

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO INSETICIDA METAMIDOFÓS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO DE SOROCABA, SÃO PAULO: UMA
PROPOSTA DE METODOLOGIA ANALÍTICA**

Camila Delanesi Guedes

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Saúde Pública.**

**Área de concentração: Saúde
Ambiental.**

**Orientador: Prof. Dr. Wanderley da
Silva Paganini.**

**São Paulo
2011**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO INSETICIDA METAMIDOFÓS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO DE SOROCABA, SÃO PAULO: UMA
PROPOSTA DE METODOLOGIA ANALÍTICA**

Camila Delanesi Guedes

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Saúde Pública.**

**Área de concentração: Saúde
Ambiental.**

**Orientador: Prof. Dr. Wanderley da
Silva Paganini.**

**São Paulo
2011**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida a quem sempre elevo meus pensamentos nos momentos de alegrias, tristezas e dificuldades.

Ao Vinícius por ter me auxiliado de forma determinante na realização deste trabalho, certa de que sem esta ajuda, sua execução seria infinitamente mais difícil.

A meus pais, Maria Helena e Edson, por terem sempre apoiado meus estudos, fornecendo toda a base, fundamental para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha irmã Priscila, por ter me apoiado, sabendo compreender minha dedicação.

A minha avó que, mesmo sem compreender a razão de tanto empenho, desejou e rezou para que eu atingisse meu objetivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que, mesmo de longe, torceram por mim e colaboraram facilitando a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wanderley da Silva Paganini por aceitar meu projeto e confiar que o concluiria, me direcionando nos momentos de dúvida e me acalmando nos momentos de ansiedade.

Ao Prof. Dr. Pedro Caetano Mancuso, pelas pontuações precisas no exame de qualificação, que muito contribuíram para a finalização do estudo.

À Prof. Dr^a Maria de Fátima Pedrozo por me servir de modelo de competência e de dedicação incondicional à pesquisa e ao ensino, imprimindo relevância científica e social ao meu projeto, bem como estímulo para desenvolvê-lo. E, com sua confiança e firmeza, me impulsionou nessa jornada me fazendo acreditar que era possível, me apoiando, compartilhando minhas dúvidas e contribuindo com as necessidades para a conclusão deste trabalho.

À Dr^a Lucilena Martins Kayo por permitir o uso das instalações do laboratório para a realização das análises, e por tolerar ausências físicas e mentais, sabendo que o conhecimento a ser adquirido contribuiria muito com os serviços lá realizados.

A todos os colegas do Núcleo de Análise Instrumental do CEAP – IC – SPTC/SP que contribuíram com amizade, interesse e estímulo ao trabalho.

A todos os colegas do grupo de orientação coletiva, pelo acompanhamento no desenvolvimento do projeto e pelas idéias e críticas construtivas, tanto na execução do estudo quanto na sua forma de apresentação.

Especialmente ao Vinícius, que além de promover incondicional apoio, confiança e estímulo para a realização do estudo, também participou ativamente na sua execução, me acompanhando em todas as coletas de água e carregando baldes e garrafas em intermináveis sábados e domingos, ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

O Brasil é um dos grandes consumidores mundiais de agrotóxicos. O uso de produtos a base de metamidofós é alto, destacando-se como um dos mais utilizados na região da sub-bacia do Alto Sorocaba, local de desenvolvimento desta pesquisa. Ele 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. Por fim, foram avaliadas, pontualmente, as águas dos três principais afluentes do rio Sorocaba, e também dele próprio. Foram obtidos resultados positivos para o metamidofós nos rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, ao longo do ano estudado, o que não foi verificado no rio Sorocaba. Estes resultados mostram o uso desta substância a montante dos pontos estudados, nos afluentes, e leva a crer que o regime lântico da represa de Itupararanga retenha o metamidofós por tempo suficiente para ele ser degradado a níveis não detectados pelo método desenvolvido, não atingindo o rio Sorocaba.

PALAVRAS-CHAVE: metamidofós, Alto Sorocaba, cromatografia líquida, espectrometria de massas, água superficial

ABSTRACT

Brazil is a big world pesticides consumer country. The use of products with methamidophos is high, being one of the most used in the Alto Sorocaba sub basin region, where this research takes place. Methamidophos presents high acute toxicity and concerned aspects of chronic toxicity, main related to reproduction. Additionally, it don't be restricted to the application areas, and can contaminate food and environment, mainly water, resulting in a public health problem. Available laboratory methods for methamidophos extraction from water, described in the consulted literature, present controversial efficiencies, and do not achieve, mostly, levels low enough to traces analisys. It was tested, in this research, several liquid-liquid extraction and phase solid extraction methods in order to pre-concentrate methamidophos, but results were not satisfactories. So, it was developed an analytical method by liquid cromathography coupled mass spectrometry, able to detect and quantify methamidophos in residual levels, without a pre-treatment sample necessity. Finally, it was evaluated, pointedly, three main tributary waters of Sorocaba river, and itself too. The results were positives for methamidophos in the Sorocamirim, Sorocabuçu and Una, al over de studied year, which was not verified in the Sorocaba river. This results show the methamidophos use upstream studied places, in the tributaries, and suggests that reservoir Itupararanga lentic system retains methamidophos long enough to be degradated under developed method detectable levels, don't achieving the Sorocaba river.

PALAVRAS-CHAVE: methamidophos, Alto Sorocaba, liquid chromathografy, mass spectrometry, superficial water.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 AGROTÓXICOS	20
3.1.1 Conceituação	20
3.1.2 Histórico	21
3.1.3 Classificação dos agrotóxicos	21
3.1.4 Agrotóxicos organofosforados	24
3.1.5 O uso de agrotóxicos, o meio ambiente e a saúde coletiva	27
3.1.6 Os agrotóxicos nas águas	31
3.1.7 O metamidofós	33
3.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS	39
3.2.1 Preparo de amostras	39
3.2.1.1 Extração líquido-líquido	40
3.2.1.2 Extração em fase sólida	422
3.2.1.3 Aplicações das técnicas de extração na análise de agrotóxicos	43
3.2.2 Métodos cromatográficos de análise	46
3.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	47
3.2.3 Espectrometria de massas	49
3.2.3.1 Espectrometria de massas em sequência	52
3.2.4 Aplicação do LC-MS/MS nas análises de agrotóxicos	544
3.2.5 Validação de métodos analíticos	54
3.2.5.1 Seletividade	566
3.2.5.2 Linearidade	577
3.2.5.3 Precisão	588
3.2.5.4 Exatidão	59
3.2.5.5 Limite de detecção e quantificação	60
3.2.5.6 Robustez	61
4 MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1 LOCAL DO ESTUDO: A REGIÃO DE SOROCABA	62
4.1.1 Os rios Sorocamirim, Una e Sorocabuçu	65
4.1.2 Amostragem	66
4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS	68
4.2.1 Material de referência do praguicida	69
4.2.2 Reagentes, solventes e materiais	69
4.2.2.1 Utilizados nas extrações	69

4.2.2.2 Utilizados na cromatografia líquida e espectrometria de massas	70
4.2.3 Equipamentos e acessórios	71
4.2.4 Avaliação dos métodos de extração	72
4.2.4.1 Extração líquido-líquido	72
4.2.4.2 Extração em fase sólida	72
4.2.5 Determinação das condições do sistema de detecção	73
4.2.6 Determinação das condições cromatográficas	73
4.2.7 Validação analítica para amostras aquosas	74
4.2.7.1 Seletividade e especificidade	74
4.2.7.2 Linearidade e intervalo	75
4.2.7.3 Precisão	75
4.2.7.4 Exatidão	76
4.2.7.5 Sensibilidade (limite de quantificação e limite de detecção)	76
4.2.7.6 Robustez	76
4.3 PRESENÇA DE AGROTÓXICOS EM CORPOS HÍDRICOS DA REGIÃO: DADOS COMPLEMENTARES	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	81
5.1.1 Extração Líquido-líquido	81
5.1.2 Extração em fase sólida (SPE)	87
5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	94
5.2.1 Otimização das condições no espectrômetro de massas	94
5.2.2 Descrição das condições cromatográficas de trabalho	97
5.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA AMOSTRAS AQUOSAS	98
5.3.1 Seletividade e especificidade	98
5.3.2 Linearidade e intervalo	99
5.3.3 Precisão	101
5.3.4 Exatidão	101
5.3.5 Sensibilidade (limite de quantificação e limite de detecção)	102
5.3.6 Robustez	103
5.4 ANÁLISE DAS ÁGUAS DOS RIOS	104
6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	109
7 REFERÊNCIAS	112
ANEXO 1	119
CURRÍCULO LATTES	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação toxicológica adotada pela ANVISA.	22
Tabela 2: Resumo das propriedades físico-químicas do metamidofós.	34
Tabela 3: Principais agrotóxicos a serem monitorados em águas doces, segundo a Resolução CONAMA 357.	38
Tabela 4: Pontos de amostragem.	66
Tabela 5: Agrotóxicos detectados no sedimento, na Bacia do Sorocaba.	78
Tabela 6: Resultados positivos para o metamidofós por ponto e data de coleta.	79
Tabela 7: Condições testadas para extração líquido-líquido e suas recuperações.	82
Tabela 8: Extrações líquido-líquido realizadas sem a adição de NaCl.	85
Tabela 9: Extrações líquido-líquido realizadas com a adição de 35 gramas de NaCl.	85
Tabela 10: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho C-18, e suas respectivas recuperações.	87
Tabela 11: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho CN, e suas respectivas recuperações.	88
Tabela 12: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho NH ₂ , e suas respectivas recuperações.	89
Tabela 13: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho Florisil, e suas respectivas recuperações.	91
Tabela 14: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho Oasis HLB, e suas respectivas recuperações.	92
Tabela 15: Valores de recuperação (%) e do coeficiente de variação (%) obtidos em repetibilidade e precisão intermediária.	102
Tabela 16: Dados dos testes de robustez.	103
Tabela 17: Resultados obtidos do monitoramento das águas dos rios.	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transporte de agrotóxicos no meio ambiente.	32
Figura 2: Estrutura do metamidofós	34
Figura 3: Extração líquido-líquido.	40
Figura 4: Etapas do processo de extração em fase sólida.	42
Figura 5: Diagrama em blocos de um sistema HPLC típico.	48
Figura 6: Análise por espectrometria de massas.	51
Figura 7: Componentes básicos de um espectrômetro de massas.	51
Figura 8: Localização da Bacia do rio Sorocaba.	62
Figura 9: Bacia Sorocaba – Médio Tietê.	63
Figura 10: Bacia do rio Sorocaba.	64
Figura 11: Representação dos pontos de coleta no mapa.	66
Figura 12: Rio Sorocamirim.	67
Figura 13: Rio Sorocabuçu.	67
Figura 14: Rio Una.	67
Figura 15: Rio Sorocaba.	67
Figura 16: Relação entre os diferentes solventes usados na extração líquido-líquido e as recuperações obtidas, com e sem o uso de NaCl.	83
Figura 17: 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.	83
Figura 18: 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.	84
Figura 19: Recuperações obtidas para três concentrações distintas.	86
Figura 20: Recuperações obtidas para o cartucho C-18.	88
Figura 21: Recuperações obtidas para o cartucho CN.	89
Figura 22: Recuperações obtidas para o cartucho NH ₂ .	90
Figura 23: Recuperações obtidas para o cartucho Florisil.	91
Figura 24: Recuperações obtidas para o cartucho Oasis HLB (médias).	93
Figura 25: Recuperações obtidas para o cartucho Oasis HLB.	93
Figura 26: Espectro de massa do metamidofós, obtido por ionização através de electrospray, no modo positivo.	95

Figura 27: Espectro de massa do metamidofós, com identificação dos fragmentos iônicos mais intensos.	96
Figura 28: Cromatograma do padrão de metamidofós. Concentração de 100 ng/L (ppt), em água.	98
Figura 29: Cromatograma do branco.	99
Figura 30: Curva de calibração do metamidofós, na faixa concentração: 0,98 a 98 µg/L.	100
Figura 31: Curva de calibração do metamidofós, na faixa de trabalho linear.	100
Figura 32: Distribuição percentual dos resultados.	105
Figura 33: Precipitação média mensal (mm) nas cidades de São Roque, Ibiúna e Sorocaba, no período de fevereiro de 2010 a janeiro de 2011.	106

SIGLAS UTILIZADAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C-18 - octadecilsilano
CEAGESP - Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CN – ciano
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV - coeficiente de variação
DBO_{5,20} – Demanda bioquímica de oxigênio
DDE – diclorodifenildicloroetileno
DDT – diclorodifeniltricloroetano
DL₅₀ - dose letal a 50%
DQO - Demanda química de oxigênio
ESI – electrospray ionization
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA - Food and Drug Administration
IDA - ingestão diária aceitável
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
K_{oc} – coeficiente de adsorção
K_{ow} – coeficiente de partição octanol-água
LC-MS/MS – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LOD - limite de detecção
LOQ - limite de quantificação
MRL - limites máximos de resíduos
MRM - multiple reaction monitoring
NaCl – cloreto de sódio
NH₂ - amino
OMPA – octametil pirofosfamida
OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

RSD - desvio padrão relativo

SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas

SIRAH - Sistema de Informações de Resíduos de Agrotóxicos em Horticultura

SPE – Solid phase extraction (extração em fase sólida)

TEPP - tetraetil pirofosfato

UGRHI - Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USEPA – United States Environmental Protection Agency

1 INTRODUÇÃO

Na era primitiva, o homem alimentava-se dos produtos naturais que conseguia através da coleta, da caça e da pesca, sendo dependente do que o ambiente lhe oferecia, para sobreviver. Aos poucos, aprendeu a cultivar a terra e a produzir seu sustento, conforme suas necessidades, tornando-se menos dependente e passando a exercer domínio sobre as condições naturais de sobrevivência.

Com o desenvolvimento da agricultura, o homem fixou-se ao solo e apropriou-se da terra, surgindo, dessa forma, as bases materiais, sociais e políticas das primeiras civilizações agrícolas.

Na Grécia e na Roma antiga, a atividade agrícola era considerada a atividade econômica principal, sendo a unidade econômica básica a família. Já no final da Idade Média, com o surgimento do mercantilismo, adotou-se um modo capitalista de produção agrícola, onde a agricultura passou a ser vista como fonte de riqueza, modelo tal que persiste até a atualidade (CORAZZA, 2002).

Após a Segunda Grande Guerra a agricultura mundial sofreu intensas mudanças, sendo estabelecido um padrão agrícola baseado na mecanização, em cultivares de alto potencial de rendimento, em técnicas de irrigação, e no uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos) visando a elevação da produtividade. Ao mesmo tempo, a ciência, relacionada à síntese orgânica, sofria um substancial desenvolvimento (TREVISAN, 2002).

Esse cenário teve importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos, e a partir da década de 1960, tal padrão agrícola foi difundido para os países de Terceiro Mundo, num processo conhecido como “Revolução Verde”, onde foram observadas profundas mudanças na sociedade e no processo tradicional do trabalho na agricultura, bem como seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana.

No Brasil, historicamente, havia uma agricultura baseada no latifúndio, na monocultura de exportação, no trabalho escravo, na abundância de terras novas e férteis e no descaso pelo manejo e conservação do solo, com pouca diversificação e

quase nenhuma qualificação da força de trabalho e dos processos agrícolas (CAPDEVILLE, 1991).

Até o início do século XX, o Brasil continuava sendo um país eminentemente agrícola que produzia para exportar e que não conseguia suprir a si mesmo com os gêneros alimentícios necessários ao seu abastecimento interno. A guerra de 1914, que proporcionou condição para um surto de industrialização, agravou a situação de desabastecimento e carência dos gêneros alimentícios, pois orientou mais ainda as atividades agrícolas para a exportação, a fim de abastecer os países em guerra (CAPDEVILLE, 1991).

A Revolução Verde somada a problemas sociais como a urbanização acelerada e desorganizada verificada desde 1970 trouxe importante contribuição para a situação ora vigente no ambiente rural brasileiro. Atualmente, a grande maioria da população vive em áreas urbanas, e ao mesmo tempo o governo brasileiro incentiva continuamente o aumento da produção agrícola, uma vez que ela é responsável por 23% do produto interno bruto do país, gerando um superávit comercial de US\$ 50 bilhões e empregando 17 milhões de pessoas (MPOG, 2009). Esses fatores fizeram com que um grupo cada vez menor de agricultores, na sua maioria despreparados e não-assistidos, fosse responsável por uma produtividade cada vez mais elevada, conseguida, predominantemente, com a utilização crescente de agrotóxicos e fertilizantes (MOREIRA, 2002).

Nos dias atuais, é estimado um consumo mundial de 2,5 a 3 milhões de toneladas de agrotóxicos por ano (MOREIRA, 2002). A América Latina é a região onde se observa um maior aumento no uso de agrotóxicos, muito em parte pela influência do Brasil, que consome cerca de metade do montante de toda a região. Entre 1964 e 1991, o consumo de agrotóxicos no país aumentou 276,2%, frente a um aumento de 76% na área plantada ao passo que no período entre 1991 e 2000, foi observado um aumento de quase 400% no consumo desses agentes químicos, frente a um aumento de 7,5% na área plantada (MIRANDA et al., 2007).

