



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BAURU – FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

THAMIRIS SCARPARO CHIQUNATTO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS INGREDIENTES
ATIVOS IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS EM
PRODUTOS TÉCNICO FORMULADOS POR CLUE-
DAD**

Bauru

2016

THAMIRIS SCARPARO CHIQUNATTO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS
IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS EM PRODUTOS TÉCNICO
FORMULADOS POR CLUE-DAD**

Trabalho de conclusão de Curso
apresentado ao curso de
Licenciatura em Química da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como
requisito parcial para obtenção do
título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bauru
2016

THAMIRIS SCARPARO CHIQUINATTO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS
IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS EM PRODUTOS TÉCNICO
FORMULADOS POR CLUE-DAD**

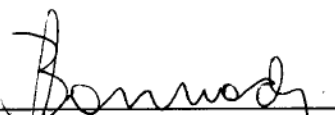
Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciatura em Química sob a orientação do Professor Doutor Daniel Rinaldo.

Banca Examinadora:



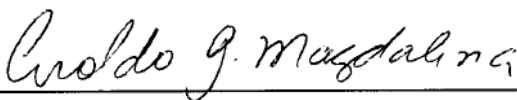
Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho



Prof. Dr. Gilbert Bannach

Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho



Prof. Dr. Aroldo Geraldo Magdalena

Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho

Bauru, 28 de Janeiro de 2016.

Dedico este trabalho, a DEUS que me abençoou e me guiou em toda esta jornada e aos meus pais e familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos, em especial à minha mãe Criseide que sempre esteve ao meu lado dando suporte em todos os momentos e situações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre me guiar e me acompanhar nos caminhos mais tortuosos e me amparar nas horas mais difíceis.

Agradeço aos meus pais João Marcos e Criseide por me ampararem sempre e a todos meus familiares, por todos os ensinamentos, apoio e compreensão que apenas eles poderiam me proporcionaram.

Agradeço a todos os meus professores pela dedicação, atenção e paciência, em especial ao meu professor orientador Dr. Daniel Rinaldo, que teve dedicação junto a mim na conclusão deste projeto.

Agradeço ao Dr. Junior César Modesto por ter aberto as portas de sua empresa JMBioAnalises para a realização das análises.

E por último, agradeço a todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado para me apoiar nesta jornada e em especial ao meu maior companheiro de todos os anos de faculdade e da vida, Diego Sanches, que me ensinou técnicas de sua importância para a conclusão deste projeto, me incentivou e me deu suporte, me mostrando que mesmo nos momentos mais difíceis sempre há uma saída, que as dificuldades vividas é que nos diferencia dos demais.

“A ciência sem religião é paralítica.
E a religião sem a ciência é cega.”
(Albert Einstein)

RESUMO

O emprego de pesticidas no controle de pragas nas lavouras é uma prática bastante utilizada no Brasil e no mundo. Tratam-se de substâncias químicas ou agentes biológicos que agem impedindo, destruindo, repelindo ou mitigando os danos causados por diversas pragas em seu cultivar. Para que o tratamento seja eficaz é necessário aplicar doses corretas no controle de cada praga, para cada cultura.

Diante deste contexto, este projeto teve como objetivo quantificar os teores dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós presentes em produtos técnicos formulados e comparar com o informado em suas bulas comerciais.

As análises foram realizadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo (CLUE-DAD).

A comparação do tempo de retenção e espectro UV das substâncias presentes nas amostras com os dos padrões comerciais permitiram a identificação inequívoca de Imidacloprida e Clorpirifós, proporcionando excelente especificidade e seletividade do método.

No âmbito de determinações de princípios ativos em produtos formulados, o método desenvolvido apresentou boa sensibilidade nas condições aplicadas, com limites de detecção ($4,2 \cdot 10^{-2}$ mg L⁻¹ para Imidacloprida e $1,1 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ para Clorpirifós) e quantificação ($1,4 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ para Imidacloprida e $3,6 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ para Clorpirifós) satisfatórios para as concentrações encontradas nas matrizes analisadas. Além disso, bons resultados foram obtidos com relação à precisão, com valores de coeficiente de variância na faixa de 0,6 a 0,7% para repetibilidade (intra-dia) e 0,4 a 0,58% para a precisão intermediária (inter-dia).

A exatidão do método foi determinada por testes de recuperação, cujos valores ficaram compreendidos na faixa de 98 a 102%. Tendo em vista as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, Lei nº 7802), esses valores evidenciam boa exatidão do método empregado.

As concentrações obtidas na quantificação dos ingredientes ativos nos produtos formulados apresentaram valores dentro do permitido pela ABNT, sendo 60,1% (m/v) $\pm$ 0,6% para Imidacloprida e 48,3% (m/v) $\pm$ 0,4% para Clorpirifós, os valores dos teores expressos em bula são 60,0% (m/v) e 48,0% (m/v), respectivamente.

Palavras-chave: Imidacloprida, Clorpirifós, CLUE.

ABSTRACT

The use of pesticides to manage pest problems in agriculture has become a common practice around the world. Pesticides consist in chemical substances or biological agents that act preventing, destroying, repelling or mitigating the damage caused by pests in agriculture. In order to a successful treatment, the correct dosage of pesticide has to be applied for each kind of culture.

In this context, this project aims to quantify the levels of the active ingredients Imidacloprid and Chlorpyrifos present in formulated technical products and compare with the reported in their commercial leaflets.

The analyzes were performed by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to a photodiode array detector (CLUE-DAD). The identification of Imidacloprid and Chlorpyrifos in the samples was realized by comparison of the time of retention and UV spectre of those substances with the commercials patterns, resulting in a excellent method specificity of the method.

In the scope of determination of active ingredients in formulated products, the method developed showed good sensitivity in the applied conditions, with suitables limits of detection ($4.2 \cdot 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ for Imidacloprid and $1.1 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ to Chlorpyrifos) and quantitation ($1.4 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ and Imidacloprid $3.6 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ to Chlorpyrifos) for the concentrations found in matrices analyzed. Furthermore, good results were obtained to the method accuracy with coeficiente of variance values in the range of 0.6 to 0.7% for repeatability (intra-day) and 0.4 to 0.58% for intermediate precision (inter-day).

The accuracy of the method was determined by recovery tests, the values were comprised in the range of 98 102%. According to the recommendations of the Associação Brasileira de Normas Técnicas, these values show good accuracy of the method.

The concentrations obtained in the quantification of the active ingredients in formulated products showed values within permitted by ABNT, 60.1% (w / v) $\pm$ 0.6% to Imidacloprid and 48.3% (w / v) $\pm$ 0.4% to Chlorpyrifos, the values of those contents, in bull is 60.0% (m / v) and 48.0% (w / v), respectively.

Keywords: Imidacloprid, Chlorpyrifos, CLUE.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FLUXOGRAMA DOS PARÂMETROS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.	16
FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DO INGREDIENTE ATIVO IMIDACLOPRIDA.	17
FIGURA 3: ESTRUTURA MOLECULAR DO INGREDIENTE ATIVO CLORPIRIFÓS.	18
FIGURA 4: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO IMIDACLOPRIDA.	37
FIGURA 5: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO CLORPIRIFÓS.	38
FIGURA 6: CROMATOGRAMA DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 8,4 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 8,8 MG L ⁻¹ .	39
FIGURA 7: CROMATOGRAMA DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 18,9 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 19,8 MG L ⁻¹ .	39
FIGURA 8: CROMATOGRAMA DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 37,7 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 32,9 MG L ⁻¹ .	40
FIGURA 9: CROMATOGRAMA DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 60,8 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 48,3 MG L ⁻¹ .	40
FIGURA 10: CROMATOGRAMA DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 71,3 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 61,5 MG L ⁻¹ .	41
FIGURA 11: CROMATOGRAMAS DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 104,8 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 85,6 MG L ⁻¹ .	41
FIGURA 12: CROMATOGRAMAS DA PRIMEIRA INJEÇÃO DA ANÁLISE EM TRIPLICATA DA SOLUÇÃO DE IMIDACLOPRIDA 157,2 MG L ⁻¹ E CLORPIRIFÓS 120,8 MG L ⁻¹ .	42
FIGURA 13: CROMATOGRAMA DO BRANCO DOS SOLVENTES UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS CONTAMINANTES NA REGIÃO DOS PICOS DE IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS.	43
FIGURA 14: ESPECTROS UV DO PADRÃO AUTÊNTICO DE IMIDACLOPRIDA UTILIZADO COMO ESPECTRO DE COMPARAÇÃO PARA AS AMOSTRAS.	43
FIGURA 15: ESPECTROS UV DO PADRÃO AUTÊNTICO DE CLORPIRIFÓS UTILIZADO COMO ESPECTRO DE COMPARAÇÃO PARA AS AMOSTRAS.	44
FIGURA 16: CROMATOGRAMA DOS PICOS DE IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS NAS CONCENTRAÇÕES CALCULADAS DE 8,4 MG L ⁻¹ E 8,8 MG L ⁻¹ , RESPECTIVAMENTE E DOS RUÍDOS UTILIZADOS COMO BASE PARA OS CÁLCULOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.	45
FIGURA 17: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DAS ANÁLISES PARA DETERMINAÇÃO DA REPETITIVIDADE.	47
FIGURA 18: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DAS ANÁLISES PARA DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE (DIA 1).	50
FIGURA 19: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DAS ANÁLISES PARA DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE (DIA 2).	50
FIGURA 20: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO AMOSTRA CONSIDERADA DA ANÁLISE DE RECUPERAÇÃO.	54

FIGURA 21: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA SOLUÇÃO AMOSTRA FORTIFICADA COM NÍVEL INFERIOR (ANÁLISE 1).	54
FIGURA 22: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA SOLUÇÃO AMOSTRA FORTIFICADA COM NÍVEL NOMINAL (ANÁLISE 2).	55
FIGURA 23: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA SOLUÇÃO AMOSTRA FORTIFICADA COM NÍVEL SUPERIOR (ANÁLISE 3).	55
FIGURA 24: CROMATOGRAMA DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO MÉTODO (ROBUSTEZ I – ANÁLISE 1).	59
FIGURA 25: CROMATOGRAMA DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO MÉTODO (ROBUSTEZ II – ANÁLISE 2).	59
FIGURA 26: CROMATOGRAMA DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO MÉTODO (ROBUSTEZ III – ANÁLISE 3).	60
FIGURA 27: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS (AMOSTRA 1A).	62
FIGURA 28: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS (AMOSTRA 1B).	62
FIGURA 29: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS (AMOSTRA 2A).	63
FIGURA 30: CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DE TEOR DOS INGREDIENTES ATIVOS IMIDACLOPRIDA E CLORPIRIFÓS (AMOSTRA 2B).	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO I - RAMPA DE ELUIÇÃO DOS INGREDIENTES ATIVOS.....	22
QUADRO II - DILUIÇÕES DAS SOLUÇÕES PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE IMIDACLOPRIDA.....	24
QUADRO III - DILUIÇÕES DAS SOLUÇÕES PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CLORPIRIFÓS.	24
QUADRO IV – VALOR LIMITE PARA COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DO ANALITO.....	28
QUADRO V - VALOR LIMITE PARA O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DO ANALITO.....	32
QUADRO VI - VALORES CRÍTICOS PARA O TESTE DE GRUBBS (GC).....	33
QUADRO VII - CONCENTRAÇÃO, RESPOSTA DAS SOLUÇÕES PADRÕES UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE IMIDACLOPRIDA.	36
QUADRO VIII - CONCENTRAÇÃO, RESPOSTA DAS SOLUÇÕES PADRÕES UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CLORPIRIFÓS.....	36
QUADRO IX - DADOS DA REPETITIVIDADE PARA IMIDACLOPRIDA.....	46
QUADRO X - DADOS DA REPETITIVIDADE PARA CLORPIRIFÓS.	46
QUADRO XI - DADOS DA REPRODUTIBILIDADE PARA IMIDACLOPRIDA.....	48
QUADRO XII - DADOS DA REPRODUTIBILIDADE PARA CLORPIRIFÓS.	49
QUADRO XIII - DADOS DE RECUPERAÇÃO PARA IMIDACLOPRIDA.....	52
QUADRO XIV - DADOS DE RECUPERAÇÃO PARA CLORPIRIFÓS.....	53
QUADRO XV - PARÂMETROS ANALÍTICOS E VARIAÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	56
QUADRO XVI - DADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO PARA IMIDACLOPRIDA.....	57
QUADRO XVII - DADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO PARA CLORPIRIFÓS.....	58
QUADRO XVIII - RESULTADOS DA ANÁLISE DO TEOR DE IMIDACLOPRIDA.	61
QUADRO XIX - RESULTADOS DA ANÁLISE DO TEOR DE CLORPIRIFÓS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E CIGLAS

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas;

Abs = Absorbância;

Anvisa = Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

BPL = Boas Práticas de Laboratório;

CAS = *Chemical Abstracts Service*;

CLUE = Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência;

CV = Coeficiente de Variação;

DAD = Detector de arranjo de fotodiodos;

EC = Concentrado Emulsionável;

IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;

IUPAC = União Internacional de Química Pura e Aplicada;

FM = Fase móvel;

G1 e Gn e Gc = Teste de Grubbs;

K = *Fator de abrangência*;

LD = Limite de Detecção;

LQ = Limite de Quantificação;

m = Massa;

mΩ = Mi Lion;

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

OMS = Organização Mundial da Saúde;

PTFE = Politetrafluoretileno (teflon);

RBC = Registro Brasileiro de Calibração;

RET = Registro Especial Temporário;

SC = Suspensão Concentrada;

TR = Tempo de Retensão;

U = Incerteza expandida/Incerteza Padrão;

v = Volume.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Imidacloprida	16
1.2. Clorpirifós.....	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Substâncias de Referência	20
3.2. Produtos Formulados.....	20
3.3. Placebo	20
3.4. Reagentes e Consumíveis Utilizados.....	21
3.5. Equipamentos	21
3.6. Preparação das amostras	21
3.7 Condições Cromatográficas	22
3.8. Tratamento dos dados	22
3.9. Parâmetros para a Validação do Método Analítico	22
3.9.1. Especificidade e Seletividade	22
3.9.2. Linearidade e Faixa de Trabalho (Curva de calibração)	23
3.9.3. Sensibilidade	25
3.9.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	26
3.9.5. Repetitividade.....	26
3.9.6. Reprodutibilidade Interna.....	27
3.9.7. Recuperação.....	27
3.9.8. Robustez	29
3.9.9. Teor do Produto Formulado	29
3.10. Fórmulas, Tratamentos Estatísticos e Limites do Método.....	30
3.10.1. Média aritmética	30
3.10.2. Desvio padrão	31
3.10.3. Coeficiente de Variação (CV)	31
3.10.4. Teste de Grubbs (G1/Gn).....	32
3.10.5. Incerteza de Medição	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Linearidade e Faixa de Trabalho (Curvas de calibração)	35

4.2 – Sensibilidade.....	42
4.3 – Limites de Detecção e Quantificação.....	44
4.4 – Repetitividade	45
4.5 – Reprodutibilidade Interna	47
4.6 – Recuperação	51
4.7 – Robustez.....	56
4.8 – Teor do Produto Formulado	60
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida é uma técnica físico-química que fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura denominado como amostra ou analito, que é introduzida no equipamento através de um injetor automático ou manual. A migração ocorre devido as diferentes interações entre o analito e duas fases imiscíveis, sendo uma fase móvel, um fluido orgânico ou inorgânico que arrasta os componentes da amostra, passando pela outra fase denominada como fase estacionária, a coluna cromatográfica, que pode ser inorgânica ou um suporte inorgânico revestido com partículas orgânicas, como, por exemplo, C₈ e C₁₈.

Os analitos são separados na coluna cromatográfica e quando eluídos chegam ao detector que emite um sinal (pico) naquele momento da análise. Cada analito terá um tempo de eluição diferente devido às diferentes interações apresentadas pelos mesmos com ambas as fases. Ao final da análise, o software registra um gráfico com as informações necessárias para a quantificação e identificação de cada analito, o cromatograma (Nascimento, A., 2011).

Devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos e os mais diversos campos da indústria e pesquisas, é uma técnica que pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (COLLINS, 1997).

Um dos campos de maior utilização é a química analítica, principalmente em estudos que envolvem a determinação de agrotóxicos em amostras ambientais e produtos formulados. A cromatografia é utilizada tanto para a confiabilidade do(s) teor(es) do(s) ingrediente(s) ativo(s) em produtos formulados, quanto na determinação de resíduos de agrotóxicos em água, solo, matrizes animais, vegetais etc.

No Brasil, todo e qualquer produto técnico formulado utilizado no controle de pragas em lavouras deve antes ser analisado por laboratórios creditados pela Boas Práticas de Laboratoriais (BPL) e que possuem certificação de três órgãos de controle que exigem excelência nas análises: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), responsável pela classificação toxicológica; o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pela avaliação da

eficácia agrônômica registrante e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), responsável pela avaliação de periculosidade ambiental. Cada produto a ser comercializado como agrotóxico recebe um Registro Especial Temporário (RET), destinado a atribuir o direito de utilização para finalidades apenas experimentais. O RET tem duração de três anos, que pode ser renovável por igual período. Os produtos formulados possuem ingredientes ativos que são utilizados em grande escala em diversos agrotóxicos com diferentes formulações. Entre os ingredientes ativos mais utilizados estão o Imidacloprida e Clorpirifós.

Para a validação de um método analítico são realizados as análises dos seguintes parâmetros.

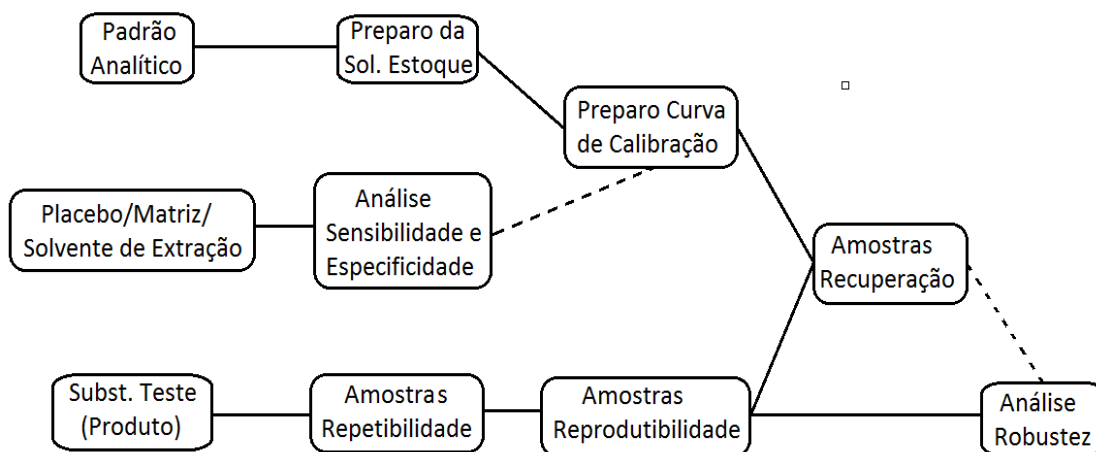


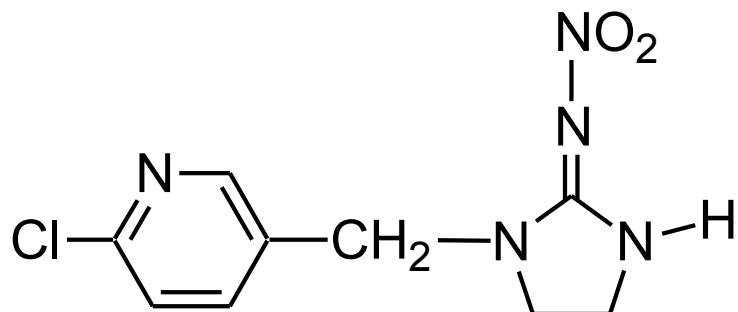
Figura 1: Fluxograma dos parâmetros para a validação de método analítico.

