

I-355 – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAR A PRESENÇA DO INSETICIDA METAMIDOFÓS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE ABASTECIMENTO.

Camila Delanesi Guedes⁽¹⁾

Farmacêutica-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Mestranda em Saúde Ambiental na Faculdade de Saúde Pública de Universidade de São Paulo. Perita Criminal da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo.

Wanderley da Silva Paganini

Engenheiro Civil pela UNESP de Bauru/SP, Engenheiro Sanitarista, Mestre e Doutor em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - USP, Livre-Docente em Saneamento Básico e Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública da USP. Superintendente de Gestão Ambiental da Diretoria de Tecnologia, Empreendimentos e Meio Ambiente da SABESP e Professor Associado do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Endereço⁽¹⁾: Rua Moncorvo Filho, 410 - Butantã – São Paulo - SP - CEP: 05507-060 - Brasil - Tel: (11) 3811-7166 - e-mail: camila.cdg@usp.br.

RESUMO

O Brasil é um dos grandes consumidores mundiais de agrotóxicos, e o uso de produtos a base de metamidofós é alto. O metamidofós apresenta elevada toxicidade aguda e preocupantes aspectos de toxicidade crônica, relacionados principalmente à reprodução. Adicionalmente, não fica restrito às áreas aplicadas, contaminando alimentos e o meio ambiente, principalmente a água, o que pode acarretar em sérios problemas de saúde pública. Os métodos laboratoriais disponíveis para a extração do metamidofós de matrizes aquosas, descritos na literatura consultada, apresentam eficiências controversas e não atingem, em sua maioria, níveis baixos o suficiente para análise de traços. Foram testados, nesta pesquisa, diversos métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida para a pré-concentração do metamidofós, não se obtendo resultados satisfatórios. Desta forma, foi desenvolvido um método analítico através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, capaz de detectar e quantificar o metamidofós em níveis residuais, sem a necessidade de pré-tratamento das amostras.

PALAVRAS-CHAVE: Metamidofós, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, água superficial.

INTRODUÇÃO

A contaminação das águas superficiais por praguicidas está descrita em uma vasta gama de literatura científica no Brasil e no mundo, e serve como embasamento para a adoção de medidas de controle e prevenção de sua ocorrência. A grande preocupação permanece focada no consumo humano dessa água potencialmente contaminada, mas também nos prejuízos causados às macro e micro faunas, o que pode levar a um grande desequilíbrio ecológico.

A substância foco deste estudo é o metamidofós, que é um praguicida organofosforado de largo espectro de ação, e apresenta toxicidades aguda e crônica preocupantes.

A toxicidade aguda do metamidofós, para mamíferos, é bem estabelecida e proveniente do seu mecanismo de ação: inibição de enzimas colinesterásicas. Já a toxicidade proveniente de exposições crônicas é difusa, sendo citadas na literatura alterações reprodutivas como alterações em esperma, em células embrionárias, comprometimento de embriões e filhotes, diminuição de fertilidade de fêmeas, dentre outras (BURRUEL, 2000), potenciais citotóxico, mutagênico e genotóxico em ratos (KARABAY e OGUZ, 2005), alterações morfológicas nos tecidos cardíacos de animais de experimentação (CALORE et al., 2007), bem como no sistema nervoso central (CALORE et al., 2006), neuropsicológicas como ansiedade, distúrbios na performance visuo-motora, habilidades visuo-perceptivas e velocidade de processamento de informações (TAPIA et al.,

2006) e na tireóide (SATAR et al, 2008), sendo classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como altamente tóxico.

Seu uso, no Brasil, é alto, e sua elevada solubilidade em água, bem como a baixa tendência a se concentrar nos sedimentos, gera uma séria preocupação com a saúde dos que utilizam essas águas.

Até há bem pouco tempo as normativas brasileiras não adotavam valores máximos para a presença de metamidofós em água, porém, em 2010 ocorreu a revisão da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (MS) que propunha a inclusão do metamidofós no padrão de potabilidade brasileiro de água, e em 2011 foi promulgada a Portaria MS nº 2914, já contendo o valor de limite máximo de metamidofós, em água para consumo humano, de 12 µg/L. (MS, 2010; MS, 2011).

Essa nova exigência somada a dados da literatura que têm demonstrado a presença de metamidofós em águas superficiais e subterrâneas no Brasil e no mundo, evidenciam a necessidade de pronta disponibilidade de métodos laboratoriais capazes de identificar e quantificar tal substância na água, em níveis residuais.

