

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

ANTONIO HENRIQUE ORTOLAN

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR
DE INGREDIENTE ATIVO EM PRODUTO TÉCNICO
FORMULADO POR CLUE-DAD**

BAURU
2012

ANTONIO HENRIQUE ORTOLAN

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR
DE INGREDIENTE ATIVO EM PRODUTO TÉCNICO
FORMULADO POR CLUE-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Química, sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Aparecida Zeferino Garcia.

**BAURU
2012**

O78d

Ortolan, Antonio Henrique

Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de teor de ingrediente ativo em produto técnico formulado por cluedad / Antonio Henrique Ortolan -- 2012.

46f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Márcia Ap. Zeferino Garcia.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Validação. 2. CLUE. 3. CLAE. 4. Fenil pirazol. I. Garcia, Márcia Ap. Zeferino. II. Título.

ANTONIO HENRIQUE ORTOLAN

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INGREDIENTE ATIVO EM
PRODUTO TÉCNICO FORMULADO POR CLUE-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Ap. Zeferino Garcia.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Márcia Aparecida Zeferino Garcia
Universidade Sagrado Coração

Profa. Dra. Beatriz Antoniassi Tavares
Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Dorival Roberto Rodrigues
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 11 de Junho de 2012.

Dedico este trabalho, a DEUS que me abençoou em toda esta jornada, aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, e me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por proporcionar-me mais uma conclusão desta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, por todos os ensinamentos que eles me proporcionaram, e todo o apoio que somente eles poderiam me dar.

Agradeço a todos os meus professores, desde os tempos da pré-escola, até hoje, todos fazem parte da minha vida e minha história, e sempre me lembrarei deles com carinho.

Agradeço em especial à minha professora orientadora Dra. Márcia Ap. Zeferino Garcia, pela sua paciência, atenção e dedicação junto a mim neste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, que ao longo da minha jornada me ajudaram sempre, e estiveram comigo em todos os momentos, em especial agradeço aos meus amigos Éder e Valdemir, pelo apoio dado neste trabalho para que ele fosse realizado.

“Eu agradeço a todos que me disseram não.
É por causa deles que fiz tudo eu mesmo”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Este trabalho visa o desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação do teor de ingrediente ativo em produto técnico formulado utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). O pesticida escolhido pertence ao grupo químico fenil-pirazol. As técnicas convencionais de determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são muito demoradas, com um tempo de retenção do analito na fase estacionária relativamente alto. Empregando a técnica de CLUE o tempo de análise é reduzido apresentando assim uma grande vantagem em relação às metodologias disponíveis. Na otimização da metodologia foi empregado uma coluna analítica Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD com 3.0 x 150 mm d.i., tamanho de partícula de 1,8 μm . A fase móvel utilizada foi de Acetonitrila: água ultra pura 70:30 v/v com fluxo de 1,6 mL/min e comprimento de onda de 275 nm e detecção feita com um detector por arranjo de diodos (DAD). A linearidade do método apresentou coeficiente de correlação de 0,99998. As recuperações variaram de 99,91% para fortificação menor e de 99,76% para fortificação maior, coeficiente de variação (CV) de 0,69% para fortificação menor e coeficiente de variação (CV) de 0,95% para fortificação maior. Os resultados obtidos atendem às exigências da legislação brasileira e internacional. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade aos resultados, os valores obtidos por CLUE mostraram que a técnica é eficiente para o objetivo proposto.

Palavras-chave: Validação. CLUE. CLAE. Fenil-Pirazol.

ABSTRACT

This work aims at the development and validation methodology for the determination of content of active ingredient in technical product formulated using the technique of liquid chromatography ultra efficiency (UHPLC). The chosen pesticide belongs to the chemical group phenyl-pyrazole. Conventional techniques of determination by high performance liquid chromatography (HPLC), take much time with a retention time of the analyte in the stationary phase relatively high. By employing the technique of UHPLC the analysis time is reduced and thus has a great advantage over available methods. The optimization of the method was employed a C18 analytical column Eclipse Plus Rapid Resolution HD 150 x 3.0 mm id, particle size of 1.8 micrometers. The mobile phase was acetonitrile: ultrapure water 70:30 v / v with flow rate of 1.6 mL / min and a wavelength of 275 nm and detection was made by a diode array detector (DAD). The linearity of the method showed a correlation coefficient of 0.99998. The recoveries ranged from 99.91% for minor fortification and 99.76% for larger fortification; coefficient of variation (CV) of 0.69% for minor fortification and coefficient of variation (CV) of 0.95% for larger fortification. The results meet the requirements of Brazilian and international laws. Validation should ensure, through experimental studies, that the method meets the requirements of analytical applications, ensuring reliability of results. Values obtained by UHPLC have shown that this technique effective for the proposed objective.

Keywords: Validation. UHPLC. HPLC, Fenil-Pirazol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma com os tipos de cromatografia	12
Figura 2 - Etapas da cromatografia líquida clássica	14
Figura 3- Colunas cromatográficas	14
Figura 4 – Equipamento simplificado para CLAE.	15
Figura 5 - Compartimento para colunas da <i>Agilent Technologie</i> modelo 1290.....	17
Figura 6- Estrutura semelhante ao composto avaliado	24
Figura 7 - Cromatógrafo líquido Agilent 1290 Infinity	26
Figura 8 – Preparação da curva.	27
Figura 9 - Soluções padrão utilizadas na Curva Analítica.	28
Figura 10- Condições cromatográficas.	28
Figura 11- Cromatograma obtido na análise em branco.	30
Figura 12 - Cromatograma do Placebo.	31
Figura 13 - Cromatograma obtido para o padrão na concentração de 19,57 mg/L.	32
Figura 14 - Cromatograma obtido para o padrão na concentração de 89,45 mg/L.....	32
Figura 15 - Curva Analítica obtida para o pesticida em estudo com seis níveis de concentração, avaliados em triplicata.	34
Figura 16 - Cromatograma para avaliação da reprodutibilidade do analista 1	37
Figura 17- Cromatograma para avaliação da reprodutibilidade do analista 2.....	38
Figura 18 – Cromatograma obtido na concentração de 22,2656 mg/L, recuperação menor avaliada	40
Figura 19 – Cromatograma obtido na concentração de 60,1171 mg/L, recuperação maior avaliada	40
Figura 20 - Pico da menor concentração quantificada, ponto A da curva	41
Figura 21 – Ruído da menor concentração quantificada, ponto A da curva	42
Figura 22 – Determinação do Limite de Detecção (LD).....	43
Figura 23 – Limite de Quantificação (LQ).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Resultado das triplicatas realizadas para avaliação da linearidade do pesticida do grupo químico fenil pirazol	33
Tabela 2: Resultado final da avaliação da linearidade do método para o pesticida do grupo químico fenil-pirazol com o Fator de resposta	33
Tabela 3: Avaliação da precisão analítica expressa através do coeficiente de variação, CV(%) para repetitividade para n= 10.	35
Tabela 4: Resultados obtidos para avaliação da precisão interna ou reprodutibilidade	36
Tabela 5: Valores encontrados para avaliação da recuperação do pesticida nas amostras de placebo fortificadas	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência

CLUE-DAD – Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos

CV – Coeficiente de variação

DAD – Detector por arranjo de diodos

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

F.P. – Fenil-Pirasol

CG – Cromatografia Gasosa

GARP – Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes

Orgânicos

ISO – Organização Internacional para Padronização

IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional

IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

SE – Solução Estoque

tR – Tempo de retenção

UV-VIS – Ultravioleta - visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CROMATOGRAFIA	12
1.1.1 Cromatografia líquida.....	13
1.1.2 Diferenças entre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e a Cromatografia Líquida Clássica -CLC.....	13
1.1.3 Diferenças entre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – CLUE	15
1.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	18
1.2.1 Conceitos básicos do processo de validação.....	18
1.2.2 Parâmetros analíticos para validação de métodos	18
1.3 PESTICIDAS	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 INSTRUMENTAÇÃO E EQUIPAMENTOS	25
2.2 REAGENTES	26
2.3 PESTICIDA SELECIONADO	27
2.4 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO PESTICIDA	27
2.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	28
2.6 PREPARO DE AMOSTRAS.....	29
2.7 RECUPERAÇÃO.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4 CONCLUSÃO	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico e fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária sendo chamada de fase móvel (LANÇAS, 1993).

Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (COLLINS,1997).

A fase estacionária empregada poderá ser um sólido ou um líquido enquanto que a fase móvel poderá ser um fluido líquido, um gás ou um gás em condições supercríticas (acima da temperatura crítica e a altas pressões). Se a fase móvel for um líquido, a cromatografia será cromatografia a líquido ou cromatografia de fase líquida. Se a fase móvel for um gás ou um vapor, a cromatografia será cromatografia a gás ou cromatografia de fase gasosa. (JARDIM,2006). A Figura 1, mostra um fluxograma com os principais tipos de cromatografia que são qualificados de acordo com a fase móvel ou a fase estacionária utilizada.

