



Kelly Neoob de Carvalho Castro

**Métodos de quantificação de imidacloprid
em soluções aquosas: Validação
metrológica e comparação entre
absorciometria molecular e cromatografia
líquida de alta eficiência.**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade e Inovação da PUC-Rio como requisito para obtenção do título de Mestre em Metrologia.

Orientador: Prof. Reinaldo Calixto de Campos

Co-orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro
Março de 2007



Kelly Neoob de Carvalho Castro

Métodos de Quantificação de Imidacloprid em soluções aquosas: Validação metrológica e comparação entre absorciometria molecular e cromatografia líquida de alta eficiência

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação do Centro Técnico Científico da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Aprovada pela Comissão Examinadora e homologada pela Coordenação Setorial de Pós-Graduação, formalizado pelas respectivas assinaturas.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos

Orientador
Departamento de Química
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

Co-Orientador
Departamento de Química
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Dra. Vanderléa de Souza

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e
Qualidade Industrial

Dr. Aderval Severino Luna

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dr. Josino Costa Moreira

Fundação Oswaldo Cruz

Coordenação Setorial de Pós-Graduação:

Prof. José Eugênio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do
Centro Técnico Científico (PUC-Rio)
Rio de Janeiro, 30 de março de 2007.

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Kelly Neoob de Carvalho Castro

Graduou-se em Engenharia Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1985. Atuou no setor de celulose no período de 1985 a 1986. Desempenhou atividade profissional, no setor de defensivos agrícolas e medicamentos de uso veterinário de 1986 a 2007, atuando no desenvolvimento de produtos, inclusive, como responsável técnico por laboratório de ensaios pertencente à RBLE e REBLAS.

Ficha Catalográfica

Castro, Kelly Neoob de Carvalho

Métodos de quantificação de imidacloprid em soluções aquosas: Validação metrológica e comparação entre absorciometria molecular e cromatografia líquida de alta eficiência / Kelly Neoob de Carvalho Castro; orientador: Reinaldo Calixto de Campos; co-orientador: Ricardo Queiroz Aucélio. – 2007.

166 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Metrologia Qualidade e Inovação) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Incerteza de medição. 3. Validação de métodos analíticos. 4. Comparação de incertezas e tolerâncias. 5. Técnicas estatísticas. 6. Espectrometria de absorção molecular. 7. Imidacloprid. I. Campos, Reinaldo Calixto de. II. Aucélio, Ricardo Queiroz. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade Industrial. III. Título.

CDD: 389.1

Agradecimentos

Aos Professores Reinaldo Calixto de Campos e Ricardo Queiroz Aucélio pelo acolhimento, orientação e incentivo na realização deste trabalho.

À professora Ana Cristina Oliveira do Departamento de Matemática da PUC - Rio pela ajuda na revisão da parte estatística do trabalho.

Ao Anselmo Bezerra Neves, técnico do Departamento de Química da PUC - Rio, pela ajuda na parte experimental realizada nos laboratórios desta instituição.

Aos colegas da Servatis, pela ajuda na condução da parte experimental realizada no LADM.

A diretoria da Servatis, pela compreensão e liberação para realização do curso.

A PUC - Rio e ao professor Maurício Frota pelo auxílio concedido durante o curso.

Aos funcionários da PUC - Rio, em especial à Eliane, secretaria do CTC e à Márcia, secretária do curso.

A comissão examinadora

Resumo

Castro, Kelly Neoob de Carvalho Castro; Campos, Reinaldo Calixto; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Métodos de quantificação de imidacloprid em soluções aquosas: Validação metrológica e comparação entre absorciometria molecular e cromatografia líquida de alta eficiência.** Rio de Janeiro, 2007. 166 p. Dissertação de Mestrado – Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Um procedimento analítico é considerado apropriado para uma aplicação específica quando é capaz de gerar resultados confiáveis, que possibilitem a tomada de decisão com grau de confiança adequado, sendo sua adequação consolidada mediante a realização de ensaios de validação. Este trabalho propõe a utilização de um procedimento analítico alternativo, mais simples e econômico, baseado na técnica espectrofotométrica de absorção molecular, para quantificação de imidacloprid, um inseticida sistêmico, em amostras de solução aquosa. Foi demonstrado que o procedimento proposto é adequado ao uso pretendido descrevendo-se, detalhadamente, cada etapa da validação, considerando-se os limites estabelecidos para cada parâmetro de validação e aplicando-se técnicas estatísticas apropriadas na avaliação dos mesmos: análise de variância, análise de regressão, testes de significância, gráficos de controle e a estimativa da incerteza de medição. As incertezas de medição dos procedimentos de rotina e alternativo foram estimadas e comparadas às tolerâncias estipuladas, estabelecendo o procedimento alternativo como adequado. Uma comparação experimental deste procedimento com o de rotina (baseado em HPLC) foi realizada como parte do protocolo de validação. Além da avaliação do procedimento para quantificação de imidacloprid em nível de traços, foi investigada também a possibilidade de sua utilização, para a quantificação do mesmo ingrediente ativo em produtos formulados. Neste caso, foi demonstrado, através da comparação das incertezas estimadas às tolerâncias estabelecidas, que o procedimento alternativo não é adequado, por apresentar incertezas na ordem de aproximadamente 50% do valor destas tolerâncias, não possuindo assim o rigor metrológico requerido para esta aplicação.