As técnicas de preparo de amostras mais utilizadas atualmente são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida, que baseiam-se nas relativas afinidades dos analitos em fases distintas e imiscíveis entre si (LANÇAS, 2004), e apresentam as finalidades básicas de promover o *clean up* da amostra e a concentração do analito, o que permite a sua detecção pelas técnicas analíticas disponíveis.

Deste modo, o objetivo deste trabalho é desenvolver e validar metodologia de extração (líquido-líquido e em fase sólida) e análise de resíduos de metamidofós em águas superficiais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: padrão analítico de metamidofós da Sigma-Aldrich Brasil Ltda., metanol grau HPLC (Merck, Brasil); acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker, Brasil); água ultrapurificada em sistema Direct-Q UV₃[®] Millipore (resistividade 18,2 mΩ cm); formiato de amônio puríssimo p.a. para espectrometria de massas ≥ 99,0% (Sigma-Aldrich, EUA); ácido fórmico p.a. 98 – 100% (Merck, Alemanha); éter P.A. (Synth, Brasil); clorofórmio P.A. (Synth, Brasil); acetona P.A. (Synth, Brasil); diclorometano P.A. (Carlo Erba, Itália); ácido acético P.A. 30%; ácido clorídrico P.A. 6N; cloreto de sódio P.A. (Nuclear, Brasil); cloreto de potássio P.A. (Fisher Scientific, Estados Unidos); adaptador para múltiplos cartuchos e formação de vácuo (Sigma-Aldrich); compressor de ar; cartuchos de extração em fase sólida: C-18 Lichrolut[®] 1000mg (Merck, Alemanha); CN Lichrolut[®] 500 mg (Merck, Alemanha); NH₂ Lichrolut[®] 500 mg (Merck, Alemanha); Florisil Lichrolut[®] 1000 mg (Mg₂SiO₃) (Merck, Alemanha); Oasis HLB 200 mg e 100 mg (Waters, Estados Unidos).

Equipamento e acessórios: cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent Technologies (1200 series), constituído por degaseificador, bomba quaternária, amostrador automático, forno de coluna, coluna cromatográfica Phenomenex Hydro C-18 (50 mm de comprimento, 2 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 5 µm) e detector do tipo espectrômetro de massas Triploquadropolo Q-trap 3200 da marca Applied Biosystems, com ionização à pressão atmosférica por *electrospray*.

RESULTADOS OBTIDOS

Foram testadas diversas condições do espectrômetro de massas e do cromatógrafo líquido, selecionando-se as melhores condições para a composição do método, como segue: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS), sob as seguintes condições: fase móvel - água contendo ácido fórmico e formiato de amônio 25% e metanol 75%, fluxo - 250 µL/min, tempo de análise - 5 minutos, volume de injeção 60µL, modo de ionização da fonte: *electrospray* no modo positivo, voltagem do cone: 31 volts, energia de colisão: 15 eV, temperatura da fonte: 350° C.

Para o desenvolvimento e estabelecimento da metodologia de preparo das amostras, foram testadas inúmeras condições em duas técnicas distintas: extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (SPE), e os resultados obtidos estão expressos na figura 1 e na tabela 1.

Figura 1: Recuperações para diferentes solventes usados na extração líquido-líquido *versus* recuperações obtidas, com e sem o uso de NaCl (amostras de 250mL e pH 3).