O consumo de agrotóxicos na região Sudeste do Brasil está estimado em 12 Kg de agrotóxico / trabalhador / ano, podendo atingir valores bem superiores a este em algumas áreas produtivas (MOREIRA, 2002).

Esse grande e crescente consumo de agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde dos trabalhadores rurais e da população em geral. Tais conseqüências são, geralmente, condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados entre si, como por exemplo: uso inadequado dessas substâncias, alta toxicidade de certos produtos, falta de utilização de equipamentos de proteção, precariedade de mecanismos de vigilância, dentre outros.

Os agrotóxicos usados nas plantações, em geral, apresentam elevada toxicidade e não ficam restritos às áreas aplicadas. Eles podem permanecer nos vegetais cultivados, mesmo após a colheita, contaminando os alimentos e sendo ingeridos pela população.

Outra possibilidade extremamente preocupante é a contaminação ambiental por essas substâncias, já que, uma vez no ambiente, eles sofrerão diversos processos físicos, químicos e biológicos, individualmente ou simultaneamente, o que acarreta na contaminação dos mais importantes compartimentos ambientais: atmosfera, solos, águas superficiais e profundas. Essas substâncias podem aparecer até mesmo em localidades distantes do ponto de aplicação, devido à intercomunicabilidade dos compartimentos ambientais e às ocorrências climáticas.

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, o metamidofós, apresenta toxicidades aguda e crônica preocupantes, sendo classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como altamente tóxico.

Além disso, as características químicas e físico-químicas do metamidofós indicam alto potencial de contaminação das águas, devido a sua alta solubilidade neste meio e baixa tendência a se concentrar nos sedimentos, e também uma moderada persistência no ambiente, com tempo de meia vida máxima maior que 300 dias, podendo variar com o pH do meio e com a incidência de luz solar, já que apresenta uma tendência a sofrer fotólise.

Adicionalmente, o uso de produtos cujo ingrediente ativo é o metamidofós, no Brasil, é alto, destacando-se como um dos praguicidas mais utilizados, também, na região da sub-bacia do Alto Sorocaba, escolhida para o desenvolvimento desta pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar, no período de um ano, a presença do inseticida organofosforado Metamidofós, em amostras de água colhidas do rio Sorocaba e seus afluentes: Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, todos localizados na região do Alto Sorocaba, São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar o método analítico para proceder às análises do metamidofós em águas superficiais;
- Realizar a quantificação do metamidofós no Alto Sorocaba e seus principais afluentes;
- Por meio dos resultados das análises das águas dos rios, verificar a presença, a extensão e determinar a rota de contaminação dos rios, a jusante e a montante dos pontos avaliados;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AGROTÓXICOS

3.1.1 Conceituação

O termo agrotóxico, segundo a Lei 7.802/1989 e os Decretos 98.816/1990 e 4.074/2002, refere-se a diversos produtos e agentes utilizados na agricultura cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Desse modo, estão incluídas substâncias usadas como inseticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, dentre outras.

A Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) adota o termo *'pesticide'*, cuja tradução direta para a língua Portuguesa, onde se obtém o termo *pesticida*, não é adequada, uma vez que o termo *'peste'* significa: *“Doença contagiosa, epidêmica, muitas vezes mortal; pestilência”*. Segundo alguns autores, o termo *praguicida* é a tradução correta para designar substâncias destinadas à prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga (OGA, 2003).

Neste trabalho serão adotados, como sinônimos, o termo agrotóxico, que é o utilizado nas leis e normas regulamentadoras do Brasil, e também o termo *praguicida*, como tradução de *'pesticide'*, difundido mundialmente.

3.1.2 Histórico

Compostos com ação praguicida são utilizados desde a antiguidade no controle de organismos indesejáveis para o homem. Os primeiros relatos datam de cerca de 1500 A.C., com o uso de enxofre queimado para purificar casas (KLAASSEN, 2008).

Diversos outros compostos, de origem natural e inorgânica, foram usados ao longo dos tempos, por exemplo, os chineses utilizavam sulfetos de arsênico para controlar insetos de jardim. No ocidente, o primeiro relato data de 1669, com o uso de arsênico e tabaco como inseticidas de contato. Além disso, são citados também compostos de cobre, ácido hidrocianídrico, dissulfito de carbono, dentre outros (KLAASSEN, 2008).

Os arsênicos foram os mais utilizados na antiguidade para o controle das pragas, primeiramente como inseticidas e posteriormente como herbicidas. Como fungicidas, foram muito usados o enxofre e os compostos de mercúrio (KLAASSEN, 2008).

O período entre 1935 e 1950 foi caracterizado pelo desenvolvimento das maiores classes de praguicidas, particularmente os inseticidas. Em 1939 Paul Müller descobriu que o DDT (diclorodifeniltricloroetano), primeiramente sintetizado em 1874 e comercializado a partir de 1942, era letal para insetos.

3.1.3 Classificação dos agrotóxicos

Atualmente, calcula-se que existam mais de 1500 substâncias utilizadas como ingredientes ativos de produtos agrotóxicos, que podem estar presentes em milhares de formulações diferentes, em quantidades diversas e em associações distintas ao redor do mundo (PATNAIK, 2007).

Devido a essa imensa diversidade de compostos, existem algumas classificações comuns adotadas para facilitar a abordagem do assunto.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classificam os praguicidas em quatro grupos baseados nas toxicidades agudas oral, ocular e dérmica das substâncias, em ratos, utilizando a DL₅₀ (dose letal a 50% - dose capaz de levar a óbito metade do lote de animais de experimentação) como principal parâmetro de avaliação.

Tabela 1: Classificação toxicológica adotada pela ANVISA, com DL₅₀ oral.

Classe	Descrição	DL ₅₀ oral (ratos) – mg/kg	
		Sólido	Líquido
I	Extremamente tóxico	≤ 5	≤ 20
II	Altamente tóxico	5-50	20-200
III	Medianamente tóxico	50-500	200-2000
IV	Pouco tóxico	> 500	> 2000

Freqüentemente, os praguicidas são classificados também de acordo com as suas funções. Os termos são compostos pela classe de pragas que é atingida pela substância, seguida do sufixo ‘cida’, do latim *caedere*, que significa matar, obtendo-se as seguintes classes: inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, avicidas, algicidas, acaricidas, dentre outras. (PATNAIK, 2007; JICKELLS e NEGRUSZ, 2008).

Os inseticidas são a classe de agrotóxicos de maior importância no controle de pragas, particularmente nos países em desenvolvimento. Eles são largamente utilizados na agricultura e englobam compostos quimicamente bem diferenciados, sendo didaticamente subdivididos de acordo com suas estruturas químicas, obtendo-se as seguintes subclasses principais: organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008).

Os praguicidas do grupo dos organofosforados, por serem de particular interesse desta pesquisa, serão discutidos no próximo item.

Os organoclorados, como DDT, aldrin, dieldrin, clordano, lindano, dentre outros, são compostos orgânicos halogenados com propriedades inseticidas, que foram extensivamente utilizados no passado tanto na agricultura quanto em aplicações domésticas e urbanas. O DDT, principal representante da classe, foi primeiramente sintetizado em 1874, porém sua ação inseticida foi descoberta somente em 1939. De meados da década 1940 até os anos 70 o DDT foi muito usado até mesmo em programas de erradicação da malária. Sua toxicidade aguda é moderada, porém a exposição crônica pode acarretar problemas no fígado e nos sistemas reprodutivos. De forma geral, os organoclorados apresentam propriedades químicas e físico-químicas que lhes conferem características de persistência ambiental, bioconcentração e biomagnificação nas cadeias alimentares, como por exemplo, baixa volatilidade, boa estabilidade e alta lipossolubilidade, acarretando efeitos deletérios à saúde humana, ao meio ambiente e aos ecossistemas. Em virtude disto, eles estão nos primeiros lugares em várias listas de poluentes na Europa e foram banidos em muitos países (Suíça, Estados Unidos, Reino Unido, etc.) a partir de 1970. Em função de suas altas persistências, têm sido responsabilizados como poluidores do meio ambiente (poluentes orgânicos persistentes). Acumulam-se nos tecidos gordurosos do homem, causam redução de fertilidade em animais e desequilíbrios biológicos na natureza, ressaltando que muitas espécies de insetos se tornaram resistentes a eles (SANTOS, 2007; PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008).

Os carbamatos são compostos de estruturas variadas, mas sempre oriundos do ácido carbâmico. Suas toxicidades agudas também variam de baixas até extremamente altas. O mecanismo de toxicidade dos carbamatos é análogo ao dos organofosforados, ou seja, eles inibem a enzima acetilcolinesterase. Porém, diferentemente dos fosforados, a inibição induzida pelos carbamatos é transitória e rapidamente reversível na presença de água (CASARETT, 2008). Em geral, os carbamatos são utilizados na agricultura através de pulverização ou diretamente no solo. A alta solubilidade em água de alguns compostos limita seu uso em vegetais com alto conteúdo hídrico, e também devido a essa propriedade química, a contaminação das águas tem sido relatada na literatura. As principais vias de exposição de humanos a esses agrotóxicos são o consumo de alimentos e a ingestão

de água contaminada e principalmente no Brasil, são relatadas intoxicações agudas em trabalhadores rurais, ingestões acidentais e também criminosas (PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008).

Os inseticidas do grupo dos piretróides são análogos sintéticos das piretrinas. Estas, por sua vez, já eram usadas na China e Pérsia antigas, obtidas através da extração de flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*. As piretrinas, porém, eram rapidamente decompostas pela luz e por esse motivo foram desenvolvidas substâncias semelhantes que poderiam ser sintetizadas pelo homem: os piretróides. Nos últimos trinta anos tais substâncias têm sido muito utilizadas por todo o mundo em diversas áreas (agricultura, uso doméstico, na medicina para tratamento tópico de escabiose, etc) devido à sua alta atividade inseticida, relativamente baixa toxicidade a mamíferos, baixa persistência ambiental, e baixa tendência a induzir resistência dos insetos. A exposição humana aos piretróides, através da via inalatória, pode causar reações localizadas no trato respiratório, com edema laríngeo, tosse, dores no peito e alteração no ritmo respiratório. Além disso, a toxicidade aguda pode levar ao desenvolvimento de uma síndrome com alteração de comportamento, agressividade, tremores corporais, prostração e salivação. A exposição dérmica aos piretróides causa parestesia, e são relatados como efeitos de exposições crônicas alterações hepáticas, desregulações do sistema endócrino e desenvolvimento de alergias (SANTOS, 2007; JICKELLS, 2008; CASARETT, 2008).

3.1.4 Agrotóxicos organofosforados

Ainda no século XIX muitos compostos organofosforados começaram a ser sintetizados, juntamente com o desenvolvimento dos processos de síntese orgânica, porém suas aplicações como inseticidas ocorreram somente no final da década de 1930 e início de 1940 (PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008).

As propriedades inseticidas e a estrutura química geral dos organofosforados foi descoberta em 1937 por Gerhard Schrader que, em 1941, desenvolveu o inseticida

OMPA – octametil pirofosfamida e, em 1944, o primeiro praguicida organofosforado a ser comercializado, cuja substância ativa era o tetraetil pirofosfato (TEPP). Posteriormente foram desenvolvidas outras substâncias, algumas com maior estabilidade (paration, por exemplo), outras com menor toxicidade (malation, por exemplo) (OGA, 2003; PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008).

Algumas centenas de compostos organofosforados têm sido desenvolvidas desde então, e atualmente, eles são largamente usados em diversos produtos comerciais para controle e combate a pragas, principalmente como inseticidas agrícolas em fruticultura, horticultura, cultura de algodão, cereais, sementes e plantas ornamentais (OGA, 2003; VEIGA, 2006), sendo que 40% do mercado mundial de praguicidas, em 1999, era representado por organofosforados (SANTOS, 2007).

A principal razão para o sucesso desses compostos é sua elevada atividade biológica acoplada à sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida, em plantas, da ordem de 2 até 10 dias. Ou seja, os organofosforados são susceptíveis à degradação por hidrólise, oxidação e outros processos, apresentando baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente quando comparados aos compostos clorados. Apresenta ainda acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 horas do contato. Os inseticidas organofosforados são importantes não somente pela proteção agrícola que oferecem, mas também pelos propósitos industriais, domiciliares e ambientais, que permitem o uso de algumas substâncias também em ambientes urbanos e domésticos (SANTOS, 2007; PATNAIK, 2007).

Esses compostos exercem sua ação, principalmente, através da inibição enzimática, o que determina sua alta toxicidade para diversos organismos animais que possuem tais enzimas. Por isso, eles são responsáveis também por um alto número de casos de intoxicações e mortes, tanto humanas quanto de animais não alvos, acidentais ou não.

As duas enzimas mais importantes inibidas por tais substâncias são a acetilcolinesterase, cuja ação específica é hidrolisar rapidamente a acetilcolina, e a butirilcolinesterase (ou pseudo-colinesterase), não específica, capaz de hidrolisar diversos tipos de ésteres. A primeira enzima está presente em altas concentrações no

sistema nervoso (central, periférico e autônomo) e nas hemácias, e a última é encontrada principalmente no soro, pâncreas e fígado.

A acetilcolina, por sua vez é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico (autônomo e motor-somático), necessária para a transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do sistema autônomo, em todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e em algumas fibras simpáticas pós-ganglionares. Além disso, a acetilcolina é o transmissor da placa mioneural e de algumas sinapses no sistema nervoso central (OGA, 2003).

Os organofosforados, ao inibirem as enzimas colinesterásicas, principalmente a acetilcolinesterase, promovem o acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas e conseqüentemente surgem manifestações tóxicas decorrentes de uma hiperestimulação dos receptores de acetilcolina. Os sinais e sintomas mais comuns são: broncoespasmos, aumento da secreção brônquica, salivação excessiva, lacrimejamento excessivo, constrição das pupilas, diminuição dos batimentos cardíacos, aumento da motilidade intestinal, diarreia, fadiga muscular, câimbras, dores de cabeça, insônia, tremores musculares, convulsões e coma, podendo levar à morte (OLSON, 2004; PATNAIK, 2007; CASARETT, 2008) dependendo das condições de exposição, a saber: dose ou concentração utilizada, via de introdução, duração e freqüência da exposição, suscetibilidade individual e propriedades físico-químicas da substância.

A interação entre os organofosforados e a acetilcolinesterase tem sido muito estudada e sabe-se que, em geral, ela ocorre rapidamente e apresenta uma alta estabilidade, podendo levar horas e até mesmo dias para ser revertida, dependendo da estrutura química da substância envolvida. Um fenômeno que pode ocorrer é o 'envelhecimento' do complexo enzima-organofosforado, e a partir desse momento a enzima é considerada irreversivelmente inibida, significando, para o organismo, que a recuperação das funções realizadas por ela depende da produção de novas enzimas, processo esse que pode levar dias (CASARETT, 2008).

A literatura também comenta o desenvolvimento de síndrome intermediária e polineuropatia tardia decorrentes da intoxicação por muitos organofosforados. A

primeira é caracterizada por fraqueza de músculos respiratórios e do pescoço, e aparece alguns dias após a intoxicação; a última pode ocorrer de 2 a 3 semanas após a exposição e é caracterizada por tremores das mãos e pés, seguida por perda sensorial, progressiva fraqueza muscular, flacidez de músculos das extremidades e ataxia (CASARETT, 2008).

3.1.5 O uso de agrotóxicos, o meio ambiente e a saúde coletiva

O desenvolvimento da agricultura, a ampliação das fronteiras agrícolas, a modernização dos meios de produção, e, principalmente, a demanda dos mercados de produtos em quantidade e em qualidade, têm exigido cada vez mais o uso de produtos químicos para a garantia de produtividade (TREVISAN, 2002).

Isso, porém, tem gerado inúmeros impactos negativos tanto para o meio ambiente como para a saúde humana. As estimativas feitas pelas agências internacionais de saúde são extremamente preocupantes, indicando principalmente problemas de intoxicações agudas, determinadas pelo contato direto com produtos altamente tóxicos, e de conseqüências imediatas podendo levar o indivíduo à morte. Essas intoxicações são classicamente descritas nos compêndios médicos e permitem a determinação dos efeitos adversos ou das doenças relacionadas a essas substâncias (TRAPÉ, 2003).

Além do mais, seu uso inadequado, no que tange à frequência de aplicação, à falta de utilização de equipamentos de proteção e muitas vezes ao modo de uso incorreto, somados à alta toxicidade de alguns produtos e à precariedade dos mecanismos de vigilância, dentre outros, pode causar a contaminação de solos, atmosfera, águas superficiais e subterrâneas, e alimentos, apresentando, conseqüentemente efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos e intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, assim como o risco de contaminação ocupacional de trabalhadores rurais. Além dos perigos aos seres humanos, sabe-se que a introdução de agrotóxicos no ambiente pode provocar efeitos indesejáveis, como a

alteração da dinâmica bioquímica natural pela pressão de seleção exercida sobre os organismos, tendo como consequência, mudanças no funcionamento do ecossistema afetado (SPADOTTO, 2006).