1.1. Imidacloprida

O ingrediente ativo imidacloprida (Figura 2) é um composto cristalino incolor com odor característico fraco, altamente tóxico, estando presente na classe toxicológica III pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Apresenta fórmula molecular $C_9H_{10}ClN_5O_2$ e identificação pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como N-[1-[(6-cloropiridin-3-il)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitramida, apresenta massa molecular de $255,66 \text{ g mol}^{-1}$, pertencente ao grupo químico Neonicotinóide, e pertencente à classe dos inseticidas, registrado sob o CAS (*Chemical Abstracts Service*) 138261-41-3. Foi relatada primeiramente por A.

Elbert et al. (1990), e introduzido ao mercado em 1991 pela empresa Multinacional Bayer Cropscience (Wise; Loveys, 2002).

Figura 2: Estrutura molecular do ingrediente ativo Imidacloprida.



Fonte: Wise e Loveys (The e-Pesticide Manual, 2002).

O imidacloprida é um composto amplamente utilizado no controle de diversas pragas, podendo apresentar diversas formulações tais como, Pó seco (DP); Suspensão Concentrada para Tratamento de Sementes (FS); Granulado (GR); Suspensão Concentrada (SC); Concentrado Solúvel (SL); Granulado Dispersível (WG); Polvilho Fino (GP); Pó para preparação da pasta em água (WS), apresentando diferentes concentrações, podendo variar de 20% m/v a 70% m/m.

Atualmente, o imidacloprida é comercializado por diversos fabricantes apresentando nomes comerciais variados, como por exemplo: Confidor; Vencedor; Gaúcho 600 A; Gaúcho FS (Bayer) Imidacloprida 600 FS; Saluzi 600 FS (Rotam); Nuprid 700 WG (Nufarm); Bandit® 350 SC (Arysta); Emerge (Syngenta); Picus (Cheminova), entre outros. Também pode ser encontrado em formulações com demais ingredientes ativos, como por exemplo: Amparo (Imidacloprida + Thiodicarbe); Hombro® Ultra (Tebuconazole + Imidacloprida); Movento® Energy (Spirotetramate + Imidacloprida), (Bayer); Rocks (Bifentrina + Imidacloprida) (FMC), entre outros.

O mecanismo de ação do imidacloprida é bem estabelecido. Ele atua como um antagonista nas ligações com receptores nicotínicos pós-sinápticos no sistema nervoso central de certos insetos (Wise; Loveys, 2002).

Quando aplicado como produto químico age como um inseticida sistêmico com atividade translaminar e com contato e ação no estômago das pragas a

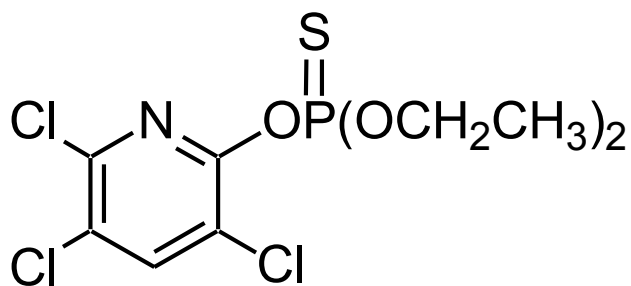
serem combatidas. É uma substância facilmente absorvida por plantas, com boa ação anti sistêmica. Utilizado no controle de insetos sugadores, tais como, pulgões, tripses e mosca-branca. É eficaz também contra insetos de solo, cupins e algumas espécies de insetos cortantes, tais como gorgulho-aquático e colorado besouro. Porém, não tem efeito sobre nematóides e ácaros. O Imidacloprida também pode ser encontrado em medicamentos veterinários no tratamento de pulgas em cães e gatos (Wise; Loveys, 2002).

Pode ser aplicado de diversas formas, como, em tratamento de sementes, tratamento do solo e tratamento foliar, a dose ao ser aplicada em cada tratamento e mesmo entre tratamentos iguais varia de acordo com a praga, cultura e produto a ser aplicado. Esses tratamentos são utilizados em diversas culturas, sendo as mais comuns, arroz, algodão, cereais, milho, beterraba, batatas, legumes, citros, pomóideas (árvores e arbustos do gênero cujos frutos comestíveis são pomos como a maçã e a pera) e frutas de caroço (Wise; Loveys, 2002).

1.2. Clorpirifós

O ingrediente ativo Clorpirifós (figura 3) é um composto cristalino incolor com odor mercaptano suave, tóxico, estando presente na classe toxicológica II pela OMS. Apresenta fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ e identificação pela IUPAC como O, O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-il fosforotioato, de massa molecular 350,59 g/mol, pertencente ao grupo químico Organofosforado e às classes dos inseticidas, formicidas e acaricidas, registrado pelo CAS 2921-88-2. Foi relatada primeiramente por E. E Kenaga et al. (1965) pelo Journal of Economic Entomology e introduzido ao mercado em 1965 pela empresa Dow AgroSciences (Wise; Loveys, 2002).

Figura 3: Estrutura molecular do ingrediente ativo Clorpirifós.



Fonte: Wise e Loveys (The e-Pesticide Manual, 2002).

O Clorpirifós é um composto vastamente utilizado no controle de diversas pragas, podendo apresentar diversas formulações tais como, DP; Concentrado Emulsionável (CE); GR; Ultra Baixo Volume (UL); WG; Pó Molhável (WP); apresentando diferentes concentrações. Na atualidade é comercializado por diversos fabricantes apresentando nomes comerciais variados, como por exemplo, Império; Patrimônio, Lorsban 480 BR; Vertex (Dow AgroSciences); Astro (Bayer); Catcher 480 EC (Cheminova); Clorpirifós Fersol 480 EC (Fersol); Curinga (Milenia); Klorpam (Nufarm), entre outros. Também pode ser encontrado em formulações misturado com demais ingredientes ativos.

Pode ser utilizado como agente biológico atuando como inibidor de colinesterase. Age como um inseticida anti-sistêmico em contato com estômago e órgãos respiratórios. Usado no controle de Coleoptera (Besouros), Diptera (moscas, mosquitos, pernilongos, borrachudos), Homoptera (cigarras, cigarrinhas, pulgões e cochonilhas) e Lepidoptera (Borboletas e Mariposas) no solo ou na folhagem em mais de 100 culturas, incluindo pomóideas, frutos de caroço, citrus, as culturas de nozes, morangos, figos, bananas, videiras, hortaliças, batata, beterraba, tabaco, soja, feijão, girassol, batata doce, amendoim, arroz, algodão, alfafa, cereais, milho, sorgo, aspargos, plantas ornamentais em estufa e ao ar livre, relvado, entre outras. Também é usado para o controle de pragas domésticas (Baratas, Moscas, Cupins), mosquitos (larvas e adultos) e em biotérios.

O Clorpirifós é anti-fitotóxico para a maioria das espécies de plantas quando utilizado como recomendado. É um composto incompatível com metais alcalinos. Pode ser aplicado de diversas formas, em diferentes concentrações (Wise; Loveys, 2002).

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método para determinação do teor de Imidacloprida e Clorpirifós, presentes em produtos técnicos e formulados, por CLUE-DAD, seguindo as normas e limites determinados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, Lei nº 7802; ABNT NBR 14029:2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas em laboratório particular, JMBioAnalises, todas as vidrarias e equipamentos utilizados apresentam registro de calibração brasileira (RBC), sendo assim equipamentos precisos que apresentam em seu RBC o erro estimado (U) e o fator de abrangência K, ambos utilizados no cálculo da incerteza do método para ambos os ativos.

3.1. Substâncias de Referência

Os padrões analíticos de Imidacloprida e Clorpirifós utilizados nas análises foram adquiridos da *Sigma Aldrich*[®] com 98,89 e 99,805% de pureza, respectivamente.

3.2. Produtos Formulados

As substâncias testes utilizadas neste estudo foram adquiridas em loja agropecuária. A Substância teste utilizada para a análise do teor do ingrediente ativo Imidacloprida é uma suspensão concentrada para tratamento de sementes (SC) contendo concentração declarada de 600,0 g L⁻¹ (60,0% m/v) do ingrediente ativo Imidacloprida, inseticida sistêmico do grupo neonicotinóide. Para a análise de teor do ingrediente ativo Clorpirifós foi utilizada uma substância teste de formulação Concentrado Emulsionável (EC) contendo concentração declarada de 480,0 g L⁻¹ (48,0% m/v) do ingrediente ativo Clorpirifós, é um inseticida de contato de ingestão do grupo químico organofosforados.

Ambas as substâncias são largamente utilizadas em várias matrizes de lavouras.

É importante ressaltar que os dois produtos estavam dentro do prazo de validade e apresentavam características físicas adequadas.

3.3. Placebo

Como as amostras analisadas neste trabalho foi uma mistura de duas substâncias distintas não houve análise do placebo.

3.4. Reagentes e Consumíveis Utilizados

Acetonitrila – Bio-Grade, lote: 963591;

Água ultrapura, 18,2 mΩ;

Padrão Imidacloprida - 98,89%; *Sigma Aldrich*[®];

Padrão Clorpirifós – 99,80%; *Sigma Aldrich*[®].

3.5. Equipamentos

Agitador Vórtex (IKA Genius 3);

Água Milli-Q3 (Millipore);

Balança Analítica Ohaus (precisão de cinco casas - 0,0050 a 210,0000 g);

Balões Volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0 e 250,0 mL, todos com RBC;

Coluna (*Zorbax Eclipse Plus C18* (2.1 x 50 mm, 1,8 μm));

Cromatógrafo Líquido UPLC-DAD - *Agilent*[®] – 1290 *Infinity*;

Injetor automático (*Agilent*[®] – 1290 *Infinity*);

Lavadora Ultrassônica (Unique);

Micropipeta P100 – Pipetman, Gilson - P1000 (20,0 a 100,0 μL);

Micropipeta P1000 – Pipetman, Gilson - P1000 (200,0 a 1000,0 μL);

Provetas de 500,0 mL.

3.6. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas medindo-se a massa entre 10,0 a 20,0 mg de cada produto a ser analisado em balão volumétricos de 10,0 mL dissolvidos em Água Ultrapura (Milli-Q) utilizando balança analítica. As amostras foram submetidas à agitação em vortex por aproximadamente 15 segundos e posteriormente submetidas ao procedimento de lavagem ultrassônica por 10 minutos; retirou-se para repouso até atingir temperatura ambiente. Em seguida transferiu-se 0,50 mL utilizando micropipeta Pipetman, Gilson - P1000, para balão volumétrico de 5,0 mL e aferiu-se o mesmo com solução Acetonitrila:Água (1:1). Transferiu-se para *vial* utilizando membranas filtrantes *Allcrom* de 0,22 μm – PTFE-Hidrofilica e analisou-se em CLUE – DAD.

3.7 Condições Cromatográficas

Equipamento: UPLC - DAD - Agilent - 1290 *infinity*;

Injetor: Automático;

Coluna (Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,8 µm));

Temperatura do Forno: 36 °C;

Comprimento de onda: 290 nm;

Volume de Injeção: 3,0 µL;

Fase Móvel: Ambas degaseificadas em lavadora ultrassônica durante 30 minutos.

(A) Água - 1% CH₂O₂ (v/v);

(B) Acetonitrila

Quadro I - Rampa de eluição dos ingredientes ativos.

Tempo (min.)	Fase A (%)	Fase B (%)	Vazão (mL min ⁻¹)
00:00	50	50	0,350
01:00	25	75	0,350
02:50	25	75	0,350
02:60	50	50	0,350
04:00	50	50	0,350

3.8. Tratamento dos dados

Para a quantificação de dados foi utilizado o *software Agilent 1290 (offline)*. Para a determinação de repetibilidade, reprodutibilidade, recuperação e robustez foram utilizados os valores das concentrações apresentadas nos cromatogramas em mg L⁻¹. Para a quantificação da amostra foi utilizado a relação área do pico da amostra/área do pico apresentado no ponto mais próximo da curva.

3.9. Parâmetros para a Validação do Método Analítico

3.9.1. Especificidade e Seletividade

Tal análise é realizado normamente com o branco do placebo/branco da amostra matriz, porém, como as substâncias analisadas provém de uma mistura de duas substâncias, não há placebo da mesmas, assim o teste de especificidade e seletividade foi realizado com análise do branco dos solventes utilizados para extração das amostras e comparando os espectros UV de cada substância nas amostras com o espectro UV apresentado pelas substâncias puras. Para essa

determinação foram analisados: i) 3,0 µL da solução acetonitrila:água (1:1). A análise e a comparação dos espectros foram realizadas para avaliar uma possível presença de interferentes na região onde os picos de Imidacloprida e Clorpirifós são detectados. O espectro UV de Imidacloprida apresenta absorções máximas (λ_{max}) nos comprimentos 220 e 270 nm, e o do Clorpirifós apresenta λ_{max} em 234 e 290 nm.

3.9.2. Linearidade e Faixa de Trabalho (Curva de calibração)

A curva de calibração é construída para quantificar as amostras a serem analisadas na validação analítica do estudo, é a primeira etapa a ser realizada, para tal procedimento primeiramente é realizado o preparo das soluções estoques a serem utilizadas na construção das curvas de calibração.

A linearidade foi determinada através das curvas de calibração dos padrões analíticos Imidacloprida e Clorpirifós. Para a construção da curva de calibração a norma ABNT NBR 14029:2005 requer no mínimo sete pontos, diferindo as concentrações em ordem crescente, com análise em triplicata de cada um deles. O coeficiente de regressão/correlação da reta deve ser superior a 0,97.

Para tal análise as curvas de calibração foram construídas a partir da análise, em triplicata, de sete soluções contendo diferentes concentrações dos padrões analíticos previamente preparados.

No preparo da solução estoque de Imidacloprida utilizou-se balão volumétrico de 10,0 mL, $1,06 \cdot 10^{-1}$ mg do padrão de pureza de 98,89% foram pesados e solubilizado em acetonitrila, a concentração final obtida foi de $1,1 \cdot 10^{-3}$ mg L⁻¹. A partir da diluição desta solução estoque foram preparadas outras sete soluções padrões.

A identificação das soluções padrões, as alíquotas de diluições e as respectivas concentrações finais destas soluções estão apresentadas no Quadro II.

Quadro II - Diluições das soluções para a construção da curva de calibração de Imidacloprida.

Alíquota da Solução Estoque e/ou Padrão (mL)	Volume Final (mL)	Concentração da Solução Padrão Final (mg L⁻¹)	Identificação da Solução Padrão Final
0,040 Sol. Estoque	5,0	8,4	Solução A
0,090 Sol. Estoque	5,0	$1,9 \cdot 10^1$	Solução B
0,180 Sol. Estoque	5,0	$3,8 \cdot 10^1$	Solução C
0,290 Sol. Estoque	5,0	$6,1 \cdot 10^1$	Solução D
0,340 Sol. Estoque	5,0	$7,2 \cdot 10^1$	Solução E
0,500 Sol. Estoque	5,0	$1,1 \cdot 10^2$	Solução F
0,750 Sol. Estoque	5,0	$1,6 \cdot 10^2$	Solução G

No preparo da solução estoque de Clorpirifós utilizou-se balão volumétrico de 10,0 mL, $1,10 \cdot 10^1$ mg do padrão de pureza de 99,80% foram pesados e solubilizado em acetonitrila, a concentração final obtida foi de $1,1 \cdot 10^3$ mg L⁻¹. A partir da diluição desta solução estoque foram preparadas outras sete soluções padrões.

A identificação das soluções padrões, as alíquotas de diluições e as respectivas concentrações finais destas soluções estão apresentadas no Quadro III.

Quadro III - Diluições das soluções para a construção da curva de calibração de Clorpirifós.

Alíquota da Solução Estoque e/ou Padrão (mL)	Volume Final (mL)	Concentração da Solução Padrão Final (mg L⁻¹)	Identificação da Solução Padrão Final
0,040 Sol. Estoque	5,0	8,8	Solução A
0,090 Sol. Estoque	5,0	$2,0 \cdot 10^1$	Solução B
0,150 Sol. Estoque	5,0	$3,3 \cdot 10^1$	Solução C
0,220 Sol. Estoque	5,0	$4,8 \cdot 10^1$	Solução D
0,280 Sol. Estoque	5,0	$6,2 \cdot 10^1$	Solução E
0,390 Sol. Estoque	5,0	$8,6 \cdot 10^1$	Solução F
0,550 Sol. Estoque	5,0	$1,2 \cdot 10^2$	Solução G

Para o preparo das soluções estoques utilizadas na construção das curvas de calibração e posteriormente na fortificação da amostra matriz para a análise de recuperação utilizou-se a equação 1.

Equação 1 - Solução Padrão

$$C = \frac{m}{v} \cdot p$$

Onde:

C = concentração final (mg L⁻¹);

m = massa pesada (mg);

v = volume de diluição (L);

p = pureza (%).

Para os cálculos das concentrações de cada ponto das curvas de calibração utilizou-se a equação 2.

Equação 2 - Solução Padrão Curva de Calibração

$$C_c = \frac{C \cdot A}{v}$$

Onde:

C_c = concentração da solução padrão final (mg L⁻¹);

C = concentração final (mg L⁻¹);

A = alíquota retirada para diluição (mL);

v = volume de diluição (mL).

3.9.3. Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada pelo coeficiente angular da curva de calibração, conforme a equação 3:

Equação 3 – Coeficiente Angular da Curva de Calibração:

$$S = \frac{dx}{dc}$$

Onde:

S = sensibilidade

dx = variação da resposta

dc = variação da concentração

3.9.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Detecção Instrumental é definido como sendo a menor concentração do analito que pode ser detectado com segurança. É determinado como sendo a concentração ou quantidade que resulta em sinal analítico no mínimo três vezes o sinal ruído.

O Limite de Quantificação do Método é definido como sendo a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e veracidade. É determinado como sendo a concentração ou quantidade que resulta em sinal analítico no mínimo dez vezes o sinal ruído.

Para os cálculos dos LD Instrumental e LQ do método determinou-se a altura dos picos dos analitos nos cromatogramas de menor concentração das curvas. Determinou-se a altura dos ruídos em três diferentes pontos deste cromatograma e calculou-se a média das alturas. Para obtenção da razão Sinal/Ruído, dividiu-se o valor do sinal (pico dos analitos) pelo valor médio do ruído encontrado. Utilizando os dados da relação Sinal/Ruído dos picos de Imidacoprida e Clorpirifós com suas respectivas concentrações, calculou-se o limite de detecção (regra de três simples). O LD foi definido como sendo a concentração dos analitos que produz um sinal três vezes a relação Sinal/Ruído, e o LQ foi definido como sendo a concentração dos analitos que produz um sinal dez vezes a relação sinal/ruído.

