

USO DE ETANOL COMO SOLVENTE ALTERNATIVO NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA A DETERMINAÇÃO DE CLOMAZONE EM DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Vitor Augusto Ramos Lopes

Bacharel em Química, graduado pela UNIFACP- Centro Universitário de Paulínia.

Gláucia Maria Ferreira Pinto

Pós-doutora em Engenharia Química, Professora do Centro Universitário de Paulínia

RESUMO - A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é uma técnica amplamente utilizada na indústria e no meio acadêmico, para elaboração de metodologias que tem por objetivo quantificar e qualificar os mais diversos tipos de substâncias. Este trabalho demonstra a viabilidade do uso de um solvente orgânico alternativo à acetonitrila, que é de longe o solvente mais empregado como fase móvel do HPLC, mas que é tóxico e de alto custo. O método estudado utilizou etanol para determinação de Clomazone em defensivo agrícola, para ilustrar a viabilidade dessa substituição.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida; Etanol; Acetonitrila; Clomazone.

Introdução

As técnicas analíticas instrumentais são parte fundamental da rotina de praticamente todos os laboratórios dentro e fora da indústria, e estas vem evoluindo com o tempo para acompanhar as demandas por mais poder de resolução, sensibilidade, seletividade e eficiência que o mercado vem exigindo. Neste modelo, métodos de HPLC (a técnica analítica mais usada em desenvolvimento de produtos e controle de qualidade) também evoluíram, e assim sugeriram técnicas como a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), que através da utilização de partículas de sílica com diâmetros de partícula menores que 2 μm como fase estacionária, permitiram o desenvolvimento de métodos mais ágeis e eficientes (MALDANER, 2012). Para acoplamento com a cromatografia, a espectrometria de massas se firmou cada vez mais, pois permite a quantificação de concentrações ínfimas de analitos, na ordem de fentogramas, e identificação de substâncias mesmo em matrizes complexas.

Contudo, nos últimos anos surgiu uma outra demanda importante além do poder analítico das técnicas, a redução do impacto das análises ao meio ambiente e a saúde humana e dessa forma, vem-se buscando alternativas para tornar as metodologias mais sustentáveis, sem que haja perda da eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência, tem como pilares dois componentes, a fase móvel, que é uma mistura de solvente(es) orgânicos e muitas vezes água (com ou sem aditivos) e a fase estacionária, que é constituída por um sólido adsorvente (como a sílica) ou um suporte modificado quimicamente com uma fase ligada (como o C-18), e através da interação das substâncias que compõem a amostra com esses dois componentes que ocorre a separação dessas substância, possibilitando assim sua identificação e quantificação, quando acoplada a um detector. Se tratando da fase móvel, um dos solventes orgânicos mais utilizados na cromatografia por fase reversa (quando a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária) é a acetonitrila, devido a suas características físico-químicas que proporcionam bons resultados de resolução, seletividade e sensibilidade, contudo esse solvente apresenta a

desvantagem de ser tóxico tanto para o ser humano, quanto para o meio ambiente. Uma alternativa que vem se mostrando promissora para a substituição desse solvente é o etanol. O etanol apresenta algumas características negativas para ser usado nas separações por HPLC, como alta viscosidade, principalmente quando misturado com água, o que leva a aumentos na pressão da coluna, que podem levar a diminuição de sua vida útil. Porém, tais desvantagens podem ser contornadas com alterações simples na metodologia, como aumentos da temperatura do forno e diminuição da vazão de fase móvel. A principal vantagem do etanol é de ser não só mais barato do que a acetonitrila, mas também menos agressivo a saúde humana e ao meio ambiente.

Cromatografia Líquida e a Acetonitrila

A cromatografia é uma técnica relativamente antiga, que por algum tempo foi ignorada e esquecida, até ganhar nova atenção nos últimos 50 anos, onde teve seu potencial explorado e assim se mostrou uma técnica muito versátil podendo ser utilizada para identificar compostos, separação de substâncias indesejadas de amostras e de componentes de misturas, servindo como técnica de purificação. (FRANCO, 2015)

Essa técnica vem se aperfeiçoando com o tempo desde métodos extremamente simples, até os muito complexos, sendo usada na atualidade principalmente em análises quantitativas, e uma das subcategorias dessa técnica muito utilizada para esse fim é a cromatografia líquida (CL), em especial a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e parte fundamental desse tipo de metodologia é o uso de solventes orgânicos para auxiliar a eluição dos componentes que constituem a amostra analisada, permitindo separar os mesmos de forma a isolar o analito de interesse por meio da alteração da força de eluição da fase móvel (FM), que ocorre com a mudança na proporção de orgânico na mesma, isto se dá pelo ajuste na seletividade e resolução do método proveniente dessas alterações, esses são os chamados modificadores orgânicos da fase móvel.

