

VI-298 – METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DO INSETICIDA METAMIDOFÓS PARA ANÁLISE DE CONTAMINAÇÕES AMBIENTAIS

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.

Maria de Fátima Pedrozo

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

Maycon Maciel Dias

Farmacêutico pela Universidade Presbiteriana Mackenzie.

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 metamidofós é um praguicida organofosforado de largo espectro de ação, sendo classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como extremamente tóxico. Ele apresenta alta solubilidade em água, álcoois e cetonas, média solubilidade em compostos orgânicos clorados e baixa solubilidade em hexano e tolueno. Isso faz com que não fique restrito às áreas de aplicação agrícola, podendo contaminar alimentos e o meio ambiente, principalmente a água, acarretando em um potencial problema de saúde pública. A extração líquido-líquido é uma das técnicas de extração mais utilizadas até a atualidade e no presente trabalho foram testados diversos esquemas de solventes a fim de proceder o pré-tratamento de amostras aquosas contaminadas, em níveis residuais, com metamidofós. Os resultados, tanto de recuperação quanto de reprodutibilidade, não foram satisfatórios, devendo-se buscar outras alternativas para proceder sua análise.

PALAVRAS-CHAVE: Aumento de Capacidade, Melhoria da Qualidade, Água com Alcalinidade, Coagulante Adequado, Auxiliares de Floculação.

INTRODUÇÃO

O metamidofós (ou O,S-dimetilfosforamidotioato; $C_2H_8NO_2PS$) é um praguicida organofosforado de largo espectro de ação.

Ele é classificado, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como extremamente tóxico e sua alta toxicidade aguda 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 (alterações em esperma, em células embrionárias, comprometimento de embriões e filhotes, diminuição de fertilidade de fêmeas, dentre outras) (EXTOXNET) (BURRUEL, 2000), potenciais citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em ratos (IPCS, 2002; KARABAY e OGUZ, 2005; ERGENE, CELIK e KAYA, 2007), alterações morfológicas nos tecidos cardíacos de animais de experimentação (hipertrofias cardíacas) (CALORE et al., 2007), alterações no sistema nervoso central de ratos (atrofias em algumas regiões cerebrais) (CALORE et al., 2006), alterações neuropsicológicas (ansiedade, distúrbios na performance visuo-motora, habilidades visuo-perceptivas e velocidade de processamento de informações) (TAPIA et al., 2006) e alterações na tireóide (SATAR et al., 2008).

Em relação às suas características físico-químicas, ele apresenta alta solubilidade em água, álcoois e cetonas, média solubilidade em compostos orgânicos clorados e baixa solubilidade em hexano e tolueno (WHO, 1993). Isso faz com que não fique restrito às áreas de aplicação agrícola, podendo contaminar alimentos e o meio ambiente, principalmente a água, acarretando em um potencial problema de saúde pública.

Apesar das normativas brasileiras não adotarem valores máximos aceitáveis para o metamidofós em água, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em novembro de 2009, publicou uma consulta pública que sugeria a proibição do seu uso em todo o território nacional, devido às características neurotóxicas, imunotóxicas e toxicidade sobre o sistema endócrino, reprodutor e desenvolvimento embrionário (ANVISA, 2009). Além disso, a revisão da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, que está em andamento, está propondo a inclusão do metamidofós no padrão de potabilidade brasileiro de água, com o valor máximo permitido de 12 µg/L (MS, 2010). No estado americano da Flórida a concentração máxima permitida de tal inseticida em água potável é de 5 µg/L (5 ppb) (EEAA, 2003). Na Holanda, o metamidofós está na “lista-negra” de substâncias cujas emissões deveriam ser cessadas imediatamente. Já a União Européia, adota o valor de 0,1 µg/L como concentração máxima permitida de qualquer praguicida em águas destinadas ao consumo humano.

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

A extração líquido-líquido é uma das técnicas de extração mais utilizadas até a atualidade, e baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra, em dois solventes diferentes e imiscíveis entre si (LANÇAS, 2004), com 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.

Desta forma, o presente trabalho objetivou verificar o comportamento do metamidofós em extrações líquido-líquido, com a finalidade de estabelecer metodologia capaz de detectar resíduos deste inseticida em águas superficiais.

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no laboratório do Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo.

Padrão analítico do praguicida

O padrão analítico de metamidofós utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. e soluções aquosas com diferentes concentrações dele foram preparadas com água ultrapurificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 mΩ cm).