3.9.5. Repetitividade

A análise de repetitividade é realizada para avaliar se o método cromatográfico é um método repetitivo. Para avaliar tal parâmetro a norma ABNT NBR 14029:2005 requer que sejam preparadas no mínimo sete amostras independentes da mesma amostra, mantendo o mesmo analista, mesmo método, mesmo equipamento, mesmo laboratório e em instantes sucessivos.

Para a análise da repetibilidade foram realizadas sete pesagens independentes da mesma amostra, com concentração aproximada de $5,2 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ de Imidacloprida e $5,8 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ de Clorpirifós. Para tal avaliação foram utilizadas as sete soluções da reprodutibilidade do dia um.

3.9.6. Reprodutibilidade Interna

A análise de reprodutibilidade é realizada para avaliar se o método cromatográfico é um método reprodutivo, ou seja, que reproduz os dados obtidos mesmo com variação de um dos parâmetros de preparo ou análise das amostras. Para avaliar tal parâmetro a norma ABNT NBR 14029:2005 requer que sejam preparadas no mínimo sete amostras independentes da mesma amostra, variando um ou mais dos parâmetros, equipamento, tempo de preparo ou analista.

Para a análise da reprodutibilidade do método foram preparadas 14 amostras de aproximadamente $5,2 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ de Imidacloprida e $5,8 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ de Clorpirifós, variando entre elas o tempo de preparo, sendo que, sete amostras foram preparadas em um dia e sete amostras no dia sucessivo, as demais condições foram mantidas. O preparo das amostras está descrito no item 3.6 (Preparo das Amostras).

3.9.7. Recuperação

A análise de recuperação é realizada para avaliar se o método cromatográfico é um método de boa recuperação, para isso é preparado um branco da amostra matriz e a mesma é fortificada com a solução estoque dos padrões analíticos. Para avaliar tal parâmetro a norma ABNT NBR 14029:2005 requer que sejam preparados no mínimo três fortificações de níveis diferentes, sendo uma inferior, uma nominal e uma superior, para cada ponto definido deve-se analisar no mínimo sete replicatas através da fortificação do analito no branco da amostra, e analisar todas as fortificações juntamente com o branco da amostra matriz. De acordo com a tabela IV, substâncias que apresentam em bula concentrações nominal acima de 10% o valor permitido para recuperação fica na faixa de 98,0 a 102,0%.

Para a análise da recuperação do método foram preparadas sete amostras em três diferentes níveis de fortificação. A Solução Amostra (branco da amostra matriz) foi preparada pesando-se em balão volumétrico de 25,0 mL, $2,3 \cdot 10^1 \text{ mg}$ para análise do ingrediente ativo Imidacloprida e $2,6 \cdot 10^1 \text{ mg}$ para análise do ingrediente ativo Clorpirifós. Em seguida o volume foi ajustado com Água Utrapura (Milli-Q), homogeneizado e transferido para balão volumétrico de 250,0 mL e o volume ajustado com solução acetonitrila:água (1:1).

Para os cálculos de recuperação utilizou-se a equação 4:

Equação 4 - Recuperação:

$$\%R = \frac{(A-B).100}{C}$$

Onde:

%R = porcentagem de recuperação;

A = concentração do analito medida na amostra fortificada (concentração medida);

B = concentração do analito medida no branco da amostra;

C = concentração do analito adicionado ao branco da amostra (concentração teórica).

Os valores de recuperação devem estar conforme apresentado no Quadro IV.

Quadro IV – Valor limite para coeficiente de variação de acordo com a concentração do analito.

Concentração nominal do produto	Média % ativo recuperado
> 10%	98,0 – 102,0
1 – 10%	97,0 – 103,0
< 1%	95,0 – 105,0
100 ppm	90,0 – 107,0
10 ppm	80,0 – 110,0
1 ppm	80,0 – 110,0
100 ppb	80,0 – 110,0
10 ppb	60,0 – 115,0
1 ppb	40,0 – 120,0

Fonte: Norma ABNT NBR 14029:2005.

3.9.8. Robustez

A análise de robustez é realizada para determinar se o método cromatográfico é um método robusto, ou seja, que mantém os mesmos dados obtidos com algumas modificações no método ou no preparo da amostra. Para avaliar tal parâmetro a norma ABNT NBR 14029:2005 requer que o analista identifique variáveis no procedimento analítico que possam ter efeito significativos no desempenho do método, realizar as modificações no preparo das amostras ou no método cromatográfico de análise, a análise de robustez deve ser feita com as mesmas amostras analisadas na repetitividade ou na recuperação como cada uma das variáveis estabelecidas. Os dados obtidos devem estar de acordo com os dados apresentados pela mesma medição anteriormente.

Para a análise de robustez do método foram avaliados três variáveis diferentes, sendo elas, vazão da fase móvel, proporção da fase móvel e temperatura do forno (coluna).

3.9.9. Teor do Produto Formulado

Para a determinação do teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós nos produtos formulados avaliados neste trabalho, duas amostras de aproximadamente $5,2 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ de Imidacloprida e $5,8 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ de Clorpirifós, foram analisadas. O método de preparo está descrito no item 3.6 (Preparo das Amostras).

A concentração dos ingredientes ativos nas amostras dos produtos formulados foram calculadas de acordo com a equação 5:

Equação 5 – Teor do Produto Formulado:

$$\%P / P = \frac{Aa \cdot Mp}{Ap \cdot Ma} \cdot 100$$

Onde:

% P/P = Teor do ingrediente ativo no produto formulado em % (m/m);

Aa = área do pico do cromatograma do produto formulado;

Mp = massa do padrão analítico (mg);

Ap = área do pico do cromatograma do padrão analítico;

Ma = massa do produto formulado (mg);

Para a obtenção do valor de teor em % m/v, multiplicou-se o valor encontrado em % P/P pelo valor da densidade do produto técnico ou formulado.

A densidade do produto formulado foi determinada através da pesagem em triplicata de 1,0 mL de cada produto. Com o auxílio de um béquer pesou-se três ponteiros vazias com capacidade para 1,0 mL, pipetou-se o produto formulado e pesou-se a ponteira contendo o produto formulado. O cálculo da densidade foi de acordo com a equação 6.

Equação 6 – Densidade do Produto Formulado:

$$d(g/mL) = \frac{\text{massa}(g)}{\text{volume}(mL)}$$

Onde:

d = Densidade do produto formulado;

massa = massa da ponteira cheia – massa ponteira vazia;

volume = volume de produto formulado pipetado.

3.10. Fórmulas, Tratamentos Estatísticos e Limites do Método

Para todas as análises realizadas neste estudo, a norma de referência requer os cálculos de média, desvio padrão, coeficiente de variação e teste de Grubbs (G1 e Gn).

3.10.1. Média aritmética

As médias aritméticas apresentadas nos quadros de resultados foram determinadas de acordo com a equação 7.

Equação 7 – Média Aritmética:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \sum \frac{x_i}{n}$$

Onde:

$\bar{x}$ = média

x_i = valores individuais de cada replicata;

n = número de replicatas.

3.10.2. Desvio padrão

Para os cálculos de desvio padrão apresentados nos quadros de resultados utilizou-se a equação 8, o valor obtido na média aritmética foi utilizado no cálculo do desvio padrão.

Equação 8 – Desvio Padrão:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Onde:

S = desvio padrão;

$\bar{x}$ = média;

x_i = valores individuais de cada replicata;

n = número de replicatas.

3.10.3. Coeficiente de Variação (CV)

Os coeficiente de variação expressos nos quadros de resultados foram calculados através da equação 9, utilizando em seu cálculo os valores obtidos na média aritmética e no desvio padrão calculados anteriormente.

Equação 9 – Coeficiente de Variação:

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Onde:

CV = coeficiente de variação (%);

S = desvio padrão;

$\bar{x}$ = média.

Quadro V - Valor limite para o coeficiente de variação de acordo com a concentração do analito.

Analito (%)	Relação do analito	Unidade	Coeficiente de Variação (%)
100	1	100%	2,0
10	10 ⁻¹	10%	2,8
1	10 ⁻²	1%	4,0
0,1	10 ⁻³	0,1%	5,6
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	8,0
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	11
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	16
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	23
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	32
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	35

Fonte: Norma ABNT NBR 14029:2005.

3.10.4. Teste de Grubbs (G₁/G_n)

O teste de Grubbs é usado para verificação de um valor (x) disperso em relação à estimativa do desvio padrão.

Para testar o menor valor do conjunto usa-se a equação 10.

Equação 10 – Teste de Grubbs Menor valor (G_n):

$$G_n = \frac{(x_n - \bar{x})}{S}$$

Para testar o maior valor do conjunto usa-se a equação 11

Equação 11 – Teste de Grubbs Maior valor (G₁):

$$G_1 = \frac{(\bar{x} - x_1)}{S}$$

Onde:

$G1/Gn$ = teste de Grubbs;

$\bar{x}$ = média dos valores;

x = menor ou maior valor apresentado;

S = desvio padrão.

Os valores apresentados para o teste de Grubbs devem ficar abaixo do apresentado na tabela VI, confirmando assim que nenhum valor (x) foi considerado disperso.

Quadro VI - Valores críticos para o teste de Grubbs (G_c).

n	G_c (5%)	G_c (1%)
3	1,155	1,155
4	1,481	1,496
5	1,715	1,764
6	1,887	1,973
7	2,020	2,139
8	2,126	2,274
9	2,215	2,387
10	2,290	2,482
11	2,355	2,564
12	2,412	2,636
13	2,462	2,699
14	2,507	2,755
15	2,549	2,806
16	2,585	2,852
17	2,620	2,894
18	2,651	2,932
19	2,681	2,968
20	2,709	3,001
21	2,733	3,031
22	2,758	3,060

Continuação do Quadro VI...

23	2,781	3,087
24	2,802	3,112
25	2,822	3,135
26	2,841	3,157
27	2,859	3,178
28	2,876	3,199
29	2,893	3,218
30	2,908	3,236
31	2,824	3,253
32	2,938	3,270
33	2,952	3,286
34	2,965	3,301
35	2,979	3,316
36	2,991	3,330
37	3,003	3,343
38	3,014	3,356
39	3,025	3,369
40	3,038	3,381

Fonte: Norma ABNT NBR 14029:2005.

Para ter valores mais confiáveis o Quadro utilizado foi a de variação de 5%.

3.10.5. Incerteza de Medição

A incerteza de medição é calculada para especificar o que está sendo medido, incluindo a relação entre o mensurado e as grandezas medidas

O cálculo da incerteza foi determinada de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e os cálculos foram realizados tomando como base o fator de abrangência $k = 2$ (que dá um nível de confiança de aproximadamente 95%), sendo que este fator de abrangência foi naturalmente ajustado para que o valor realmente utilizado fosse mostrado e a estimativa de incerteza (U).

Primeiramente foi calculado a incerteza expressa no preparo da solução estoque, utilizando os fatores K e U expressos nos certificados RBC, da balança

utilizada para pesar o padrão analítico, do balão volumétrico de 10,0 mL utilizado para dissolução e lendo em consideração a pureza da substância. Utilizando fatos apresentados na incerteza da solução estoque foi possível calcular a incerteza para cada ponto da curva de calibração, utilizando os mesmos fatores expressos em cada certificado dos balões e micropipetas utilizados para a diluição de cada ponto da curva, para a curva de calibração também foi calculada a incerteza expressa pela concentração em relação às áreas apresentadas nas injeções em triplicata de cada ponto da curva de calibração. Para calcular a incerteza expressa nas análises de repetibilidade e reprodutibilidade foram utilizados apenas os valores obtidos em cada amostra em comparação com sua massa. A incerteza para a determinação do teor dos ingredientes ativos de cada substância em análise foram realizados considerando-se a massa pesada e a incerteza expressa pela balança utilizada (incerteza expressa no RBC), balões para dissolução utilizando os fatores K e U, balões e micropipetas utilizados para diluição das amostras utilizando os fatores K e U e ao final utilizando a pureza para ajustar o cálculo nominal realizado para o teor do ingrediente ativo. Ao final todas as incertezas foram combinadas, obtendo-se assim a incerteza do método para cada analito. As equações utilizadas para tal cálculo foram uma série de equações apresentadas pela norma seguida ABNT NBR 14029:2005.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Linearidade e Faixa de Trabalho (Curvas de calibração)

Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as diluições apresentadas nos Quadros II e III.

Os dados de concentração e resposta para os sete níveis de concentração (análise em triplicata), os coeficientes de linearidade e a equação das retas estão apresentados nos Quadros VII e VIII.

Quadro VII - Concentração, resposta das soluções padrões utilizadas para construção da curva de calibração de Imidacloprida.

Concentração (mg L ⁻¹)	Áreas (triplicata)		
8,4	156,26231	157,99477	156,75500
1,9.10 ¹	340,19376	342,25140	342,10233
3,8.10 ¹	666,04346	681,54596	667,26465
6,1.10 ¹	1054,77625	1056,86853	1057,12732
7,1.10 ¹	1504,12744	1507,18921	1511,66736
1,1.10 ²	1794,62292	1809,43311	1806,86316
1,6.10 ²	2729,76465	2731,27271	2726,479
Coeficientes de linearidade	y = 17,30401x + 46,01639		
Equação da reta	0,996870		

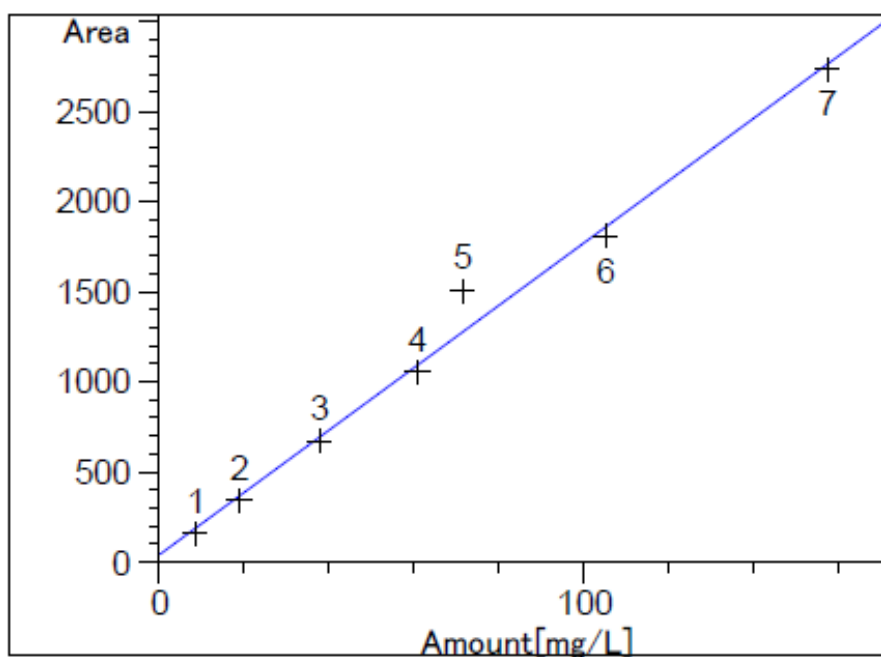
Quadro VIII - Concentração, resposta das soluções padrões utilizadas para construção da curva de calibração de Clorpirifós.

Concentração (mg L ⁻¹)	Áreas (triplicata)		
8,8	81,15858	81,58707	81,20858
2,0.10 ¹	190,48843	191,09396	190,91617
3,3.10 ¹	305,34344	319,64481	309,46008
4,8.10 ¹	433,53217	434,00381	433,42447
6,2.10 ¹	664,53632	662,89539	665,03833
8,6.10 ¹	766,75610	766,62231	766,91577
1,2.10 ²	1097,55054	1097,78540	1099,20862
Coeficientes de linearidade	y = 9,06654 x		
Equação da reta	0,996825		

Os coeficientes de regressão das curvas de calibração da Imidacloprida e Clorpirifós foram de 0,99375 e 0,99366, respectivamente (Figura 3 e 4).

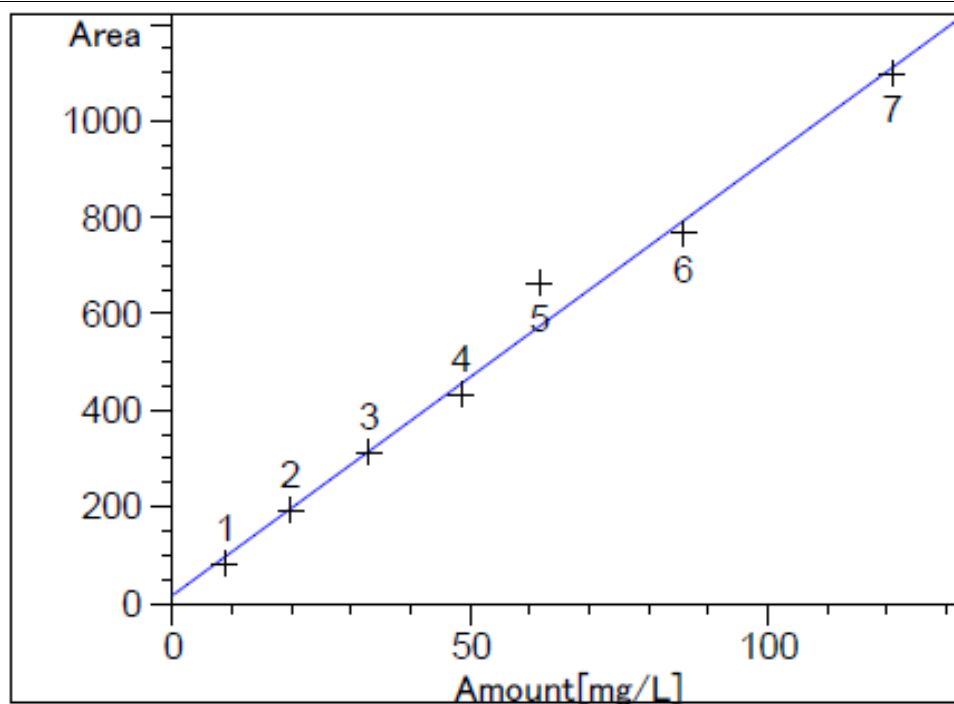
Esses valores estão acima do valor mínimo estabelecido pela norma ABNT NBR 14029:2005. Portanto, a resposta do detector em relação às variações de concentração foi linear para as duas substâncias analisadas.

Nas Figuras 06 a 12 estão representados um cromatograma representativo de uma das injeções em triplicata de cada ponto da curva de calibração.



Imidacloprid at exp. RT: 0.545
DAD1 A, Sig=290,4 Ref=400,100
Correlation: 0.99375
Residual Std. Dev.: 110.71105
Formula: $y = mx + b$
m: 17.30401
b: 46.01639
x: Amount
y: Area

Figura 4: Curva de calibração do padrão Imidacloprida.



Chlorpyrifos at exp. RT: 2.964
DAD1 A, Sig=290,4 Ref=400,100
Correlation: 0.99366
Residual Std. Dev.: 44.01053
Formula: $y = mx + b$
m: 9.06654
b: 17.49625
x: Amount
y: Area

Figura 5: Curva de calibração do padrão Clorpirifós.

