A.; LONGO, L. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1294-1299, 2011.

HALASZ, A.; HAWARI, J.; PERREAULT, N. N. new insights into the photochemical degradation of the insensitive munition formulation IMX-101 in water. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 589-596, 2018.

HAWARI, J.; MONTEIL-RIVERA, F.; PERREAULT, N. N.; HALASZ, A.; PAQUET, L.; RADOVIC-HRAPOVIC, Z.; DESCHAMPS, S.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G. Environmental fate of 2,4-dinitroanisole (DNAN) and its reduced products. **Chemosphere**, v. 119, p. 16-23, 2015.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, v. 11, p. 96-105, 1998.

JEN, J.; CHANG C.; YANG T. C. On-Line Microdialysis-high-performance liquid chromatographic determination of aniline and 2-chloroaniline in polymer industrial wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 930, p. 119-125, 2001.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part. II. Guidelines for primary validation parameters. **Instrumentation Science e Technology**, v. 26, p. 1-18, 1998.

JÖNSSON, J. A. Toward a consensus on calculating peak asymmetry. **LCGC North America**, v. 20, n. 10, p. 920-920, 2002.

KAHNG, H. Y.; KUKOR, J. J.; OH, K. H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 215–221, 2000.

KHATIWADA, R.; ROOT, R. A.; ABRELL, L.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A.; CHOROVER, J. Abiotic reduction of insensitive munition compounds by sulfate green rust. **Environmental Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 259-266, 2018.

LIANG, J.; OLIVARES, C.; FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Microbial toxicity of the insensitive munitions compound, 2,4-dinitroanisole (DNAN), and its aromatic amine metabolites. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 281-287, 2013.

LIMA, Gabriel Victor de. **Avaliação taxonômica de diferentes culturas microbianas, adaptadas à degradação anaeróbia da anilina**. 2023. 49 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

MAHMOUD, M. S., MOSTAFA, M. K.; MOHAMED, S. A.; SOBHY, N. A., NASR, M. Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by aspergillus niger strain isolated from textile wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 547–554, 2017.

MELO, N.; MENEZES, O.; PARAISO, M.; FLORÊNCIO, L.; KATO, M. T.; GAVAZZA, S. Selecting the best electron donor and operational temperature for the rapid biotransformation of the insensitive munitions compound 2,4-dinitroanisole (DNAN) by anaerobic sludge. **Water Science and Technology**, v. 83, n. 11, p. 2691-2699, 2021.

MENEZES, O.; BRITO, R.; HALLWASS, F.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T.; GAVAZZA, S. Coupling intermittent micro-aeration to anaerobic digestion improves tetra-azo dye Direct Black 22 treatment in sequencing batch reactors. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 146, p. 369-378, 2019.

MENEZES, Osmar Luiz Moreira Pereira Fonseca de. **Biotic and abiotic strategies for insensitive munitions compounds remediation**. 2020. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

MENEZES, O.; MELO, N.; PARAISO, M.; FREITAS, D.; FLORÊNCIO, L.; KATO, M. T.; GAVAZZA, S. The key role of oxygen in the bioremoval of 2,4-diaminoanisole (DAAN), the biotransformation product of the insensitive munitions compound 2,4-dinitroanisole (DNAN), over Other electron acceptors. **Chemosphere**, v. 267, 2021.

MOHAMMED, M.; MEKALA, L. P.; CHINTALAPATI, S.; CHINTALAPATI, V., R. New insights into aniline toxicity: aniline exposure triggers envelope stress and extracellular polymeric substance formation in *Rubrivivax Benzoatilyticus* JA2". **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, 2020.

MU, R.; SHI, H.; YUAN, Y.; KARNJANAPIBOONWONG, A.; BURKEN, J. G.; MA, Y. Fast separation and quantification method for nitroguanidine and 2,4-dinitroanisole by ultrafast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 7, p. 3427-3432, 2012.

MUZ, M.; DANN, J. P; JAGER, F.; BRACK, W.; KRAUSS, M.; Identification of mutagenic aromatic amines in river samples with industrial wastewater impact. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 8, p. 4681-4688, 2017.

OLIVARES, C. I.; SIERRA-ALVAREZ, R.; ALVAREZ-NIETO, C.; ABRELL, L.; CHOROVER, J.; FIELD, J. A. Microbial toxicity and characterization of DNAN (bio)transformation product mixtures. **Chemosphere**, v. 154, p. 499-506, 2016.

OLIVARES, C. I.; MADEIRA, C. L.; SIERRA-ALVAREZ, R.; KADOYA, W.; ABRELL, L.; CHOROVER, J.; FIELD, J. A. Environmental Fate of ¹⁴C Radiolabeled 2,4-Dinitroanisole in Soil Microcosms. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 22, p. 13327-13334, 2017.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. de. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PINTO, G. M. F. Como iniciar um desenvolvimento de método por HPLC? CROMVALLab, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://cromvallab.com/2021/02/08/como-iniciar-um-desenvolvimento-de-metodo-por-hplc/>. Acesso em 10 de setembro de 2022. 2021.

POURAN, S.R.; AZIZ, A. R. A.; DAUD, W. M. A. W. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 53–69, 2015.

POWELL, I. J. Insensitive Munitions - Design Principles and Technology Developments. **Propellants Explosives Pyrotechnics**, v. 41, n. 3, p. 409-413, 2016.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance Parameters for Analytical Method Validation: Controversies and Discrepancies among Numerous Guidelines. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, 2020.