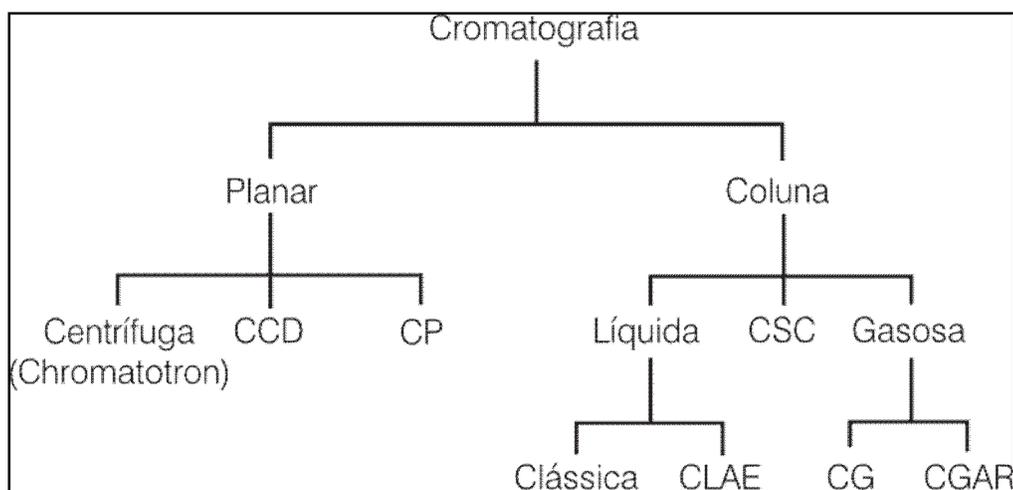


Figura 1 - Fluxograma com os tipos de cromatografia
Fonte: DEGANI (1998)

1.1.1 Cromatografia líquida

A fase estacionária utilizada neste método é um sólido, e como fase móvel utiliza-se um líquido no qual o soluto está dissolvido, assim, enquanto a fase móvel elui sobre a fase estacionária os solutos são separados de acordo com a interação destes com as fases, sendo eluído primeiro os que têm maior afinidade com a fase móvel e posteriormente os que têm maior afinidade com a fase estacionária. A cromatografia líquida pode ser dividida em:

Cromatografia líquida clássica (CLC): este método utiliza colunas com diâmetros relativamente grandes, empacotadas com fases estacionárias finamente divididas, pelas quais passam as fases móveis sob ação da gravidade. Separa misturas bastante complexas, porém é demorada e necessita que seja feito exame químico ou espectroscópico das frações coletadas (VOGEL, 2002).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Utiliza colunas fechadas que contêm partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes, são utilizadas altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo da análise (HARRIS, 2005).

1.1.2 Diferenças entre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e a Cromatografia Líquida Clássica -CLC

A cromatografia líquida clássica utiliza-se de um equipamento barato no qual o empacotamento da coluna é descartado, pois parte da amostra pode se adsorver de forma irreversível. A coluna deve ser cheia a cada separação acarretando desperdício de material e de mão-de-obra; o analista deve ser experiente, a eluição é feita pela ação da gravidade tornando o processo demorado, a quantificação e detecção são feitas pela análise manual das frações individuais o que requer muito tempo devido ao grande número de frações coletadas. Pode ser usada outra técnica instrumental que auxilie no processo de identificação do eluato, como espectrofotometria e potenciometria.(COLLINS; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003). A figura 2 mostra as etapas para a preparação de uma análise por cromatografia líquida clássica .

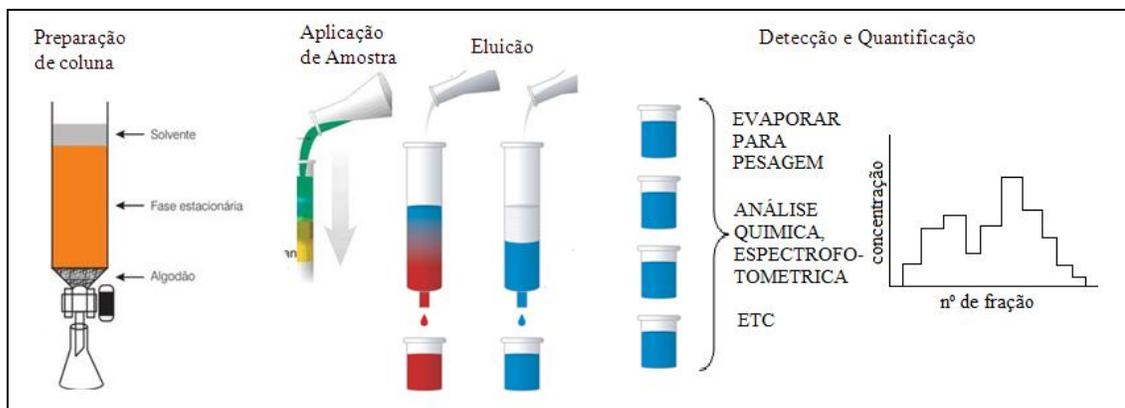


Figura 2 - Etapas da cromatografia líquida clássica
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Na cromatografia líquida de alta eficiência as colunas são fechadas e muito mais eficientes, pois existem diferentes tipos de fase estacionária melhorando a interação com o analito a ser separado e quantificado. Estas colunas podem ser utilizadas inúmeras vezes, porém oferece resistência à vazão da fase móvel necessitando aplicação de sistemas de bombas de alta pressão, o que promove uma maior velocidade de eluição. A figura 3 mostra algumas das colunas disponíveis atualmente no mercado com diferentes tamanhos.



Figura 3- Colunas cromatográficas
 Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência são mais precisas, a vazão da fase móvel é controlada. A injeção é feita com microseringas ou através de válvulas de injeção automatizadas. Atualmente no mercado existem diversos tipos de equipamentos com diferentes detectores, com alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade, mas dispõe de equipamentos caros e de alto custo de manutenção e operação (COLLINS, 1997; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003). A Figura 4 mostra um à representação de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

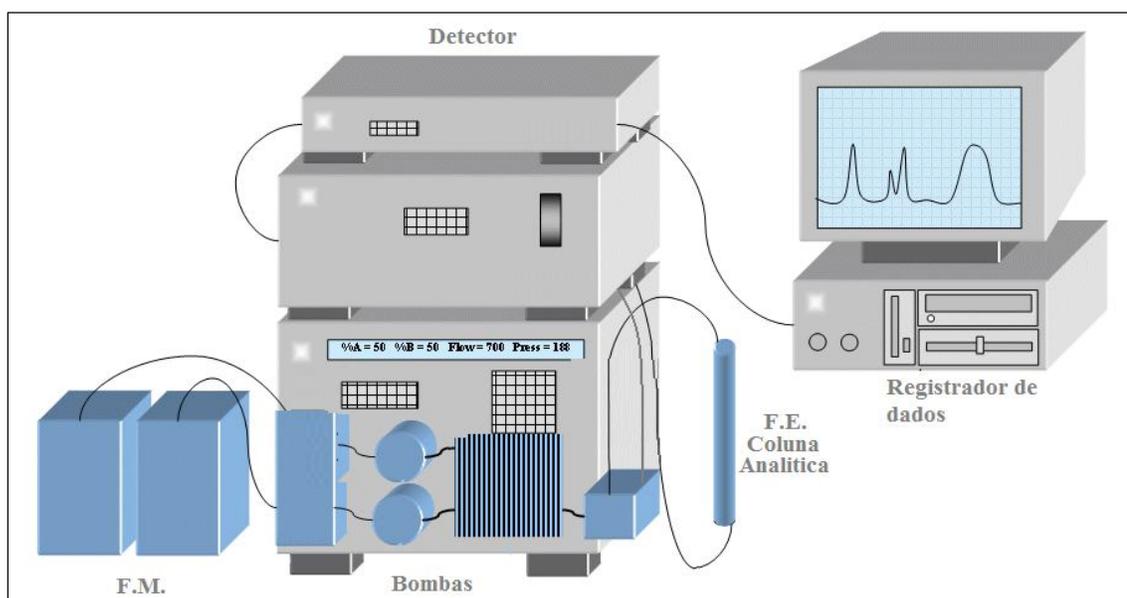


Figura 4 – Equipamento simplificado para CLAE.

Fonte: Typischer... (2003).

1.1.3 Diferenças entre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – CLUE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência vem se destacando cada vez mais e o seu emprego em laboratórios especializados em análises toxicológicas é considerado atualmente indispensável.

A separação e quantificação de pesticidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência têm se expandindo consideravelmente na atualidade. Isto se deve às vantagens reais que ela possui em relação a CG, na qual é difícil a análise de algumas classes de resíduos que possuem instabilidade térmica, alta polaridade e baixa sensibilidade em alguns detectores. Além disso, a CLAE possui uma maior variedade de mecanismos de separação possíveis, e desta forma, pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como para os inorgânicos sendo necessário que a amostra seja solúvel na FM e empregar um detector adequado.

Na determinação do teor de ingrediente ativo em produto técnico formulado, geralmente são empregados métodos cromatográficos de análise, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As análises para quantificação de teor de ingrediente ativo em produto técnico formulado, que são realizadas por CLAE convencional, ou por CG, resultam em tempos de análise muito longos. Com o objetivo de otimizar uma análise mais rápida e eficiente foi empregado no presente trabalho a técnica de CLUE Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC do inglês Ultra-High Performance Liquid Chromatography), esta nomenclatura tem sido recentemente utilizada para descrever separações que ocorrem com colunas sob pressões que superam 400 bar, enquanto que na CLAE a pressão não supera 300 bar.

Na prática, separações por CLUE podem ser realizadas em curtíssimos tempos de análise, com o mesmo poder de resolução de análises convencionais. Além disso, atualmente existem diversas colunas disponíveis (mais de dez fabricantes), tornando bastante viável a adaptação de métodos já otimizados para CLAE convencional para serem utilizados em CLUE. As principais limitações à ampla utilização da CLUE ainda são instrumentais, uma vez que se fazem necessários equipamentos especiais com bombas e sistemas de injeção capazes de suportar altíssimas pressões e detectores com elevadas taxas de aquisição de dados devido aos rápidos ciclos de análise e reduzidos volumes a serem percorridos pela fase móvel.

Temperaturas elevadas também são viáveis na melhoria do desempenho da CLAE. O emprego dessa estratégia vem sendo chamada HTLC (do inglês High Temperature Liquid Chromatography ou CLAT - Cromatografia Líquida a Alta Temperatura).

Seus principais efeitos estão relacionados à redução da viscosidade da fase móvel, o que permite mais alta difusão dos analitos e leva a maior eficiência do processo de transferência de massa. Adicionalmente, também se observa uma redução na pressão da coluna e, em associação com a característica anterior, permite análises mais rápidas por meio do aumento da vazão da fase móvel.

As modificações nas características físico-químicas dos solventes e solutos, decorrentes das altas temperaturas, implicam a necessidade de adaptações dos métodos sob essas condições. Variações na tensão superficial e constante dielétrica da água podem aumentar a sua força de eluição relativa à fase estacionária (requerendo menor percentual de solvente orgânico na fase móvel), alterações do pKa de solutos ácidos também podem modificar as interações secundárias dentro da coluna e/ou a seletividade para um certo pH da fase móvel (SANTOS NETO,2012).