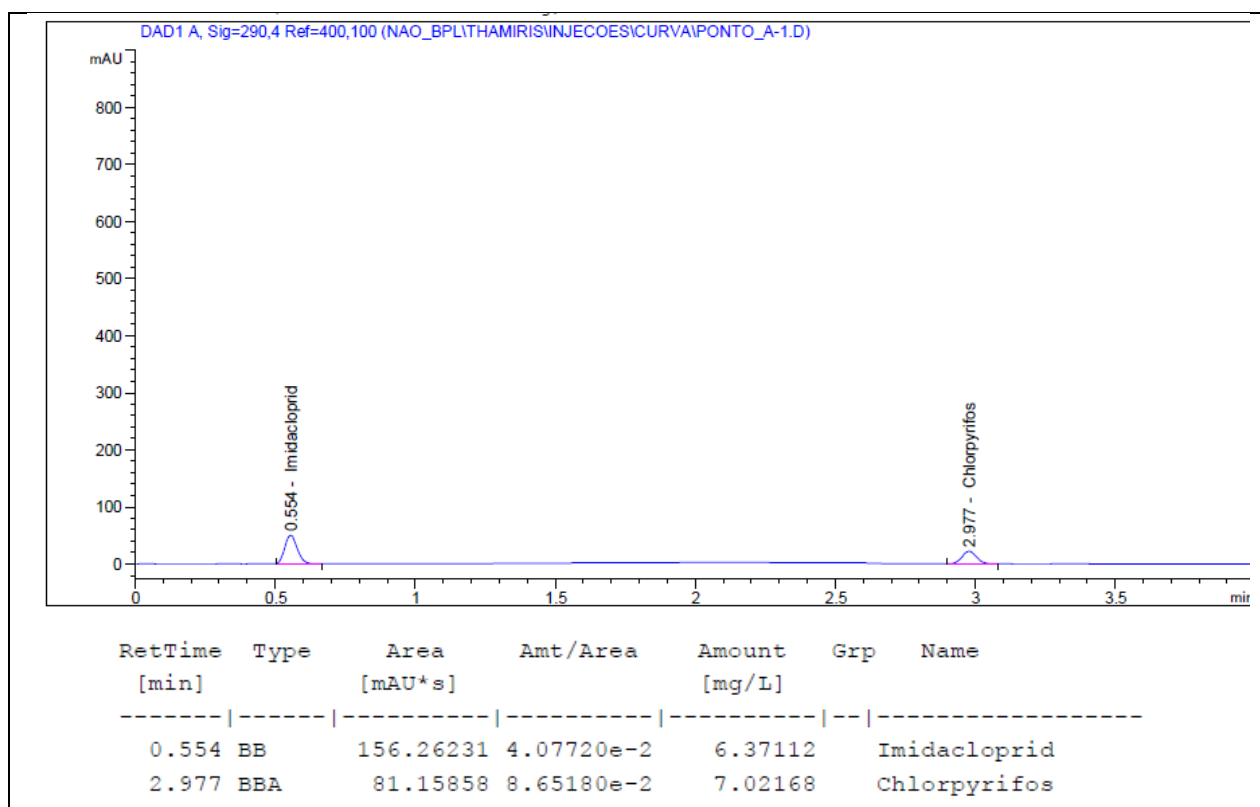


Figura 6: Cromatograma da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $8,4 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $8,8 \text{ mg L}^{-1}$.

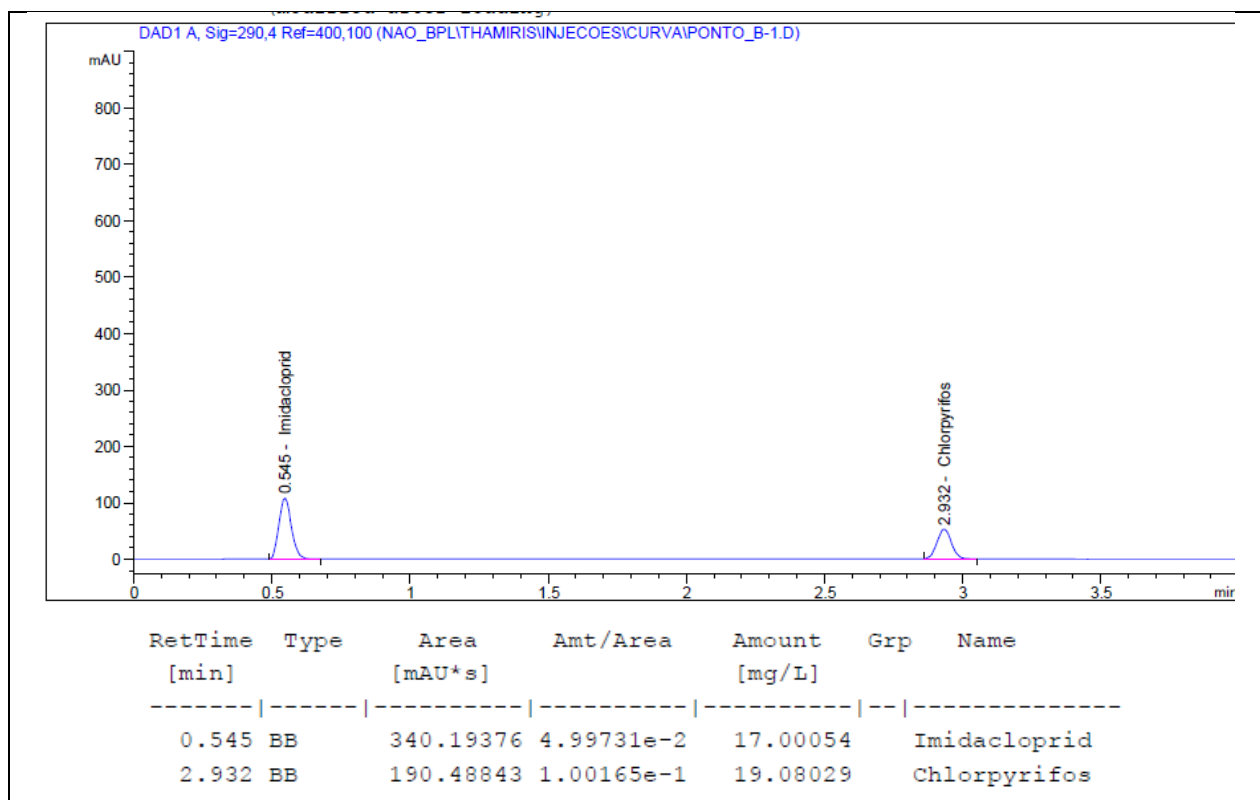


Figura 7: Cromatograma da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $1,9 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $2,0 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$.

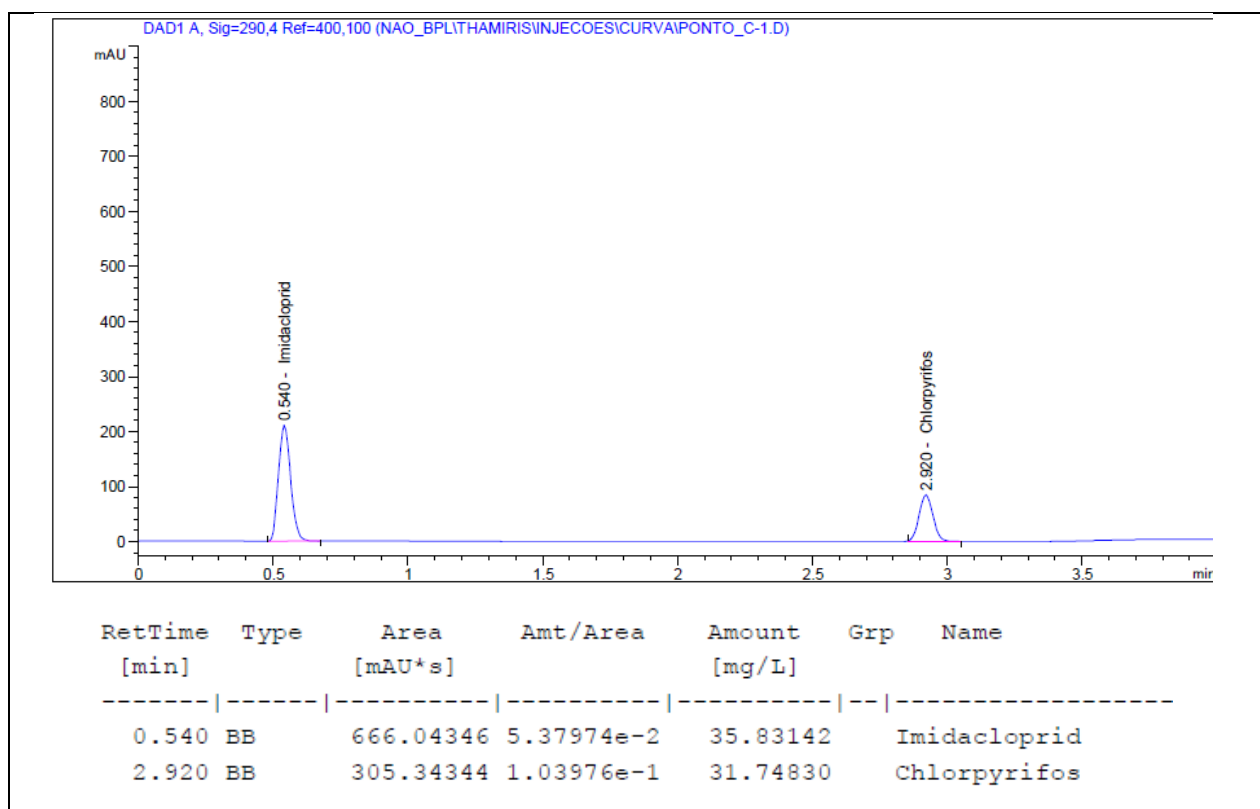


Figura 8: Cromatograma da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $3,8 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $3,3 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$.

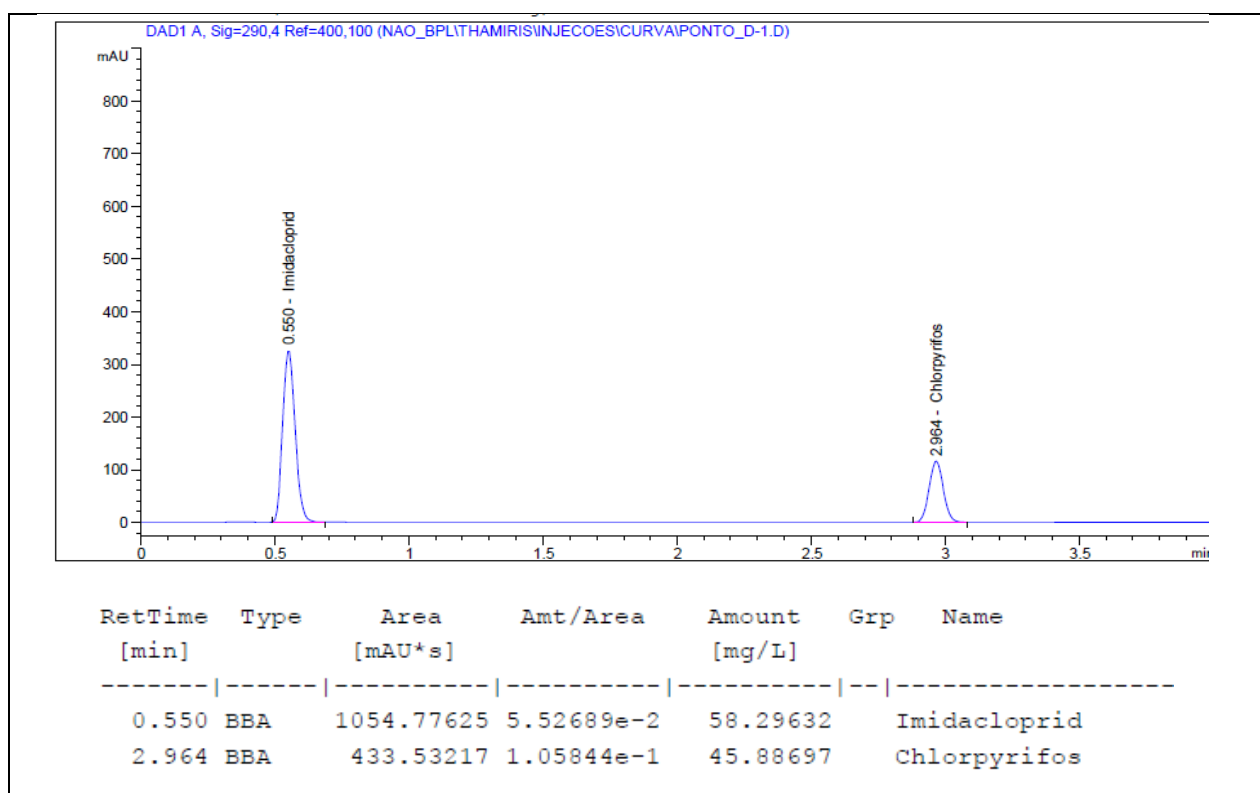


Figura 9: Cromatograma da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $6,1 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $4,8 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$.

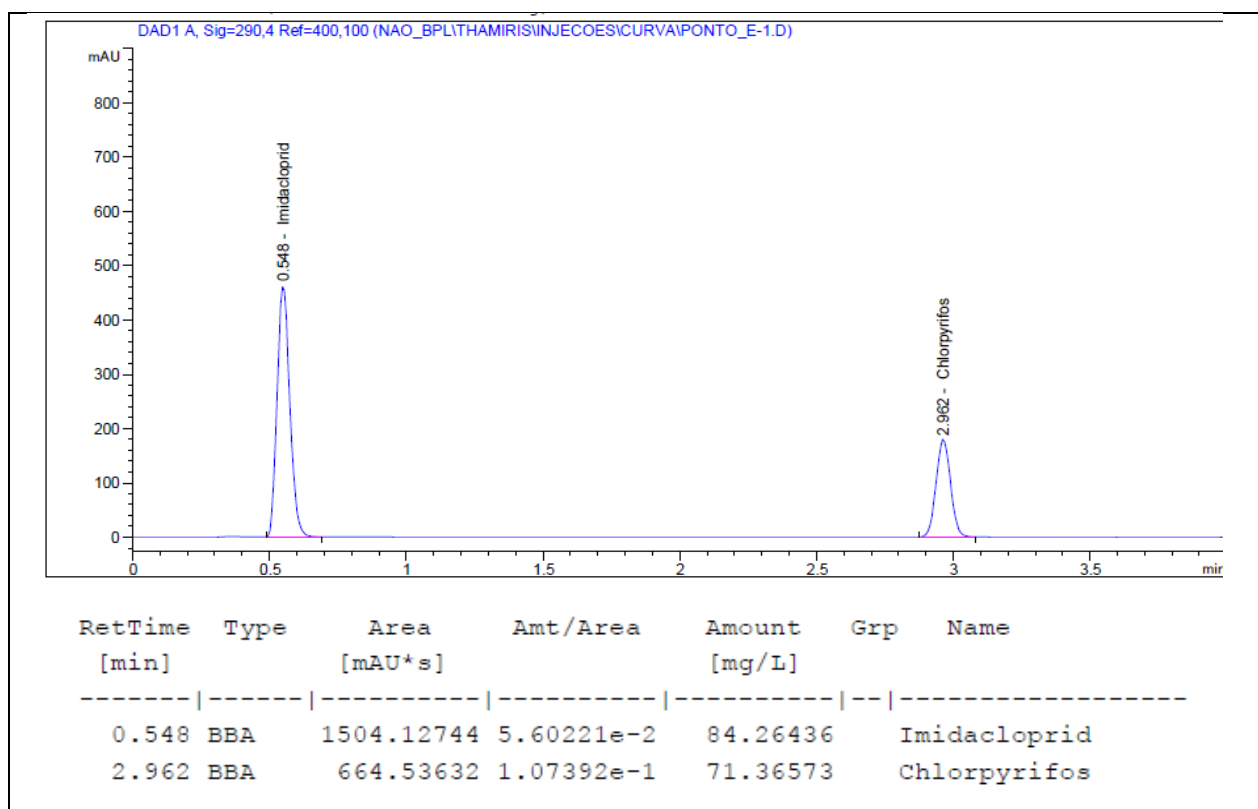


Figura 10: Cromatograma da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $7,1 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $6,2 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$.

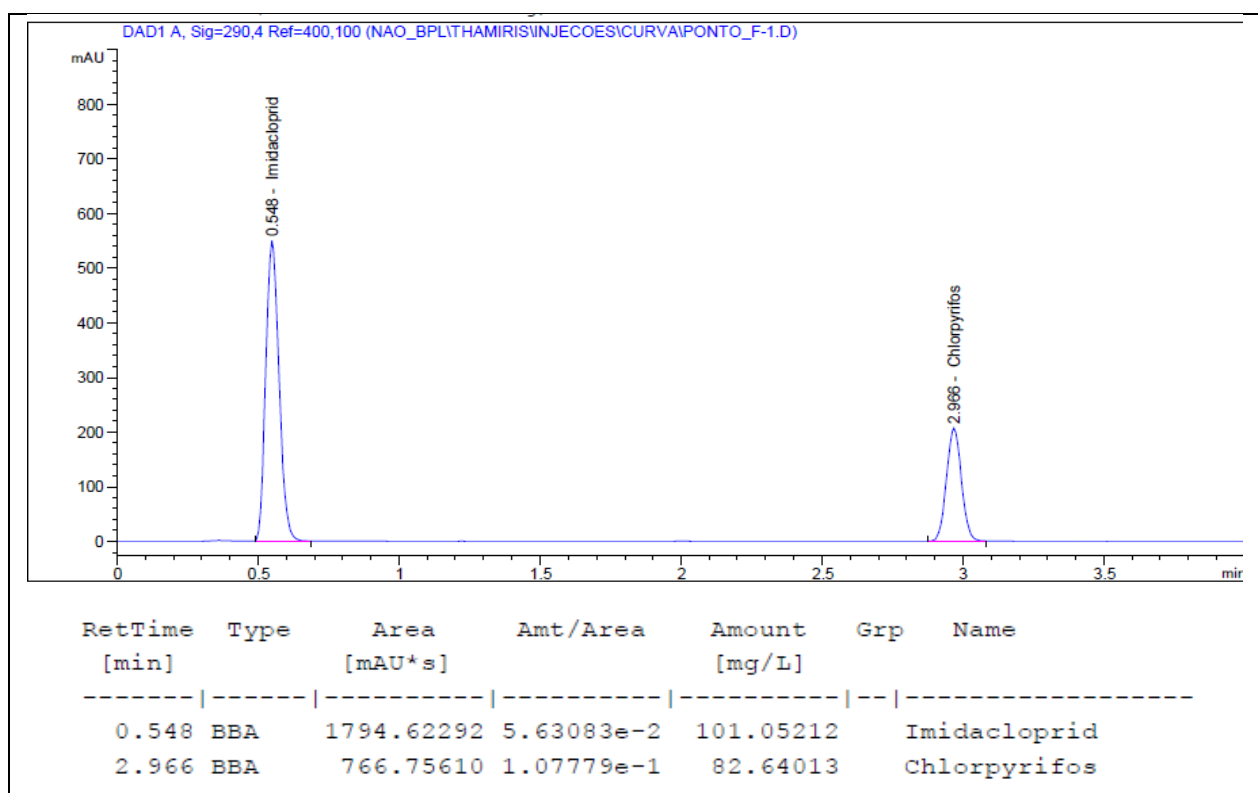


Figura 11: Cromatogramas da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $1,1 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $8,6 \cdot 10^1 \text{ mg L}^{-1}$.