Um dos solventes mais utilizado na CLAE como modificador orgânico é a acetonitrila, ou cianeto de metila (CH_3CN), que é um subproduto obtido na

síntese de resinas acrílicas, utilizadas em sua maioria na fabricação de eletrodomésticos, automóveis e eletrônicos (CASSINI et al.,2013), mas que também pode ser sintetizada usando reações de acetilação, apesar desse método ser menos utilizado devido seu alto custo. Esse uso se dá principalmente pela sua baixa viscosidade (0,4 cP a 25°C), permitindo o trabalho com fluxos mais altos, sem que haja aumento demasiado da pressão na coluna, o que pode danificá-la, alta força de eluição em fase reversa (0,52), que permite ganhos consideráveis de seletividade e resolução, e um baixo UV *Cutoff* (190 nm), fazendo com que não interfira na seletividade do método para a maioria dos compostos analisados com detector UV.

O etanol como alternativa de modificador orgânico na fase móvel (FM)

Apesar da acetonitrila apresentar uma resposta melhor em análises que utilizam comprimentos de onda menores no detector UV, devido ao seu baixo UV *Cutoff*, não há grandes restrições ao uso de álcoois como modificadores orgânicos, quando empregado comprimentos de onda superiores as 220 nm (BORGES,2010). Um dos principais fatores que dificultam a substituição da acetonitrila por etanol é sua alta viscosidade (1,2 cP a 25°C), principalmente quando misturado com água, o que leva a uma elevação na pressão da coluna, impedindo uso de vazões mais altas, porém a pressão pode ser reduzida para níveis aceitáveis utilizando temperaturas mais altas, entre 30°C e 40°C (podendo chegar a 50°C dependendo a resistência térmica da coluna utilizada), o uso dessas temperaturas mais elevadas pode se mostrar vantajoso, não só por reduzir a viscosidade da FM, mas também por alterar outras características físico-químicas da mesma, tais como constante dielétrica, tensão superficial e pKa, o que promove ganhos na resolução e seletividade do método, além da redução do tempo de análise (FRANCO, 2015).

O metanol é uma alternativa muito utilizada para a substituição da acetonitrila, já que possui características físico-químicas favoráveis a análise cromatográfica, como uma baixa viscosidade (0,6 cP a 25°C) e um UV *Cutoff* que não interfere na detecção de grande parte dos compostos (210 nm), contudo tal substância apresenta alta toxicidade podendo levar a formação de enfisemas

pulmonares quando inalado constantemente, irritações e até cegueira quando em contato com os olhos, por isso, o etanol se mostra uma alternativa mais promissora, quando se trata de opções mais sustentáveis e que atendem aos princípios da “química verde”, além de apresentar características físico-químicas mais próximas a acetonitrila do que o metanol, tais como força de eluição e ponto de ebulição, que podem ser observados na Tabela 1, além de uma maior disponibilidade no mercado, e menor preço em relação a acetonitrila.

Tabela 1 – Comparativo de força eluotrópica, ponto de ebulição e LD50 entre metanol, etanol e acetonitrila.

	Metanol	Etanol	Acetonitrila
Ponto de Ebulição (°C)	64,7	78,4	82,0
Força Eluotrópica	0,73	0,68	0,52
LD50 – Inalação, Ratos (mg/L)	3,1	95,6	6,02

Fonte própria.

Determinação de Clomazone em defensivo agrícola

Metodologia para determinação de Clomazone em defensivo agrícola por cromatografia líquida de alta eficiência, alterando o modificador orgânico do método já utilizado de acetonitrila para etanol.

Equipamentos e Materiais

Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent série 1260 Infinity, com detector UV; coluna cromatográfica Agilent Zorbax eclipse XDB C18 (150mm x 4,6mm x 5 µm); filtro PVDF/L para seringas (25mm x 0,45µm); seringa sem agulha (5mL); balança analítica, Metter Toledo AB204-5; ultrapurificador de água, Gehaka Master All; banho ultrassônico, Ecosonics.