O atual cenário do uso de agrotóxicos, baseado na existência de novas substâncias com menores toxicidades agudas e persistências no ambiente, leva à preocupação com os problemas crônicos que podem surgir, determinados pelo contato tanto direto como indireto com esses produtos, muitas vezes em baixas concentrações e por tempo prolongado. Deve-se considerar também o consumo de combinações de diversas substâncias ao longo da vida e suas ações sinérgicas.

O Brasil, por suas características de país com grande produção agrícola e com pequena estrutura social para controle desta situação, tem apresentado dados de contaminação da população rural e urbana por agrotóxicos, que indicam a gravidade da situação do ponto de vista da saúde pública (MOREIRA, 2002).

O risco determinado pelos agrotóxicos ou a probabilidade de um indivíduo adoecer pela ação destes produtos é dado pelas condições de exposição que a pessoa tem a eles e pela toxicidade dos produtos. Assim se há uma alta exposição, mesmo que o produto tenha baixa toxicidade, o risco é alto, como ao inverso, com baixa exposição e alta toxicidade, o risco se mantém alto. A questão da toxicidade não se resume em alta ou baixa, devendo-se considerar também os potenciais efeitos toxicológicos que diversos agrotóxicos promovem em exposições a longo prazo (TRAPÉ, 2003).

Segundo as estatísticas oficiais do Ministério da Saúde, pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), para o ano de 2007, foram registrados 9670 casos de intoxicação por agrotóxicos no país. Destes casos notificados, para os quais deve haver um imenso sub-registro, sendo que a notificação muitas vezes não é realizada ou até mesmo há dificuldades em se enquadrar o quadro clínico como uma intoxicação por tais substâncias, cerca de 35% foram decorrentes de uso doméstico, e boa parte ocorreram na zona urbana, indicando que esta problemática não se atém ao setor agropecuário, e tão pouco ao trabalhador rural isoladamente, mas configura sim uma questão de saúde pública (MS, 2007).

Vários grupos populacionais podem ter contato e exposição aos agrotóxicos e apresentar efeitos adversos à saúde como, por exemplo, trabalhadores nas indústrias, transporte e comércio de tais compostos, funcionários de empresas dedetizadoras, trabalhadores da Saúde Pública e da agropecuária, bem como a população em geral, através de acidentes, resíduos em águas e alimentos, campanhas de saúde pública para o controle de vetores de doenças infecciosas, uso domiciliar, dentre outros.

Um grupo populacional particularmente exposto aos agrotóxicos são os trabalhadores rurais. Essa exposição, dita ocupacional, ocorre pois os trabalhadores manipulam tais substâncias, havendo, freqüentemente, contato direto tanto no processo de formulação, ou seja na mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para uso, quanto no processo de aplicação propriamente dita: pulverização, auxílio na condução de mangueiras dos pulverizadores – as “puxadas”, descarte de resíduos e embalagens contaminadas, dentre outros, e na colheita, quando há nova manipulação dos produtos contaminados. A grande maioria dos casos de intoxicação por agrotóxicos são devido a esse tipo de contaminação ocupacional (MOREIRA, 2002). Fatores agravantes dessa exposição são a falta de orientação para o uso correto de tais substâncias, a ausência ou impossibilidade de uso de equipamentos de proteção individual, os baixos níveis de escolaridade dessa população, e a própria linguagem utilizada nos rótulos dos produtos, que na sua quase totalidade, apresenta-se inadequada ou demasiadamente técnica.

Oliveira-Silva, em um estudo realizado com cinco comunidades agrícolas da cidade de Magé, no Rio de Janeiro, mostrou que, devido aos baixos níveis de escolaridade da população avaliada, a leitura dos rótulos dos produtos agrotóxicos não era feita, ou quando era realizada, geralmente os textos não eram perfeitamente interpretados, tanto pelo nível de escolaridade da população quanto pelo teor técnico das informações disponibilizadas nos rótulos de tais produtos. Dessa forma, informações importantíssimas como: modo de uso, precauções, cuidados no manuseio, medidas a serem tomadas em casos de emergências e modo correto para o descarte das embalagens, permaneciam desconhecidas, o que acabava por levar aos seus usos inadequados, e conseqüentemente a intoxicações desses trabalhadores e prejuízos ao meio ambiente (OLIVEIRA-SILVA, 2001).

A população em geral pode estar exposta aos agrotóxicos através dos alimentos. Apesar de não haver, do ponto de vista de saúde pública, nenhuma situação de alarme com níveis altos de resíduos detectáveis nos produtos alimentares que compõem a mesa da população, deve-se considerar que no Brasil, os programas de monitoramento sistematizado de alimentos (por exemplo, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – e o Sistema de Informações de Resíduos de Agrotóxicos em Horticultura – SIRAH – da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP) têm detectado frequentemente a presença de agrotóxicos em alimentos, na maioria das vezes em baixas concentrações. Nesse contexto, algumas limitações devem ser consideradas e discutidas, como o fato de tais programas não contemplarem todos os alimentos da dieta e também a questão que somente as substâncias de uso permitido pelos órgãos reguladores são analisadas. Isto indica uma situação preocupante onde a população inteira poderia estar ingerindo continuamente diversas substâncias em baixos níveis (ou somadas em diversos alimentos diferentes, ou ainda combinadas) e por longo tempo, o que pode levar a efeitos de exposição crônica graves, parcialmente conhecidos (como distúrbios endócrinos, alterações reprodutivas, efeitos no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos, citotóxicos, carcinogênicos, etc), ou ainda totalmente desconhecidos.

Soma-se à problemática do consumo de agrotóxicos através dos alimentos, o consumo dessas substâncias através da água onde, em diversos estudos isolados, a água tem apresentado contaminação por uma gama diversificada de substâncias agrotóxicas que podem atingir as águas naturais devido a diversos processos que sofrem no ambiente. Muitas delas não são normalmente monitoradas pelos órgãos competentes.

Adicionalmente, estudos realizados em alguns estados do Brasil têm detectado também a presença de agrotóxicos no leite materno, assim como têm apontado a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao uso de agrotóxicos, demonstrando que os problemas de saúde decorrentes do uso desses “venenos” podem atingir diversas áreas da saúde da população (OMS, 1997).

3.1.6 Os agrotóxicos nas águas

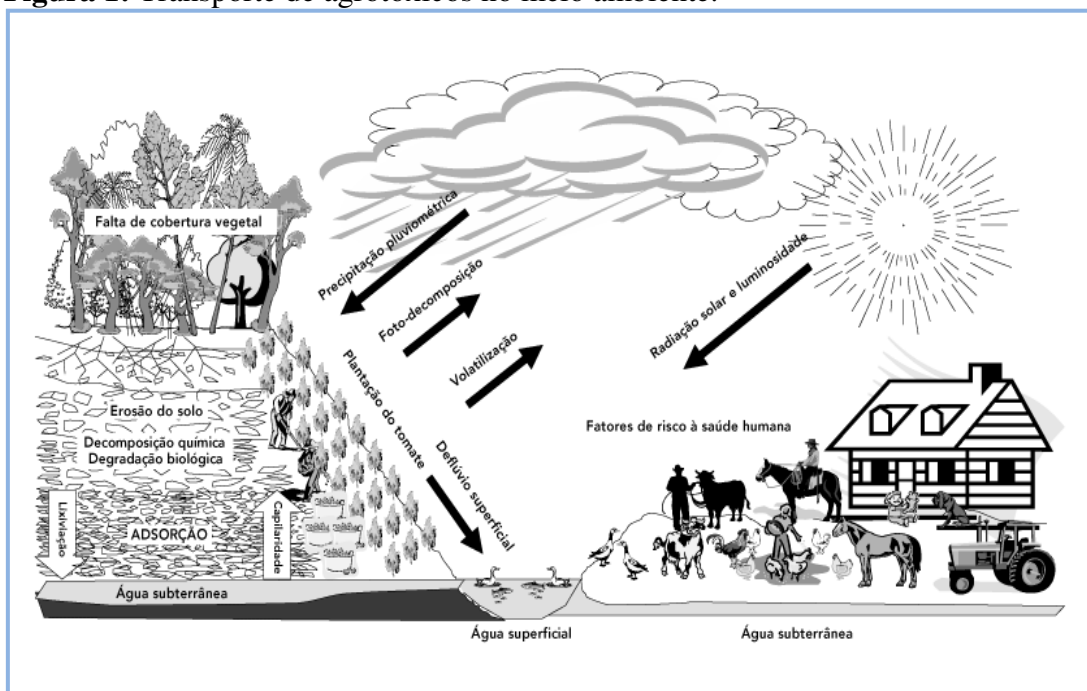
Como já foi dito anteriormente, o uso de agrotóxicos, nos dias atuais, é intenso e disseminado, e objetiva garantir uma produção agrícola farta e com o mínimo de perdas.

A aplicação dos agrotóxicos pode se dar por via sólida, líquida ou gasosa, sendo a aplicação por via líquida, predominante. Nesse processo, uma formulação concentrada é, geralmente, diluída em água, formando uma calda que, via de regra, é aplicada na forma de névoas através de pulverização. Após sua aplicação, diversos processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento no ambiente e sua distribuição pelos compartimentos ambientais, a citar: água, solo e atmosfera, podendo ocorrer sorção, absorção, degradação química e biológica, deriva, volatilização, lixiviação, carreamento superficial e interações desses processos (Figura 1). Além disso, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais afetam sua distribuição no ambiente. Por exemplo, o volume, a intensidade e a frequência das chuvas têm uma grande influência no transporte e na perda de agrotóxicos através do escoamento superficial e da percolação da água e do solo, sendo levado às partes mais baixas da topografia, podendo chegar até os rios, córregos, lagos e açudes.

As características geomorfológicas da região, quando associadas a um solo pobre e intemperizado favorecem a contaminação dos sistemas hídricos. Também, a elevação da declividade favorece o processo de deflúvio superficial, enquanto a erosão do solo e a falta de cobertura vegetal favorecem o processo de lixiviação dos agrotóxicos. Quando o terreno não conta com cobertura vegetal ou quando a plantação está nas fases iniciais de crescimento, existe uma maior probabilidade de contaminação dos sistemas hídricos subterrâneos. Por outro lado, a plantação mais desenvolvida consegue reter parte desta contaminação. Além disso, o carreamento superficial e o transporte de agrotóxicos pelo ar atmosférico também podem ser possíveis fontes de contaminação dos sistemas hídricos superficiais (VEIGA, 2006). Ao atingirem esses

sistemas, podem se somar a outros poluentes ali presentes e com eles interagirem, podendo ameaçar seriamente a vida e a saúde dos que dessas águas dependem (PAGANINI, 2007).

Figura 1: Transporte de agrotóxicos no meio ambiente.



Fonte: VEIGA, 2006.

Adicionalmente, em se tratando de pequenas propriedades rurais, é comum verificar uma proximidade inadequada das culturas agrícolas com residências, animais domésticos e reservatórios naturais de água, aumentando o risco de exposição.

Devido à intercomunicabilidade dos sistemas hídricos, qualquer contaminação em um determinado sistema hídrico pode resultar em uma contaminação distante das áreas em que foram originalmente aplicados. Por isso, a contaminação de um sistema hídrico pode representar um dano ao ecossistema local e distante, à população local que se utiliza dessa água para diversas finalidades, inclusive o consumo (VEIGA, 2006).

Diversos estudos realizados em águas superficiais têm demonstrado a sua contaminação por uma gama diversificada de substâncias agrotóxicas, que podem ter atingido as águas naturais devido aos diversos processos que sofrem no ambiente. Muitas dessas substâncias são objeto de monitoramento pelos órgãos responsáveis pelo tratamento e abastecimento público de água e pelos órgãos de vigilância ambiental, mas nem todos os agrotóxicos o são, uma vez que as legislações pertinentes a essa problemática não contemplam grande parte dos compostos utilizados na atualidade. Moreira *et al.* identificou a presença de níveis altos de agrotóxicos anticolinesterásicos em amostras de água colhidas do Rio São Lourenço, situado em uma região agrícola da cidade de Nova Friburgo, no Rio de Janeiro (MOREIRA, 2002).

A ocorrência de agrotóxicos em águas superficiais tende a ocorrer em ciclos, que podem se repetir em intervalos de dias, semanas ou meses, dependendo do tipo de corpo d'água e da substância em questão. A ocorrência de muitos agrotóxicos nesses sistemas hídricos é sazonal devido a sua característica de uso na agricultura, estando relacionada às épocas de aplicação, aos períodos de chuvas, irrigação, e ao tamanho de curso d'água. Diferentemente, a ocorrência de agrotóxicos oriunda do uso urbano não possui característica sazonal, uma vez que suas aplicações ocorrem o ano todo (USEPA, s.d.).

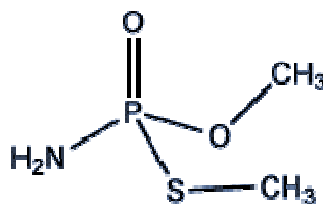
3.1.7 O metamidofós

O metamidofós (ou O,S-dimetilfosforamidotioato; $C_2H_8NO_2PS$) (Figura 2) é um praguicida organofosforado de largo espectro de ação, registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como inseticida e acaricida, e sendo classificado, por essa mesma Agência, como extremamente tóxico (classe toxicológica I).

Trata-se de um sólido cristalino incolor, de odor acre, com peso molecular de 141,12, pressão de vapor em torno de 3×10^{-4} mmHg à 30°C e ponto de fusão igual a 44,5° C.

(EXTOXNET). É estável em pH entre 3 e 8, e apresenta alta solubilidade em água, álcoois e cetonas, média solubilidade em compostos orgânicos clorados e baixa solubilidade em hexano e tolueno (WHO, 1993). A Tabela 2 apresenta um resumo das propriedades físico-químicas do metamidofós.

Figura 2: Estrutura do metamidofós



Fonte: LIMA, 2001.

Tabela 2: Resumo das propriedades físico-químicas do metamidofós.

<i>Propriedade</i>	<i>Valor</i>
Peso molecular	141,12
Pressão de vapor (mmHg – 30°C)	3×10^{-4}
Ponto de fusão (° C)	44,5
Solubilidade em água (g/L)	> 200
Log K_{ow}	- 0,8
K_{oc}	5
Constante de Henry ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$) (20°C)	$< 1,6 \times 10^{-6}$

Fontes: EXTOXNET, INGELSE, 2001.

O baixo valor de Log K_{ow} , inferior a zero, mostra uma elevada polaridade da molécula e, conseqüentemente, elevada solubilidade do metamidofós em água,

denotando extrema dificuldade de extraí-lo de matrizes aquosas. Segundo GEIB e GEBERT (2006), a eficiência da extração utilizando-se materiais derivados da sílica (extração em fase sólida) é fortemente dependente do $\log K_{ow}$, sendo que somente compostos com valores superiores a zero podem ser eficientemente extraídos. Juntamente com o K_{oc} , que mostra a relação entre concentração do ingrediente ativo aderido aos sedimentos e dissolvido na água, demonstra a tendência do metamidofós em permanecer na coluna d'água, no meio ambiente. A baixa pressão de vapor do metamidofós indica sua tendência a permanecer no meio líquido, não havendo grandes perdas por evaporação para a atmosfera.

No ambiente, o tempo de meia vida do metamidofós pode variar (EXTOXNET; HSDB): no solo, de 2 a 12 dias, dependendo do tipo e composição; na água: cerca de 309 dias em pH 5,0; cerca de 27 dias em pH 7,0 e aproximadamente 3 dias em pH 9,0. Pode ainda sofrer fotólise, o que faz com que sua meia vida, em pH 5,0, diminua para cerca de 90 dias. A volatilização, a partir da superfície da água não é esperada, bem como sua adsorção a sólidos em suspensão e sedimentos. O produto final de degradação, usualmente, é o ácido fosfórico.

Além disso, o metamidofós apresenta moderada a alta ecotoxicidade para aves (LD_{50} variando de 10 a 29,5 mg/Kg) e peixes (LD_{50} de 25 a 100 mg/L) (WHO, 1993; EXTOXNET).

Em mamíferos, estudos demonstram sua alta toxicidade aguda para exposições oral, dérmica e inalatória, sendo citados como DL_{50} , para exposição oral, em ratos, os valores: 15-30 mg/kg para machos e 16 mg/kg para fêmeas; já para exposição dérmica, os valores de DL_{50} são: 50 -110 mg/kg em machos; e nas exposições inalatórias, os estudos fornecem valores de DL_{50} de: 525 mg/m³ em uma hora de exposição e 162 mg/m³, para quatro horas, em machos (WHO, 1993). Adicionalmente, casos de envenenamento, em humanos, têm sido observados e relatados na literatura, destacando-se incidentes de envenenamento por Metamidofós em Hong Kong e na Nicarágua, além de intoxicações agudas causadas por vegetais contaminados, na China.

Outros estudos realizados em mamíferos, na sua maioria ratos, demonstram ainda alterações reprodutivas (EXTOXNET, s.d.) nos animais tratados com metamidofós, decorrentes de exposições subcrônicas e crônicas, incluindo aumento de anormalidades morfológicas em espermatozoides, diminuição de fertilidade em fêmeas, eventos adversos na proliferação de células embriônicas, aumento de embriões degenerados (BURRUEL, 2000), efeitos teratogênicos e comprometimento dos filhotes no que tange a atraso de maturação sexual, diminuição do peso, o que pode retardar o seu crescimento, e da viabilidade dos filhotes, bem como atraso no seu desenvolvimento normal (CASTRO e CHIORATO, 2007).