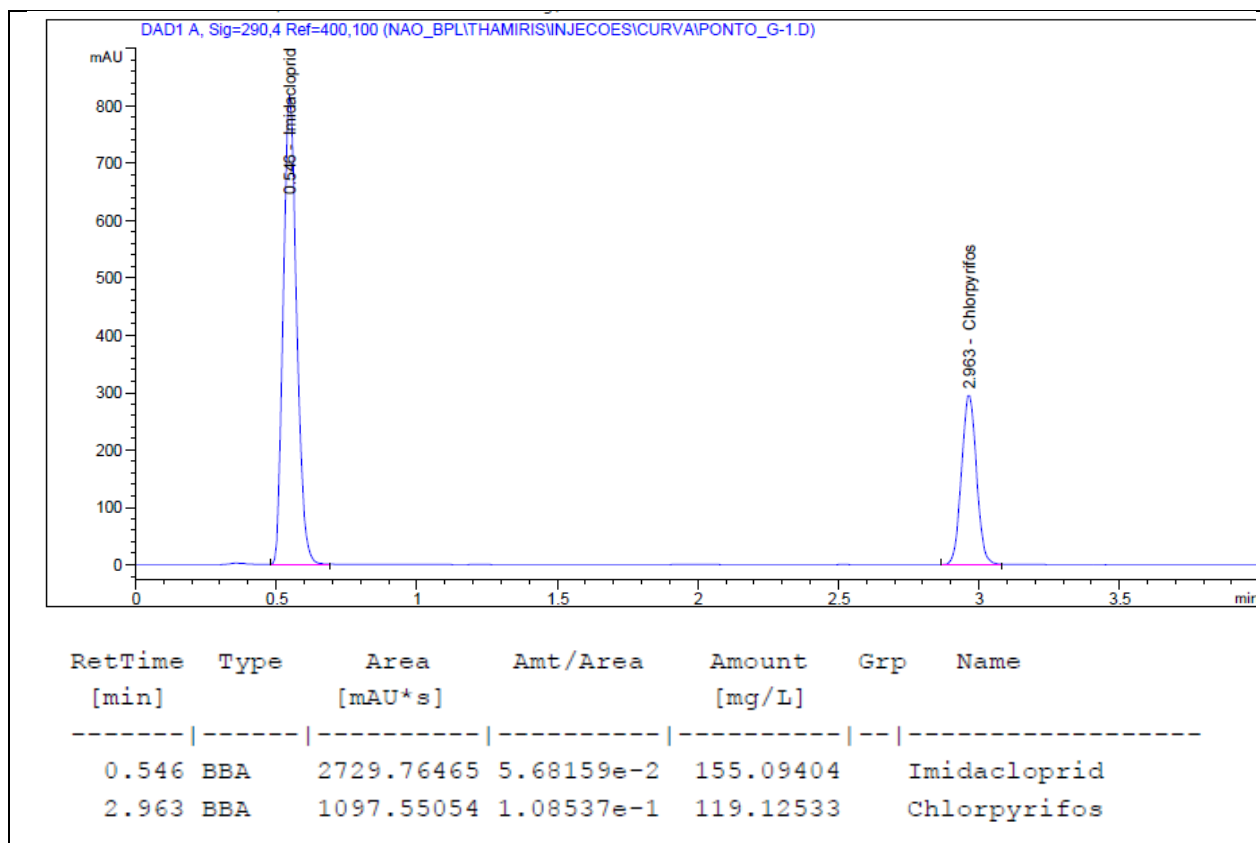


Figura 12: Cromatogramas da primeira injeção da análise em triplicata da solução de Imidacloprida $1,6 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ e Clorpirifós $1,2 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$.

4.2 – Sensibilidade

A sensibilidade do método foi determinada pelo coeficiente angular das curvas de calibração apresentando resultados de $17,30401 \text{ abs/mg L}^{-1}$ para Imidacloprida e de $9,06654 \text{ abs/mg L}^{-1}$ para Clorpirifós.

Para determinação da especificidade e seletividade do método foi realizado análise do branco (solventes utilizados na extração) e não houve constatação de interferentes nos tempos de retenção que eluem Imidacloprida e Clorpirifós, $t_r = 0,5 \text{ min}$ e $t_r = 2,9 \text{ min}$, respectivamente (Figura 13).

Além disso, para confirmação das substâncias eluídas nos $t_r = 0,5 \text{ min}$ e $t_r = 2,9 \text{ min}$ foram analisados os espectros UV e comparados com os dos padrões autênticos (Figura 14 e 15).

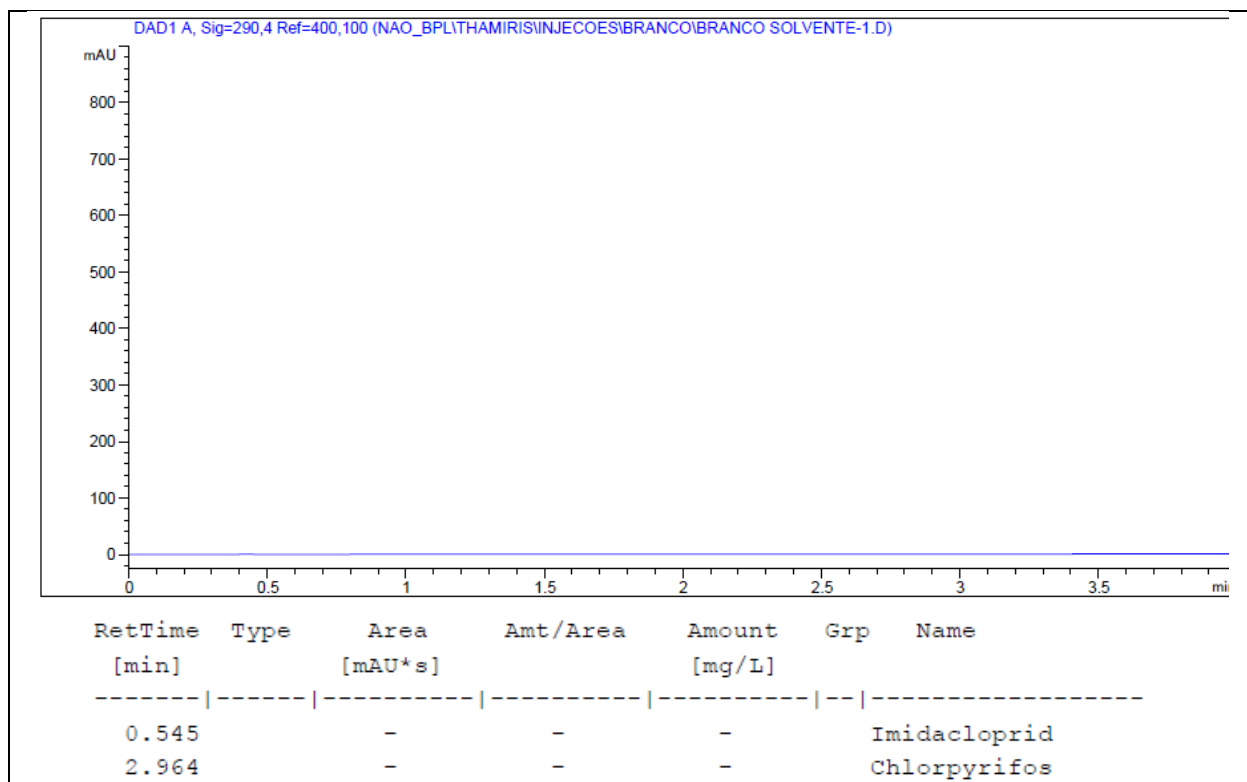


Figura 13: Cromatograma do branco dos solventes utilizado para determinação de possíveis contaminantes na região dos picos de Imidacloprida e Clorpirifós.

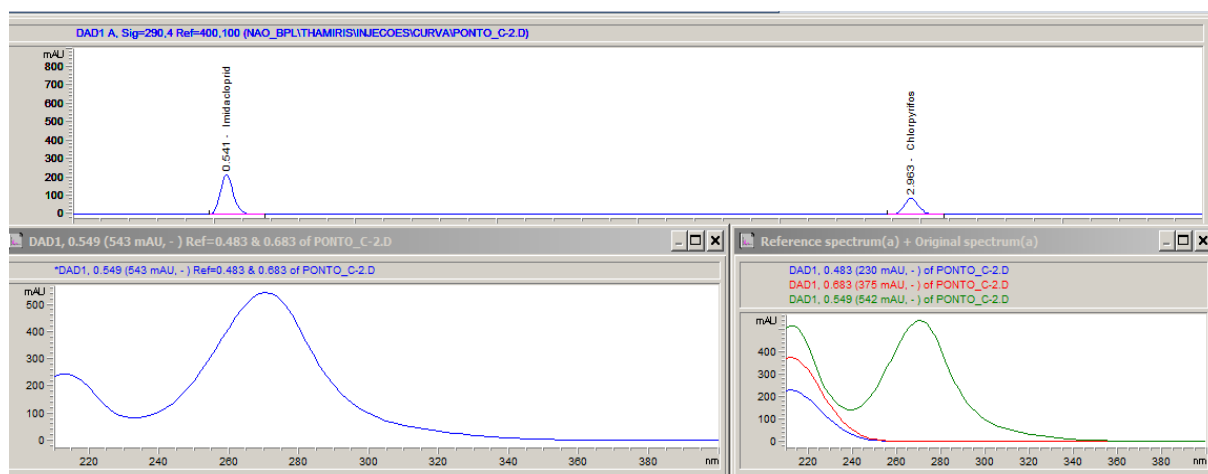


Figura 14: Espectros UV do padrão autêntico de Imidacloprida utilizado como espectro de comparação para as amostras.

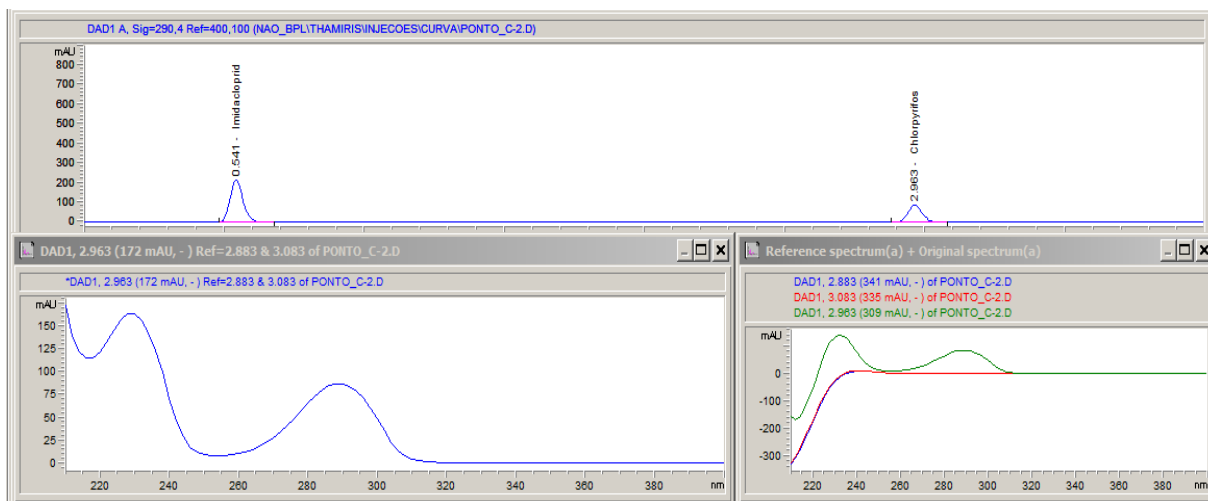


Figura 15: Espectros UV do padrão autêntico de Clorpirifós utilizado como espectro de comparação para as amostras.

4.3 – Limites de Detecção e Quantificação

As razões sinal/ruído utilizadas nos cálculos do LD e LQ foram determinadas no cromatograma da análise do menor ponto da curva de calibração de cada substância (Figura 16).

Os limites determinados para Imidacloprida foram LD = $4,2 \cdot 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ e LQ = $1,4 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$. Para Clorpirifós foram LD = $1,1 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ e LQ = $3,6 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$.

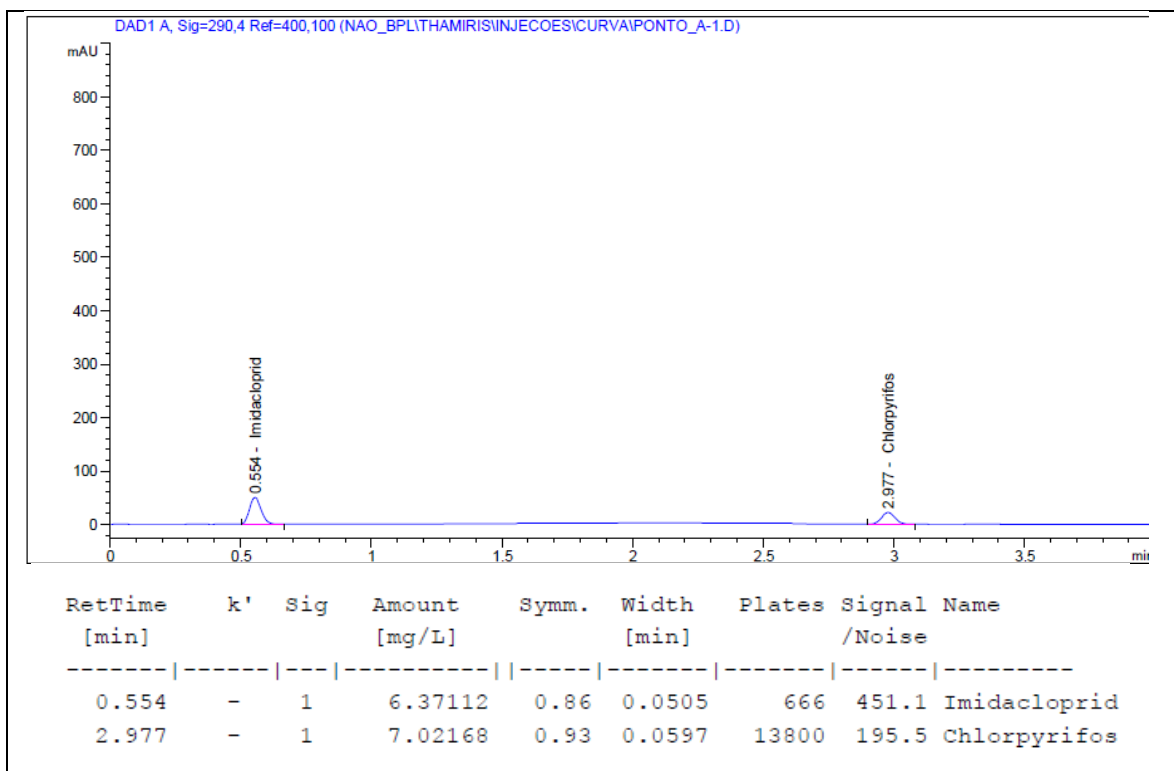


Figura 16: Cromatograma dos picos de Imidacloprida e Clorpirifós nas concentrações calculadas de $8,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $8,8 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente e dos ruídos utilizados como base para os cálculos dos limites de detecção e quantificação.

4.4 – Repetitividade

Conforme dados apresentados abaixo o método foi repetitivo, apresentou CV abaixo de 8% e nenhum valor foi excluído pelo Teste de Grubbs, estando ambos os testes abaixo de 2,020, valor limite permitido para sete medições.

Para a análise da repetitividade foram utilizadas as reprodutibilidades do dia 1 os valores obtidos no teste de repetitividade estão descritos nos Quadros IX e X e a Figura 17 apresenta um cromatograma representativo da análise, o mesmo será utilizado como base de comparação para os cromatogramas apresentados na análises de robustez.

Quadro IX - Dados da repetitividade para Imidacloprida.

Massa (g)	Concentração Nominal (mg L-1)	Concentração Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
12,0	120,0	58,2	48,5	49,2
12,9	129,0	63,8	49,4	
11,6	116,0	57,4	49,5	
10,1	101,0	49,8	49,4	
13,4	134,0	65,8	49,1	
12,1	121,0	59,3	49,0	
12,5	125,0	61,5	49,2	
Desvio Padrão (%)			0,3	
Coeficiente de Variação (%)			0,7	
Teste de Grubbs (G ₁)			1,9	
Teste de Grubbs (G _n)			1,0	

Quadro X - Dados da repetitividade para Clorpirifós.

Massa (g)	Concentração Nominal (mg L-1)	Concentração Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
11,5	115,0	52,5	45,7	45,8
14,7	147,0	67,0	45,6	
11,0	110,0	50,9	46,3	
11,2	112,0	51,4	45,9	
11,7	117,0	53,8	46,0	
18,1	181,0	82,2	45,4	
11,2	112,0	51,1	45,7	
Desvio Padrão (%)			0,3	
Coeficiente de Variação (%)			0,6	
Teste de Grubbs (G ₁)			1,3	
Teste de Grubbs (G _n)			1,6	

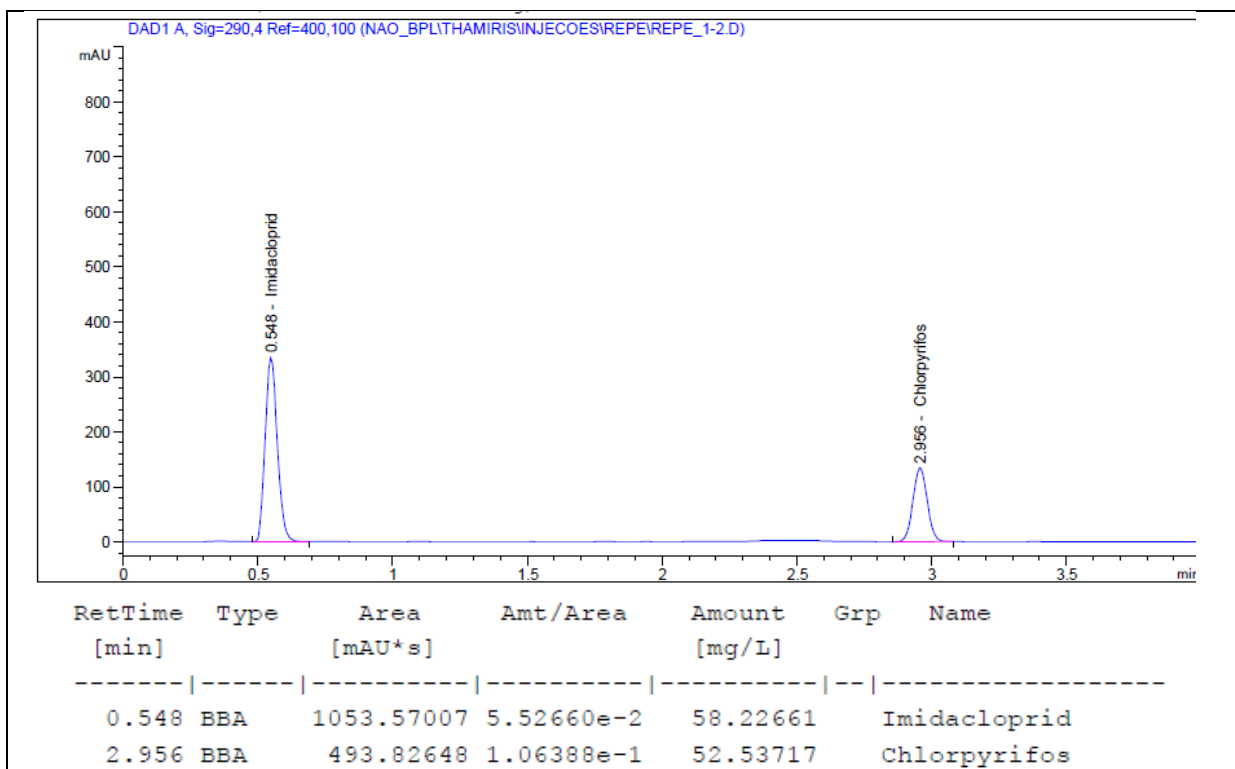


Figura 17: Cromatograma representativo das análises para determinação da repetitividade.