Reagentes e Solventes

Foi utilizado Etanol grau HPLC da marca Panreac Applichem, lote 0001926509; água ultrapura; Acetonitrila grau HPLC da marca Êxodo Científica lote 228154957 Clomazone técnico (94,2%) da marca FMC lote 030013322.

Preparo de Soluções padrão

Foram preparadas soluções padrão de Clomazone pesando massas de 40mg a 60mg (5 pontos) em balões volumétricos de 50mL, diluídas com etanol grau HPLC e levadas ao banho ultrassônico por 5 minutos para solubilização.

Preparo das amostras

Foram pesados 70mg de herbicida seletivo a base de clomazone produto acabado em balão volumétrico de 50mL em duplicata, diluídas com etanol grau HPLC e levados ao banho ultrassônico por 5 minutos para dissolução.

Procedimento

As amostras e padrões foram analisadas por CLAE, modo isocrático, em comprimento de onda de 254 nm, utilizando FM água/etanol (20/80% v/v) em vazão de 0,8mL/min, com volume de injeção de 5 µL. A utilização de uma temperatura mais alta (40°C) permitiu manter a pressão na coluna dentro de sua faixa de trabalho (média de 160 bar).

A quantificação do Clomazone (Figura 1) no produto acabado foi realizada por padronização externa com a criação de uma curva de calibração utilizando 5 soluções padrão com concentrações de 0,8 mg/mL a 1,2 mg/mL, demonstrada na Figura 2, e o cromatograma típico obtido com essas condições pode ser observado na Figura 3.

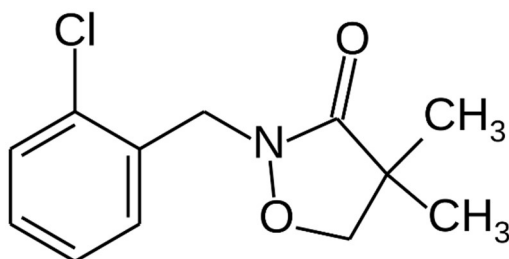


Figura 1 – Fórmula estrutural do clomazone. (Wikipedia)

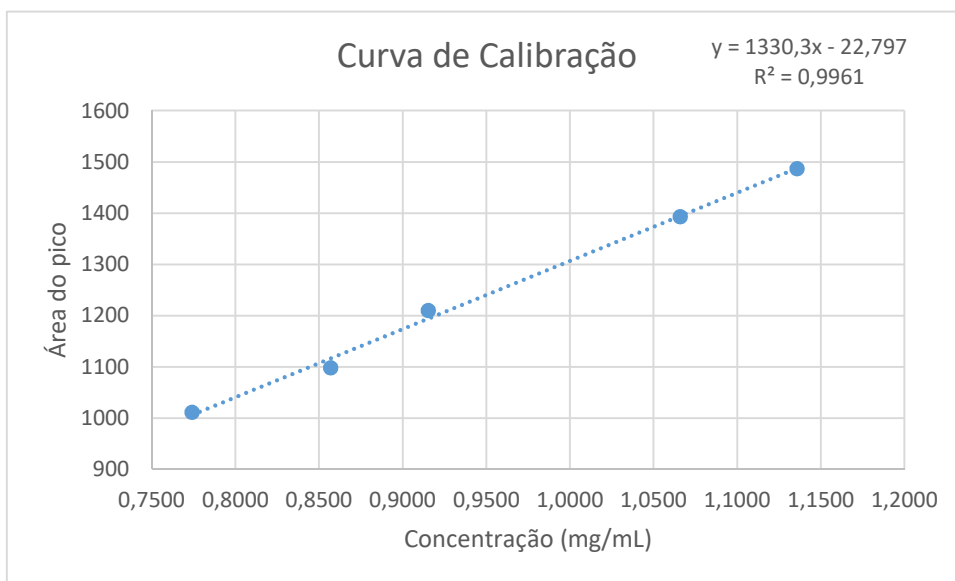


Figura 2 – Curva de calibração utilizada para quantificação de Clomazone em produto acabado, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. (Fonte própria)