Palavras-chave

Metrologia – Teses; Incerteza de medição; Validação de métodos analíticos; Comparação de incertezas e tolerâncias; Técnicas estatísticas; Espectrofotometria de absorção molecular, Imidacloprid.

Abstract

Castro, Kelly Neoob de Carvalho Castro; Campos, Reinaldo Calixto de; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Methods for the imidacloprid quantification in aqueous solutions: Metrological validation and comparison between UV-vis spectrophotometry and high-performance liquid chromatography**. Rio de Janeiro, 2007. 166 p. MSc. Dissertation – Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

For analytical procedures to be sufficiently reliable to support any decision taken based on the generated results, in order to achieve that, consolidated adequacy evaluation of the analytical procedure must be obtained by performing validation experiments. In this work, an alternative and simpler spectrophotometric method for the quantification of imidacloprid in aqueous samples was compared to the HPLC-UV based reference method used in routine. The overall validation procedure started with a detailed description of each validation stage, followed by the settling of the limits for each of the validation parameters and then, applying the following statistical techniques to evaluate each of the parameters: ANOVA, regression analysis, significance tests, control charts and uncertainty estimation. The measurement of uncertainties estimation, based on ISO-GUM recommendations, was done for both analytical procedures (the alternative one and the reference one). After comparing these uncertainties with the tolerance values, the adequacy of the alternative proposed procedure was confirmed. Finally, by consolidating the validation, the experimental comparison of quantification methods was conducted. Besides evaluating the analytical procedure for trace-level imidacloprid quantification in water samples, the proposed method was also evaluated as the analytical procedure for imidacloprid based formulated products. In this case, it was demonstrated that the spectrophotometric method did not present the requested metrological requirements for such application, since the estimated uncertainties of the alternative procedure were about 50 % of the tolerance values.

Key Words

Metrology; Measurement uncertainty; Method validation; Comparison of analytical methods; Statistical methods; Analytical methods comparison; Molecular absorbance spectrophotometry; Imidacloprid;

Sumário

1. Introdução	12
2. Validação e ferramentas estatísticas	18
2.1 Gráficos de controle	22
2.2 Testes de significância	23
2.2.1 Comparação entre média amostral e média populacional	24
2.2.2 Comparação do desvio padrão entre duas populações	24
2.2.3 Verificação da existência de valores dispersos	24
2.2.4 Verificação da homogeneidade de variâncias	25
2.2.5 Detecção de curvatura	25
2.2.6 Comparação entre duas relações lineares	26
2.3 Análise de variância	28
2.4 Análise de regressão	29
2.5 Incerteza de medição	33
3. Materiais, amostras e procedimentos analíticos	40
3.1 Materiais	40
3.2 Amostras	41
3.2.1 Amostras de produtos técnicos e formulados	41
3.2.2 Amostras para estudos toxicológicas (soluções aquosas)	41
3.3 Procedimentos analíticos	44
3.3.1 Análise de amostras para estudos toxicológicos	44
3.3.2 Análise de produtos técnicos e formulados	45
4. Resultados e discussão	47
4.1 Análise de amostras para estudos toxicológicos	47
4.1.1 Seleção do comprimento de onda	47
4.1.2 Estudo de estabilidade do sistema espectrofotométrico	48
4.1.3 Linearidade	50
4.1.4 Estudo de interferências	55
4.1.5 Estudo de precisão, exatidão e robustez	58
4.1.5.1 Robustez em função do comprimento de onda	59
4.1.5.2 Robustez em função do pH da amostra	62
4.1.6 Estimativa da incerteza de medição	64
4.1.7 Comparação experimental com método padrão	66
4.2 Análise de amostras de produtos formulados e técnico	69
5. Considerações finais	75
6. Referências bibliográficas	78
Apêndice I	82
Estimativa da incerteza de medição para determinação de teor imidacloprid em soluções aquosas – Técnica espectrofotométrica.	
Apêndice II	101
Estimativa da incerteza de medição para determinação de teor imidacloprid em soluções aquosas – Técnica cromatográfica.	