Reagentes, solventes e materiais

Os reagentes, solventes e materiais utilizados foram: funil de separação; água destilada; éter P.A. (Synth, Brasil); clorofórmio P.A. (Synth, Brasil); acetona P.A. (Synth, Brasil); diclorometano P.A. (Carlo Erba, Itália); metanol grau HPLC (Merck, Brasil); acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, Brasil); ácido clorídrico P.A. 6N; cloreto de sódio P.A. (Nuclear, Brasil); cloreto de potássio P.A. (Fisher Scientific, Estados Unidos); balões volumétricos de diversos volumes; béqueres de diversos volumes; micropipeta automática com capacidade para pipetar volumes entre 100 µL e 1000 µL (Transferpette®, Alemanha), bem como ponteiras compatíveis.

Equipamento e acessórios

O equipamento utilizado e seus componentes foram: 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, com pré-coluna equivalente. O detector, acoplado ao cromatógrafo, consistiu em um espectrômetro de massas Triploquadropolo Q-trap 3200 da marca Applied Biosystems, com ionização à pressão atmosférica por electrospray.

Método

Alíquotas de 250 mL ou 100 mL de soluções aquosas de metamidofós com concentração de 400 ng/L foram colocadas em funis de separação e agitadas vigorosamente, durante 2 minutos, com as seguintes combinações de solventes orgânicos: éter / clorofórmio (1:2), éter / acetona (1:2), éter (100%) e clorofórmio / acetona (2:1). Após a separação das fases, a porção orgânica foi recolhida em tubo de polipropileno. Tal processo foi repetido por mais quatro vezes. Os extratos orgânicos foram evaporados até a secura e os resíduos foram solubilizados em 1 mL de metanol para posteriormente serem analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), em metodologia previamente otimizada e validada (GUEDES, PAGANINI, 2010).

Alternativamente, o procedimento acima descrito foi realizado também com a adição de cloreto de sódio ou de potássio à solução inicial de metamidofós, até a sua saturação.

RESULTADOS OBTIDOS

A tabela 01 mostra todas as condições testadas, para a extração líquido-líquido, sempre utilizando água fortificada com metamidofós para se obter uma concentração final de 0,4 µg/L (ou 400 ng/L), e suas respectivas recuperações.

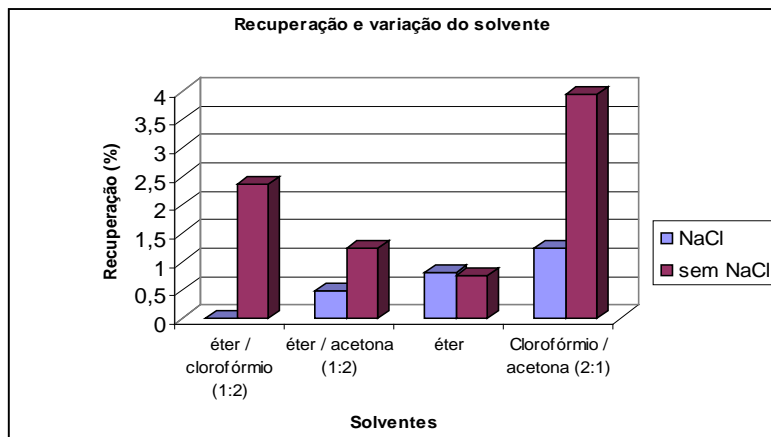
Tabela 01: Condições testadas.

<i>Volume de amostra (mL)</i>	<i>pH</i>	<i>Solvente</i>	<i>Volume de solvente (mL)</i>	<i>NaCl</i>	<i>Recuperação (%)</i>
250	3	Éter / Clorofórmio (1:2)	3 x 50	não	2,35
250	3	Éter / Clorofórmio (1:2)	3 x 50	sim (10g)	0
250	3	Éter / acetona (1:2)	3 x 50	não	1,25
250	3	Éter / acetona (1:2)	3 x 50	sim (30 g)	0,49
250	3	Éter	3 x 50	não	0,75
250	3	Éter	3 x 50	sim (30 g)	0,82
250	7	Éter / Clorofórmio (1:2)	3 x 50	não	2,78
250	7	Éter / Clorofórmio (1:2)	3 x 50	sim (30 g)	2,77
250	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	sim (70 g)	1,23
250	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	não	3,95
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	não	19,82
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	sim	135
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	não	18,40
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	sim (iodado)	0
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	Não	31,62
100	3	Clorofórmio / Acetona (2:1)	5 x 50	KCl (35 g)	0