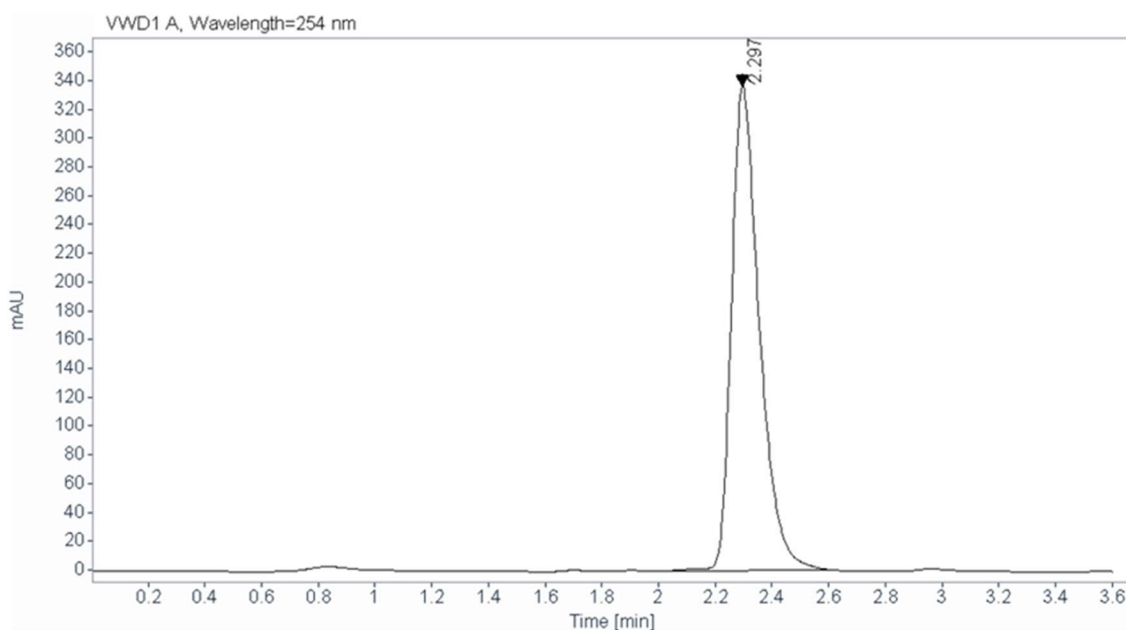


Figura 3 – Cromatograma típico de amostra de defensivo agrícola contendo Clomazone (1,0 mg/mL) nas seguintes condições: fase móvel água/etanol (20/80%v/v), vazão de 0,8 mL/min, comprimento de onda 254nm e temperatura de 40°C. (Fonte própria)

Validação do método

A validação de métodos analíticos é obrigatória para atestar a confiabilidade de métodos cromatográficos desenvolvidos.

Neste trabalho, a validação foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: Seletividade, precisão, exatidão e linearidade. Os critérios de aceitação foram estabelecidos de acordo com a ABNT NBR 14029:2016 Agrotóxicos e afins – validação de métodos analíticos.

Seletividade

A seletividade indica a capacidade de um uma metodologia de determinar específica e acuradamente o analito de interesse na presença de outros compostos (matriz). Para a avaliação desse parâmetro foram feitas três injeções, sendo uma de um placebo apenas com os excipientes da formulação, outra de etanol grau HPLC, e por último de solução de padrão com concentração equivalente à do produto acabado, feito isso, os cromatogramas foram sobrepostos (Figura 4) para facilitar a visualização de possíveis interferentes no tempo de retenção do analito.

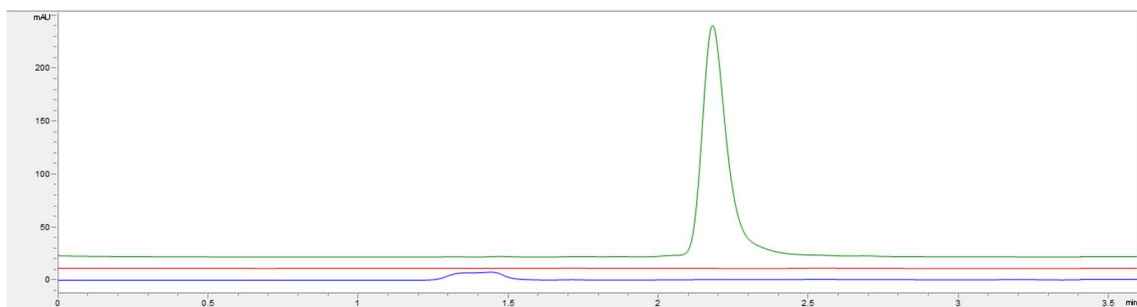


Figura 4 – Sobreposição dos cromatogramas do ativo em concentração equivalente a esperada na amostra (primeiro de cima para baixo), o etanol grau HPLC (segundo de cima para baixo) e placebo contendo os co-formulantes do produto acabado (terceiro de cima para baixo). (Fonte própria)

Como observado na Figura 4, não há nenhum excipiente da formulação que coelua e/ou se sobreponha ao pico do analito, assim como não se encontra nenhuma contaminação do solvente utilizado na fase móvel no tempo de retenção do analito, comprovando dessa forma a seletividade do método.

Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados obtidos em uma sequência de medições e para avaliar esse parâmetro foram preparadas pelo mesmo analista duas séries de cinco soluções padrão independentes de concentração equivalente à do produto acabado (1,0 mg/mL) e injetadas

sucessivamente no mesmo equipamento e em dia diferentes, os resultados podem ser observados na Tabela 2, após isso foi aplicado o teste de Grubbs para verificação de valores extremos (*outliers*), calculando o desvio padrão relativo (%DPR), segundo a Equação 1, para posterior comparação com o %DPR calculado pela equação de Horwitz (Equação 2), que expressa uma precisão genérica independente da matriz e analito, dependendo apenas da concentração, e aplicado um teste T - Student para avaliar se as médias das séries pertencem a mesma distribuição normal.

Tabela 2 – Resultado das duas series de injeções de solução padrão.

Repetição	Série 1	Série 2
	Concentração mg/mL	Concentração mg/mL
1º	0,99	1,00
2º	0,98	0,99
3º	0,99	1,01
4º	1,00	0,99
5º	0,98	1,01

Fonte própria.

$$\%DPR = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) * 100$$

Onde: % DPR = Desvio padrão relativo.

S = Desvio padrão das concentrações.

\bar{x} = Média das concentrações.

Equação 1 – Equação de desvio padrão relativo.

$$\% DPR Horwitz = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Onde: % DPR Horwitz = Desvio padrão relativo segundo a equação de Horwitz.

C = Concentração do analito (%m/m) dividida por 100.

Equação 2 – Equação de Horwitz

Após a aplicação do teste T, as séries apresentaram um T calculado de 2,08, sendo menor que o valor de T tabelado (2,31), dessa forma demonstrando que ambas pertencem a mesma distribuição normal, além disso, o teste de Grubbs mostrou que não há nenhum outlier nas mesmas, assim como um %DPR

de 1,08 e um valor de 2,03 para o %DPR Horwitz, sendo o primeiro menor que o comprova a precisão do método de acordo com a ABNT NBR 14029:2016.

Exatidão

Foram pesadas em triplicata amostras contendo placebo e padrão com concentrações de 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,2 mg/mL de Clomazone e calculada a taxa de recuperação (Equação 3) de cada solução. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) * 100$$

Onde: C1 = Concentração determinada na amostra não adicionada.
 C2 = Concentração determinada na amostra adicionada.
 C3 = Concentração adicionada.
 Equação 3 – Cálculo da recuperação das amostras.

Tabela 3 – Resultados do teste de exatidão com a recuperação encontrada em cada amostra das faixas testadas.

Repetição	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)
1°	0,8	101,9
2°	0,8	101,8
3°	0,8	101,8
1°	1,0	99,7
2°	1,0	99,5
3°	1,0	100,9
1°	1,2	99,2
2°	1,2	99,8
3°	1,2	99,7

Fonte própria

A amostras apresentaram taxas de recuperação dentro da faixa de aceitação a norma ABNT NBR 14029:2016 (98-102%), comprovando dessa forma a exatidão da metodologia.

Linearidade

Foram pesadas em triplicada soluções de 0,8mg/mL a 1,2mg/mL (n=5 pontos) e plotada três curvas de calibração com esses pontos (Figuras 5, 6 e 7), após isso, foi avaliado o coeficiente de correlação e o diagrama de resíduos da curva para avaliar se os mesmos seguem uma distribuição normal. (Figura 8).