Adicionalmente, foram demonstrados os potenciais citotóxico, mutagênico e genotóxico do metamidofós em estudos de toxicidade subcrônica, “in vivo”, em ratos (IPCS, 2002; KARABAY e OGUZ, 2005; ERGENE, CELIK e KAYA, 2007).

Também, em ensaios de exposição crônica, foram verificadas alterações nos tecidos cardíacos de ratos através da observação de hipertrofias cardíacas, incluindo hipertrofia do coração e hipertrofia das fibras musculares individualmente, e constatação de hipertensão arterial (CALORE et al., 2007).

Foram constatadas ainda alterações no sistema nervoso central em estudos de exposição crônica, em ratos, incluindo atrofia em algumas regiões cerebrais (CALORE et al, 2006) e alterações neuropsicológicas em estudos de exposição a baixas doses por um período prolongado (mais de dez anos), sendo detectados ansiedade, distúrbios na performance visuo-motora, habilidades visuo-perceptivas e velocidade de processamento de informações (TAPIA et al, 2006). Encontrou-se também relatos de alterações na tireóide, em nível tecidual, em exposição aguda de ratos (SATAR et al, 2008).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), existem onze produtos comerciais registrados no Brasil cujo princípio ativo é o metamidofós, apresentando-se geralmente na forma de concentrados solúveis. Além disso, o metamidofós é um produto de degradação de outro agrotóxico muito utilizado, o acefato. A ANVISA

permite o uso desses produtos para aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate rasteiro (com fins industriais) e trigo.

Adicionalmente, a mesma Agência considera como valor de ingestão diária aceitável (IDA), 0,004 miligramas de metamidofós por quilograma de massa corpórea, considerando todas as possíveis fontes de exposição, e estabelece limites máximos permitidos (MRL) de tal agrotóxico nos vegetais provenientes de culturas onde o uso do metamidofós é permitido, sendo: 0,05 mg/Kg em algodão; 0,1 mg/Kg em amendoim, trigo e batata; 0,01 mg/Kg em feijão e soja e 0,5 mg/Kg em tomate (ANVISA, monografia).

Em relação à presença de metamidofós em águas superficiais no Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), do Ministério do Meio Ambiente, através da Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e os limites máximos dos contaminantes em águas dependendo do seu destino (Tabela 3) (BRASIL, 2005). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), do Estado de São Paulo, é responsável pelo acompanhamento da qualidade das águas dos rios e reservatórios do Estado, bem como por realizar ações de controle e fiscalização das fontes de poluição, impedindo o lançamento de efluentes que possam comprometer sua qualidade. Esta demanda é atendida por meio da rede básica de monitoramento e dos monitoramentos regionais, bem como pela rede automática de monitoramento, onde a caracterização da qualidade da água é realizada por meio de análises de variáveis físicas, químicas e biológicas tanto da água quanto do sedimento, contemplando substâncias previstas na norma supracitada, inclusive agrotóxicos.

Já o Ministério da Saúde, através de Portaria nº 518/2004, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, e determina seus padrões de potabilidade, considerando limites máximos para diversos agrotóxicos, porém tanto a Resolução 357/2005 quanto a Portaria 518/2004 não preveem, atualmente, o monitoramento do metamidofós (VEIGA, 2006; CONAMA, 2005). Deste modo, a presença dos agrotóxicos previstos e regulamentados em legislações é continuamente monitorada nas águas para abastecimento público, o que permite detectar e corrigir

contaminações significativas ou residuais, por tais substâncias, evitando o desenvolvimento de efeitos tóxicos agudos e crônicos decorrentes da ingestão e contato com esses produtos.

Já em outros países a situação é bem diferente. Na União Européia, foi estabelecido o valor de 0,1 µg/L como concentração máxima permitida de qualquer praguicida em águas destinadas ao consumo humano independente de sua toxicidade, e 0,5 µg/L para a somatória dessas substâncias. Nos Estados Unidos, a EPA (Environmental Protection Agency) trabalha com concentrações estimadas do praguicida metamidofós em água potável, proveniente de águas superficiais, adotando valores de 28,6 a 61,8 ppb para contaminação recente e 1,5 a 3,8 ppb para contaminação tardia. Neste mesmo país, no Estado da Flórida a concentração máxima permitida para o metamidofós, em água potável, é de 5 µg/L (5 ppb) (EEAA, s.d.). Já na Holanda, o metamidofós está na “lista-negra” de substâncias cujas emissões deveriam ser cessadas imediatamente.

Tabela 3: Principais agrotóxicos a serem monitorados em águas doces, segundo a Resolução CONAMA 357.

Parâmetros orgânicos	Águas classes I e II - valor máximo (µg/L)	Águas classe III - valor máximo (µg/L)
Alacloro	20	-
Aldrin + Dieldrin	0,005	0,03
Atrazina	2	2
Carbaril	0,02	70,0
2,4-D	4,0	30,0
Demeton	0,1	14,0
DDT + DDE	0,002	1,0
Endossulfan	0,056	0,22
Endrin	0,004	0,2
Glifosato	65	280
Heptacloro epoxido + Heptacloro	0,01	0,03
Lindano (g-HCH)	0,02	2,0
Malation	0,1	100,0
Metolacloro	10	-
Metoxicloro	0,03	20,0
Paration	0,04	35,0
Simazina	2,0	-
Trifluralina	0,2	-

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 embriofetal (ANVISA, 2009), e em janeiro de 2011 foi decidido pela mesma Agência promover a retirada completa do metamidofós do mercado brasileiro, até junho de 2012. Além disso, encontra-se em revisão a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, com o intuito de incluir diversos parâmetros no padrão de potabilidade brasileiro de água, incluindo o metamidofós, com o valor máximo permitido de 12 µg/L (MS, 2010).

Reconhecendo os efeitos negativos de uma potencial contaminação por metamidofós à saúde pública e ao meio ambiente, e considerando-se que, no Brasil, não há legislação que contemple valores aceitáveis da presença de metamidofós em sistemas hídricos, a despeito do seu largo e crescente uso na agricultura, este trabalho estudou o rio Sorocaba na região do Alto Sorocaba, e seus principais formadores: o rio Sorocamirim, o rio Sorocabuçu e o rio Una, no que se refere à presença de metamidofós em suas águas, já que a atividade agrícola nos seus arredores é intensa, com o uso de agrotóxicos, dentre eles o metamidofós, e a utilização de tal substância a montante dos pontos analisados afetará a qualidade da água subsequente.

3.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS

3.2.1 Preparo de amostras

A maioria das análises que envolvem amostras “reais”, e não apenas padrões analíticos, requer uma ou mais etapas de preparação antes da identificação e medida

da concentração da substância de interesse por um instrumento analítico. Das etapas que podem estar envolvidas nessa preparação, destacam-se: filtração, extração, eliminação de impurezas (clean-up), concentração e ajuste de pH (LANÇAS, 2004).

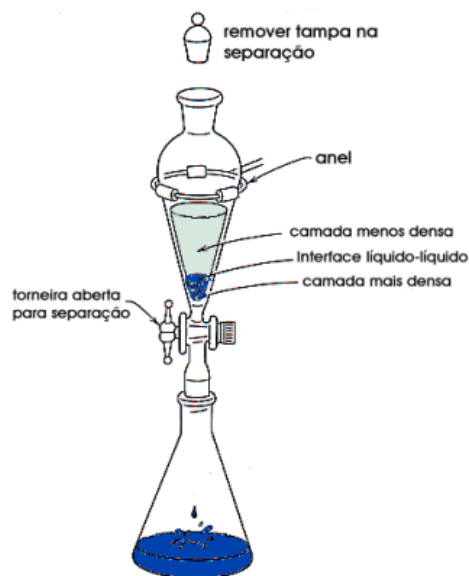
Nas análises ambientais, principalmente em determinações de micropoluentes orgânicos em águas, como por exemplo praguicidas, a baixa quantidade dessas substâncias torna difícil sua determinação direta, pela maioria dos métodos analíticos disponíveis na atualidade. Assim, a concentração do analito de interesse em um volume menor de solvente facilita sua determinação analítica.

3.2.1.1 Extração líquido-líquido

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

Em geral, a substância de interesse e os interferentes se encontram em uma amostra líquida, geralmente água, que é colocada em um funil de separação ao qual se adiciona um solvente orgânico imiscível (Figura 3).

Figura 3: Extração líquido-líquido.



Fonte: UFSC, s.d.

O sistema é agitado vigorosamente e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto, idealmente, os interferentes permanecem na água. Posteriormente, o solvente orgânico é recolhido em recipiente separado, e evaporado à secura (ou quase), e o resíduo contendo a substância a ser analisada é ressuspensionado em uma pequena quantidade de solvente, a fim de ser analisado.

A eficiência desse processo depende da solubilidade do composto de interesse na água e no solvente orgânico escolhido, bem como dos interferentes. Compostos muito polares e, portanto, com alta solubilidade em água são difíceis de serem extraídos por essa técnica. Alguns artifícios podem ser utilizados para melhorar a extração desses compostos, como por exemplo, a adição de sal até a saturação da fase aquosa, em um processo, denominado efeito 'salting out'. Classicamente, este efeito promove a separação, em duas fases, entre a porção aquosa e um solvente orgânico miscível em água. Porém, um segundo uso muito difundido deste efeito é promover um aumento na eficiência da extração líquido-líquido de compostos muito polares (MAJORS, 2009).

Por outro lado, a extração líquido-líquido apresenta algumas desvantagens significativas. Por exemplo, é um processo tedioso, que requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo moderado a alto, é de difícil automação e geralmente apresenta pequena repetibilidade/reprodutibilidade em decorrência das várias etapas inerentes ao processo (LANÇAS, 2004).

3.2.1.2 Extração em fase sólida

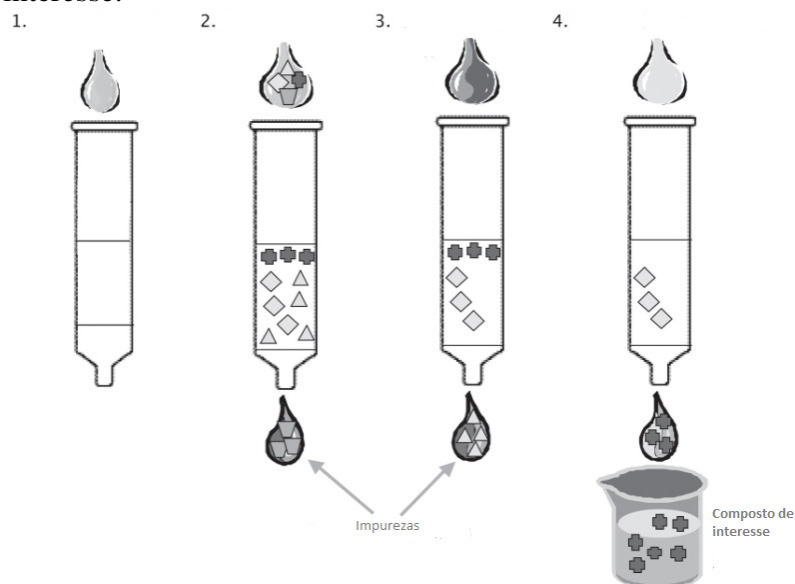
A extração em fase sólida, do inglês “Solid Phase Extraction” (SPE) foi introduzida no meio analítico em meados da década de 1970, e é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica (LANÇAS, 2004).

Ela se comporta como uma cromatografia líquida onde é empregada uma coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém a fase sólida, correspondente à fase estacionária da cromatografia.

A amostra, contendo a substância de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo, de modo a penetrar através da fase sólida. Nesse processo, o analito deve ficar retido no cartucho, devido às interações de diversos tipos: adsorção, partição, troca iônica, exclusão por tamanho, dentre outras. Após a percolação de toda a amostra, a substância de interesse, retida no cartucho, é eluída com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito, normalmente, em concentração já apropriada para análise (Figura 4).

Em análises de amostras de interesse ambiental, nas quais usualmente o analito se encontra extremamente diluído, o objetivo principal deste procedimento é promover a sua concentração, deixando passar um grande volume de amostra a fim de aprisionar o analito e elui-lo com pequena quantidade de um solvente adequado, que seguirá diretamente para análise (LANÇAS, 2004).

Figura 4: Etapas do processo de extração em fase sólida: (1) Condicionamento do cartucho; (2) percolação da amostra; (3) eliminação de impurezas; (4) eluição do composto de interesse.



Fonte: Biotage, s.d.

3.2.1.3 Aplicações das técnicas de extração na análise de agrotóxicos

Como já foi dito anteriormente, as análises de resíduos de agrotóxicos, em geral, necessitam de uma ou mais etapas de preparação das amostras antes da identificação e da medida da concentração da substância de interesse por um instrumento analítico, e na grande maioria das vezes estas etapas envolvem os processos de extração mencionados anteriormente.

A identificação dos praguicidas em matrizes variadas é muito presente nas pesquisas. GONÇALVES, em 2007, realizou a pesquisa de herbicidas em água e solo de cultivo de arroz, com o uso da extração em fase sólida no pré-tratamento das amostras. PIHLSTROM et al, em 2007, relatou o uso de acetato de etila na extração de mais de trezentos praguicidas diferentes de amostras de frutas e vegetais. PAGLIUCA et al, em 2006, procedeu à análise de agrotóxicos organofosforados em leite, através do

uso de extração líquido-líquido e em fase sólida. WANG, em 2006, realizou um estudo para a determinação de diversas classes de agrotóxicos em suco de maçã e para isso utilizou extração com solvente e clean up com a técnica de extração em fase sólida (SPE). YEOH et al, em 2006, estabeleceu um método para determinar acefato, metamidofós e monocrotofos em óleo de frutos de palmeiras utilizando também extração com solvente e clean up por SPE, e LIMA e colaboradores, 2003, desenvolveu um método para extração e análise de metamidofós provenientes de amostras de soja, propondo a confecção das colunas utilizadas na SPE.

Especificamente para análise de agrotóxicos em água, outros tantos estudos podem ser citados. Na Itália, em 2007, PASTI usou extração em fase sólida como preparo de amostras de água superficiais, a fim de determinar praguicidas. BROWN et al, 1999, mostrou a análise de diversos agrotóxicos em águas residuárias utilizando-se a técnica de extração líquido-líquido contínua no tratamento prévio das amostras. FARIA, em 2004, avaliou a eficiência de diferentes sorventes na extração em fase sólida de vários praguicidas em água.

Quando a questão é a extração e análise de metamidofós (e também alguns outros praguicidas de alta polaridade) em água, os métodos e suas eficiências são diversificados e muitas vezes controversos.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) dá as diretrizes para a extração de metamidofós de águas residuárias municipais e industriais em seu método 1657. Nele, é usada a extração líquido-líquido contínua, sob aquecimento, porém é realizada uma saturação das amostras aquosas com cloreto de sódio antes do início da extração, e o solvente utilizado é diferente do usual para os outros compostos. Tal método foi desenvolvido para amostras que continham no mínimo 10 µg/L do metamidofós (USEPA, s.d.).

Já o Manual Alemão de Análise de Resíduos de Praguicidas propõe que amostras de 50 mL de água, contaminadas com metamidofós, sejam extraídas, após a adição de cloreto de sódio, através de extração líquido-líquido, com três porções de 150 mL de diclorometano, durante dois minutos. Os níveis de fortificação descritos variaram de

5 a 1000 $\mu\text{g/L}$, e as recuperações foram em média de 80% (THIER e KIRCHHOFF, 1989).

Em 2003, ASI, em sua tese de doutorado, estudou a extração em fase sólida, e determinação cromatográfica de diversos praguicidas em alimentos e em água. Dentre os praguicidas estudados, estava o metamidofós. Foram utilizados quatro diferentes sorventes (SEO-PAK C-18, LiChrolut C-18, ENVI-Chrom P e ENVI-Carb C-18), e a fortificação das amostras de água foi feita com 1 μg de cada substância. As recuperações obtidas foram superiores a 95%.

GIRARD, 2004, estudou a extração em fase sólida do metamidofós e do acefato, no cartucho Oasis HLB da marca Waters. Para o metamidofós, foram obtidas recuperações de 50 a 60%, respectivamente para concentrações de fortificações crescentes de 50 a 800 ng/L , porém, para as concentrações menores, o coeficiente de variação foi demasiadamente alto.

Outros autores, porém, relatam dificuldades em extrair o metamidofós da água, principalmente em concentrações extremamente baixas, atribuindo esta dificuldade à alta polaridade do metamidofós, e portanto sua grande solubilidade nesse solvente.

Em 2001, INGELSE ilustrou as limitações da SPE para extração do metamidofós em níveis de traços. Ao testar cinco diferentes sorventes e utilizar amostras de 100 mL de água, a uma concentração de 50 $\mu\text{g/L}$, as recuperações obtidas para tal praguicida foram insatisfatórias, variando de 0% à, no máximo, 2%. Isso prejudica demasiadamente a análise, uma vez que os baixos limites de detecção e quantificação não podem ser atingidos. No mesmo artigo, é proposto um método através de LC-MS/MS, com injeção direta de grande volume de amostra aquosa (1 mL). Os resultados obtidos foram excelentes, atingindo baixíssimos limites de detecção (0,01 $\mu\text{g/L}$), sem ocorrer o alargamento do pico.