Essas modificações de características físico-químicas, por um lado, podem ser exploradas como forma de melhorar a seletividade do método, por outro lado, elas implicam ajustes significativos ao se fazer a transferência de um método previamente desenvolvido para CLAE para um equivalente sob elevadas temperaturas.

Outras limitações são a necessidade de instrumentação capaz de controlar adequadamente a temperatura da fase móvel, a eventual degradação dos compostos com possíveis variações de temperatura e a instabilidade térmica de algumas fases estacionárias. Estas limitações podem ser minimizadas com a tecnologia atualmente desenvolvida nos mais recentes cromatógrafos que permite a estabilização da fase estacionária. A figura 5 mostra um compartimento para colunas do cromatógrafo líquido da *Agilent Technologie*, com temperatura controlada.



Figura 5 - Compartimento para colunas da *Agilent Technologie* modelo 1290.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O uso de fase estacionária empregando sílica com partículas menores resulta em maior eficiência e permite o uso de altas velocidades. Por outro lado, quanto menor o tamanho da partícula mais altas pressões se fazem necessárias para garantir a mesma vazão da fase móvel.

As duas abordagens apresentadas acima, CLAT e CLUE, podem ser utilizadas em conjunto, expandindo ainda mais o desempenho de um sistema. Essa estratégia vem sendo chamada HT-UHPLC e tem a capacidade de atingir o máximo de produtividade (alta eficiência em um mínimo de tempo) em CLAE. (SANTOS NETO,2012).

1.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O uso de uma determinada metodologia analítica deve ser precedida da verificação de sua aplicabilidade ao objetivo proposto. Numa análise química a amostra definirá sempre os rumos a serem tomados para a determinação qualitativa ou quantitativa de uma ou várias espécies presentes (LEITE, 2002).

O método escolhido deverá relacionar a amostra com o sinal analítico e portanto torna-se importante fazer a validação deste método para avaliar se os resultados obtidos são confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente.

Em análise química, a validação também é parte integral de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, EUA e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para quantificação de produtos como fármacos e resíduos de pesticidas em qualquer tipo de matriz. (LANÇAS, 1993).

1.2.1 Conceitos básicos do processo de validação

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob considerações pelas agências reguladoras. Algumas definições podem ser transcritas:

- “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

- “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025). (RIBANI et al., 2004).

1.2.2 Parâmetros analíticos para validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são:

- seletividade;
- linearidade ou faixa de aplicação (*range*);

- precisão; exatidão;
- limite de detecção;
- limite de quantificação;
- robustez.

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito . (RIBANI et al., 2004)

1.2.2.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (LEITE , 2002).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (LANÇAS, 1993).

Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse.

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. (RIBANI et al., 2004)

1.2.2.2 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2003).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica de calibração. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (LEITE, 2002).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . O perfil da equação de uma linha reta segue a equação $y = ax + b$, calculada a partir de parâmetros de y (ordenada) e x (abscissa) conhecidos, a corresponde a inclinação ou gradiente, e b , a intersecção com a ordenada y .

O coeficiente de correlação r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. (RIBANI et al., 2004)

1.2.2.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições,

normalmente maior que 10. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 f_i}{n}} \quad \text{ou} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 f_i}{n-1}}$$

Populacional *Quando se trata de uma amostra*

\bar{X} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações),

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

sendo uma estimativa da média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

O fato de o desvio padrão ser expresso na mesma unidade dos dados limita o seu emprego quando desejamos comparar duas ou mais séries de valores, relativamente a sua dispersão ou variabilidade, quando expressas em unidades diferentes. Para contornar essas limitações pode-se caracterizar a dispersão em termos relativos ao seu valor médio, medida essa denominada de CV: Coeficiente de Variação de Pearson (razão entre o desvio padrão S e a média dos valores encontrados \bar{X}) ou Desvio Padrão Relativo (DPR).

$$\text{DPR}(\%) \text{ ou } CV\% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um DPR de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. (RIBANI et al., 2004).

1.2.2.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão).

Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão. (RIBANI et al.,2004).

1.2.2.5 Ensaios de recuperação

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

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (RIBANI, 2004).

1.2.2.6 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica.

Para determinar a precisão da resposta do detector deve-se injetar no mínimo 03 vezes uma solução padrão do analíto, sendo que o coeficiente de variação (%CV) deverá ser inferior a 5%. (RIBANI, 2004).

1.2.2.7 Limite de Quantificação (LQ)

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

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Esse critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O método analítico e seu respectivo uso ditam esse compromisso. (RIBANI, 2004).

1.3 PESTICIDAS

Os pesticidas ou praguicidas são todas as substâncias ou misturas que têm como objetivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Segundo a legislação brasileira, as substâncias tóxicas utilizadas na agricultura devem ser obrigatoriamente denominadas como agrotóxicos. (LARINI, 1999).

Um agrotóxico ou pesticida pode ser uma substância química ou um agente biológico (tal como um vírus ou bactéria) que é lançada de encontro com as pragas que estiverem destruindo uma plantação, disseminando doenças, incomodando pessoas, etc. É utilizada em diversas formas de seres vivos, tais como: insetos, erva daninha, moluscos, pássaros, mamíferos, peixes, nematelmintos e micróbios. Não são necessariamente venenos, porém quase sempre são tóxicos ao ser humano.

Na maior parte dos países, a venda ou uso de um pesticida deve ser aprovada por uma agência do governo. Diversos estudos devem ser feitos para indicar se o material é eficaz no combate as pragas. (LARINI, 1999).

Alguns pesticidas são considerados demasiadamente perigosos para serem vendidos ao público geral. Somente pessoas e ou organizações que passaram por avaliações prévias podem comprar e supervisionar a aplicação destes tipos de pesticida.

O uso de pesticidas é ainda atualmente a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, pois são altamente efetivos no que se diz respeito ao controle de pragas, possuindo ação curativa rápida, sendo relativamente econômicos, adaptáveis à maioria das situações, de uso flexível e, portanto, considerados uma ferramenta de grande valor no manejo de pragas. O conhecimento do modo de ação dos pesticidas é de extrema importância para a implementação efetiva de programas de manejo de resistência de pragas a inseticidas. (LARINI, 1999)

O agrotóxico em estudo é um inseticida de segunda geração do grupo fenil-pirazol, neste trabalho será identificado como F.P. É um composto não-iônico utilizado como produto de uso caseiro em forma de isca, para o controle de baratas, formigas, grilos e cupins. A figura 6 mostra uma estrutura semelhante ao composto avaliado.

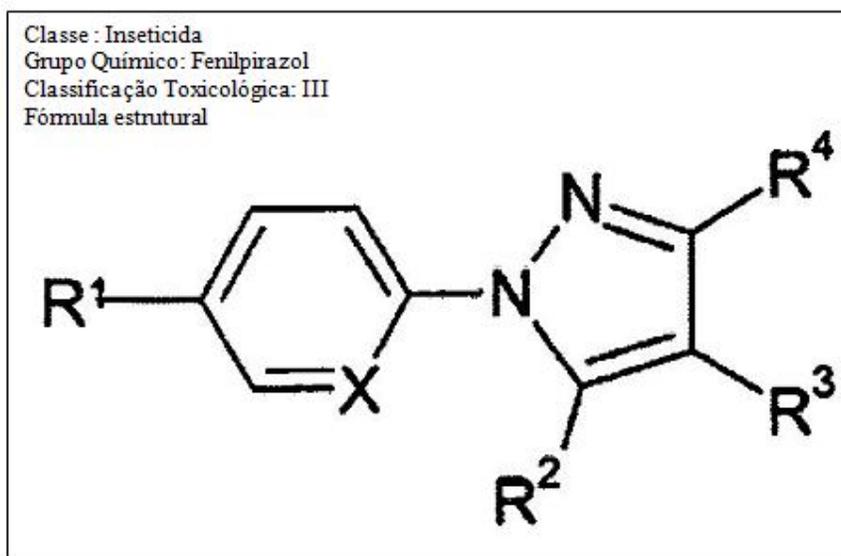


Figura 6- Estrutura semelhante ao composto avaliado
Fonte: Elaborado pelo autor.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 INSTRUMENTAÇÃO E EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram:

- Agitador vortex (Phoenix, modelo AP 56);
- Balança analítica, com precisão de 5 casas decimais (Ohaus Modelo AR 2140);
- Banho ultrassom (Modelo USC 6080 A 25 litros UNIQUE);
- Micropipeta de 10 – 100 μL (Gilson, modelo Pipetman P100);
- Micropipeta de 100 – 1000 μL (Gilson, modelo Pipetman P1000);
- Cromatógrafo Agilent, composto por um sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para programação de gradiente de alta pressão, modelo 1290 Infinity, com detector por arranjo de diodos -DAD, modelo 1290 Infinity, Injetor automático, com volume de injeção de 100 μL ;
- Porta colunas termostatizado modelo 1290 Infinity;
- Uma coluna cromatográfica ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 1200 bar tamanho (mm) 3.0 x 150, Tamanho da partícula (μm) 1.8;
- A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando-se o software Agilent Technologies Agilent OpenLAB ChemStation. A figura 7 mostra o cromatógrafo líquido utilizado neste trabalho