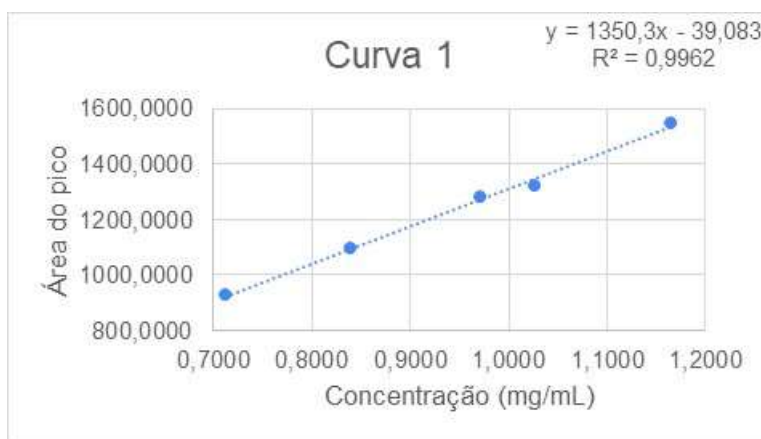


Figura 5 – Curva 1 de linearidade com coeficiente de correlação e equação da reta. (Fonte própria)

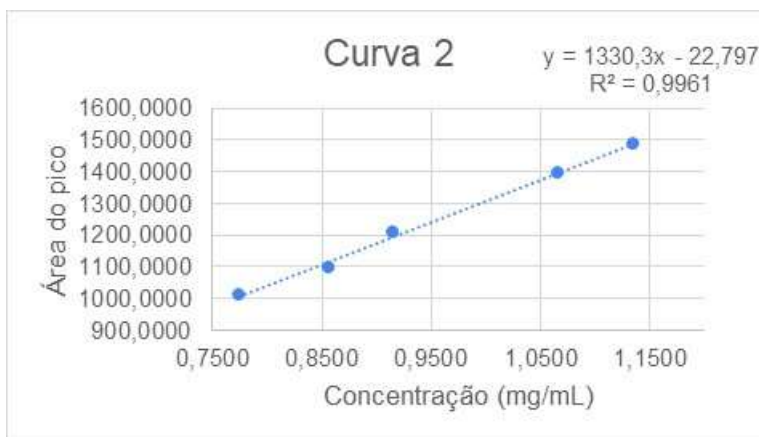


Figura 6 – Curva 2 de linearidade com coeficiente de correlação e equação da reta. (Fonte própria)

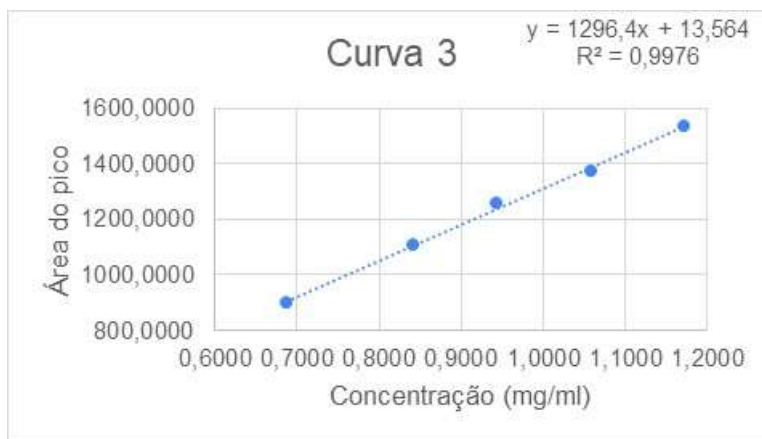


Figura 7 – Curva 3 de linearidade com coeficiente de correlação e equação da reta. (Fonte própria)

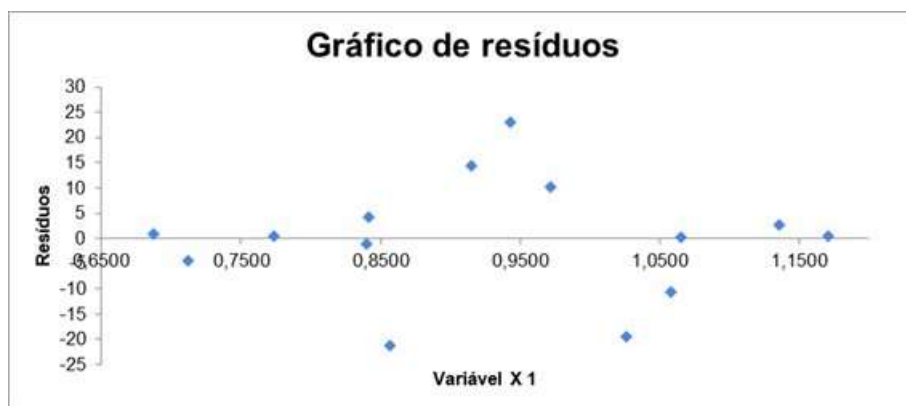


Figura 8 – Gráfico de resíduos. (Fonte própria)