Apêndice III	119
Estimativa da incerteza de medição para determinação de teor imidacloprid em produtos técnico e formulados – Técnica cromatográfica.	
Apêndice IV	137
Estimativa aproximada da incerteza de medição para determinação de teor de imidacloprid em produtos técnico e formulados – Técnica espectrofotométrica.	
Anexo I	159
Tabela de valores críticos para o teste de Cochran.	
Anexo II	160
Certificado de calibração da balança analítica	
Anexo III	164
Certificado de calibração do medidor de pH.	
Anexo IV	166
Certificado do padrão de imidacloprid.	

Lista de Tabelas:

Tabela 1.1	Principais tipos de formulações.	13
Tabela 2.1	Valores do fator divisor para as funções de distribuição de probabilidade mais utilizadas.	35
Tabela 2.2	Valores do fator de abrangência para nível de confiança de 95,45%.	39
Tabela 3.1	Listagem de equipamentos e materiais.	40
Tabela 3.2	Listagem de amostras de produtos formulados e técnicos.	41
Tabela 3.3	Amostras de solução aquosas utilizadas para comparação dos procedimentos analíticos.	42
Tabela 3.4	Composição do meio de cultura utilizado em ensaio de algas.	44
Tabela 4.1	Dados obtidos para a curva de calibração do procedimento espectrofotométrico.	51
Tabela 4.2	Resultados da análise regressão para a curva de calibração.	52
Tabela 4.3	Resultados da análise de regressão quando a passagem da curva pela origem foi forçada.	54
Tabela 4.4	Concentrações molares de imidacloprid e respectivas absorvâncias.	55
Tabela 4.5	Resultados da análise de regressão para a curva de fortificação.	57
Tabela 4.6	Conjunto unificado de dados, obtidos a partir dos dados gerado para as curva de calibração e fortificação, com introdução de variáveis de indicação.	57
Tabela 4.7	Resultados experimentais obtidos para os ensaios de fortificação.	60
Tabela 4.8	Resultados experimentais obtidos para ensaios de robustez com variação do comprimento de onda.	61
Tabela 4.9	Resumo dos dados obtidos para diferentes comprimentos de onda.	61
Tabela 4.10	Análise de variância (1 fator) para valores obtidos com comprimento de onda de 275, 278, 280, 282 e 285 nm.	61
Tabela 4.11	Análise de variância (1 fator) para valores obtidos com comprimento de onda de 280 e 278 nm.	62
Tabela 4.12	Resultados experimentais obtidos para ensaios de robustez com variação de pH.	63

Tabela 4.13	Resumo dos dados obtidos para diferentes valores de pH.	63
Tabela 4.14	Análise de variância (1 fator) para valores obtidos a diferentes níveis de pH.	64
Tabela 4.15	Comparação das incertezas estimadas e tolerâncias estabelecidas para os procedimentos de determinação de imidacloprid em solução aquosa.	65
Tabela 4.16	Resultados experimentais obtidos pela análise de amostras utilizando os procedimentos proposto e de referência.	67
Tabela 4.17	Resumo dos dados experimentais obtidos pela análise de amostras utilizando os procedimentos proposto e de referência.	68
Tabela 4.18	Resultados da análise de variância para valores experimentais obtidos na avaliação de amostras pela aplicação dos procedimentos proposto e referência.	68
Tabela 4.19	Resultados da análise de regressão obtidos a partir dos dados experimentais de comparação direta de procedimentos analíticos.	69
Tabela 4.20	Estimativa da contribuição da precisão do instrumento para incerteza do procedimento analítico.	71
Tabela 4.21	Tolerâncias e incertezas estimadas para os procedimentos sob comparação.	72

Lista de Figuras

Figura 1.1	Fórmula estrutural do imidacloprid	15
Figura 2.1	Representação gráfica da metade dos intervalos de confiança, a , para as distribuições normal, retangular e triangular, respectivamente.	35
Figura 4.1	Espectro de absorção de imidacloprid (10 mg/L) em solução aquosa.	48
Figura 4.2	Gráfico de controle para valores individuais de absorvância.	49
Figura 4.3	Gráfico de controle para amplitudes variantes dos valores de absorvância.	49
Figura 4.4	Gráfico preliminar para avaliação visual da faixa linear.	50
Figura 4.5	Espectro de varredura, 200 a 350 nm, para amostras das matrizes envolvidas e soluções aquosas com diferentes teores de Imidacloprid.	56
Figura 4.6	Comparação das incertezas expandidas para os procedimentos analíticos de determinação de imidacloprid em soluções aquosas.	65
Figura 4.7	Comparação das incertezas estimadas e tolerâncias estabelecidas para os procedimentos de determinação de imidacloprid em solução aquosa.	66
Figura 4.8	Comparação das diversas contribuições, na forma de incerteza padrão relativa, para a incerteza de medição dos procedimentos alternativo e padrão.	72
Figura 4.9	Representação gráfica dos intervalos de tolerância, especificação e incertezas de medição por tipo de procedimento e tipo de produto.	74