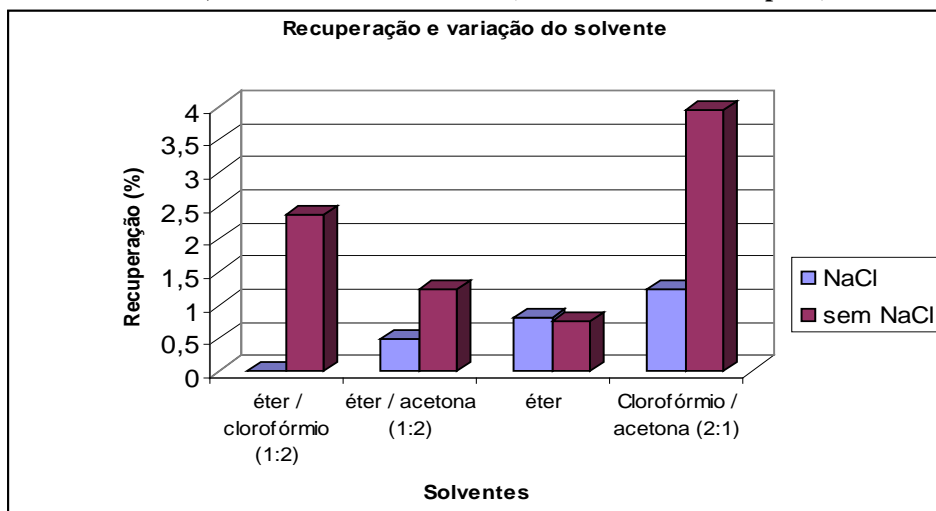


Tabela 1: Recuperações para diferentes cartuchos e combinações de solventes usados na extração em fase sólida.

	Condicionamento	Eluição	pH	Volume de amostra (mL)	Recuperação (%)
C-18	3mL ACN + 3mL água	2 x 3 mL ACN	3	250	1,80
	5mL MeOH + 5mL água	2 x 3 mL ACN	3	250	0,89
	5mL MeOH + 5mL água	2 X 5 mL MeOH	3	250	1,77
	3mL ACN + 3mL água ac fosf. pH3	2 x 3 mL ACN:água acida pH3 (9:1)	3	250	0
CN	3mL MeOH + 3mL água	2 x 3 mL MeOH	3	250	0,67
	3mL MeOH + 3mL água	2 x 3 mL MeOH	7	250	1,39
	3mL MeOH + 3mL MeOH:água (1:9)	2 x 3 mL MeOH:água (9:1)	3	250	2,22
	3mL MeOH + 3mL MeOH:água (1:9)	2 x 3 mL MeOH:água (9:1)	7	250	2,25
NH ₂	3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN:água (9:1)	3	100	1,43
	3mL ACN + 3mL água acida pH3	2 x 6 mL ACN:água (9:1)	3	250	0
	3mL ACN + 3mL água acida pH3	2 x 6 mL ACN:água acida pH3 (9:1)	3	250	0
	3mL ACN + 3mL água acida pH3	2 x 6 mL ACN:água acida pH3 (9:1)	3	100	0
Florisil	2 x 3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN	3	250	0,51
	2 x 3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN	3	100	1,93
	2 x 3mL MeOH + 3mL água	2 x 5 mL MeOH:solução ac acetico 30% (9:1)	3	100	0
	2 x 3mL MeOH + 3mL água	2 x 5 mL MeOH:solução ac acetico 30% (9:1)	3	250	0
	5mL clorofórmio:acetona (2:1) + 5mL água	5 x 6 mL clorofórmio:acetona (2:1)	3	100	2,05

Figura 2: Recuperações para diferentes diferentes cartuchos e combinações de solventes usados na extração em fase sólida.

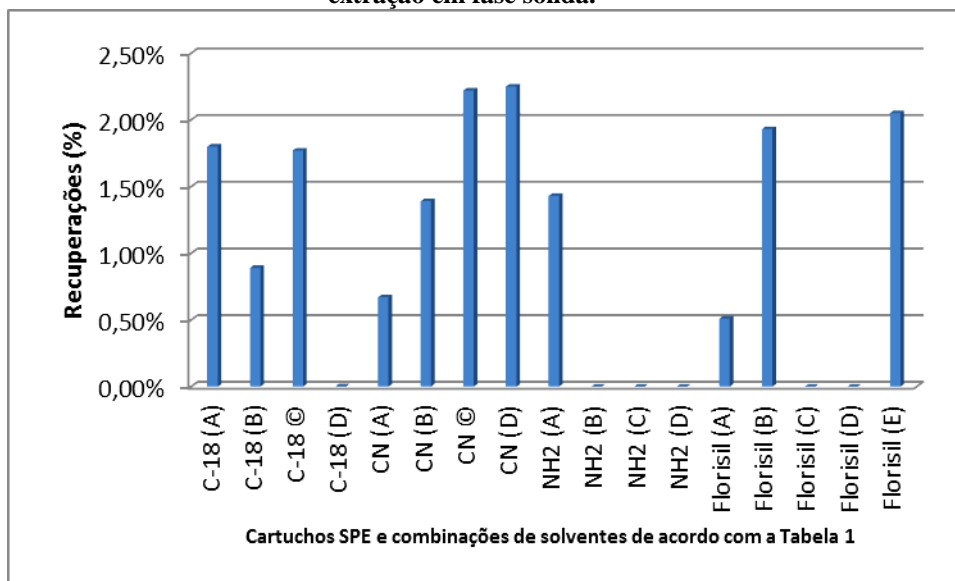


Tabela 2: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho Oasis HLB, e suas respectivas recuperações.