As três curvas apresentaram um coeficiente de correlação maior/igual a 0,99, o que atende ao critério de aceitação da norma ABNT NBR 14029:2016, além disso os resíduos gerados por elas apresentam uma distribuição aleatória ao redor do eixo X, não apresentando comportamento regular, ou tendência funcional, mostrando que o modelo é homocedástico, comprovando dessa forma a linearidade da metodologia e que o método dos mínimos quadrados ordinários é aplicável para o tratamento dos dados.

Comparação entre as metodologias utilizando etanol e acetonitrila como modificador orgânico

A comparação foi realizada entre os parâmetros preço do modificador orgânico e sensibilidade da metodologia.

Limite de Detecção

Os limites de detecção foram determinados preparando duas séries de três soluções padrão independentes com a menor concentração utilizada na curva de calibração (0,8 mg/mL) e injetadas sucessivamente, calculada a relação sinal/ruído de cada amostra, nos seguimentos da base do pico de interesse (2 a 2,8 minutos para a metodologia utilizando Etanol e de 4 a 5 minutos para a metodologia utilizando Acetonitrila), através do software do equipamento (OpenLab CDS 2.6) e a concentração encontrada das mesmas, os resultados

podem ser observados na Tabela 4, assim como suas respectivas médias e aplicada a Equação 4.

Tabela 4 – Concentração encontrada e relação sinal ruído das soluções padrão injetadas nas metodologias utilizando etanol e acetonitrila como modificador orgânico, e suas respectivas médias.

Repetição	Etanol		Acetonitrila	
	Concentração encontrada (mg/mL)	Relação Sinal/Ruído	Concentração encontrada (mg/mL)	Relação Sinal/Ruído
1º	0,8120	364,2	0,8113	218,7
2º	0,7920	374,1	0,7992	218,2
3º	0,8082	302,7	0,8003	242,1
Média	0,8041	347,0	0,8036	226,3
LD (%m/m)	0,87		1,33	

Fonte própria

$$LD = \frac{3x(Cstd)}{(S/D)xCs} x 100$$

Onde: LD = Limite de detecção do método (% m/m).
 Cstd = Concentração da solução de calibração mais diluída.
 (S/D) = Razão entre a altura do sinal e a altura do ruído para o analito no cromatograma da solução de calibração mais diluída.

Equação 4 – Equação para determinação do limite de detecção segunda a norma NBR 14029:2016.

Pode ser observado que a metodologia utilizando etanol como modificador orgânico possui um limite detecção menor que a usada como referência, o que indica que com tal substituição podem ser alcançados níveis de sensibilidade equivalentes, ou até superiores, como observado na Figura 9, que demonstra que podem ser obtidos picos mais intensos e com maior área nessa metodologia em relação a referência utilizando acetonitrila, que combinado com as características de preço e toxicidade do etanol demonstra que o mesmo é uma alternativa não só viável, mas também vantajosa, não só pela sua sensibilidade, mas também pelo tempo de análise reduzido, apesar do aumento da pressão (Tabela 5).

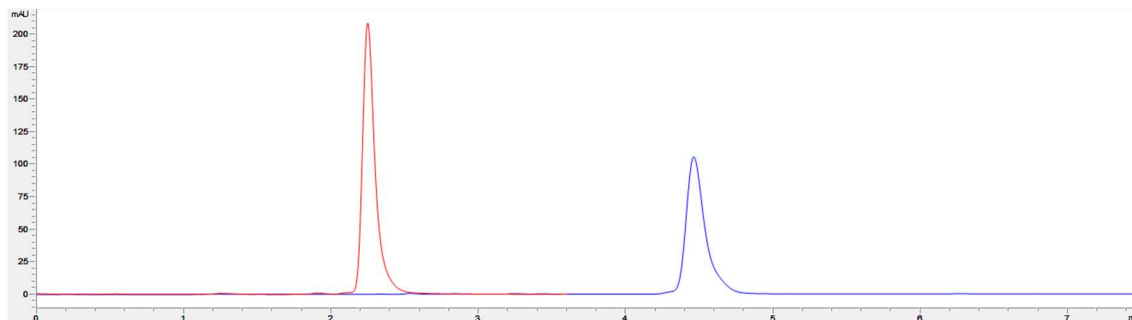


Figura 9 – Sobreposição dos cromatogramas do ativo em concentração equivalente a esperada na amostra utilizando a metodologia com Etanol (pico a esquerda) e Acetonitrila (pico a direita) como modificador orgânico. (Fonte própria)