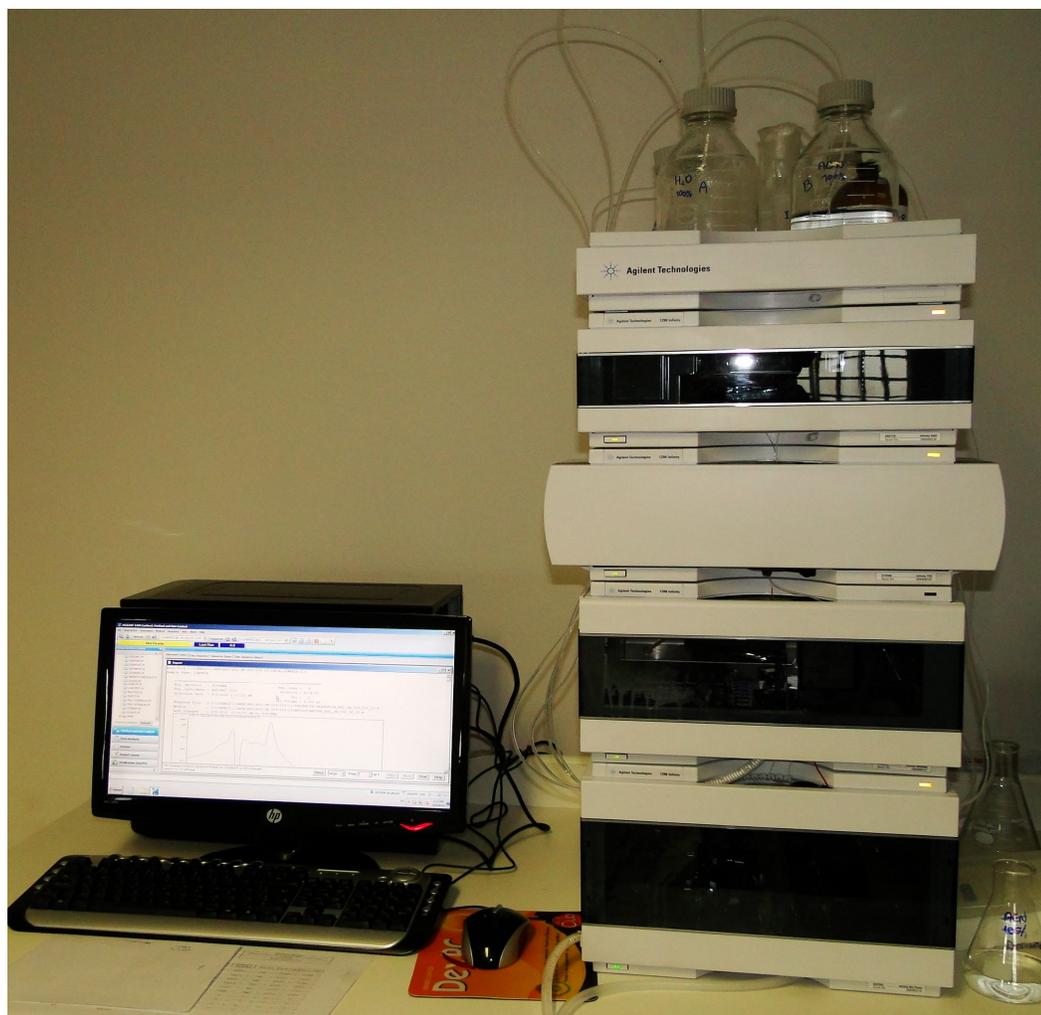


Figura 7 - Cromatógrafo líquido Agilent 1290 Infinity
Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 REAGENTES

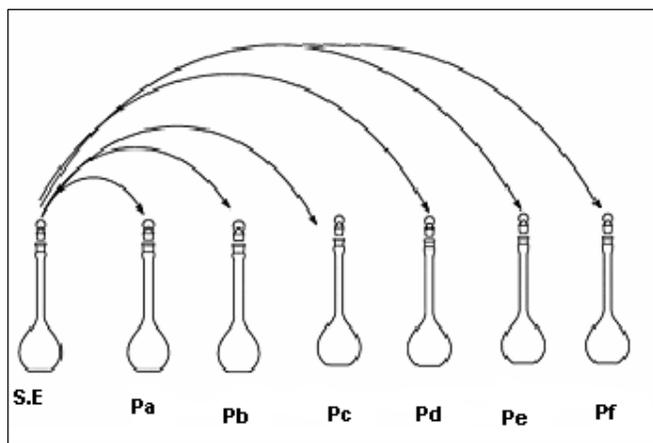
- Padrão analítico do agrotóxico com pureza de 99,4%, doado pelo fabricante
- Solventes, acetonitrila, grau cromatográfico da Tedia, água (Milli-Q – Millipore);
- Deterglass Alcalino da Chemco, para lavagem da vidraria utilizada, comum em laboratório de Análise Química Quantitativa.

2.3 PESTICIDA SELECIONADO

O pesticida avaliado neste trabalho foi selecionado devido a solicitação do fabricante para o desenvolvimento e validação de uma nova metodologia para quantificação por CLUE melhorando o tempo de análise já otimizado por CLAE. O padrão utilizado foi doado pelo fabricante e pertence à família do fenil-pirazol.

2.4 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO PESTICIDA

A partir do padrão sólido foi preparada uma solução estoque do pesticida de 1113,28 mg/L em acetonitrila totalmente solúvel. Esta solução foi estocada em refrigerador a - 4 °C por até 6 meses. A partir da solução estoque foram feitas diluições em concentrações adequadas para serem empregadas na construção das curvas analíticas e na fortificação, como esquematizado na figura 8.



*Diluições a partir da
solução estoque (S.E)*

Figura 8 – Preparação da curva.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A linearidade foi avaliada em uma faixa de 11,00 mg/L – 90,00 mg/L. Foram preparadas seis soluções-padrão para construção da curva analítica, com solução placebo. A figura 9 mostra os valores das concentrações.

Ponto A	11,1328 mg/L
Ponto B	20,0390 mg/L
Ponto C	31,1718 mg/L
Ponto D	55,6640 mg/L
Ponto E	66,7968 mg/L
Ponto F	89,0624 mg/L

Figura 9 - Soluções padrão utilizadas na Curva Analítica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Estas soluções, principalmente as mais diluídas, permanecem estáveis por um período de sete dias se armazenadas adequadamente e refrigeradas a - 4 °C.

2.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Foi utilizado o sistema cromatográfico descrito no item 2.1, modo de eluição isocrático, fase móvel com água ultra pura e acetonitrila, com fluxo de 1,6 mL/min. O volume de amostra injetado no sistema CLUE foi de 20 µL e a detecção foi realizada por absorção no UV por arranjo de diodos. A figura 10 mostra as condições cromatográficas completa para o pesticida estudado.

Condições Cromatográficas			
Equipamento:	CLUE-DAD-AGILENT-1290 INFINTY		
Coluna:	Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 3.0 x 150 mm, 1,8 µm		
Vol. de injeção (µL):	20		
Temp. do Forno (°C):	25	Comprimento de Onda (nm):275	
Fase Móvel : (v/v)	Acetonitrila (70%) Água Milli-Q(30%)		
Tempo (minutos)	Fase Móvel (v/v) Acetonitrila(70) – Água Mili-Q (30)		Fluxo (mL/min)
00:00			1,60
04:00			1,60

Figura 10- Condições cromatográficas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após serem definidas as condições cromatográficas de separação, foi otimizada a identificação do pesticida estudado injetando-se uma solução de 50 mg/L preparada em uma solução de água e acetonitrila 1:1 v/v.

O tempo de retenção e o espectro de absorção no UV do pesticida foi comparado ao obtido quando se injetou uma amostra desse composto industrializado.

Através do espectro de absorção no UV, determinou-se o comprimento de onda de absorção máxima do agrotóxico. Foi escolhido um comprimento de onda intermediário de 275 nm, no qual o composto apresentou alta absorbância.

2.6 PREPARO DE AMOSTRAS

As amostras pesadas foram dissolvidas em 10 mL de água e colocadas em ultra som por 10 minutos. Em seguida foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para um balão volumétrico de 5 mL, cujo volume foi completado o seu volume com ACN/água (1:1).

Para o desenvolvimento e otimização do método de preparo das amostras foram avaliados vários métodos de recuperação, empregando-se o placebo do composto industrializado, com o objetivo de se obterem resultados adequados, tanto em termos de recuperação quanto em quantidade de interferentes. Nesta etapa, foi empregada a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos.

2.7 RECUPERAÇÃO

O processo de fortificação se inicia com a adição da S.E. em concentração adequada ao nível desejado na solução placebo que foi obtida pesando 25,8 mg do Placebo, dissolvidos em 25 mL de água e deixado no ultrassom por 10 minutos. Em seguida foi retirado uma alíquota de 20 mL e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, cujo o volume foi completado o seu volume com Acetonitrila/Água (1:1).

O processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem dentro da amostra real. Nem sempre isto é totalmente possível, visto que a solução de fortificação é obtida com solventes orgânicos que geralmente, não estão presentes na matriz original, por isso tenta-se usar o mínimo possível de solução de fortificação. Deste modo na metodologia proposta, buscaram-se condições que promovam o mínimo de alterações possíveis na amostra original.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vidraria utilizada nas análises de pesticidas deve estar isenta de eventuais contaminantes, os quais podem interferir e levar a resultados errôneos, tanto na análise qualitativa, como na quantitativa, mascarando ou aumentando a concentração dos compostos presentes.

O procedimento utilizado para a limpeza da vidraria mostrou-se adequado, uma vez que os cromatogramas obtidos nas análises em branco não apresentaram picos na faixa do tempo de retenção (tR) referente ao composto de interesse. A análise em branco consiste em aplicar todas as etapas da metodologia sem incluir o analito em questão. A figura 11 representa o cromatograma obtido.