Volume (mL)	Conc. (µg/L)	Recuperação (%)	Recup. Média (%)	Desvio Padrão	CV (%)
5	0,8	54,13	54,13	-	-
5	0,4	81,31	101,66	0,2877	28,30
		122,00			
20	0,4	21,84	11,02	0,1530	138,85
		0,2			
5	0,26	0	8	0,1198	155,74
		0			
		0			
		25,04			
		21,15			
		0			
20	0,26	0	2	0,04243	173,20
		0			
		7,35			

Como os métodos de extração, tanto líquido-líquido quanto em fase sólida, não se mostraram eficientes e/ou reproduzíveis na extração do metamidofós da água, foi desenvolvida uma metodologia para análise direta das amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), capaz de trabalhar com a amostra in-natura e mesmo assim atingir níveis de detecção baixos o suficiente para atender às normativas internacionais (ppb e ppt, respectivamente). Para isto, utilizou-se um volume de injeção maior que o usual da prática laboratorial, e o resultado foi a obtenção de um método, através de LC-MS/MS extremamente sensível, e cujos parâmetros de validação e de segurança analíticos, normalmente exigidos na obtenção de certificações nacionais e internacionais de qualidade, mostraram-se satisfatórios, como segue: seletividade, linearidade ($r^2 = 0,9989$), precisão e exatidão, limites de quantificação ($LOQ = 12,59$ ng/L) e de detecção ($LOD = 2,46$ ng/L) e robustez (tolera pequenas variações de fluxo e de temperatura).

CONCLUSÕES

Os testes relativos à extração do metamidofós da água, nos níveis de concentração almejados, não forneceram resultados satisfatórios nem para extração líquido-líquido, nem para a extração em fase sólida. As propriedades físico-químicas do metamidofós predisseram tais resultados, visto que denotam alta polaridade e

conseqüentemente alta solubilidade dele em água, o que inviabiliza sua extração, principalmente em níveis residuais. Desta forma, uma análise direta por LC-MS/MS, sem pré-tratamento da amostra, pode ser realizada, e foi desenvolvido um método extremamente sensível, rápido e cujos parâmetros de validação e de segurança analíticos, normalmente exigidos na obtenção de certificações nacionais e internacionais de qualidade, mostraram-se satisfatórios.

Atualmente, as normas internacionais e nacionais têm estabelecido níveis de tolerância cada vez mais baixos para substâncias diversas em matrizes ambientais, sendo necessários, portanto, métodos de análise prontamente validados, rápidos e capazes de detectar quantidades ínfimas desses compostos. Nesse contexto, o desenvolvimento e validação da metodologia de análise de metamidofós por LC-MS/MS são importantíssimos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta pública nº 89, de 27 de novembro de 2009. Proposta de regulamento técnico para o ingrediente ativo metamidofós em decorrência da reavaliação toxicológica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 nov. 2009.
2. BURRUEL, V. R. et al Paternal effects from methamidophos administration in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 165, p. 148-157, 2000.
3. CALORE, E. E. et al. Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 64, p. 251-255, 2006.
4. CALORE, E. E. et al. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 66, p. 447-450, 2007.
5. KARABAY, N.U.; Oguz, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and metamidophos. **Genetics and Molecular Research - Online Journal**, v.4, n. 4, p. 653-662, Nov. 2005. Disponível em <<http://funpecrp.com.br>>. Acesso em: 22 ago. 2008.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Processo de revisão e proposta de minuta de atualização da Portaria MS n. 518, de 25 de março de 2004. **Relatório Final**. Brasília, 2010.
7. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS n. 2914, de 14 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2011.
8. SATAR, D., et al. Ultrastructural changes in rat tissue after acute organophosphate poisoning and effects of antidotal therapy with atropine and pralidoxime: a single-blind, ex vivo study. **Current therapeutic research**, v. 69, n.4, p. 334-342, 2008.
9. TAPIA, L. R. et al. Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides. **Neurotoxicity and Teratology**, v. 28, p. 694-703, 2006.
10. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. RiMa : São Carlos, 2004.