RIBANI, M.; CARLA, B. G.; BOTTOLI, M.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, F. C. L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

SANG, W.; CUI, J.; FENG, Y.; MEI, L.; ZHANG, Q.; LI, D.; ZHANG, W. Degradation of aniline in aqueous solution by dielectric barrier discharge plasma: Mechanism and degradation pathways. **Chemosphere**, v. 223, p. 416-424, 2019.

SANTOS NETO, A. J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 71-81, 2010.

SANTOS, V.; DIOGO, J.; PACHECO, M. J. A.; CIRÍACO, L.; MORÃO A.; LOPES, A. Electrochemical degradation of sulfonated amines on SI/BDD electrodes. **Chemosphere**, v. 79, n. 6, p. 637-645, 2010.

SCHROER, Hunter William. **Biotransformation and Photolysis of 2,4-Dinitroanisole, 3-Nitro-1,2,4-Triazol-5-one, and Nitroguanidine**. 2018. 187f. PhD thesis, University of Iowa, Iowa, 2018.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO. Estudo econômico do APL de confecções do agreste. Recife: SEBRAE, 2013. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/Sebrae/PortalSebrae/Anexos/EstudoEconomicodoAPLdeConfeccoesdoAgreste>. Acesso em 03 de agosto de 2022. 2013.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHEN, J. Y.; OU, C. J.; ZHOU, Z. Y.; CHEN, J.; FANG, K. X.; SUN, X. Y.; LI, J. S.; ZHOU, L.; WANG, L. J. Pretreatment of 2,4-dinitroanisole (DNAN) producing wastewater using a combined zero-valent iron (ZVI) reduction and Fenton oxidation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 993-1000, 2013.

SILI, C.; LISHI, F.; CHAOYI, P.; DINGHAO, C.; QINGWEI, G.; SHA, C.; JI, W. Case study on emergency disposal of aniline pollution in Zhanghe river. **Earth and Environmental Science**, v. 267, 2019.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. Ed. New York, John Wiley and Sons, 1997.

SOUZA, Matheus Paraíso. **Combinação de processos microbiológicos redutivos e oxidativos para degradação do compost insensível de munição 2,4-dinitroanisol (DNAN)**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

SUN, W.; YUN L.; MCGUINNESS, L. R.; LUO, S.; HUANG, W.; KERKHOF, L. J.; MACK, E. E.; HÄGGBLUM, M. M.; FENNELL, D. E. Identification of anaerobic aniline-degrading bacteria at a contaminated industrial site. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 11079-11088, 2015.

SVIATENKO, L.; KINNEY, C.; GORB, L.; HILL, F. C.; BEDNAR, A. J.; OKOVYTYYY, S.; LESZCZYNSKI, J. Comprehensive investigations of kinetics of alkaline hydrolysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene), DNT (2,4-dinitrotoluene), and DNAN (2,4-dinitroanisole). **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 17, p. 10465-10474, 2014.

SZCZEPANIK, B.; SŁOMKIEWICZ, P. Photodegradation of aniline in water in the presence of chemically activated halloysite. **Applied Clay Science**, v. 124, p. 31-38, 2016.

TAKEO, M.; OHARA, A.; SAKAE, S.; OKAMOTO, Y.; KITAMURA, C.; KATO, D.I.; NEGORO, S. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ glutamylanilide. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 19, p. 4406–4414, 2013.

TAYLOR, S.; PARK, E.; BULLION, K.; DONTSOVA, K. Dissolution of three insensitive munitions formulations. **Chemosphere**, v. 119, p. 342-348, 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single- laboratory validation of methods of analysis – (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TIMOFEEVA, I.; KANASHINA, D.; KIRSANOV, D.; BULATOV, A. A heating-assisted liquid-liquid microextraction approach using menthol: separation of benzoic acid in juice samples followed by HPLC-UV determination. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 265-270, 2018.

TU, Y.; REN, L. F.; SHAO, J.; HE, Y. Simultaneous removal of aniline and antimony (Sb(V)) from textile wastewater using amidoxime-PAN/PLA nanofiber microsphere supported TiO₂. **Separation and Purification Technology**, v. 286, 2022.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical Chemistry – (IUPAC recommendations). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VILELA, A. C. Döhler é multada em R\$ 350 mil pelo vazamento no rio Cachoeira em Joinville. Florianópolis, 20 de julho de 2012. Disponível em: <https://ndmais.com.br/noticias/dohler-e-multada-em-r-350-mil-pelo-vazamento-no-rio-cachoeira-em-joinville>. Acesso em: 22 de novembro de 2022.

WALSH, M. R.; WALSH, M. E.; TAYLOR, S.; RAMSEY, C. A.; RINGELBERG, D. B.; ZUFELT, J. E.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G.; DIAZ, E. Characterization of PAX-21 insensitive munition detonation residues. **Propellants, Explosives, Pyrotechnics**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2013.

WANG, D.; ZHENG, G.; WANG, S.; ZHANG, D.; ZHOU, L. Biodegradation of aniline by *Candida tropicalis* AN1 isolated from aerobic granular sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 12, p. 2063–2068, 2011.

WANG, C.; FULLER, M. E.; HERATY, L. J.; HATZINGER, P. B.; STURCHIO, N. C. Photocatalytic mechanisms of 2,4-dinitroanisole degradation in water deciphered by C and N dual-element isotope fractionation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, 2021.

WANG, L. H.; HUANG, W. S.; TAI, H. M. Simultaneous determination of p-aminobenzoic acid and its metabolites in the urine of volunteers, treated with p-aminobenzoic acid sunscreen formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1430-1436, 2007.

XU, Y.; HUANG, T.; WANG, S.; MENG, M.; YAN, Y. SiO₂-Coated molecularly imprinted sensor based on si quantum dots for selective detection of catechol in river water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, 2022.