Tabela 5 – Comparativo das áreas das amostras de ativo em concentração equivalente a esperada no produto acabado tempo de retenção, tempo de análise e pressão da coluna nas metodologias utilizando Etanol e Acetonitrila.

	Etanol	Acetonitrila
Área	1273,9	964,5
Tempo de Retenção (min)	2,25	4,46
Tempo de análise (min)	3,6	5,5
Pressão da coluna (bar)	160	115

Fonte própria

Preço

Solicitado orçamento de acetonitrila e etanol grau HPLC para avaliação do custo/litro. Resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Custo litro do etanol e acetonitrila grau HPLC.

Etanol	Acetonitrila
Custo/Litro (Reais)	Custo/Litro (Reais)
78,80	157,19

Fonte própria

Pode ser observado uma diferença de quase cinquenta por cento a menos no custo/litro do etanol em relação a acetonitrila grau HPLC, o que combinado ao fato de se apresentar muito mais disponível no mercado, já que, diferente da acetonitrila, não depende da demanda de outros produtos para ser produzida,

tornando-o uma alternativa interessante a mesma, não só do ponto de vista ecológico, mas também econômico.

CONCLUSÃO

O presente artigo tem como proposta gerar uma reflexão acerca da aplicação dos princípios da química verde a química analítica instrumental, em especial a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência, sugerindo alternativas mais sustentáveis a algumas soluções utilizadas com muita frequência na maioria das metodologias analíticas empregadas no mercado, como a troca da acetonitrila e do metanol, solventes largamente utilizados como modificadores orgânicos nas fases móveis, por etanol, uma alternativa bem menos tóxica e que apresenta também vantagens financeiras, não só pelo seu baixo custo, principalmente quando comparado com a acetonitrila, mas também sua maior disponibilidade no mercado e menor custo de descarte dos resíduos gerados pelas análises com o mesmo.

Como observado, por esses motivos é possível afirmar que, apesar de apresentar algumas dificuldades na sua utilização, sendo a principal a alta viscosidade da mistura água/etanol, que gera altas pressões na coluna podendo levar a redução da sua vida útil e até danificá-la permanentemente, essas podem ser remediadas com relativa facilidade como apresentado no método proposto no presente artigo, utilizando um fluxo mais baixo e temperaturas mais altas, o que permite realizar as análises atingindo pressões próximas das faixas usuais de trabalho, assim como alcançar bons resultados de resolução, seletividade e tempo de análise.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, Nádia Machado de; VELOSO, Márcia Cristina da Cunha; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. **Validação de métodos cromatográficos de análise** – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quim. Nova**, São Paulo, v 32, n 9, p. 2476-2481, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14029: Agrotóxicos e afins** – Validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

BORGES, Endler Marcel; BOTTOLI, Carla B.G.; COLLINS, Carol.H. Possibilidades e limitações no uso de temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Quim. Nova**, São Paulo, v 33, n 4, p. 945-953, 2010.

BRESOLIN, J.D.; et al. **Avaliação ecotoxicológica de resíduos de cromatografia líquida contendo acetonitrila**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, 2010, Campos do Jordão. Livro de Resumos, 2010, p 3.

CASSINI, Sérgio Túlio Alves; ANTUNES, Paulo Wagner Pereira; KELLER, Regina. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, São Paulo, v 36, n 8, p. 1208-1213, 2013.

FRANCO, Luciana Gurgel. **Cromatografia verde**. Bauru, 2015. 39 p. Monografia (Licenciatura em Química) – Universidade Estadual Paulista.

Waters, **Fundamentos da cromatografia de convergência**. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.waters.com/nextgen/br/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-convergence-chromatography/fundamentals-of-convergence-chromatography.html>>. Acesso em: 31 out. 2022.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fonte. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, São Paulo, p 197-207.

SILVA, Bruna de Souza. **Cromatografia verde**. Araraquara, 2021. 48 p. Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Estadual Paulista.