4.5 – Reprodutibilidade Interna

Conforme dados apresentados abaixo o método se demonstrou reprodutível, apresentou CV abaixo de 8% e nenhum valor foi excluído pelo Teste de Grubbs, estando ambos os testes abaixo de 2,507, valor limite permitido para 14 medições.

Para a análise da reprodutibilidade foram avaliadas 14 pesagens independentes, preparadas em dois dias, sendo sete amostras no primeiro dia e sete amostras no dia consecutivo, os valores obtidos no teste de reprodutibilidade estão descritos nos Quadros XI e XII e as Figuras 18 e 19 apresentam um cromatograma representativo da análise de do dia 1 e do dia 2, respectivamente.

Quadro XI - Dados da reprodutibilidade para Imidacloprida.

Dia 1				
Massa (g)	Concentração Nominal (mg L-1)	Concentração Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
12,0	120,0	58,6	48,8	49,0
12,9	129,0	63,5	49,2	
11,6	116,0	57,1	49,2	
10,1	101,0	49,7	49,2	
13,4	134,0	65,4	48,8	
12,1	121,0	58,7	48,5	
12,5	125,0	61,1	48,8	
Dia 2				
13,8	138,0	67,7677	49,1	48,8
10,9	109,0	52,9496	48,6	
10,9	109,0	53,1855	48,8	
10,5	105,0	51,1352	48,7	
11,6	116,0	56,6039	48,8	
12,1	121,0	59,4219	49,1	
13,0	130,0	63,2667	48,7	
Teor Médio Global da Substância (%)			48,9	
Desvio Padrão (%)			0,2	
Coeficiente de Variação (%)			0,5	
Teste de Grubbs (G ₁)			1,5	
Teste de Grubbs (G _n)			1,5	

Quadro XII - Dados da reprodutibilidade para Clorpirifós.

Dia 1				
Massa (g)	Concentração Nominal (mg L-1)	Concentração Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
11,5	115,0	52,6	45,7	45,7
14,7	147,0	67,0	45,6	
11,0	110,0	50,4	45,8	
11,2	112,0	51,1	45,6	
11,7	117,0	53,4	45,7	
18,1	181,0	82,7	45,7	
11,2	112,0	51,4	45,9	
Dia 2				
12,3	123,0	55,9	45,5	45,8
10,2	102,0	47,1	46,2	
11,8	118,0	53,6	45,5	
10,1	101,0	46,3	45,8	
11,0	110,0	50,4	45,8	
11,1	111,0	50,9	45,8	
14,6	146,0	66,8	45,8	
Teor Médio Global da Substância (%)			45,7	
Desvio Padrão (%)			0,2	
Coeficiente de Variação (%)			0,4	
Teste de Grubbs (G ₁)			1,6	
Teste de Grubbs (G _n)			2,4	

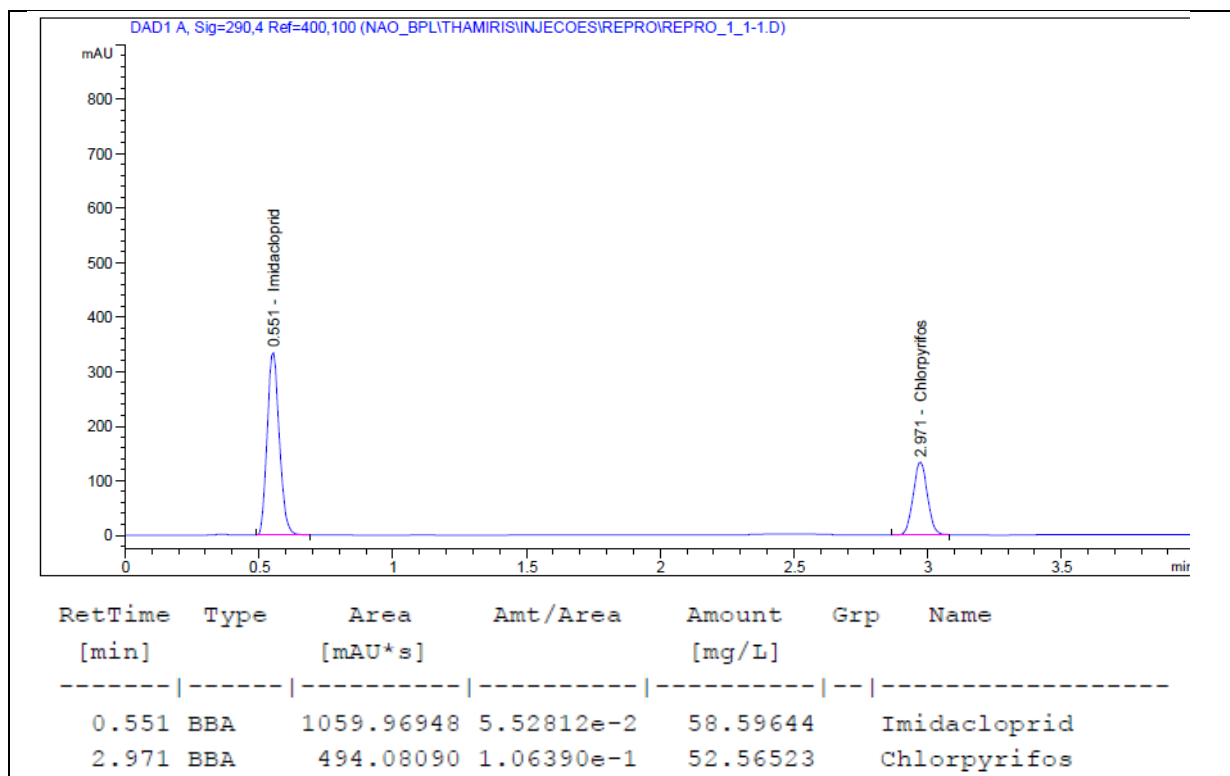


Figura 18: Cromatograma representativo das análises para determinação da reprodutibilidade (Dia 1).

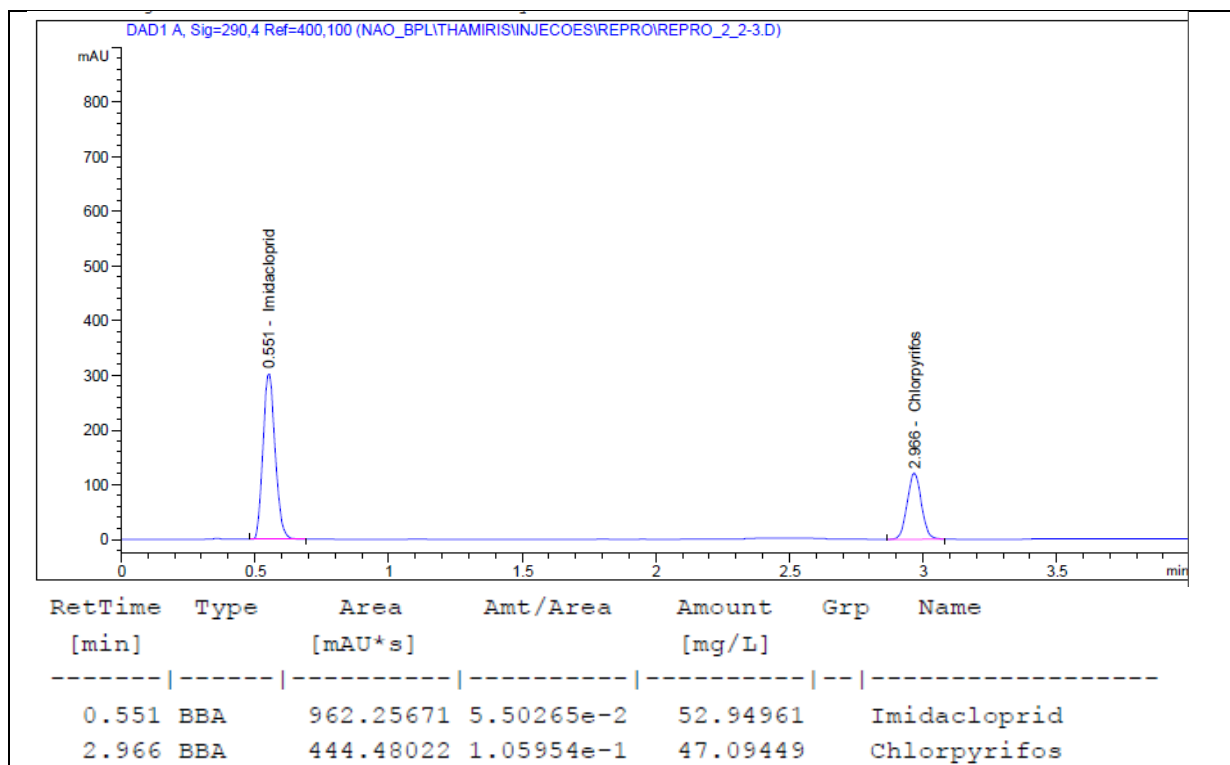


Figura 19: Cromatograma representativo das análises para determinação da reprodutibilidade (Dia 2).

4.6 – Recuperação

Conforme dados apresentados abaixo o método apresentou boa recuperação, ficando as médias apresentadas para os três diferentes níveis, assim como a média aritmética dos três níveis na faixa de 98,0 – 102,0%, o CV apresentado ficou abaixo de 5,6% e nenhum valor foi excluído pelo Teste de Grubbs, estando ambos os testes abaixo de 2,733, valor limite permitido para 21 medições.

Para a análise da recuperação foram avaliadas 21 amostras diferentes, sendo sete fortificadas para o nível inferior (abaixo do meio da curva, concentração apresentada entre o ponto B e o ponto C das curvas de calibração), sete fortificações para o nível nominal (meio da curva, mesma concentração apresentada pelo ponto D das curvas de calibração) e sete fortificadas com o nível superior (acima do meio da curva, concentração apresentada entre o ponto E e o ponto F das curvas de calibração). Os resultados de cada um dos níveis de fortificação e as respectivas repetições estão apresentados nos Quadros XIII e XIV. A Figura 20 apresenta o cromatograma do branco da amostra matriz utilizado nos cálculos da recuperação, e os cromatogramas representativos de cada um dos diferentes níveis de fortificação estão apresentados nas Figuras 21 a 23.

Quadro XIII - Dados de recuperação para Imidacloprida.

Concentração do Branco da Amostra: 56,5682 mg L-1			
Nível de Fortificação (mg L-1)	Conc. Experimental (mg L-1)	Recuperação (%)	Média (%)
21,0	77,8	101,4	100,9
	77,8	101,4	
	77,7	100,8	
	77,7	100,8	
	77,7	100,6	
	77,8	101,2	
	77,6	100,1	
60,8	117,5	100,2	100,2
	117,6	100,4	
	117,6	100,4	
	117,0	99,5	
	117,6	100,3	
	117,9	100,9	
	117,2	99,8	
73,4	130,0	100,1	101,1
	130,6	101,0	
	131,5	102,1	
	131,4	102,0	
	130,8	101,1	
	130,7	101,0	
	130,2	100,3	
Média da recuperação (%)		100,7	
Desvio Padrão (%)		0,7	
Coeficiente de Variação (%)		0,7	
Teste de Grubbs (G1)		1,9	
Teste de Grubbs (Gn)		2,0	

Quadro XIV - Dados de recuperação para Clorpirifós.

Concentração do Branco da Amostra: 49,3503 mg L-1			
Nível de Fortificação (mg L-1)	Conc. Experimental (mg L-1)	Recuperação (%)	Média (%)
22,0	71,5	101,1	100,4
	71,4	100,5	
	71,4	100,3	
	71,3	100,2	
	71,5	100,7	
	71,4	100,3	
	71,2	99,5	
48,3	98,0	100,8	101,0
	98,1	100,9	
	98,2	101,1	
	98,5	101,7	
	98,2	101,0	
	97,9	100,5	
	98,0	100,7	
65,9	114,9	99,6	100,1
	115,2	100,0	
	115,6	100,5	
	115,1	99,8	
	115,5	100,4	
	115,4	100,3	
	115,3	100,2	
Média da recuperação (%)		100,5	
Desvio Padrão (%)		0,5	
Coeficiente de Variação (%)		0,5	
Teste de Grubbs (G1)		1,8	
Teste de Grubbs (Gn)		2,3	

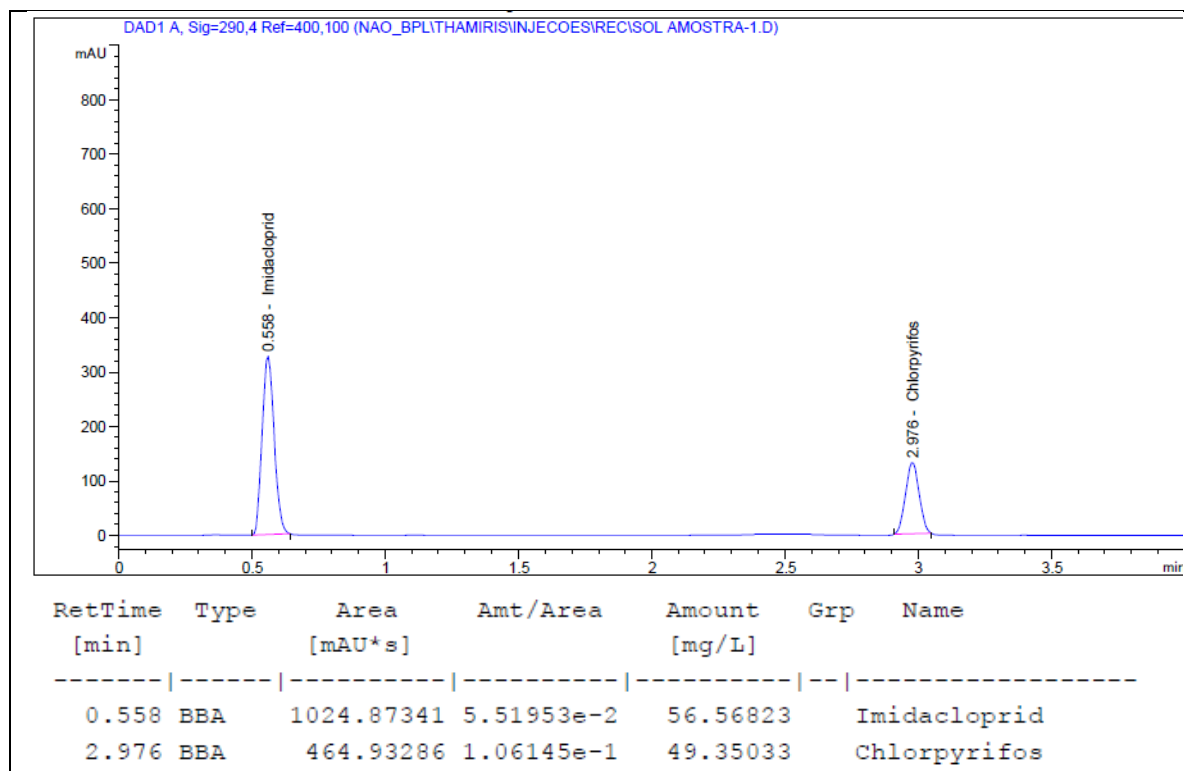


Figura 20: Cromatograma da Solução Amostra considerada da análise de recuperação.

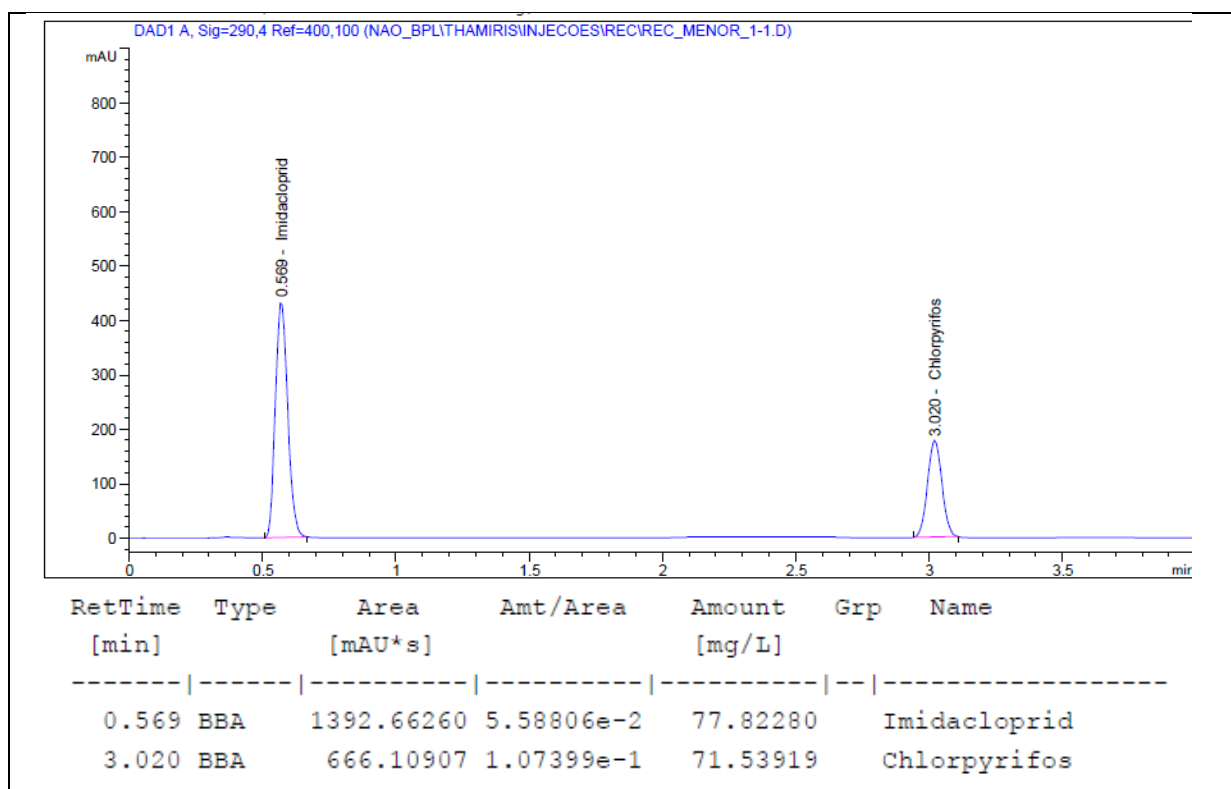


Figura 21: Cromatograma representativo da Solução Amostra fortificada com nível inferior (Análise 1).