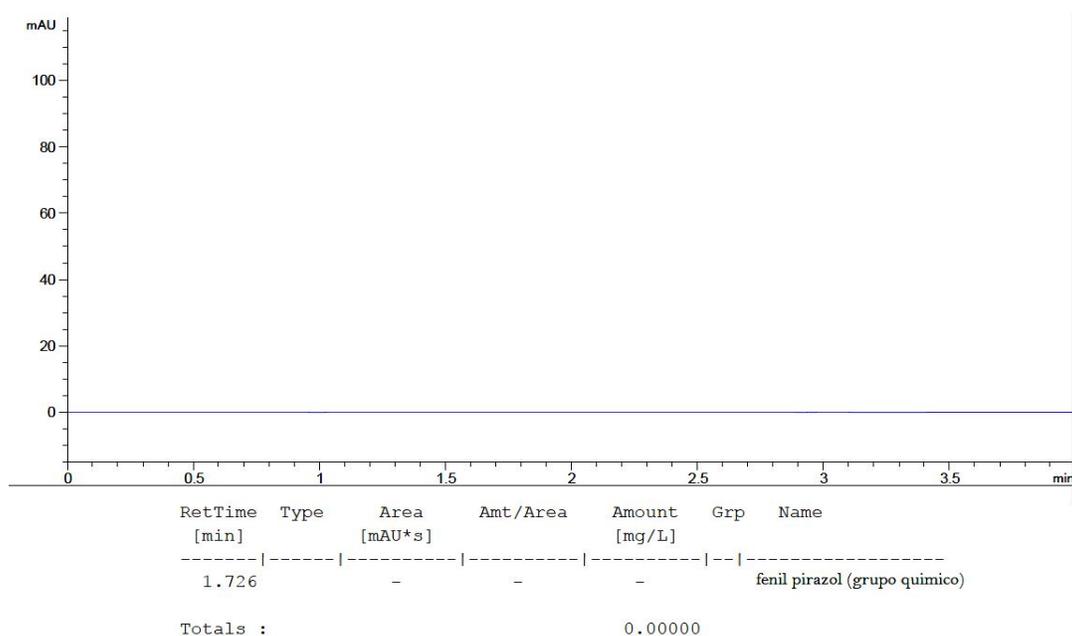


Figura 11- Cromatograma obtido na análise em branco.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As condições cromatográficas de análise foram estabelecidas considerando-se alguns parâmetros tais como, temperatura da coluna, fluxo da fase-móvel, pressão da bomba, volume da amostra injetado, tempo de retenção do analito e composição da fase móvel de modo a se obter um eficiente desempenho do equipamento com um menor tempo de análise e uma melhor resolução.

O estudo da influência da matriz foi verificado através da aplicação do método ao placebo. O cromatograma obtido com a análise da matriz (placebo) sem a adição do pesticida do grupo fenil-pirazol está mostrado na figura 12 e não apresenta picos interferentes na região de retenção, nas condições empregadas.

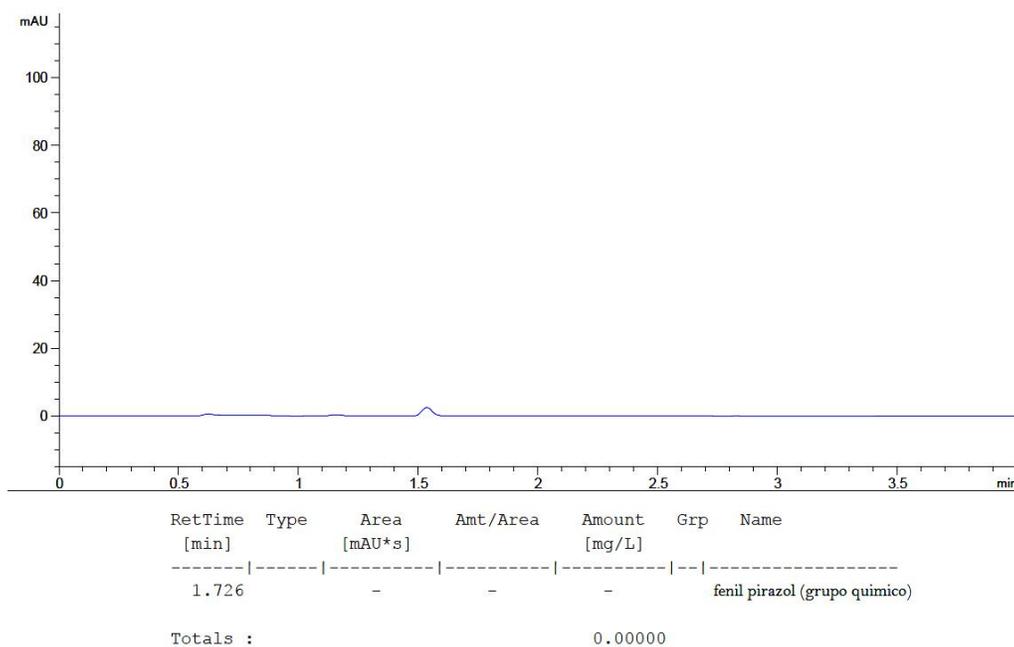


Figura 12 - Cromatograma do Placebo.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras 13 e 14 mostram dois cromatogramas para duas soluções padrão com concentrações diferentes, da curva analítica do pesticida F.P. nas condições cromatográficas otimizadas, com excelente resolução.

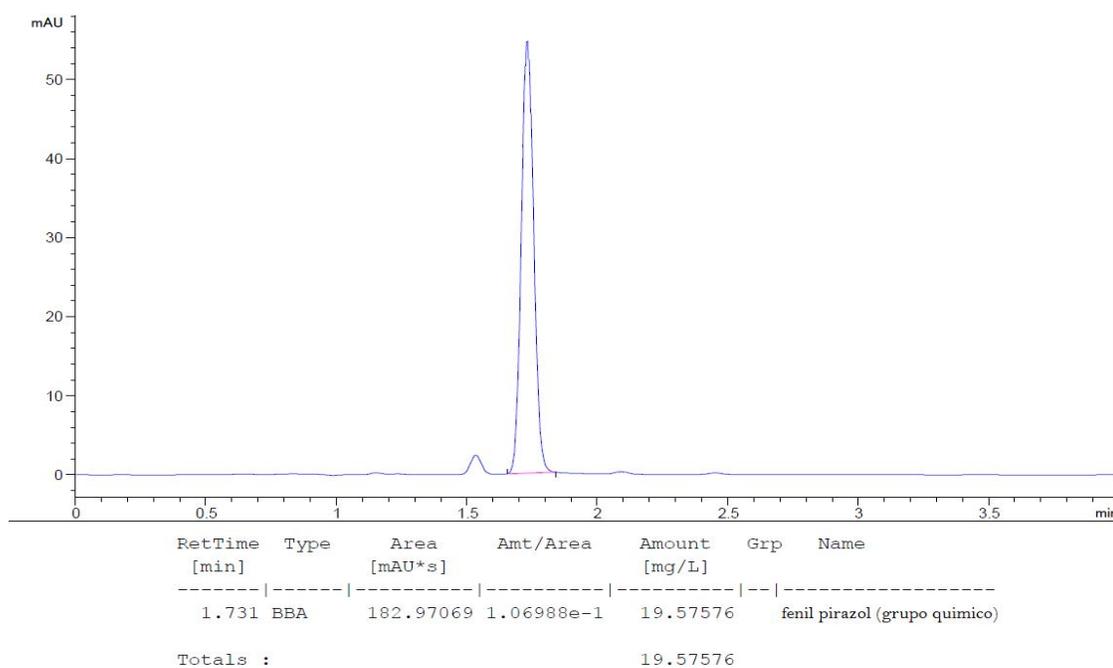


Figura 13 - Cromatograma obtido para o padrão na concentração de 19,57 mg/L.
Fonte: Elaborado pelo autor.

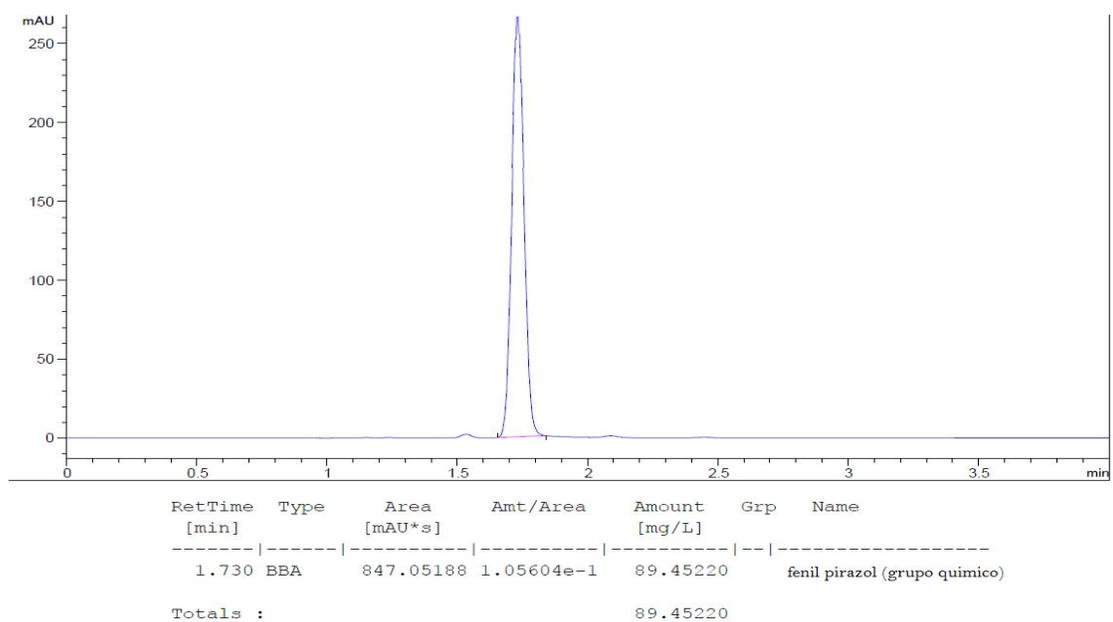


Figura 14 - Cromatograma obtido para o padrão na concentração de 89,45 mg/L.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Determinou-se a linearidade das amostras utilizando-se a média dos resultados para três soluções padrão no intervalo de concentração apresentado na tabela 1.

Tabela 1 : Resultado das triplicatas realizadas para avaliação da linearidade do pesticida do grupo químico fenil pirazol

	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E	Solução F
Concentração (mg/L)	11,1328	20,0390	31,1718	55,6640	66,7968	89,0624
Área – 1	105,8035	182,9707	289,2152	530,3142	626,7634	847,0519
Área – 2	105,9051	182,9765	288,7968	530,3352	626,7857	846,5279
Área – 3	105,9205	182,8458	288,8515	529,7648	627,2045	845,6954
Área – Média	105,8764	182,9310	288,9545	530,1381	626,9179	846,4251

A tabela 2 mostra os resultados finais obtidos na avaliação da linearidade do método com os respectivos, fatores de resposta, mostrando a repetibilidade nos resultados com desvio padrão menor do que 1%.