Adicionalmente, LIU, em 2006, realizou um estudo com determinados praguicidas polares, incluindo o metamidofós, a fim de determinar e comparar a eficiência da extração líquido-líquido e da extração em fase sólida (cartuchos OASIS HLB da Waters e Chromabond HR-P) para tais substâncias. Ao se utilizar 500 mL de amostra, a recuperação do metamidofós, com concentração de fortificação de 0,5

$\mu\text{g/L}$, foi extremamente baixa tanto para a extração líquido-líquido (4,6%) quanto para a SPE (5,2%). Nos testes com menor quantidade de amostra e simultaneamente com maior concentração de fortificação, a recuperação na SPE foi crescente, chegando à recuperação de 93,6% com volume de 5 mL e concentração de fortificação de 5 $\mu\text{g/L}$.

Na mesma linha, GEIB e GEBERT, em 2006, avaliou vinte e um diferentes sorventes de extração em fase sólida para a extração de substâncias altamente polares, incluído o metamidofós. A concentração de fortificação foi de 10 $\mu\text{g/L}$ e o volume de amostra foi 100 mL. Os sorventes de octadecilsilano (C-18) não se mostraram adequados para extrair o metamidofós, atingindo-se recuperação máxima de 18%. Os sorventes poliméricos apresentaram recuperações bastante variadas, indo de praticamente 0% até 60% de recuperações.

3.2.2 Métodos cromatográficos de análise

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define a cromatografia como sendo um método físico de separação no qual os componentes são separados e distribuídos entre duas fases, uma delas fixa (a fase estacionária) e a outra dotada de movimento em determinada direção (a fase móvel) (ANDREY, 2003).

A cromatografia possui aplicação em todas as áreas de ciência. Atualmente, a conformação em coluna é a mais difundida. Ela foi inventada e assim denominada no início do século XX pelo botânico russo Mikhail Tswett, que empregou a técnica para separar vários pigmentos vegetais, tais como clorofilas e xantofilas, fazendo-se passar dissoluções destes compostos através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que deu origem ao nome cromatografia (do grego *chroma* que significa cor, e *graphein* que significa escrita) (SKOOG et al, 2001).

Ela agrupa um conjunto importante e diverso de métodos de separação, sendo que em todos eles, a amostra se desloca juntamente com uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel passa através de uma fase estacionária imiscível e fixa a uma coluna ou a uma superfície sólida. Existem diversos tipos de fases estacionárias e fases móveis, sendo escolhidas de tal forma que os componentes da amostra se distribuam de modo distinto entre elas. Assim, aqueles componentes que são fortemente retidos pela fase estacionária se movem lentamente com o fluxo de fase móvel; e ao contrário, os componentes que são pouco retidos pela fase estacionária, se movimentam com rapidez junto com a fase móvel. Como consequência, os componentes da amostra se separam em bandas que podem ser analisadas qualitativa ou quantitativamente. Ao final da coluna, há um detector que registra o sinal em função do tempo, sendo obtido, desse modo, um gráfico denominado cromatograma, o qual fornece informação a respeito da identificação do componente através da posição do pico ao longo do tempo, ou seja, do tempo de retenção do composto, e também da sua quantidade, através da intensidade da resposta de um analito (altura ou área do pico) na amostra investigada e sua comparação com a intensidade de resposta de quantidades conhecidas do padrão analítico da mesma substância, medida sob as mesmas condições (SKOOG et al, 2001; ANDREY, 2003).

3.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência*

A cromatografia líquida é caracterizada pelo uso de uma fase móvel líquida.

Em uma primeira etapa de seu desenvolvimento, em meados do Século XX, a cromatografia líquida utilizava colunas de vidro com diâmetros de 1 a 5 centímetros, e comprimentos de 50 a 500 centímetros. Essas colunas eram preenchidas com partículas de fase sólida grandes, em geral de 150 a 200 micrômetros de diâmetro.

* CLAE; em Inglês: High Performance Liquid Chromathography, HPLC.

Desse modo, os fluxos de solventes (fases móveis) eram baixos e conseqüentemente os tempos de separação e análise eram altos, podendo levar várias horas. Com a necessidade de acelerar as análises, os cientistas perceberam que poderiam diminuir os tamanhos das colunas (diâmetro e comprimento) e os tamanhos das suas partículas de preenchimento, obtendo-se com isso resultados melhores e em menor tempo. Porém, somente em finais de 1960 é que a tecnologia adequada para produzir partículas de preenchimento bem pequenas (da ordem de 3 a 10 micrometros) tornou-se disponível. Essas novas colunas requereram o desenvolvimento de uma instrumentação sofisticada, capaz de trabalhar a altas pressões, e a todo esse novo aparato deu-se o nome de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, sigla oriunda do termo em inglês) (SKOOG et al, 2001).

Atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica de separação mais utilizada, com vendas anuais de equipamentos e acessórios que se aproximam a um bilhão de dólares. Isso se deve à sua boa sensibilidade, fácil adaptação às determinações quantitativas exatas e, sobretudo a sua grande aplicabilidade a compostos de interesse para a ciência, indústria e sociedade em geral. Alguns exemplos desses materiais são: praguicidas, drogas, antibióticos, esteróides, hidrocarbonetos, carboidratos, aminoácidos, proteínas e até mesmo uma variedade de espécies inorgânicas (SKOOG et al, 2001).

Um cromatógrafo líquido típico é composto pelos seguintes módulos: reservatório de fase móvel, bomba, injetor, coluna e detector (Figura 5).

Figura 5: Diagrama em blocos de um sistema HPLC típico.



Esse sistema funciona através do bombeamento contínuo de solventes (fase móvel) ao longo dos módulos representados acima. Em determinado momento, uma única alíquota de amostra é introduzida na parte inicial da coluna. Seus componentes se

distribuem então, em diferentes extensões, entre as duas fases. O fluxo contínuo do solvente faz com que a amostra avance pela coluna, ao mesmo tempo em que ocorre uma série de transferências contínuas do soluto entre a fase móvel e a estacionária. Se o analito tiver maior afinidade pela fase móvel, ele se moverá com maior velocidade através da coluna, porém se ele tiver maior afinidade pela fase estacionária, ficará mais tempo retido por ela e se moverá mais lentamente, até que o detector seja atingido.

As colunas são tubos de aço inoxidável com diâmetro interno uniforme, preenchidas por partículas porosas com diâmetros constantes e pequenos, da ordem de poucos micrômetros. Normalmente as partículas são de sílica, alumina ou poliestireno-divinilbenzeno e podem ser recobertas com películas orgânicas que se unem química ou fisicamente a elas, determinando a polaridade da coluna (SKOOG et al, 2001).

Os detectores utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência devem apresentar adequada sensibilidade, boa estabilidade e reprodutibilidade, resposta semelhante e linear para os analitos, estendendo a várias ordens de magnitude, tempo de resposta curto e independente do fluxo, dentre outras (SKOOG et al, 2001).

Um grande número de tipos de detectores são usados rotineiramente, incluindo-se detectores por radiação ultravioleta, fluorescência, eletroquímicos, de condutividade, índices de refração e espectrometria de massas.

3.2.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi desenvolvida em meados do ano 1907, por J. J. Thomson, porém, somente em meados da década de 1940 ela começou a ser aplicada em análises químicas de rotina pela indústria do petróleo, para a quantificação de misturas de hidrocarbonetos produzidos no fracionamento catalítico. Anteriormente, análises de amostras desse tipo, que com frequência possuíam até nove hidrocarbonetos diferentes em sua composição, eram realizadas através de destilação

fracionada e posteriores medidas dos índices de refração dos componentes separados. Para tal, era requerido um tempo de operação de cerca de 200 horas ou mais (SKOOG et al, 2001).

No início da década de 1950 ocorreu um rápido aperfeiçoamento dos espectrômetros de massas comerciais, e eles começaram a ser utilizados na área química para a identificação e a elucidação estrutural de uma ampla variedade de compostos orgânicos. E, a partir da década de 1980, outros avanços na tecnologia dos equipamentos usados na espectrometria de massas permitiram difundir seu uso para outras áreas da ciência como a biologia e a bioquímica (SKOOG et al, 2001).

Atualmente, esta técnica está sendo amplamente difundida devido à sua versatilidade nas aplicações, confiabilidade dos resultados obtidos e alta sensibilidade, porém apresenta elevados custos de aquisição, manutenção e operação.

A grande quantidade de substâncias químicas orgânicas existentes e utilizadas nos dias atuais, muitas delas com características semelhantes, torna difícil a tarefa de identificá-las inequivocamente em uma amostra, somente com o uso da cromatografia como ferramenta, uma vez que os resultados de tempo de retenção obtidos não são específicos para cada composto. Desse modo, informações complementares são necessárias e, normalmente, são provenientes de uma técnica auxiliar, freqüentemente alguma forma de espectrometria.

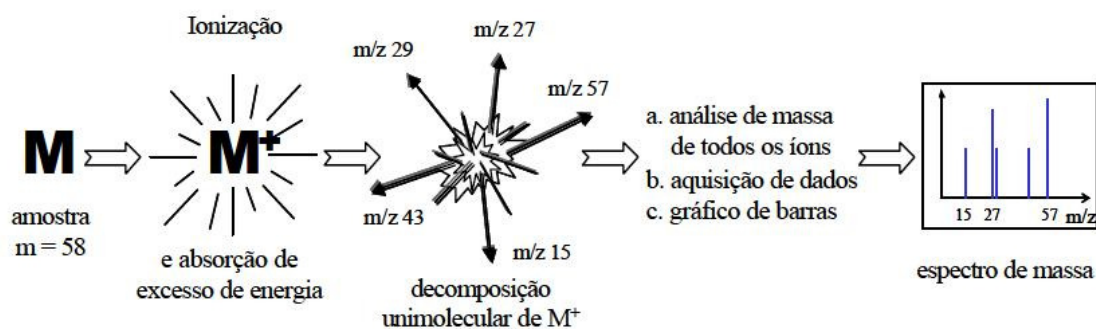
A espectrometria de massas pode fornecer, em muitos casos, a identificação absoluta da molécula questionada. Isso ocorre pois ela fornece não somente informações estruturais do composto, como por exemplo, principais grupos funcionais presentes, mas também a massa molecular do analito. Esta última é, muitas vezes, uma informação valiosíssima, que reduz dramaticamente o número de possíveis estruturas para o composto analisado (ANDREY, 2003).

Uma outra grande vantagem da espectrometria de massas é a sua alta sensibilidade, onde a identificação inequívoca do composto e sua quantificação podem ser obtidas mesmo com quantidades muito baixas do analito (da ordem de picogramas), com altas exatidão e precisão (ANDREY, 2003).

Um resumo do processo integral de análise pela espectrometria de massa clássica, culminando num espectro de massa típico frequentemente encontrado na literatura é mostrado na Figura 6, onde M representa as moléculas de um composto puro. Após um processo de ionização, M^+ se decompõe, criando íons de massas menores que, detectados, geram o espectro de massa.

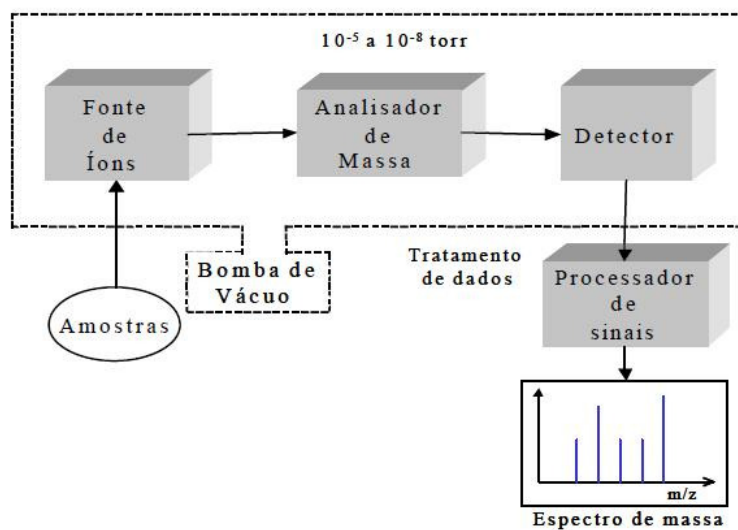
Para que o processo possa acontecer, é preciso que o instrumento possua os componentes adequados. A Figura 7 mostra um diagrama de blocos dos componentes principais de um espectrômetro de massa. Como é possível ver na figura, são três os componentes principais: uma fonte de íons, o analisador de massas e o detector. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons, pela ação de um agente ionizante, e os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas. A função do analisador de massas é separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga (m/z). Os espectrômetros de massa podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massas. Finalmente um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados na memória de um computador e mostrados em uma tela (RODRIGUEZ, 2003).

Figura 6: Análise por espectrometria de massas.



Fonte: RODRIGUEZ, 2003.

Figura 7: Componentes básicos de um espectrômetro de massas.



Fonte: RODRIGUEZ, 2003

É essencial para o funcionamento desses equipamentos, a manutenção de um alto vácuo (10^{-8} a 10^{-4} torr) em todos os componentes do instrumento, com exceção do processador de sinais. Isso se deve ao fato de os componentes da atmosfera interagirem com as partículas carregadas geradas pelo sistema, destruindo-as.

3.2.3.1 Espectrometria de massas em sequência

A espectrometria de massas em sequência, normalmente abreviada como MS/MS, consiste no acoplamento de um espectrômetro de massas a outro, geralmente do tipo quadrupolar. Este consiste em quatro varetas cilíndricas precisamente alinhadas paralelamente, entre as quais são aplicadas radio frequências e voltagens variáveis, de modo que somente uma unidade de massa (ou algumas unidades, pré-selecionadas) pode atravessar os quadrupolos e atingir o detector (SMITH, 2005).

O primeiro espectrômetro serve para isolar um ou mais íons moleculares presentes em uma mistura, ou seja, passarão através dele moléculas inteiras, previamente ionizadas por uma fonte de ionização branda, normalmente o electrospray. É possível pré-estabelecer quais íons moleculares serão selecionados nesse primeiro espectrômetro, isto é, somente os compostos de interesse. Eles atingirão então um segundo quadrupolo que atua como uma câmara de colisão, livre de campos elétricos e magnéticos, na qual se bombeia um gás inerte, normalmente nitrogênio ou hélio. As colisões entre os íons moleculares de interesse, selecionados no primeiro quadrupolo, e o gás produzem fragmentações dos primeiros, dando numerosos íons filhos. Estes atingirão um terceiro quadrupolo que fará uma varredura das massas dos íons filhos, sendo posteriormente detectados e registrados. É possível também, nesse último quadrupolo, pré-estabelecer quais íons filhos atingirão o detector, normalmente dois ou três fragmentos mais abundantes e característicos da fragmentação do composto de interesse. Desse modo, somente atingirão o detector fragmentos iônicos previamente determinados e oriundos da fragmentação da substância que se quer analisar, método esse denominado MRM (multiple reaction monitoring).

A ionização por electrospray, citada anteriormente, ocorre em condições atmosféricas de temperatura e pressão, e resumidamente consiste no bombeamento da amostra através de um capilar de aço inoxidável sobre o qual é aplicado um potencial elétrico. A amostra é então nebulizada e dessolvatada, havendo subsequente aumento na sua densidade de carga e a formação dos íons, já em fase gasosa (SKOOG et al, 2001).

Todo esse processo faz com que a técnica de espectrometria de massas, particularmente MS/MS, forneça uma identificação inequívoca do composto.

Alguns autores descrevem ainda, como uma outra vantagem da espectrometria de massas em sequência, a não obrigatoriedade de haver um cromatógrafo antes do espectrômetro, uma vez que este último, por si só, já é capaz de separar o composto de interesse das outras substâncias presentes na amostra (SKOOG et al, 2001; SMITH, 2005). Porém, a visualização dos resultados é facilitada com o uso do

cromatógrafo acoplado, uma vez que são obtidos cromatogramas, de interpretação mais rápida e simples que espectros de massa.

3.2.4 Aplicação do LC-MS/MS nas análises de agrotóxicos

Atualmente, a espectrometria de massas em sequência tem sido aplicada à determinação qualitativa e quantitativa dos componentes de uma ampla variedade de materiais complexos encontrados na natureza e na indústria. Alguns exemplos incluem a determinação de metabólitos de drogas, feromônios de insetos, alcalóides em plantas, traços de contaminantes ambientais, polímeros, compostos petroquímicos, bifenilas policloradas, prostaglandinas, praguicidas, etc., sendo uma técnica de crescente aplicação (SKOOG et al, 2001).

3.2.5 Validação de métodos analíticos

Segundo LANÇAS, 2004, validação é “o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado”.

No caso de um sistema de análise de substâncias químicas, a validação permite assegurar que o sistema esteja funcionando adequadamente dentro das condições para as quais foi validado, e principalmente, permite conhecer as limitações do processo e assegurar que o desempenho esperado seja atingido, dentro dos limites pré-determinados durante a validação.