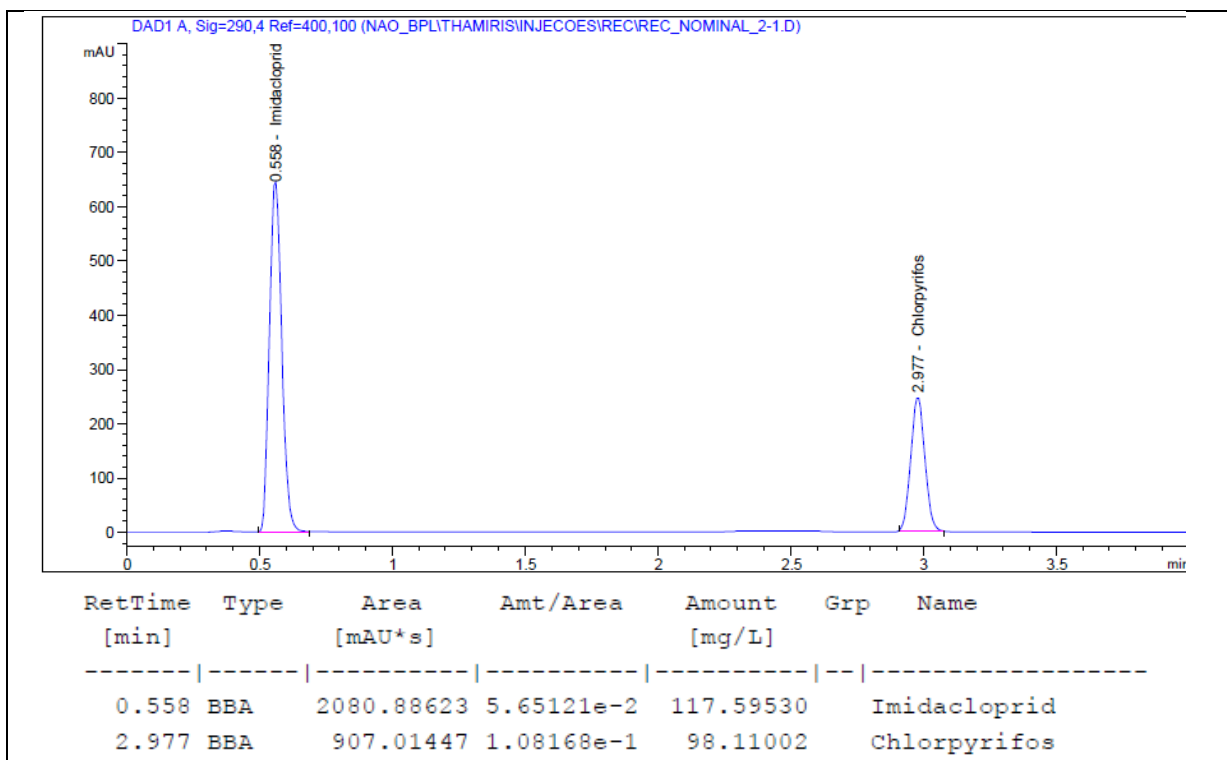


Figura 22: Cromatograma representativo da Solução Amostra fortificada com nível nominal (Análise 2).

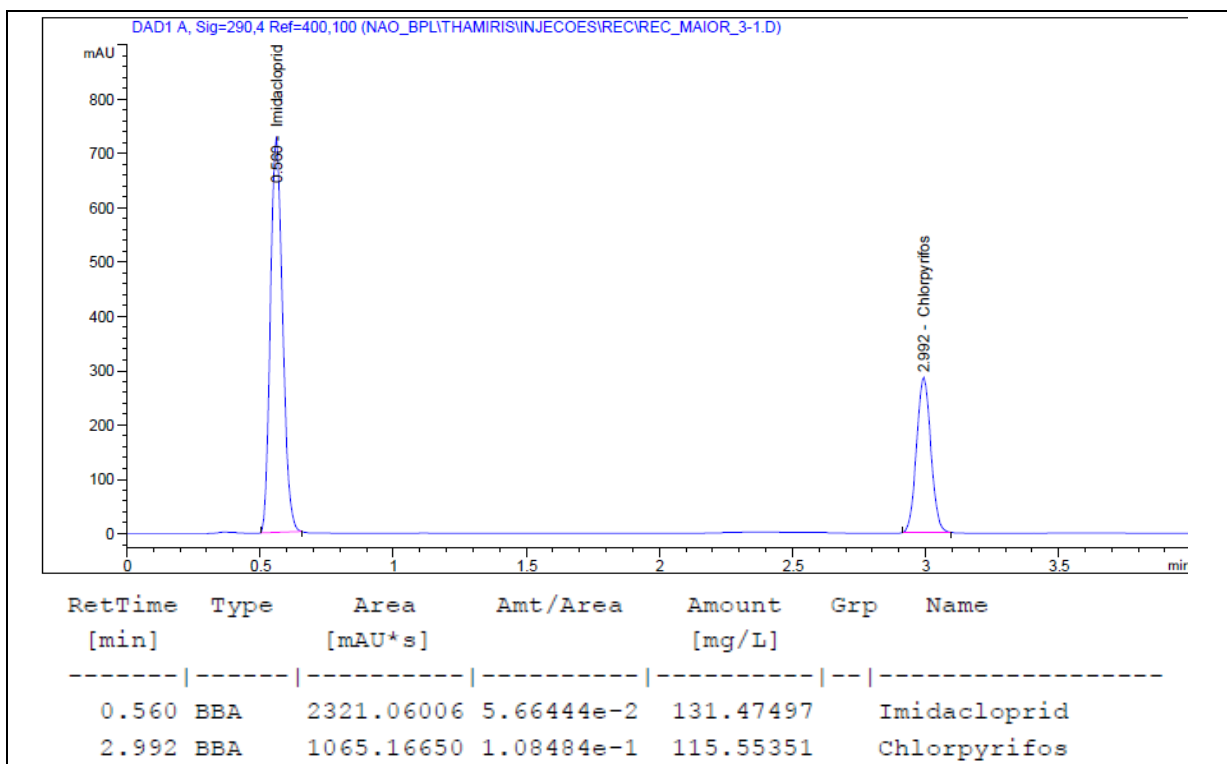


Figura 23: Cromatograma representativo da Solução Amostra fortificada com nível superior (Análise 3).

4.7 – Robustez

Para a análise da robustez foi utilizado a repetitividade, sendo submetida à análise em três diferentes situações com pequenas alterações no método cromatográfico. Os parâmetros avaliados e as alterações realizadas para a determinação da robustez do método estão apresentados no Quadro XV.

Os dados observados na avaliação da robustez estão apresentados nos Quadros XVI e XVII, estando todos os teores obtidos de acordo com o teor apresentado para a análise de repetibilidade, o CV ficou abaixo de 8% e nenhum valor foi excluído pelo Teste de Grubbs, estando ambos os testes abaixo de 2,733, valor limite permitido para 21 medições, portanto, o método desenvolvido pode ser considerado robusto. Caso os teores observados em cada uma das análises de robustez apresentassem divergência dos valores obtidos para a análise de repetitividade (amostras utilizadas para determinar a robustez do método), ou os TR apresentados para cada analito nos testes de robustez apresentasse uma variação considerável do TR apresentado nas demais análises, o método não seria considerado um método robusto.

Os cromatogramas representativos estão apresentados nas Figuras 24 a 26, em comparação com o cromatograma apresentado na Figura 17 é possível constatar que o TR apresentado para Imidacloprida e Clorpirifós apresentaram uma variação de no máximo 0,1 min, variação mínima.

Quadro XV - Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método cromatográfico.

	Fatores	Original do Método	Variação
Robustez I	Vazão da fase móvel	0,300 mL min ⁻¹	0,301 mL min ⁻¹
Robustez II	Proporção da fase móvel	Fase A: 50 e 25% Fase B: 50 e 75%	Fase A: 49 e 24% Fase B: 51 e 76%
Robustez III	Temperatura da coluna	36 °C	37 °C

Quadro XVI - Dados da robustez do método para Imidacloprida.

Descrição	Massa (g)	Conc. Nominal (mg L-1)	Conc. Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
Robustez I	12,0	120,0	58,9	49,0	49,1
	12,9	129,0	63,5	49,2	
	11,6	116,0	57,0	49,1	
	10,1	101,0	49,6	49,2	
	13,4	134,0	65,4	48,8	
	12,1	121,0	59,4	49,1	
	12,5	125,0	61,3	49,0	
Robustez II	12,0	120,0	58,2	48,5	48,9
	12,9	129,0	63,2	49,0	
	11,6	116,0	57,0	49,2	
	10,1	101,0	49,6	49,1	
	13,4	134,0	65,2	48,7	
	12,1	121,0	59,2	48,9	
	12,5	125,0	61,2	48,9	
Robustez III	12,0	120,0	58,8	49,0	49,1
	12,9	129,0	63,7	49,4	
	11,6	116,0	56,7	48,8	
	10,1	101,0	49,7	49,2	
	13,4	134,0	65,6	48,9	
	12,1	121,0	59,0	48,8	
	12,5	125,0	61,9	49,5	
Teor Médio Global da Substância (%)				49,0	
Desvio Padrão (%)				0,2	
Coefficiente de Variação (%)				0,5	
Teste de Grubbs (G₁)				2,1	
Teste de Grubbs (G_n)				2,3	

Quadro XVII - Dados da robustez do método para Clorpirifós.

Descrição	Massa (g)	Conc. Nominal (mg L-1)	Conc. Experimental (mg L-1)	Teor (%)	Teor médio (%)
Robustez I	11,5	115,0	52,4	45,6	45,6
	14,7	147,0	66,6	45,3	
	11,0	110,0	50,4	45,8	
	11,2	112,0	51,3	45,8	
	11,7	117,0	52,7	45,1	
	18,1	181,0	82,9	45,8	
	11,2	112,0	51,2	45,7	
Robustez II	11,5	115,0	51,5	44,8	45,0
	14,7	147,0	65,6	44,6	
	11,0	110,0	49,8	45,3	
	11,2	112,0	50,5	45,1	
	11,7	117,0	52,7	45,0	
	18,1	181,0	81,5	45,0	
	11,2	112,0	50,5	45,1	
Robustez III	11,5	115,0	52,7	45,8	45,7
	14,7	147,0	66,8	45,5	
	11,0	110,0	50,4	45,8	
	11,2	112,0	51,1	45,7	
	11,7	117,0	53,6	45,8	
	18,1	181,0	82,5	45,6	
	11,2	112,0	50,8	45,4	
Teor Médio Global da Substância (%)				45,4	
Desvio Padrão (%)				0,4	
Coeficiente de Variação (%)				0,8	
Teste de Grubbs (G₁)				2,0	
Teste de Grubbs (G_n)				1,1	

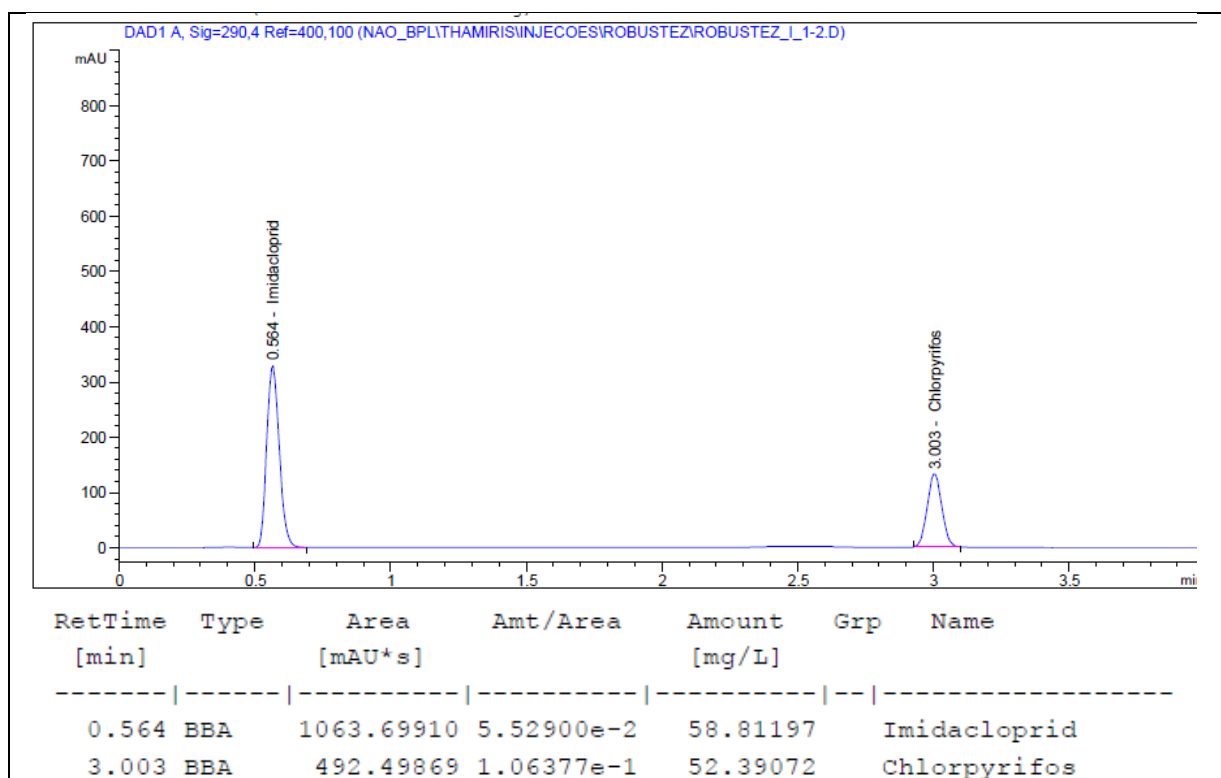


Figura 24: Cromatograma das análises de robustez do método (Robustez I – Análise 1).

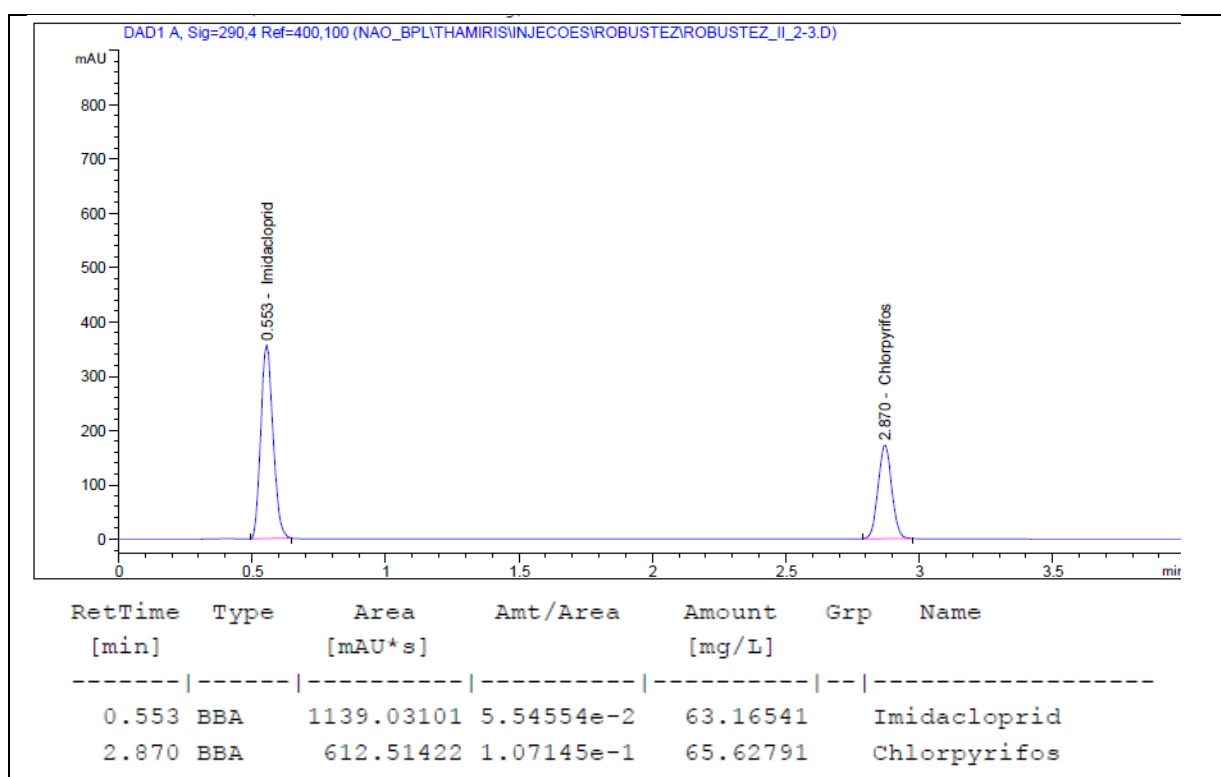


Figura 25: Cromatograma das análises de robustez do método (Robustez II – Análise 2).

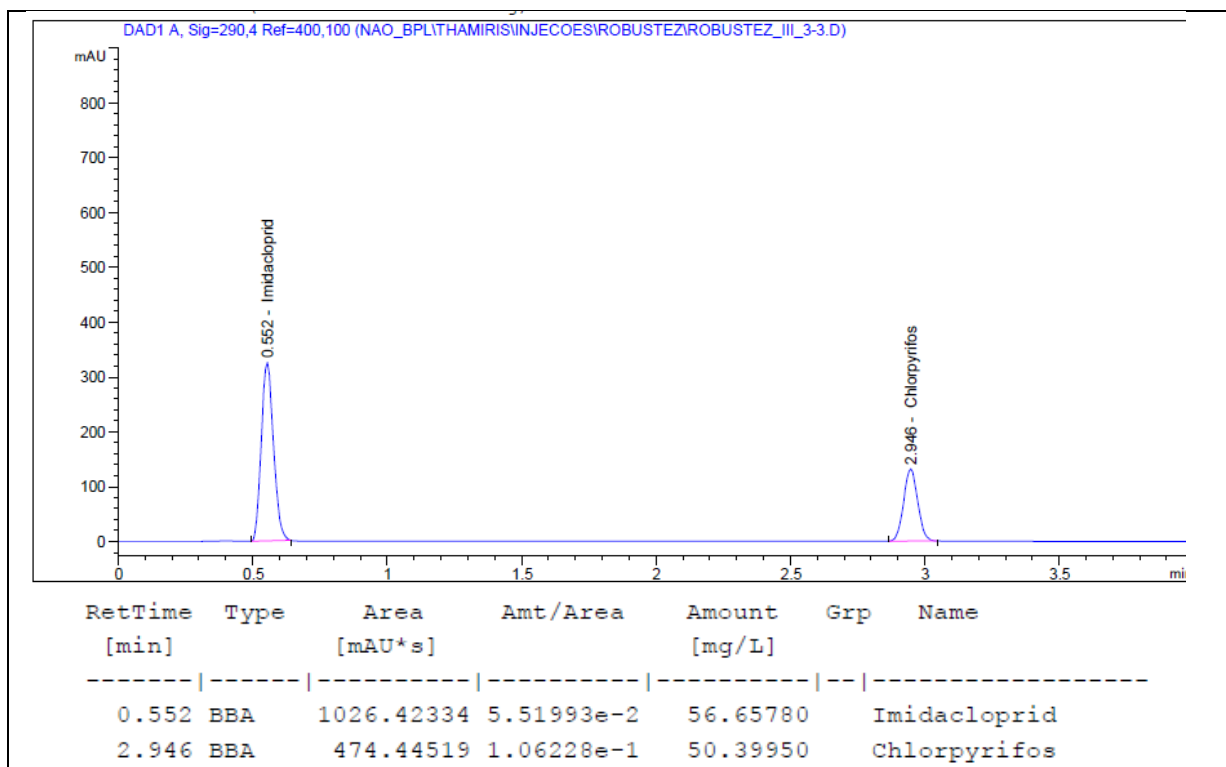


Figura 26: Cromatograma das análises de robustez do método (Robustez III – Análise 3).