Tabela 2: Resultado final da avaliação da linearidade do método para o pesticida do grupo químico fenil-pirazol com o Fator de resposta

<i>t_R</i> = 1,725 min - 1,729 min	Concentração		Fator de resposta
	(F.P) mg/L	Área (média)	(Área/Amostra)
Padrão A	11,13300	105,87635	9,5101
Padrão B	20,03900	182,93098	9,1292
Padrão C	31,17200	288,95446	9,1289
Padrão D	55,66400	530,13808	9,5239
Padrão E	66,79700	626,91785	9,3854
Padrão F	89,06200	846,42507	9,5038
			V médio = 9,3636

A Figura 15 mostra a curva analítica e a equação da reta obtidas pelo *software Agilent Technologies Agilent Open LAB ChemStation*. Como pode ser observado pela equação da reta $Y = 9,50365.X - 3,07043$, o valor do coeficiente angular obtido pela regressão linear foi igual a 9,50365, ou seja próximo do fator de resposta médio encontrado, de **9,3636**, o que comprova a excelente linearidade do método proposto.

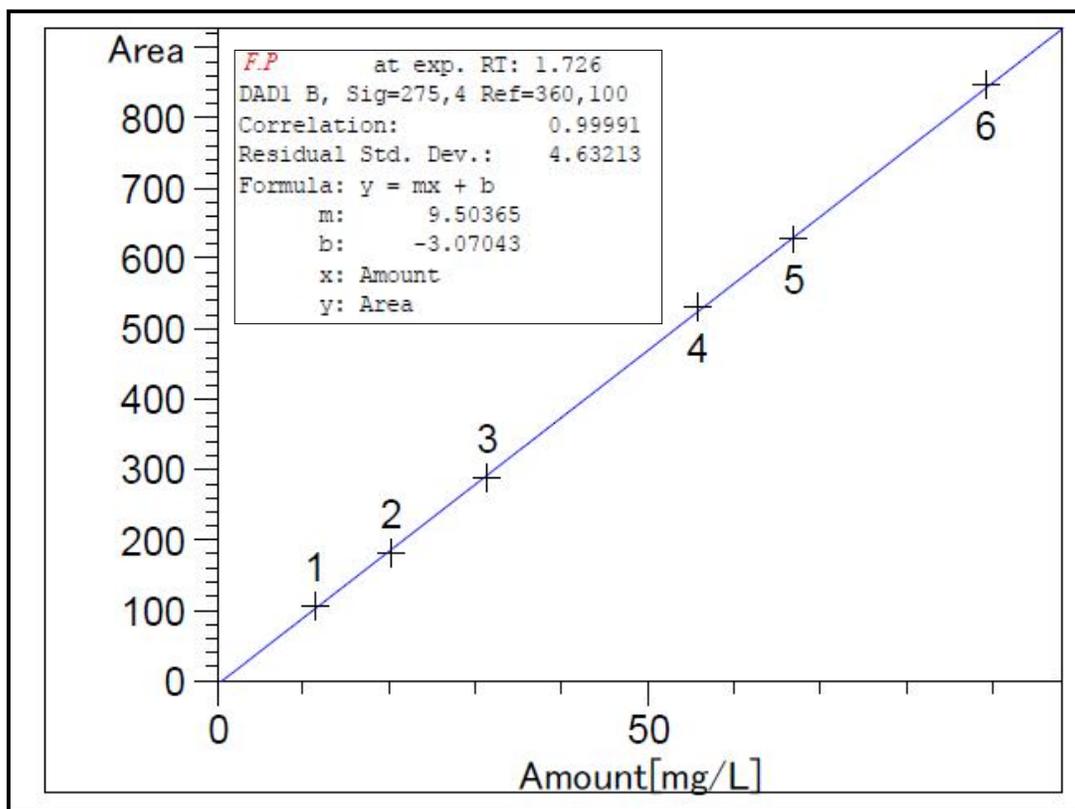


Figura 15 - Curva Analítica obtida para o pesticida em estudo com seis níveis de concentração, avaliados em triplicata.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de variação entre os valores encontrados para os fatores de resposta ficou bem abaixo do permitido pela legislação, menor de 1% (ANVISA, 2003). O gráfico de calibração encontrado apresentou coeficiente de correlação de 0,99991 o que representa uma excelente linearidade.

Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes Orgânicos (GARP) recomenda que as replicatas das soluções para a curva de calibração apresentem desvio relativo ou coeficiente de variação inferior a 5 %, os resultados obtidos atenderam este critério (RIBANI et al., 2004).

Para a avaliação da repetibilidade após a obtenção da curva de calibração para o pesticida puro avaliado, foram realizados alguns testes preliminares para a adaptação do protocolo para a determinação deste pesticida em amostras comercializadas. A precisão foi considerada no nível de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutividade. A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. A Repetitividade, também é conhecida como precisão intra-ensaios.

Foram realizadas injeções sucessivas da mistura preparada. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos com os CV% considerados para avaliar a precisão.

Tabela 3: Avaliação da precisão analítica expressa através do coeficiente de variação, CV(%) para repetitividade para n= 10.

Replicatas	Massa Produto (mg)	Concentração Nominal (mg/L)	Concentração Experimental (mg/L) F.P.	Teor (%)	DP	CV (%)
1			38,2273	19,11		
2			38,1894	19,09		
3			38,1965	19,10		
4			38,2130	19,11		
5	10,0	200,000	38,2095	19,10		
6			38,2058	19,10	0,01	0,04
7			38,2173	19,11		
8			38,2356	19,12		
9			38,1988	19,10		
10			38,1956	19,10		
-	-	-	-	V _m = 19,10	-	-

Para avaliar a reprodutibilidade interna ou precisão interna da metodologia foram realizadas cinco replicatas por dois analistas diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos para avaliação da precisão interna ou reprodutibilidade

Ana- lista	Repli- cata	Massa Produto (mg)	Concent. Nominal (mg/L)	Concentr. Experimental (mg/L)	Teor (%)	Média do Teor (%)	DP	CV (%)
1	1	10,2	204,0000	39,0601	19,1471	19,19	0,30	1,54
	2	10,0	200,0000	39,0303	19,5151			
	3	10,2	204,0000	38,2144	18,7325			
	4	10,0	200,0000	38,3592	19,1796			
	5	10,8	216,0000	41,8323	19,3668			
2	1	10,6	212,0000	40,5754	19,1393	19,04	0,16	0,86
	2	11,5	230,0000	43,2004	18,7828			
	3	10,6	212,0000	40,7265	19,2106			
	4	10,3	206,0000	39,2739	19,0650			
	5	11,1	222,0000	42,1661	18,9937			

Para análise de constituintes em nível de mg/L, o coeficiente de variação para avaliação da precisão analítica pode ser no máximo 20% no limite de quantificação do

método, ou até 15% fora do limite. Portanto para este método a determinação do FP pode ser considerada precisa.

As figuras 13 e 14 mostram dois cromatogramas obtidos para avaliação da precisão interna, sendo um pelo analista 1 e outro pelo analista 2, considerando esta mudança de variável pode-se confirmar a repetibilidade no t_R e no fator de resposta obtido pelos dois analistas pela metodologia proposta.

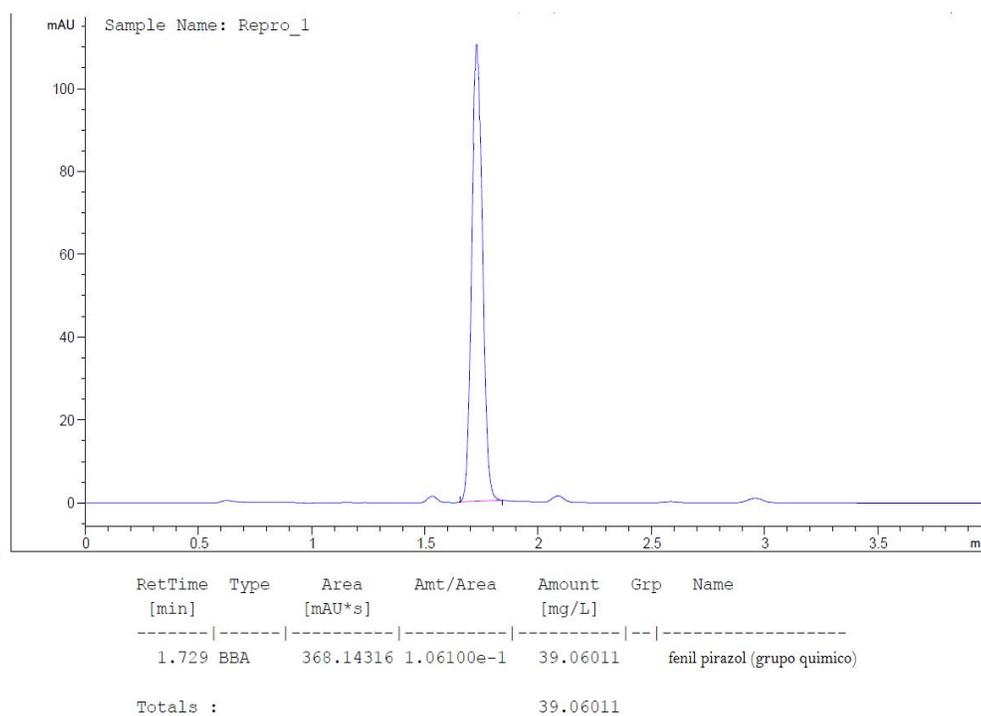


Figura 16 - Cromatograma para avaliação da reprodutibilidade do analista 1
Fonte: Elaborado pelo autor.