O processo de validação em laboratórios de análises químicas passou a ter importância na década de 1970, a partir da constatação de enormes variabilidades entre os resultados obtidos em análises toxicológicas de amostras submetidas a

estudos interlaboratoriais, por órgãos do governo dos Estados Unidos da América. Posteriormente, instituições governamentais americanas, como o Food and Drug Administration (FDA) e a Environmental Protection Agency (EPA) iniciaram esforços para a criação do sistema denominado ISO/IEC-25, do inglês International Standardization Organization / International Electrotechnical Commission, cujo objetivo principal é criar normas que promovam a padronização das exigências a serem seguidas pelos laboratórios para que eles demonstrem competência na realização dos serviços e para que os resultados obtidos se tornem internacionalmente aceitos e passíveis de reprodução em outros laboratórios (LANÇAS, 2004).

A partir disso, cada país passou a estabelecer seus próprios programas para assegurar a qualidade dos serviços laboratoriais prestados e dos dados gerados.

A importância fundamental da validação de uma metodologia analítica reside no fato de que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis.

Existem vários procedimentos distintos para a validação, dependendo da finalidade da análise, havendo freqüentemente discrepâncias entre os diferentes sistemas de validação. Ou seja, não há um sistema único de validação que atenda às exigências dos diferentes órgãos nacionais e internacionais de avaliação da qualidade dos laboratórios de análise. Apesar dessa discrepância, a maioria das instituições responsáveis pela qualidade dos dados gerados concorda com a necessidade de adoção de alguns critérios fundamentais para a validação de metodologias analíticas (LANÇAS, 2004).

Atualmente, no Brasil, para demonstrar sua competência técnica, os laboratórios devem se submeter a um credenciamento pelos órgãos responsáveis: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e/ou o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO). Eles disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente a Resolução ANVISA RE nº 899/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 / 2003 (RIBANI, 2004).

Desse modo, como não há consenso sobre os procedimentos de validação e os parâmetros a serem determinados, alguns autores sugerem critérios mínimos que devem ser atendidos no processo. Segundo RIBANI e colaboradores, 2004, os parâmetros mínimos a serem determinados na validação de uma metodologia analítica são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A ANVISA considera esses mesmos parâmetros, já o INMETRO inclui alguns outros, como a especificidade e a sensibilidade.

3.2.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método determinar o composto de interesse de maneira inequívoca, na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004).

Assim, a seletividade avalia o grau de interferência de outras espécies, além da substância de interesse, que possam estar presentes, e deve garantir que o pico de resposta seja exclusivamente do composto desejado (RIBANI, 2004).

Alguma confusão é freqüentemente criada entre os termos seletividade e especificidade. Este último é atribuído, por alguns autores, a um método experimental que produza resposta somente para uma única substância de interesse. Já um método que produza respostas para um conjunto de substâncias com características em comum pode ser chamado de seletivo. Atualmente, diversos órgãos internacionais, por exemplo a International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC, têm sugerido apenas o uso do termo seletividade (RIBANI, 2004).

A seletividade de um método cromatográfico pode ser verificada através da injeção, no cromatógrafo, de um branco confeccionado com a mesma matriz da amostra a ser analisada. Nesse processo, não devem ser observados picos na região do tempo de retenção do composto de interesse.

3.2.5.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico para produzir resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse nas amostras, dentro de uma faixa de concentração (INMETRO, 2007).

Na prática, a linearidade pode ser obtida através de padronização externa, onde são preparadas diversas soluções, de concentrações conhecidas, a partir de um padrão certificado da substância de interesse. Essas soluções de padrões são analisadas pelo método proposto e os sinais obtidos (área ou altura dos picos) são relacionados com as concentrações em um gráfico onde as concentrações são plotadas no eixo x e as áreas, no eixo y . A curva obtida é denominada curva de calibração ou curva analítica e deve ser uma reta, para que o método seja considerado linear. Tais curvas necessitam também de um tratamento estatístico adequado usando-se o método matemático conhecido como regressão linear, o qual permite obter a equação da reta ($y = ax + b$), os coeficientes de regressão a e b e o coeficiente de correlação r .

O coeficiente de correlação r fornece uma estimativa da qualidade da curva obtida, onde valores mais próximos de 1,0 indicam uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Alguns autores consideram valores de r superiores à 0,999 como sendo evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA aceita valores de r de no mínimo 0,99 e o INMETRO, 0,90 (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

É importante ressaltar que, para a construção das curvas analíticas, devem ser preparados e analisados no mínimo seis níveis de concentração, distribuídos uniformemente sobre a faixa de concentração de interesse (ANVISA, 2003).

3.2.5.3 Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra, ou seja, é o termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI, 2004; LANÇAS, 2004; INMETRO, 2007)

O modo mais simples e difundido de se expressar e avaliar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), onde:

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{S}{\text{média}} \times 100$$

Normalmente, métodos de quantificação de substâncias em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Em métodos de análises de resíduos ou traços, são aceitos CV de 15% a 20% (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003).

A precisão é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade, ou repetitividade, termos considerados sinônimos por diversos autores, representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, por um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição descritas abaixo (RIBANI, 2004; INMETRO, 2007):

- Mesmo procedimento;
- Mesmo analista;
- Mesmo instrumento usado sob as mesmas condições;
- Mesmo local;
- Repetições em um curto intervalo de tempo.

A literatura consultada sugere que sejam realizadas análises de padrões da substância de interesse em no mínimo três níveis de concentração diferentes (baixa, média e alta), com o número de replicatas, para cada nível, variando de 3 a 7, a fim de ser calculado o CV (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro de um mesmo laboratório, devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. O procedimento para sua determinação segue os mesmos preceitos da determinação da repetibilidade, supra descrita e também é expressa em termos de RSD ou CV (RIBANI, 2004).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra usando-se (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004):

- Mesmo método;
- Diferentes laboratórios;
- Diferentes operadores;
- Diferentes equipamentos.

Ela se refere aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e não é imprescindível na validação de um método que será executado por um único laboratório (INMETRO, 2007).

3.2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos em um ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2007; RIBANI, 2004).

Na prática a exatidão é determinada através da adição de quantidades conhecidas de um padrão certificado da substância de interesse à matriz e comparando-se os valores medidos com os valores reais, obtidos através do certificado de análise do padrão utilizado.

De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, a exatidão deve ser determinada utilizando-se no mínimo três concentrações (baixa, média e alta) contemplando a faixa de aplicação do procedimento, realizando-se no mínimo cinco determinações por concentração. O desvio não deve exceder 20%, quando se tratarem de análises de resíduos. Ela é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, através da expressão:

$$\text{Exatidão} = [\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}] \times 100$$

3.2.5.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de uma substância que pode ser detectada pelo método em questão, porém sem ser necessariamente quantificada (LANÇAS, 2004).

Na prática, ele é corresponde à menor concentração do analito capaz de produzir um sinal diferente do ruído, indicando com segurança a presença da substância. O modo mais simples e difundido de se determinar o LOD é através da comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas da substância de interesse e um branco (matriz isenta do composto). A concentração do analito capaz de fornecer um sinal três vezes maior que o ruído obtido com os brancos é considerada o limite de detecção do método.

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004).

Os mesmos critérios de obtenção do LOD podem ser adotados para o LOQ, porém utilizando-se a relação sinal-ruído 10:1 (RIBANI, 2004). Segundo a ANVISA, é aceitável a relação 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base, ou seja, o limite de quantificação deve ser uma concentração que produza um sinal no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência do branco no tempo de retenção do analito. Além disso, seu pico deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80% a 120%, através da análise de cinco amostras de padrões (ANVISA, 2003).

3.2.5.6 Robustez

A robustez de um método é uma medida da sua capacidade de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004).

Em análises por cromatografia líquida de alta eficiência, a robustez pode ser avaliada através da variação de diversos parâmetros como a composição (cerca de $\pm 2\%$), o pH e o fluxo da fase móvel, temperatura da coluna ($\pm 5^\circ\text{C}$), dentre outras. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método é dito robusto a tais variações são aceitas no procedimento (RIBANI, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO ESTUDO: A REGIÃO DE SOROCABA

A região de Sorocaba está situada na porção sudeste do Estado de São Paulo, e abriga a Bacia do rio Sorocaba, que apresenta uma área de drenagem de 5.269 km², abrangendo 18 municípios e totalizando uma população de pouco menos de 1 milhão de habitantes, devendo atingir 2.472.216 até o ano de 2020. Cerca de 25% da bacia do Sorocaba ainda possui cobertura de mata natural, 4,5% com cerrados e cerradões, 7,5% de área de reflorestamento, 32,5% de área de pastagem (mais da metade cultivada) e uma policultura variada, com destaque para o milho e cana de açúcar, e outros usos múltiplos, como o uso urbano e industrial (SMITH, 2005).

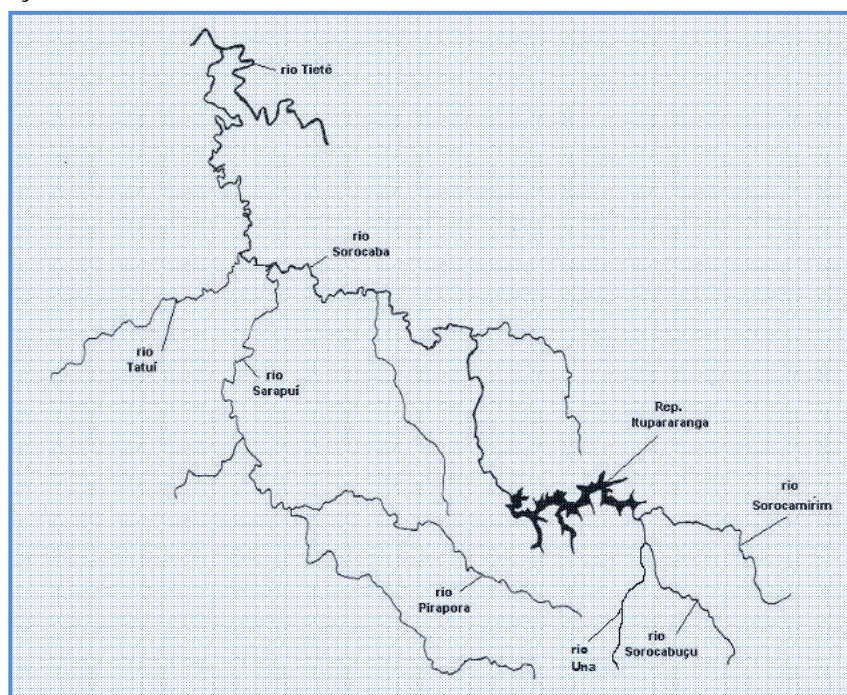
Figura 8: Localização da Bacia do rio Sorocaba.



Fonte: SALLES, 2008

O principal rio da Bacia é o rio Sorocaba, sendo seus formadores os rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, e tendo os rios Tatuí, Sarapuí, Pirajibu e Ipanema como outros afluentes (SMITH, 2005).

Figura 9: Bacia Sorocaba – Médio Tietê, com destaque para os rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una.



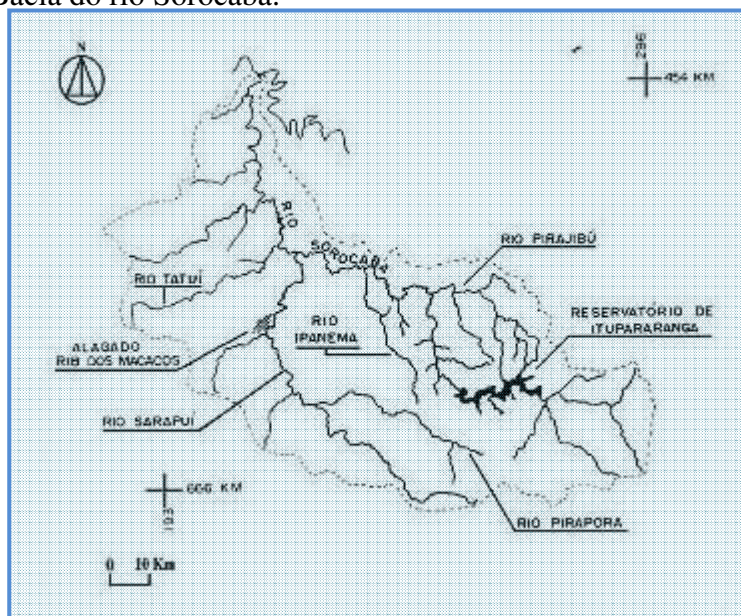
Fonte: VILLARES, GOMIERO, GOITEIN, 2007.

Verifica-se que os municípios pertencentes a essa região apresentam elevado índice de abastecimento de água (aproximadamente 100%), mas, em relação ao esgotamento sanitário, a situação mostra-se precária, já que diversos corpos d'água recebem esgoto *in natura* devido a não existência de sistemas efetivos de tratamento de esgotos. A área urbana de Ibiúna possui carga potencial de esgoto sanitário com 1.065 Kg DBO_{5,20}/dia, sendo 48% tratado. Já Vargem Grande Paulista possui carga potencial com 1.134 Kg DBO_{5,20}/dia, lançados diretamente (*in natura*) em um afluente do rio Sorocamirim (SALLES, 2008).

A Bacia do rio Sorocaba está dividida em seis sub-bacias, dentre as quais se insere a bacia do Alto Sorocaba com área de 929 km², correspondendo a 7,7% da área total. Alumínio, Cotia, Ibiúna, Mairinque, Piedade, São Roque, Vargem Grande Paulista e Votorantim são os municípios que compõem a área de drenagem da sub-bacia do Alto Sorocaba, mas nem todos possuem suas áreas territoriais totalmente incluídas nela (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2000).

Na Bacia do rio Sorocaba encontra-se também a Represa de Itupararanga, que foi construída em 1912, nas cabeceiras do rio Sorocaba, e cuja barragem situa-se, hoje, no município de Votorantim. Com área de drenagem de 851 km² e vazão máxima de 39,12 m³/s, o reservatório recebe água dos rios Sorocabuçu, Sorocamirim e Una, que antes da construção da represa, se uniam para formar diretamente o rio Sorocaba, e banha os municípios de Ibiúna, Mairinque, Alumínio, Piedade e Votorantim. São abastecidos com suas águas os municípios de Sorocaba (74% do consumo), Votorantim (92%), Ibiúna (100%) e São Roque (32%) (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2000).

Figura 10: Bacia do rio Sorocaba.



Fonte: IMAPES.

4.1.1 Os rios Sorocamirim, Una e Sorocabuçu

O rio Sorocamirim possui sua cabeceira no município de Cotia, passa pelo município de Vargem Grande Paulista e terras de São Roque, chegando ao varjão de Ibiúna, despejando suas águas no rio Sorocabuçu. Ele recebe, ao longo de seu curso, em seu leito, as águas do ribeirão dos Grilos, ribeirão Sara, ribeirão Votorantim, ribeirão dos Pintos, rio Morro Grande e córrego do Curral.

Já o rio Una nasce no município de Ibiúna e vai desaguar no rio Sorocabuçu nas proximidades da represa Itupararanga. Para sua formação recebe as águas do córrego do Cupim, ribeirão do Leopoldo e ribeirão do Salto e pequenos afluentes provenientes de nascentes.

O rio Sorocabuçu nasce também em Ibiúna e inicialmente recebe as águas do ribeirão Rafael Grande. Depois passa a receber as águas do rio Murundu, e é reforçado pelo ribeirão dos Alves e ribeirão Paiol Grande. Ele corta quase todo o município de Ibiúna até desembocar na represa de Itupararanga.

Os municípios que abrigam esses três rios citados acima possuem como uma das principais atividades de ocupação do solo a agricultura irrigada, destacando-se os cultivos de milho, tomate, batata, alface, cheiro verde, escarola, rúcula, repolho, couve-flor e outras olerícolas (COUTO, 2008).

Adicionalmente, é relatado o uso de diversos agrotóxicos na região (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2000), dentre eles o metamidofós. Tais usos são confirmados por programas de monitoramento de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, que detectam a presença de resíduos de metamidofós em diversos tipos de alimentos, dentre eles os principais cultivados na região, e ainda através de um estudo realizado nas águas da Represa de Itupararanga, que confirmaram a presença de tal agrotóxico em alguns pontos de coleta e em determinadas épocas do ano (VELINI, 2007).

4.1.2 Amostragem

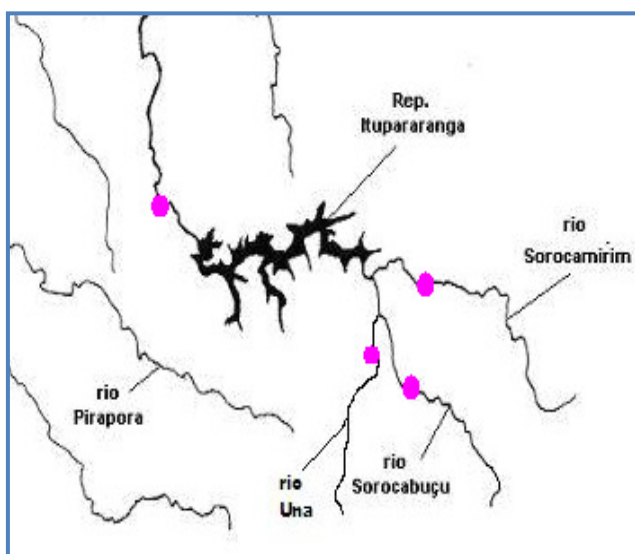
As amostras de água foram obtidas através de coletas mensais nos leitos dos Rios Sorocamirim, Sorocabuçu, Una e Sorocaba, este último após a represa de Itupararanga, na Região de Sorocaba, São Paulo, SP.