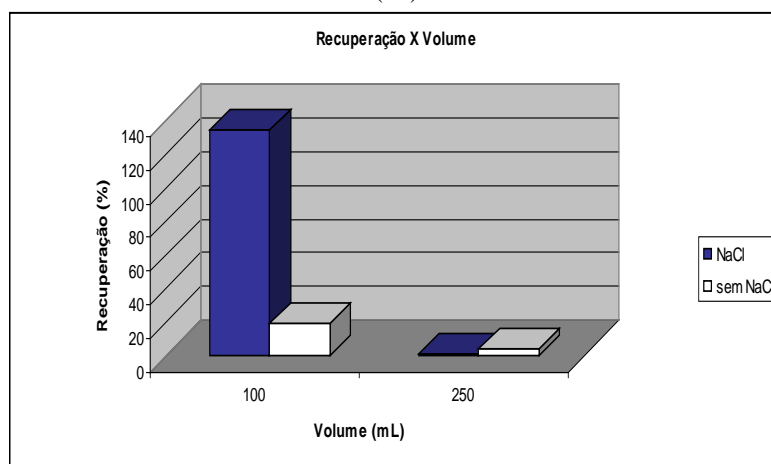
A partir destes resultados, pode-se estabelecer algumas relações, com a finalidade de comparar os diferentes métodos, e verificar qual apresentou maior eficiência. Os gráficos 01, 02 e 03 demonstram isto.

Como pode ser observado através dos dados expostos na tabela 01 e nos gráficos 01, 02 e 03, as extrações realizadas em 100 mL de água fortificada com 0,4 µg/L de metamidofós, em pH 3, utilizando-se clorofórmio /

acetona (2:1) como solvente, forneceram as melhores recuperações dentre os esquemas de extração testados, com ou sem o uso de cloreto de sódio (NaCl).



(01)



(02)

Gráficos 01 e 02: (01) Relação entre os diferentes solventes usados na extração líquido-líquido e as recuperações obtidas, com e sem o uso de NaCl. (02) Relação entre dois volumes distintos de amostra testados na extração líquido-líquido com clorofórmio / acetona (2:1), em pH 3, e suas respectivas recuperações, obtidas com e sem o uso de NaCl.

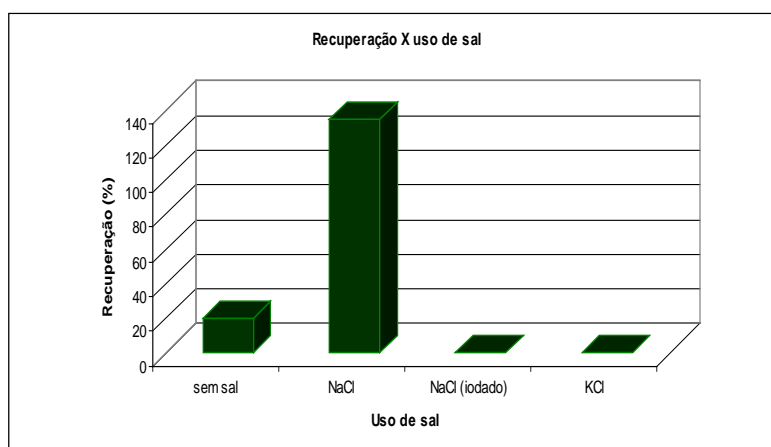


Gráfico 03: Relação entre extrações líquido-líquido realizadas com clorofórmio / acetona (2:1), em amostras de 100 mL, pH 3, e suas respectivas recuperações. Variou-se a utilização de sal e seu tipo.

As recuperações variaram de zero a 31,62%, tendo-se obtido um único valor considerado muito bom (135%) que, na verdade, foi atribuído à contaminação da vidraria utilizada, pois não se pode reproduzi-lo.

Como pode ser observado, as extrações realizadas em 100 mL de água fortificada com 0,4 µg/L de metamidofós, em pH 3, utilizando-se clorofórmio / acetona (2:1) como solvente, forneceram as melhores recuperações, em média 23,28%, dentre os esquemas de extração testados, sem o uso de sal.

Em face a esses resultados, partiu-se para uma segunda etapa do processo, que foi a determinação da eficiência e da reprodutibilidade do método, em três concentrações dentro da faixa de interesse: baixa, média e alta. As tabelas 02 e 03 e o gráfico 04 mostram os resultados dos testes.

Tabela 02: Extrações líquido-líquido realizadas sem a adição de NaCl.

Concentração de fortificação (µg/L)	Recuperação individual (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
0,048	6,72	9,6	9,678437	100,74
	1,7			
	20,4			
0,48	12,17	10,65	6,532812	61,30
	16,3			
	3,5			
0,98	8,17	3,15	4,367337	138,79
	1,02			
	0,25			

Tabela 03: Extrações líquido-líquido realizadas com a adição de 35 gramas de NaCl.