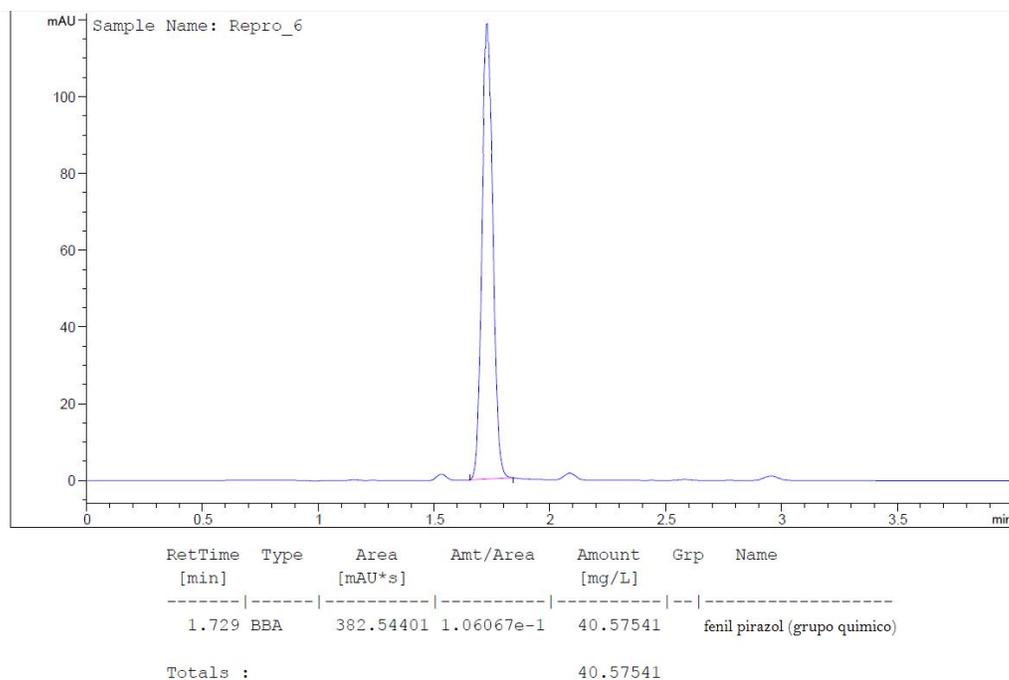


Figura 17- Cromatograma para avaliação da reprodutibilidade do analista 2
Fonte: Elaborado pelo autor.

A abrangência da exatidão foi avaliada em dois níveis de concentração, para cada nível, foram efetuadas cinco determinações. Os valores de recuperação obtidos para o pesticida estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores encontrados para avaliação da recuperação do pesticida nas amostras de placebo fortificadas

Concentração Nominal (mg/L)	Concentração Experimental (mg/L)	Recuperação (%)	Média das recuperações (%)	DP (%)	CV (%)
22,2656	22,0090	98,8474	99,91	0,69	0,69
	22,2705	100,0222			
	22,3780	100,5046			
	22,1904	99,6623			
	22,3809	100,5177			
60,1171	59,9439	99,7118	99,76	0,95	0,95
	59,4176	98,8364			
	60,3461	100,3809			
	60,7298	101,0191			
	59,4402	98,8740			

O método foi considerado suficientemente exato, pois as recuperações estão compreendidas na faixa entre 70 e 120%, estabelecida pela literatura na área de análise de resíduos de pesticidas. Os valores de recuperação encontrados ficaram muito próximos de 100% e se repetiram em todas as amostras, evidenciando a consistência do método, fato já comprovado pelo estudo da precisão.

As figuras 15 e 16 mostram dois cromatogramas obtidos para avaliação da recuperação na faixa de concentração menor de 22,2656 mg/L e um segundo cromatograma para a recuperação maior na concentração de 60,1171mg/L.

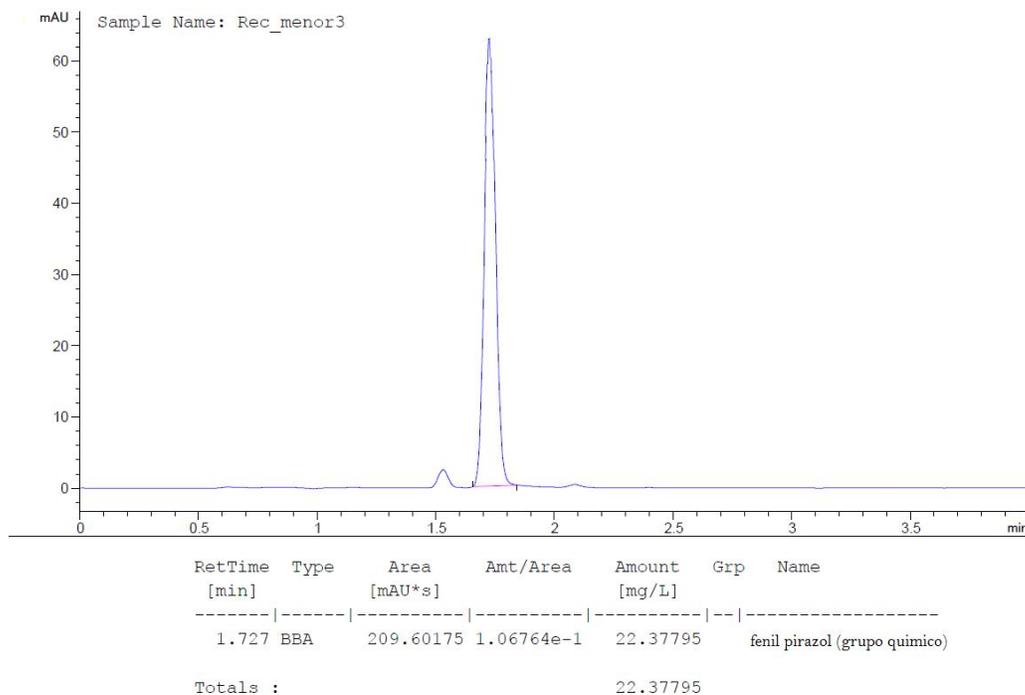


Figura 18 – Cromatograma obtido na concentração de 22,2656 mg/L, recuperação menor avaliada
 Fonte: Elaborado pelo autor.

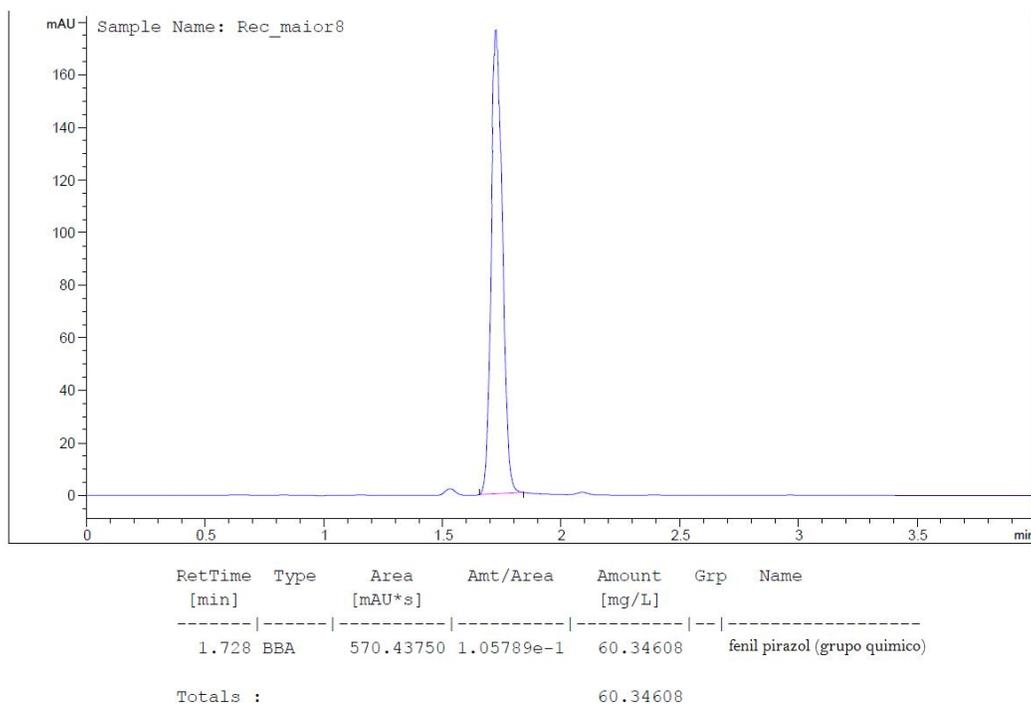


Figura 19 – Cromatograma obtido na concentração de 60,1171 mg/L, recuperação maior avaliada
 Fonte: Elaborado pelo autor.

O Limite de Quantificação é o menor nível de concentração em que se conhecem a exatidão e a precisão do método. De acordo com o método de o Limite de Detecção (LD) é calculado com base nos resultados para o LQ. O cromatograma obtido para o limite de quantificação foi de 11,45601mg/L mostrado na Figura 20.