Tais coletas foram realizadas no período de Fevereiro de 2010 a Janeiro de 2011, em pontos coincidentes com locais de monitoramentos regulares realizados pela CETESB, nos quatro corpos hídricos, sendo as coordenadas representadas na Tabela 4.

Tabela 4: Pontos de amostragem.

<i>Corpo Hídrico</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>
Rio Sorocaba	23 31 24	47 26 58
Rio Sorocamirim	23 37 01	47 12 50
Rio Sorocabuçu	23 39 29	47 12 35
Rio Una	23 38 55	47 13 21

Figura 11: Representação dos pontos de coleta no mapa.



Fonte: VILLARES, GOMIERO, GOITEIN, 2007 (modificado).

Os pontos de coleta foram fotografados, e são mostrados nas Figuras 12 a 15.

Figura 12: Rio Sorocamirim.



Figura 13: Rio Sorocabuçu.



Figura 14: Rio Una.



Figura 15: Rio Sorocaba.



No momento da coleta, as amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em frasco de vidro âmbar, seguindo-se os preceitos recomendados no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater e as normas de coleta adotadas pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). Optou-se por não acidificar as amostras a fim de evitar prejuízo às análises e ao equipamento. Ainda nos locais das amostragens foram preenchidas fichas de coleta (modelo: anexo 1) contendo dados adicionais como temperatura, pH e condições meteorológicas nas últimas 24 horas. Os frascos foram acondicionados em isopores com gelo, até serem transportados ao laboratório. No laboratório, as

amostras foram armazenados em geladeira, de 2 a 8° C, e foram submetidas a análise em no máximo 72 horas. A profundidade de amostragem foi de cerca de 30 centímetros.

4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os métodos analíticos existentes para a análise de metamidofós em água, levantados na revisão bibliográfica, apresentaram resultados controversos em relação às eficiências de extração, processo este comumente empregado na análise de substâncias em níveis residuais, por promover a concentração do analito e o *clean up* da amostra. Alguns deles ofereceram bons resultados de recuperação e outros não, porém a maioria dos pesquisadores trabalhou com concentrações de metamidofós acima das almeçadas para este trabalho.

Esta inconsistência na literatura, somada à necessidade de pronta disponibilidade de um método capaz de detectar e quantificar o metamidofós, na água, em níveis de traços e utilizando-se recursos materiais e financeiros acessíveis à pesquisa, motivou a realização de testes com diversos procedimentos de extração líquido-líquido e em fase sólida, e culminou com o desenvolvimento de nova metodologia capaz de alcançar os objetivos propostos, etapa esta realizada anteriormente à análise das águas dos rios.

Tais 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.

4.2.1 Material de referência 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).

Todo o padrão foi dissolvido em 1 mililitro de metanol grau HPLC, obtendo-se uma solução estoque de 100 mg/mL, que foi armazenada sob refrigeração e ao abrigo da luz. A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções de trabalho, em água ultrapurificada, nas concentrações adequadas para proceder às análises no equipamento.

4.2.2 Reagentes, solventes e materiais

4.2.2.1 Utilizados nas extrações

- ✓ 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 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);
- ✓ 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;
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, com capacidade para 50 mL e 12 mL (Eurotips scientific);
- ✓ 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).

4.2.2.2 Utilizados na cromatografia líquida e espectrometria de massas

- ✓ Metanol grau HPLC (Merck, Brasil);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker, Brasil);
- ✓ Água ultrapurificada em sistema Direct-Q UV₃[®] Millipore (resistividade 18,2 m Ω cm);
- ✓ Formiato de amônio puríssimo p.a. para espectrometria de massas $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Ácido fórmico p.a. 98 – 100% (Merck, Alemanha);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, com capacidade para 50 mL e 12 mL (Eurotips scientific);
- ✓ Micropipeta automática com capacidade para pipetar volumes entre 100 μL e 1000 μL (Transferpette[®], Alemanha), bem como ponteiras compatíveis;

- ✓ Micropipeta automática com capacidade para pipetar volumes entre 1 mL e 5 mL (Digipet[®]), bem como ponteiras compatíveis;
- ✓ Seringas descartáveis com capacidade nominal de 10 mL (TKL[®]);
- ✓ Vial de vidro âmbar, capacidade para 1,8 mL, com tampa e septo (CMS[®], Brasil);
- ✓ Filtro com membrana de 0,20 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore, Brasil).
- ✓ Membrana em ésteres de celulose de 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro;

4.2.3 Equipamentos e acessórios

O equipamento utilizado no desenvolvimento do método e nas análises das amostras, bem como seus componentes, estão descritos abaixo:

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent Technologies (1200 series), constituído por:
 - ✓ Degaseificador;
 - ✓ Bomba quaternária;
 - ✓ Amostrador automático
 - ✓ Forno de coluna;
- ✓ Detector acoplado ao cromatógrafo: espectrômetro de massas Triploquadropolo Q-trap 3200 da marca Applied Biosystems, com ionização à pressão atmosférica por *Electrospray*.
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do software Analyst (Applied Biosystems).
- ✓ 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;

4.2.4 Avaliação dos métodos de extração

4.2.4.1 Extração líquido-líquido

Porções 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 diversas combinações de solventes orgânicos. 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.

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.

4.2.4.2 Extração em fase sólida

Porções de 250 mL ou 100 mL de soluções aquosas de metamidofós com concentração de 400 ng/L foram submetidas a processo de extração em fase sólida variando-se o pH da amostra, os cartuchos de extração, os solventes de condicionamento e eluição e seus volumes.

O processo consistiu no condicionamento do cartucho por percolação de solvente através dele, sob baixo vácuo e/ou sob condições atmosféricas. Em seguida, sem secar o cartucho, a amostra foi percolada sob baixo vácuo, mantendo-se fluxo constante e lento. Após a passagem de todo o volume da amostra, o cartucho foi secado através de passagem de ar, por 5 minutos. Posteriormente foi realizada a

eluição do composto de interesse através da percolação de solvente adequado pelo cartucho, também sob baixo vácuo e/ou condições atmosféricas. O extrato foi recolhido em tubo de polipropileno, evaporado até a secura e o resíduo foi solubilizado em 1 mL de metanol, para posteriormente ser analisado.

4.2.5 Determinação das condições do sistema de detecção

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram feitas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, de solução analítica padrão de metamidofós na concentração de 500 µg/L. A partir deste procedimento foi possível escolher o modo de ionização da fonte, a voltagem do cone, a energia de colisão e a temperatura da fonte, dentro da faixa indicada pelo fabricante.

Após a otimização dessas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para a qualificação e quantificação da substância e o método foi criado no modo *multiple reaction monitoring* (MRM).

4.2.6 Determinação das condições cromatográficas

As fases móveis usadas continham diferentes combinações e proporções dos seguintes solventes: A – água contendo ácido fórmico e formiato de amônio; B – acetonitrila contendo ácido fórmico; C – água contendo formiato de amônio; D – metanol.

Foram testadas as seguintes proporções:

- 100% de A;
- 100% de B;

- 100% de C;
- 100% de D;
- 25% de C e 75% de D;
- Gradiente iniciando-se com 100% de A até 100% de D em 2 minutos;
- Gradiente iniciando-se com 100% de A até 50% de A e D em 2 minutos;
- 25% de A e 75% de D.

Foram testados os seguintes fluxos de fase móvel, por minuto: 250 μL , 450 μL e 550 μL ; e também os seguintes volumes de injeção: 5 μL , 10 μL , 50 μL e 60 μL .

4.2.7 Validação analítica para amostras aquosas

Após a determinação das melhores condições cromatográficas e espectrométricas, foi realizada a validação do método.

Como já foi dito anteriormente, existem vários procedimentos distintos para a validação, havendo frequentemente discrepâncias entre os diferentes sistemas de validação. No presente trabalho foram adotados os preceitos da ANVISA, do INMETRO e dos autores Lanças e Ribani.

Neste procedimento, foram avaliados os parâmetros seletividade/especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão, sensibilidade e robustez.

4.2.7.1 Seletividade e especificidade

Analisaram-se inúmeros brancos em todas as etapas da validação a fim de ser verificado se, no tempo de retenção esperado, era observada a presença de algum

interferente que pudesse conduzir a uma falsa identificação do composto ou que impedisse a sua identificação.

4.2.7.2 Linearidade e intervalo

A linearidade foi verificada em duas etapas: na faixa de concentração de 0,98 a 98 $\mu\text{g/L}$ e na faixa de concentração de 12,59 a 1259,53 ng/L .

Para este estudo foram utilizadas soluções de calibração de metamidofós, preparadas em água, com diferentes concentrações ao longo das faixas estudadas e avaliadas em triplicatas e quintuplicadas, tendo sido determinado o coeficiente de determinação (r^2).

4.2.7.3 Precisão

A precisão foi determinada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, sendo demonstrada através do cálculo do coeficiente de variação médio (CV%).

Para a determinação da repetibilidade, foram analisadas seis concentrações distintas, distribuídas ao longo da faixa linear estudada, e cada concentração foi avaliada em quintuplicata, em um mesmo dia.

Já para a precisão intermediária, foram estudadas três diferentes concentrações (baixa, média e alta), também em quintuplicata, em dias distintos.

4.2.7.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela análise de seis amostras de concentrações conhecidas, contemplando a faixa de trabalho linear, e expressa em porcentagem de recuperação (R%).

4.2.7.5 Sensibilidade (limite de quantificação e limite de detecção)

O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido considerando-se a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (níveis de resíduos).

Para a determinação do limite de detecção (LOD) foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi três vezes maior que o sinal do ruído da linha de base, no tempo de retenção do composto de interesse.

4.2.7.6 Robustez

Para avaliar a robustez do método, foram variados os seguintes parâmetros: fluxo, composição da fase móvel e temperatura da coluna.

4.3 PRESENÇA DE AGROTÓXICOS EM CORPOS HÍDRICOS DA REGIÃO: DADOS COMPLEMENTARES

A título de comparação, revisou-se dados de análises de agrotóxicos realizados regularmente pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, na região em estudo e também dados de outra pesquisa, realizada por VELINI, na represa de Itupararanga.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, realiza regularmente o monitoramento da qualidade das águas doces em todo o Estado de São Paulo, inclusive na sub-bacia do Alto Sorocaba.

Os pontos de monitoramento rotineiros nesta região são:

- Rio Una, na cidade de Ibiúna;
- Rio Sorocabuçu, na cidade de Ibiúna;
- Rio Sorocamirim, na cidade de São Roque;
- Represa de Itupararanga, com quatro pontos sendo dois para avaliar a balneabilidade;
- Rio Sorocaba, com seis pontos nas cidades de Sorocaba, Tatuí, Cerquilha e Laranjal Paulista.

Em todos eles são coletados dados de campo (coloração, pH, temperatura da água, temperatura ambiente, condições climáticas nas últimas 24 horas) e são avaliados parâmetros físico-químicos, como cloreto total, alumínio, cobre e ferro dissolvidos, condutividade, DBO_{5,20}, DQO, fluoreto total, fósforo total, manganês total, nitrogênio amoniacal, nitrato, oxigênio dissolvido, sólidos totais, turbidez e zinco total, e também parâmetros biológicos, como coliformes termotolerantes.

Os compostos orgânicos, dentre eles os agrotóxicos, são avaliados somente em um ponto, o qual alternou entre o Rio Sorocaba e a Represa de Itupararanga, desde 2002. Tais parâmetros foram avaliados somente no sedimento, o que é permitido pela

Resolução CONAMA 357, quando não existem métodos de análise disponíveis para a água.

Dentre os agrotóxicos pesquisados, foram detectados somente o DDE e o lindano, principalmente no sedimento da Represa de Itupararanga, e em anos específicos, conforme ilustra a Tabela 5.

As características físico-químicas e químicas dos agrotóxicos encontrados, que são da classe dos organoclorados, são extremamente diferentes das características do metamidofós, implicando em comportamentos completamente distintos. Por esse motivo, a comparação entre os dados obtidos pelos monitoramentos da CETESB e os oriundos do presente estudo não deve ser feita.

Tabela 5: Agrotóxicos detectados no sedimento, na Bacia do Sorocaba.

<i>Corpo d'água</i>	<i>Ano</i>	<i>Agrotóxico</i>	<i>Resultado</i>
Represa de Itupararanga	2002	DDE	8,8 µg/Kg
Rio Sorocaba	2004	Lindano	3,38 µg/Kg
Represa de Itupararanga	2008	DDE	4,8 µg/Kg
Represa de Itupararanga	2009	DDE	7,53 µg/Kg

Fonte: CETESB.

Alternativamente, VELINI realizou um monitoramento nas águas da Represa de Itupararanga, entre dezembro de 2005 e junho de 2007. No total foram 15 pontos de coleta, em três profundidades diferentes: superfície, meio e fundo. Foi avaliada a presença de inseticidas (carbofuran, fipronil, metamidofós, paration-metílico), herbicidas (alaclor, ametrina, amicarbazona, atrazina, clomazona, diuron, glifosato, hexazinona, metolaclor, tebutiuron e trifluralina), fungicidas (miclobutanil, flutriafol, tebuconazol, carbendazim) e cafeína.

Em todas as coletas foram detectados os seguintes herbicidas: ametrina, clomazona, metolaclor e trifluralina. Os compostos hexazinona e tebutiuron estiveram presentes em cinco e quatro coletas respectivamente.

Em relação aos fungicidas, somente o tebuconazol foi detectado em todas as coletas. O flutriafol foi encontrado em dezembro de 2005 e depois não apareceu mais.

A cafeína foi detectada em todos os períodos de amostragem, o que sugere uma forte carga de despejo de esgotos domésticos na região.

Para os inseticidas, foi constatada a presença de metamidofós, carbofuran e fipronil, sendo que para os dois últimos o resultado positivo foi somente uma vez para cada. Para o metamidofós, os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados positivos para o metamidofós por ponto e data de coleta.

<i>Ponto</i>	<i>Dez/2005</i>	<i>Abr/2006</i>	<i>Jul/2006</i>	<i>Dez/2006</i>	<i>Fev/2007</i>	<i>Jun/2007</i>
3	n.d.	n.d.	n.d.	166,98 ng/L	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	190,99 ng/L	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	103,10 ng/L
10	n.d.	n.d.	n.d.	292,55 ng/L	n.d.	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	173,37 ng/L	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	270,74 ng/L	278,89 ng/L	n.d.	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	97,15 ng/L	n.d.	n.d.
15	n.d.	n.d.	n.d.	235,93 ng/L	n.d.	n.d.

Fonte: VELINI, 2007.

A partir destes dados pode-se perceber que o metamidofós foi o inseticida mais detectado na água o que indica seu uso na região e também sua tendência em permanecer na água, o que já era esperado analisando-se suas características físico-químicas e de solubilidade.

As quantidades encontradas, em geral, foram superiores às permitidas pela União Européia, que é de 0,1 µg/L (ou seja, 100 ng/L). Porém, notou-se que a presença do metamidofós é pontual, ou seja, em uma mesma data de coleta, nem todos os pontos, dentro da mesma Represa, apresentaram resultado positivo. Além disso, não se pode restringir a presença do metamidofós às épocas de seca, uma vez que as maiores incidências desse inseticida foram no mês de dezembro de 2006. Adicionalmente, a presença dele também não foi constante em todos os meses de dezembro avaliados.

Isto indica que a contaminação da água por metamidofós está intimamente relacionada ao seu uso na agricultura, aparecendo em pulsos, provavelmente num período próximo da sua aplicação, aplicação esta que pode variar durante o ano, verificando-se que não há regularidade na sua utilização, por parte dos agricultores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Foram testadas diversas metodologias de extração líquido-líquido e em fase sólida, descritas na literatura, e também algumas variações, na tentativa de extrair o metamidofós da água e concentrá-lo em uma menor quantidade de solvente.

5.1.1 Extração Líquido-líquido

A Tabela 7 mostra todas as condições testadas, para a extração líquido-líquido, sempre utilizando-se água fortificada com metamidofós para se obter uma concentração final de 0,4 µg/L (ou 400 ng/L).

A partir destes resultados, pode-se estabelecer algumas relações, com a finalidade de comparar os diferentes métodos, e verificar qual apresentou maior eficiência.

A Figura 16 mostra a relação entre os diferentes solventes testados na extração líquido-líquido, de 250 mL de amostra e suas respectivas recuperações, com e sem o uso de NaCl. Já a Figura 17, explicita a relação entre dois volumes distintos de amostra testados, 100 mL e 250 mL, em extrações com clorofórmio / acetona (2:1), em pH 3, com e sem o uso de NaCl, e suas respectivas recuperações. Por fim, na Figura 18, variou-se a utilização de sal e seu tipo, em extrações realizadas com clorofórmio / acetona (2:1), para amostras de 100 mL, em pH 3.

Tabela 7: Condições testadas para extração líquido-líquido e suas recuperações.

<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

Figura 16: Relação entre os diferentes solventes usados na extração líquido-líquido e as recuperações obtidas, com e sem o uso de NaCl.