Concentração de fortificação (µg/L)	Recuperação individual (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
0,048	89,94	58,52	0,452281	77,29
	78,93			
	6,68			
0,48	8,64	27,55	0,269937	97,98
	53,20			
	48,13			
0,98	0,22	6,9	0,083534	121,12
	4,30			
	16,24			
	0,15			

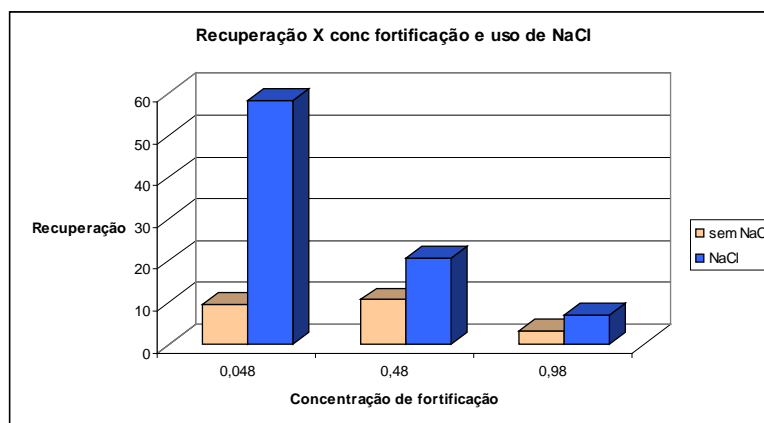


Figura 04: Recuperações obtidas para três concentrações distintas.

Observando-se as recuperações obtidas sem a adição de NaCl, verificou-se uma baixa eficiência da extração para as três concentrações testadas; já com a adição do sal, foram obtidas recuperações melhores porém inversamente proporcionais à concentração do metamidofós, o que pode indicar uma maior eficiência do processo em concentrações mais baixas do que nas mais altas, ou ainda, um problema constante de contaminação da vidraria utilizada, em particular do funil de separação que, mesmo após exaustiva lavagem, poderia não estar completamente descontaminado. Para ambos os esquemas de extração testados, foram observados altos coeficientes de variação (CV), o que evidencia a baixa reprodutibilidade dos métodos.

CONCLUSÕES

Os diversos esquemas de solventes testados, com variações de volume de amostra, pH e adição de sal, em geral, não apresentaram boas recuperações.

Ainda assim, as extrações realizadas com 100 mL de água fortificada, em pH 3 e utilizando clorofórmio / acetona (2:1) como solvente, forneceram as melhores recuperações, e por isso foram testadas em três concentrações diferentes (baixa, média e alta), na tentativa de verificar a reprodutibilidade do método.

Observou-se que as melhores recuperações foram obtidas com a adição de 35 gramas de cloreto de sódio, porém o coeficiente de variação foi muito alto para os três níveis de concentração, o que compromete a reprodutibilidade do método e impossibilita seu uso na prática laboratorial.

Uma única recuperação acima de 135% (Tabela 01) foi desconsiderada para efeitos de análise dos dados uma vez que foi muito destoante das demais. Existe a suspeita de ter havido contaminação em alguma etapa do processo.

Uma vez que os resultados obtidos na extração líquido-líquido não foram satisfatórios, os esforços para o desenvolvimento de métodos capazes de determinar quantidades mínimas (da ordem de partes por bilhão e até trilhão) de metamidofós em água continuaram. Foi avaliada, posteriormente, a técnica de extração em fase sólida (SPE), que também não atingiu o objetivo proposto. Finalmente, optou-se por estabelecer um método com injeção direta das amostras de água no cromatógrafo líquido (sem extração prévia), aumentando consideravelmente o volume injetado. Esta sutil modificação foi decisiva e levou a uma melhora significativa nos níveis de detecção e de quantificação atingidos, sendo mantidos todos os outros parâmetros de segurança analíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Proposta de regulamento técnico. Consulta pública nº89, 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. Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br>. Acesso em 31 out. 2010.
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. ERGENE S., CELIK A., CAVAS T., KAYA F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environmental International**, v. 33, 2007, p. 877-885.
6. EXTOTOXNET – Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. **Methamidophos**. United States [s. d.]. Disponível em: < S:\IC\CEAP\NAI\Peritos\camila.cdg\Mestrado\EXTOTOXNET PIP - METHAMIDOPHOS.htm>. Acesso em: 12 mar. 2009.
7. IPCS – International Programme on Chemical Safety. **Pesticides Residues in Food**. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues. Methamidophos, 2002. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr10.htm>>. Acesso em: 13 abr. 2009.

8. 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/GMR/year2005/vol4-4/gmr0134_full_text.htm>. Acesso em: 22 ago. 2008.
9. GUEDES, C. D., PAGANINI, W.S. Análise de resíduos do inseticida organofosforado metamidofós por LC-MS/MS – uma validação de metodologia analítica. In: X SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2010, Maceió. Anais... São Paulo:Associação Brasileira de engenharia Sanitária e Ambiental.
10. 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, 2008, p. 334-342.
11. MS - Ministério da Saúde. Processo de revisão e proposta de minuta de atualização da Portaria MS nº 518/2004 – Relatório Final. Brasília, 2010.
12. TAPIA, L. R. *et al.* Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides. **Neurotoxicity and Teratology**, v. 28, 2006, p. 694-703.
13. WHO – World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. **Methamidophos: Health and Safety Guide**. Geneva, 1993.