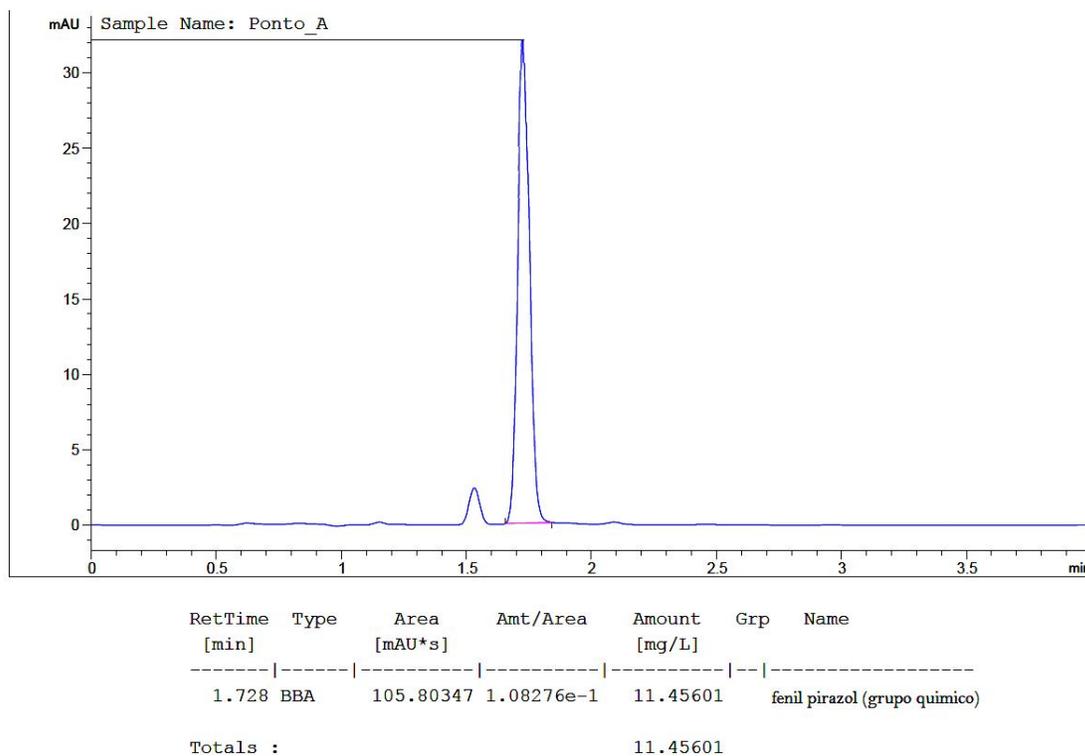
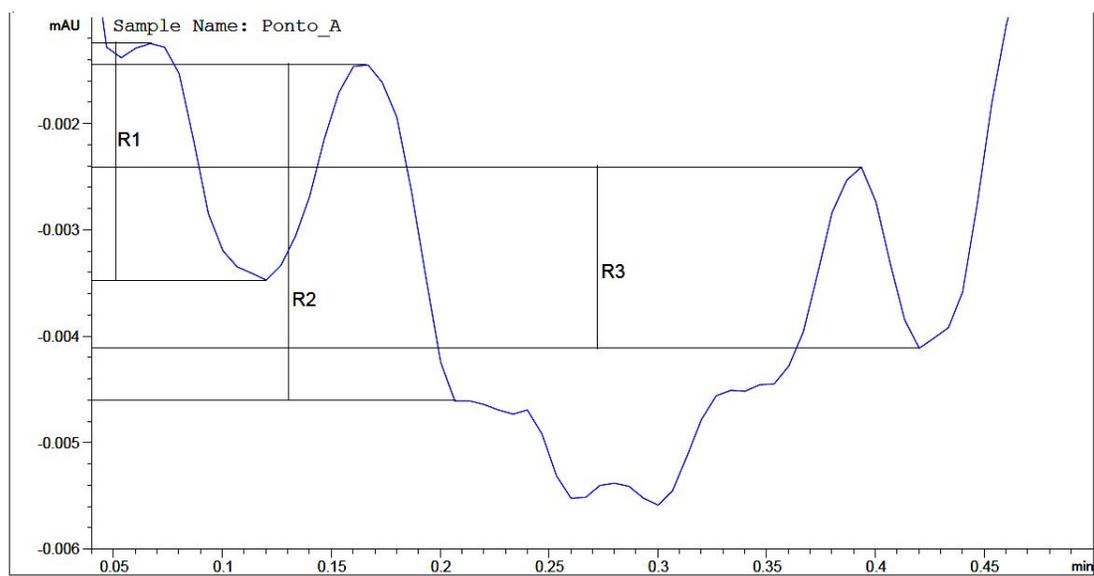


Figura 20 - Pico da menor concentração quantificada, ponto A da curva
Fonte: Elaborado pelo autor.

O cromatograma mostrado na figura 21 foi utilizado para o cálculo do limite de detecção, considerando o ruído identificado no cromatograma da menor concentração quantificada, ponto A da curva.



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
1.728	BBA	105.80347	1.08276e-1	11.45601		fenil pirazol (grupo quimico)
Totals :				11.45601		

Figura 21 – Ruído da menor concentração quantificada, ponto A da curva
 Fonte: Elaborado pelo autor.

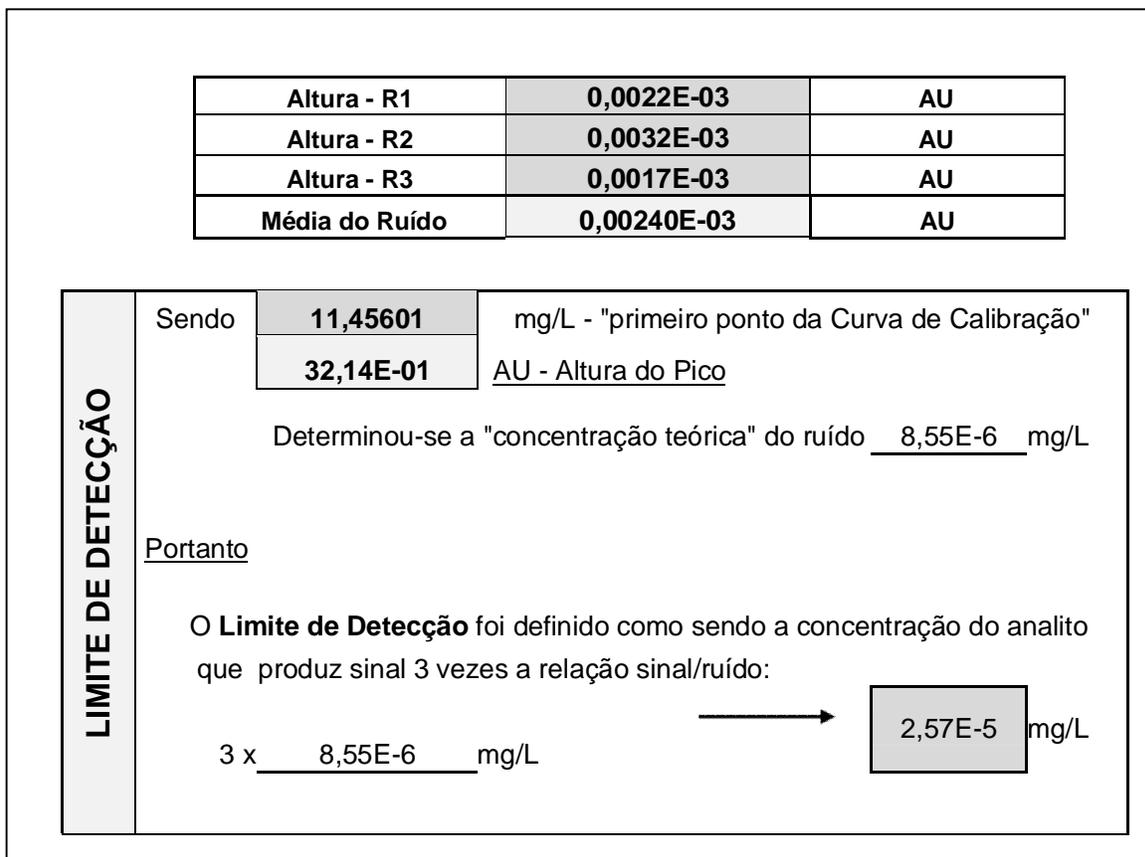


Figura 22 – Determinação do Limite de Detecção (LD)

Fonte: Elaborado pelo autor.

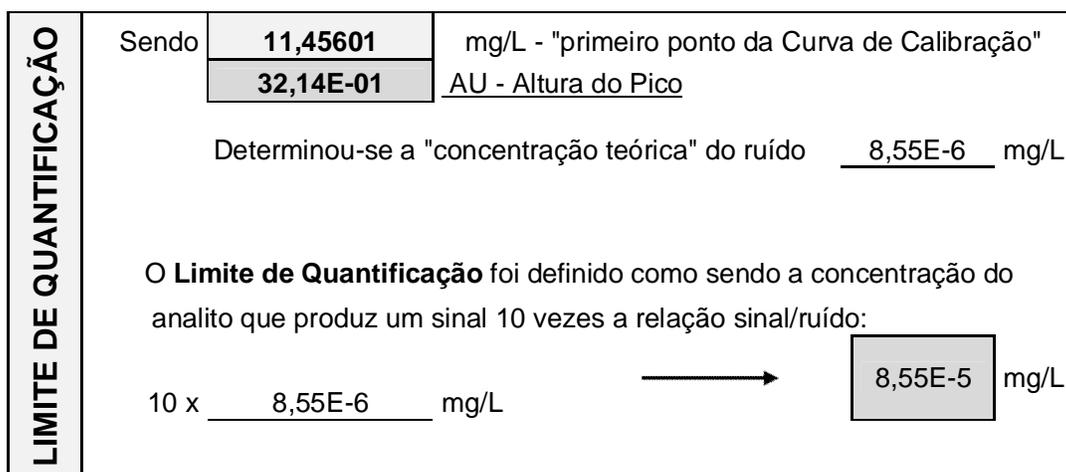


Figura 23 – Limite de Quantificação (LQ)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4 CONCLUSÃO

As atividades desenvolvidas neste trabalho empregando CLUE-DAD, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência resultaram em uma proposta de trabalho analítico rápido e eficiente que se resume em uma simples dissolução da amostra em água e acetonitrila seguida pela injeção da amostra no cromatógrafo. O consumo de solvente foi significativamente resumido pela redução no tempo de retenção dos métodos anteriores propostos para este grupo químico de pesticida.

Dos parâmetros discutidos neste trabalho, os referentes ao próprio método, isto é sensibilidade, limite de quantificação e detecção satisfazem a legislação e as necessidades a que a metodologia se propõe. Quanto a precisão e exatidão, estes satisfazem as exigências do modelo estatístico aplicado para validação de metodologia para pesticidas, Desde modo considerou-se o método desenvolvido validado, sendo adequada para avaliação do agrotóxico em formulações comercializadas. Os ensaios de validação apresentados estão de acordo com as recomendações internacionais e vigentes no país.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos**, Resolução-Re nº. 899, de 29 De Maio de 2003.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 416p.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 207p.

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

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia**, 1998
Disponível em: < <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/actual.pdf>>. Acesso em:08/06/2012

GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.183-238.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005. 876p.

JARDIM, Isabel Cristina Fontes Sales; GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.

JAKOB, E.; ELMADF, I.; Rapid and simple HPLC analysis of vitamin K in food, tissues and blood. **Food Chemistry**, v.68, n.2, p.219-221, fev 2000.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**, 4. ed., Editora Átomo: Campinas, 2002.

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

SANTOS NETO, A. J. **Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC**, 2012 Disponível em: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2011.005>
Acesso em: 22 março 2012

TYPISCHER aufbau einer HPLC-apparatur. **Wikipedia**, 2003. Disponível em:
<<http://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:HPLC.gif>>. Acesso em: 08 jun. 2012.

VOGEL, Arthur. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462p.