4.8 – Teor do Produto Formulado

Para a análise do teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós em seus respectivos produtos formulados, foram preparadas duas amostras e analisadas em duplicata os dados obtidos nas análises estão apresentados nos Quadros XVIII e XIX, as Figuras 27 a 30 apresentam os cromatogramas das análises das amostras utilizados nos cálculos dos teores dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós.

A concentração encontrada em ambos os produtos estão entre os parâmetros determinados pela norma ANBT NBR 14029:2005 apresentando uma diferença de $\pm 5\%$ do valor informado na bula.

Os valores apresentados em bula para as substâncias testes utilizadas para a determinação dos teores dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós é de 60,0% (m/v) e 48,0% (m/v), respectivamente.

Quadro XVIII - Resultados da análise do teor de Imidacloprida.

Massa do Padrão: 3,0.10 ⁻¹ mg				
Área do padrão (média): 1056,2574				
Massa do Produto Formulado (mg)	Área do Produto Formulado	Teor médio (%)	Teor médio final (% m/m)	Teor médio final (% m/v)
6,3.10 ⁻¹	1065,2997	48,7	48,6	60,1*
6,3.10 ⁻¹	1064,5205	48,6		
6,4.10 ⁻¹	1079,4895	48,5		
6,4.10 ⁻¹	1081,4044	48,6		
Densidade: 1,2363 g mL ⁻¹				

* para a obtenção do valor final (m/v, %), o teor obtido pelos cálculos área do padrão – área da amostra (m/m) foram multiplicados pela densidade apresentada por cada produto. Tal correção é necessária, pois os produtos analisados estão em seu estado físico líquido.

Quadro XIX - Resultados da análise do teor de Clorpirifós.

Massa do Padrão: 2,4.10 ⁻¹ mg				
Área do padrão: 433,65348				
Massa do Produto Formulado (mg)	Área do Produto Formulado	Teor médio (%)	Teor médio final (% m/m)	Teor médio final (% m/v)
6,1.10 ⁻¹	496,7671	45,3	45,2	48,3*
6,1.10 ⁻¹	497,0978	45,4		
6,0.10 ⁻¹	484,7027	45,0		
6,0.10 ⁻¹	485,1642	45,0		
Densidade: 1,0687 g mL ⁻¹				

* para a obtenção do valor final (m/v, %), o teor obtido pelos cálculos área do padrão – área da amostra (m/m) foram multiplicados pela densidade apresentada por cada produto. Tal correção é necessária, pois os produtos analisados estão em seu estado físico líquido.

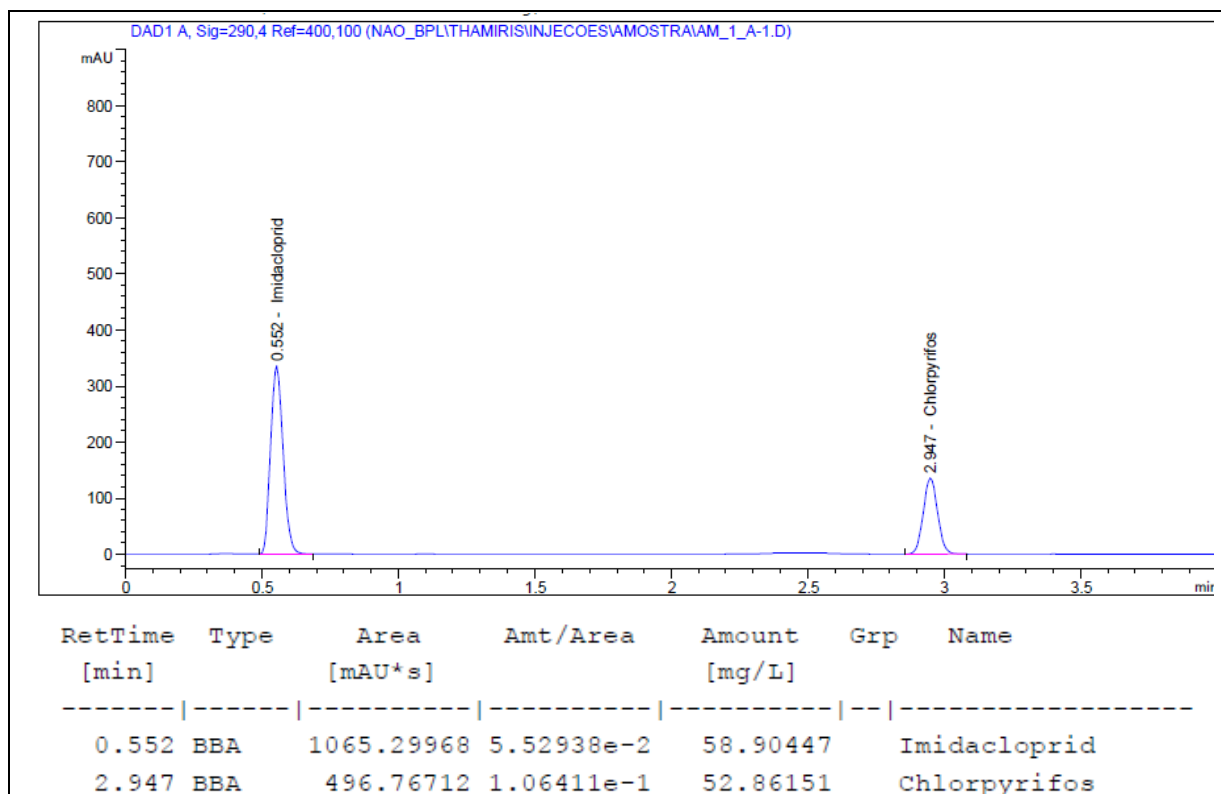


Figura 27: Cromatograma da análise de teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós (amostra 1A).

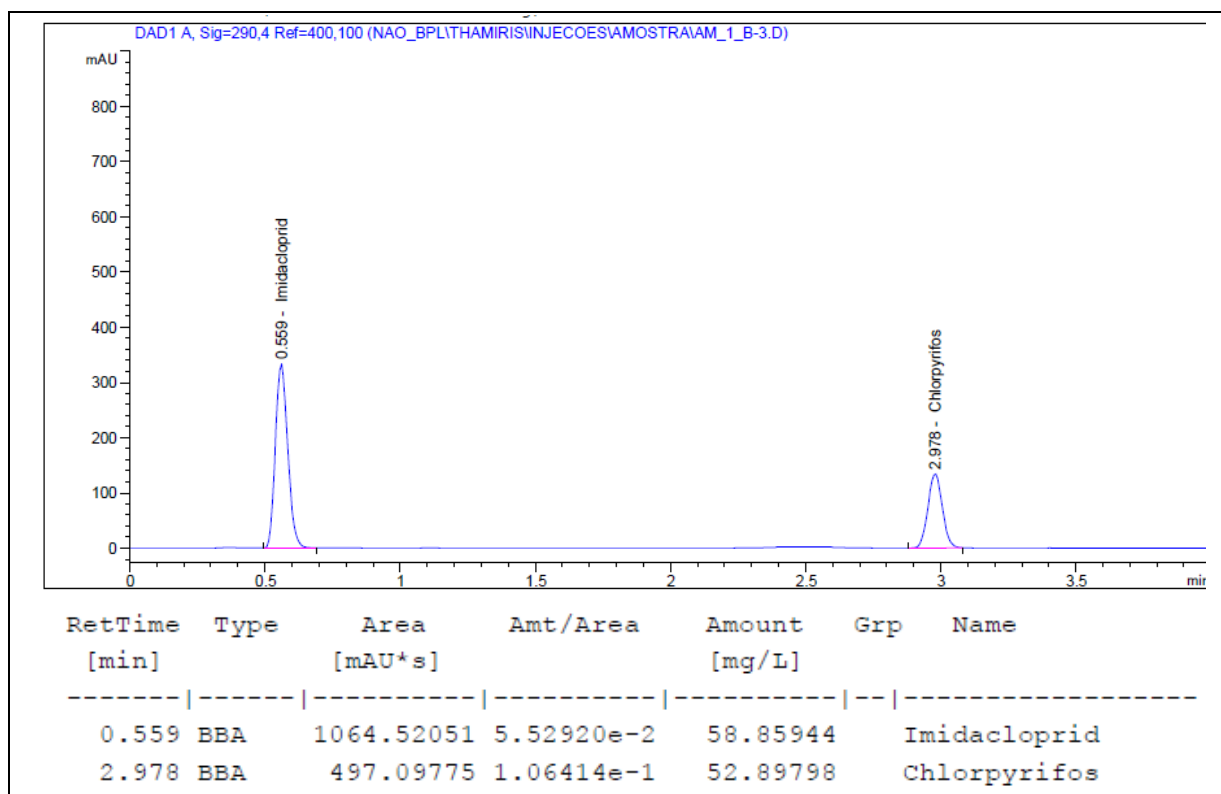


Figura 28: Cromatograma da análise de teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós (amostra 1B).

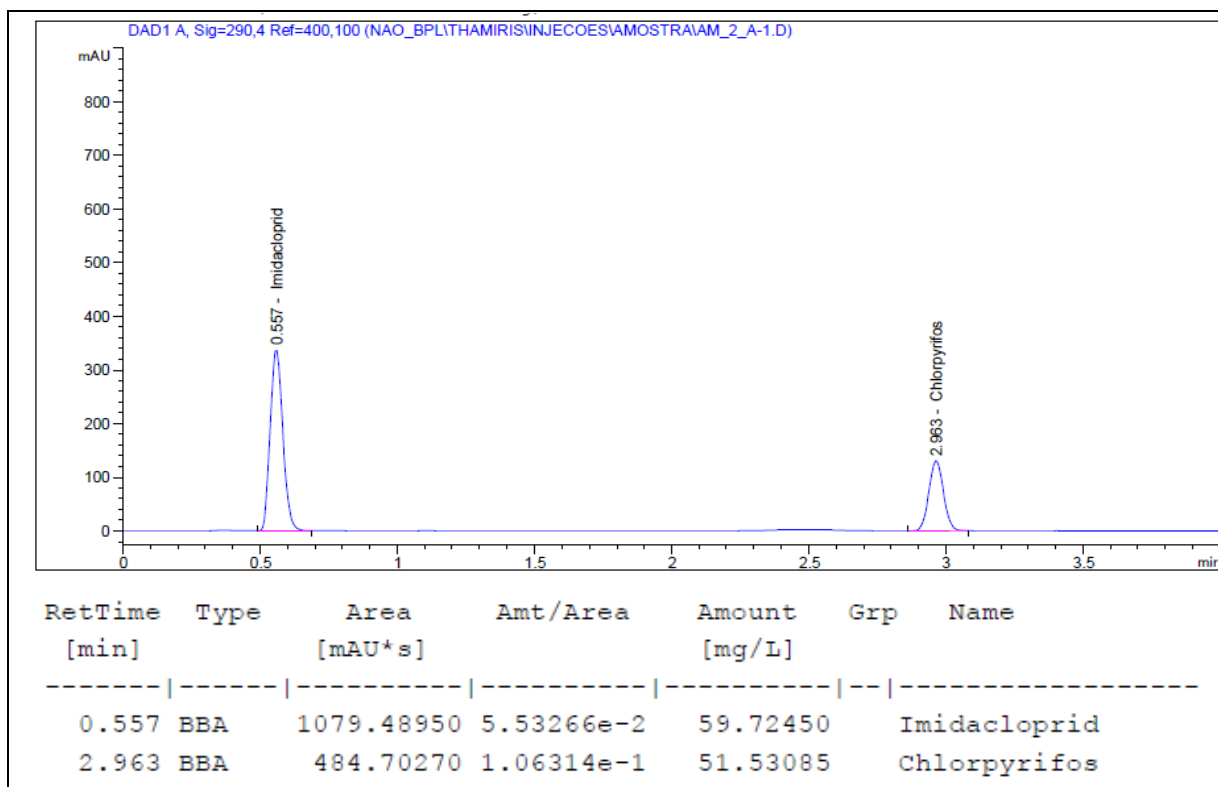


Figura 29: Cromatograma da análise de teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós (amostra 2A).

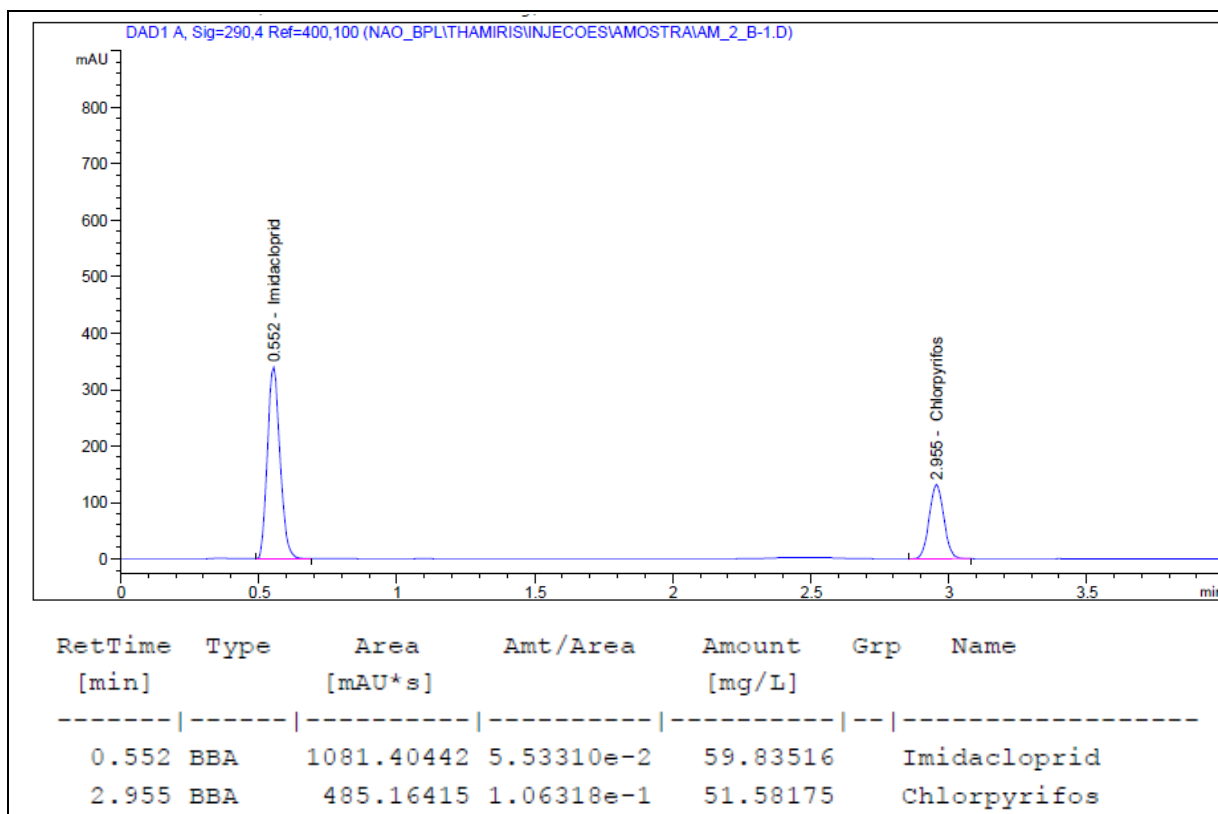


Figura 30: Cromatograma da análise de teor dos ingredientes ativos Imidacloprida e Clorpirifós (amostra 2B).

5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido permitiu a determinação do teor de Imidacloprida e Clorpirifós em produtos técnicos e formulados por CLUE-DAD de maneira rápida e eficiente, comparado aos equipamentos CLAE, que levam um maior tempo para a análise visto que não é um equipamento de rápida resolução.

A validação do método permitiu ajustar as figuras de mérito de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, Lei nº 7802). Com isso, o método poderá ser aplicado para análises dessas substâncias em laboratórios certificados, nas condições que foram realizadas as análises neste trabalho.

Os teores encontrados de Imidacloprida e Clorpirifós nos produtos comerciais analisados e suas respectivas incertezas foram de 60,1% (m/v) $\pm$ 0,6% e 48,3% (m/v) $\pm$ 0,4%, respectivamente, os valores encontrados estão dentro da faixa exigida pela norma ABNT NBR 14029:2005, apresentando diferenças de $\pm$ 5% do valor informado na bula e todos os coeficientes de variação apresentados estão entre 5,6 a 8%, dependendo da concentração das amostras a serem trabalhadas, de acordo com o Quadro V, nenhum valor apresentado em nenhum dos parâmetros analisados foi excluído pelo Teste de Grubbs, concluindo assim que o método cromatográfico desenvolvido neste projeto é repetitivo, reprodutivo, robusto e apresenta ótima recuperação.

É importante ressaltar que o método desenvolvido e validado para determinação do teor de Imidacloprida e Clorpirifós apresentou figuras de mérito com valores recomendados pela ABNT em matrizes de produtos formulados, não podendo ser aplicado para análises da concentração dessas substâncias em frutos ou qualquer outro tipo de matriz.

6. REFERÊNCIAS

BRASIL. Norma Brasileira, **Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos - ABNT NBR 14029:2005**; Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, RJ, 2 ed., 2005.

BRASIL. Norma Brasileira; **Normas de apresentação tabular**; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 3 ed., 1993.

CHOWDHURY, A. Z. *et al.* Occurrence of Organophosphorus and Carbamate Pesticide Residues in Surface Water Samples from the Rangpur District of Bangladesh. **Bull Environ Contam Toxicol.** n 89, p. 202-207. 2002.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, Carol H. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27.

BRASIL. Constituição (1989). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Casa Civil: **Subchefia para Assuntos Jurídicos**. Lei nº 7802 (**Lei de Agrotóxicos**). Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 05 jul. 2015.

NACIMENTO, A. **A Importância da Cromatografia**. Ciências da Vida, 2011. Disponível em <<http://www.engenhariae arquitetura.com.br/blog/ciencias-da-vida/?p=378>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

PLACKE, F. J.; Weber, E. **Resíduos por HPLC** – Proteção das plantas – Nachrichten - Bayer; In: Jornal Magazine, 109-182, 1993.

ROSSI, R. *et al.* Use of Hig-Performance Liquid Chromatography-UV and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of the Imidacloprid Contento f Honeybees, Pollen, Paper Filters, Graa and Flower. **Chromatographia.** n 61. P 189-195. 2005;

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

WISE; LOVEYS. **The e-Pesticide Manual** - THE BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL, versão 2.1, 13ª edição, EUA 202.