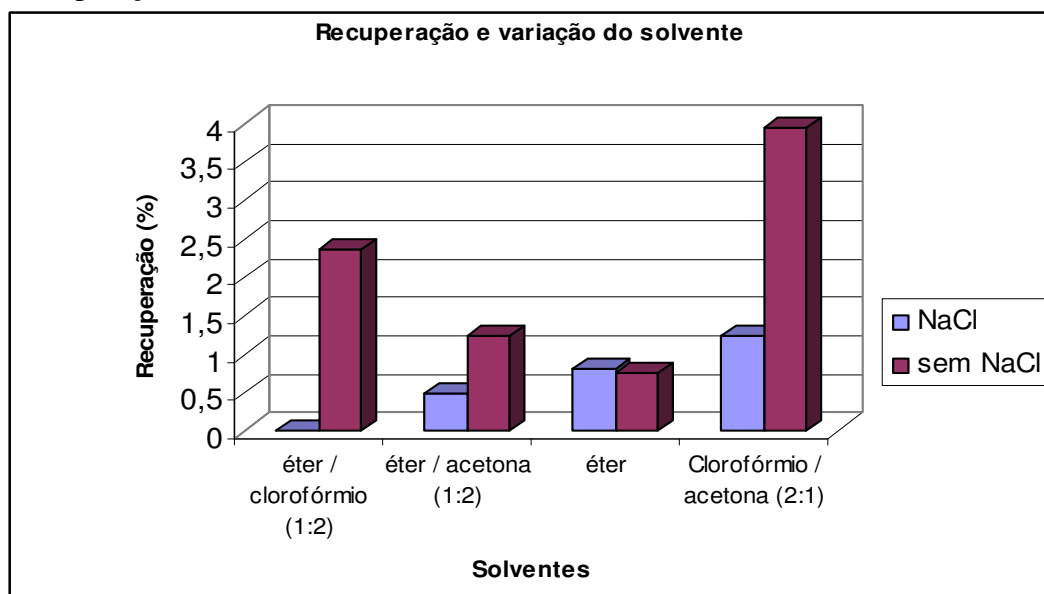


Figura 17: Relação entre dois volumes distintos de amostra testados na extração líquido-líquido com clorofórmio / acetona (2:1), em pH 3, e suas respectivas recuperações, obtidas com e sem o uso de NaCl.

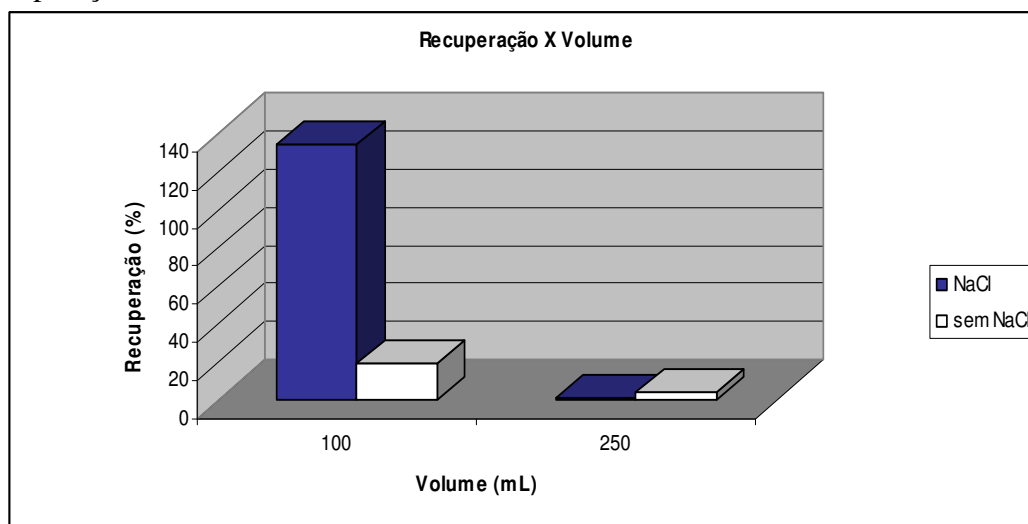
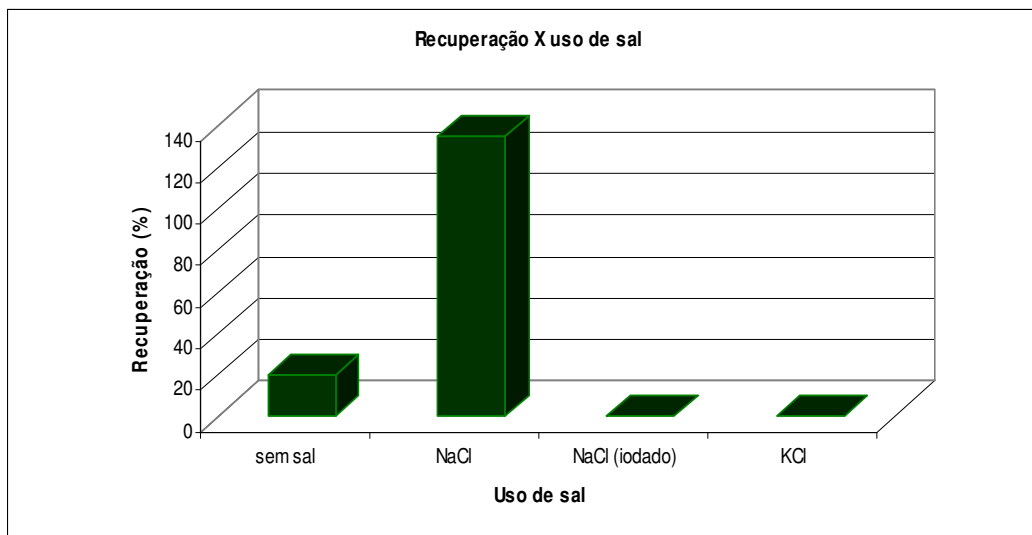


Figura 18: Relação entre extrações líquido-líquido realizadas com clorofórmio / acetona (2:1), em amostras de 100 mL, pH 3, e suas respectivas recuperações. Variou-se a utilização de sal e seu tipo.



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 através dos dados expostos na Tabela 7 e nas Figuras 17 e 18, 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.

De 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 8 e 9 e a Figura 19 mostram os resultados dos exames.

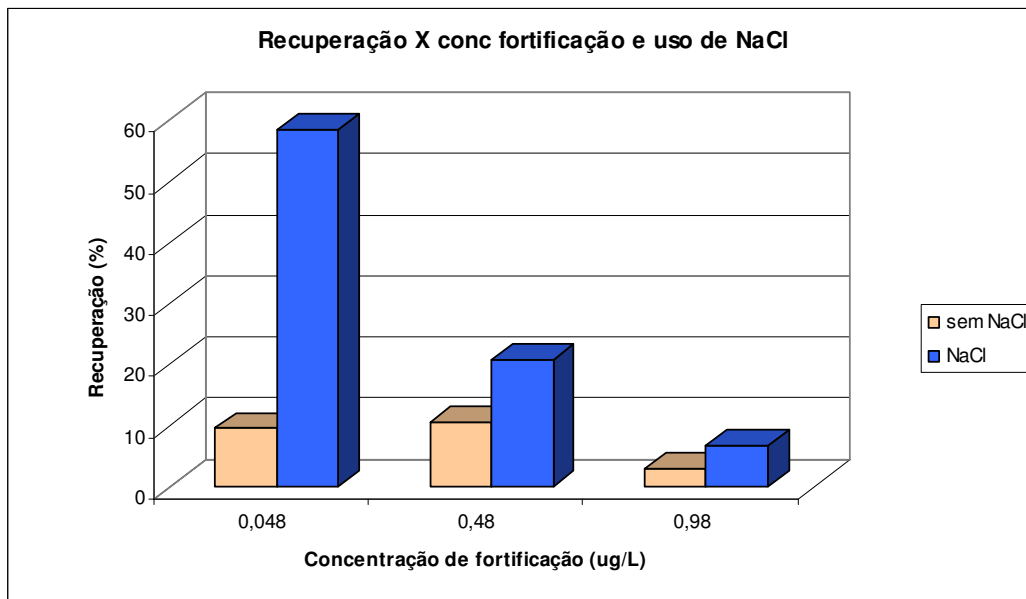
Tabela 8: Extrações líquido-líquido realizadas sem a adição de NaCl.

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

Tabela 9: Extrações líquido-líquido realizadas com a adição de 35 gramas de NaCl.

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

Figura 19: 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.

Assim, os testes com a extração líquido-líquido não se mostraram eficientes para viabilizar seu uso rotineiro em análises laboratoriais do metamidofós, considerando-se níveis residuais e matrizes aquosas, devido às suas baixas recuperações e baixa reprodutibilidade. Com isso, partiu-se para testes com a extração em fase sólida.

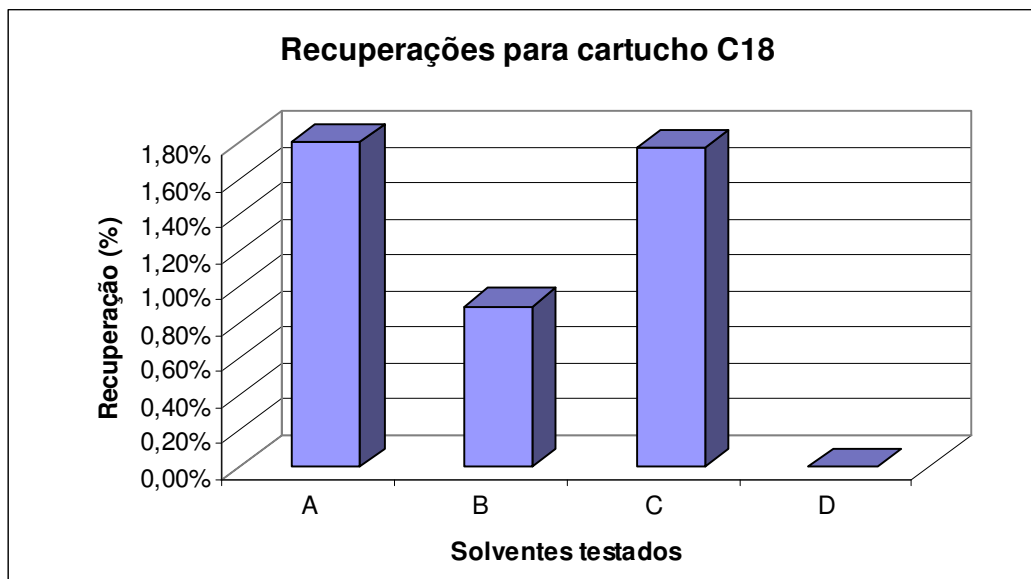
5.1.2 Extração em fase sólida (SPE)

A extração do metamidofós de matrizes aquosas, através da técnica de extração em fase sólida, foi testada variando-se: cartuchos de extração, esquemas de solventes, tanto para o condicionamento do cartucho quanto para a eluição, volumes de amostra, concentrações de fortificação e pH.

Para o cartucho octadecilsilano (C-18), de 1000 mg de preenchimento, as condições testadas e suas respectivas recuperações estão representadas na Tabela 10 e na Figura 20.

Tabela 10: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho C-18, e suas respectivas recuperações.

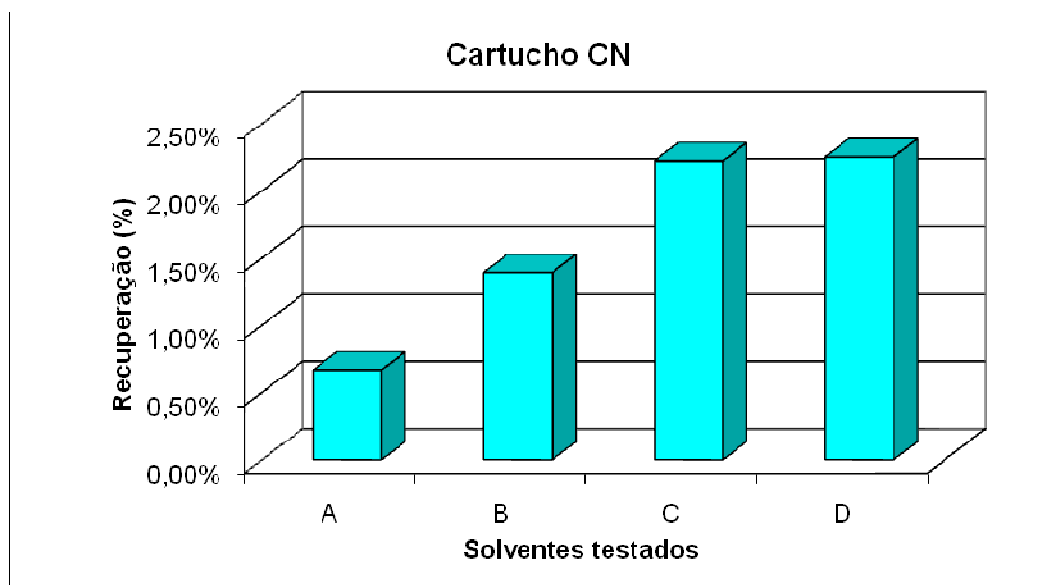
	<i>Condicionamento</i>	<i>Eluição</i>	<i>pH</i>	<i>Volume de amostra (mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
A	3mL ACN + 3mL água	2 x 3 mL ACN	3	250	1,80
B	5mL MeOH + 5mL água	2 x 3 mL ACN	3	250	0,89
C	5mL MeOH + 5mL água	2 X 5 mL MeOH	3	250	1,77
D	3mL ACN + 3mL água ac fosf. pH3	2 x 3 mL ACN:água acida pH3 (9:1)	3	250	0

Figura 20: Recuperações obtidas para o cartucho C-18.

Para o cartucho ciano (CN), de 500 mg de preenchimento, as condições testadas e suas respectivas recuperações estão representadas na Tabela 11 e na Figura 21.

Tabela 11: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho CN, e suas respectivas recuperações.

	<i>Condicionamento</i>	<i>Eluição</i>	<i>pH</i>	<i>Volume de amostra (mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
A	3mL MeOH + 3mL água	2 x 3 mL MeOH	3	250	0,67
B	3mL MeOH + 3mL água	2 x 3 mL MeOH	7	250	1,39
C	3mL MeOH + 3mL MeOH:água (1:9)	2 x 3 mL MeOH:água (9:1)	3	250	2,22
D	3mL MeOH + 3mL MeOH:água (1:9)	2 x 3 mL MeOH:água (9:1)	7	250	2,25

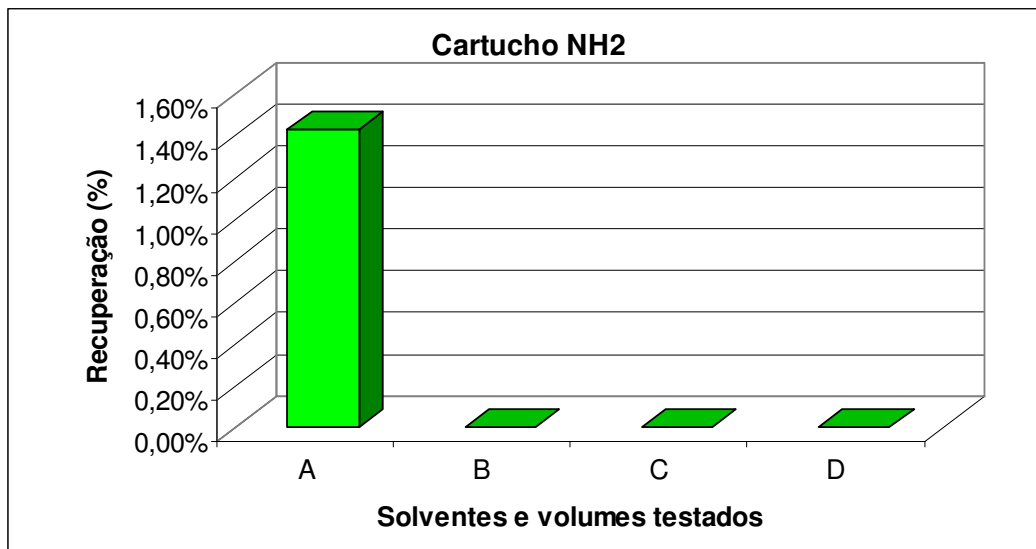
Figura 21: Recuperações obtidas para o cartucho CN.

Para o cartucho amina (NH_2), de 500 mg de preenchimento, as condições testadas e suas respectivas recuperações estão representadas na Tabela 12 e na Figura 22.

Tabela 12: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho NH_2 , e suas respectivas recuperações.

	<i>Condicionamento</i>	<i>Eluição</i>	<i>pH</i>	<i>Volume de amostra (mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
A	3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN:água (9:1)	3	100	1,43
B	3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN:água (9:1)	3	250	0
C	3mL ACN + 3mL água ácida pH3	2 x 6 mL ACN:água ácida pH3 (9:1)	3	250	0
D	3mL ACN + 3mL água ácida pH3	2 x 6 mL ACN:água ácida pH3 (9:1)	3	100	0

Figura 22: Recuperações obtidas para o cartucho NH₂.



Nos resultados obtidos com o uso dos cartuchos C-18 (octadecilsilano) e NH₂ (amina), as recuperações variaram de zero a 1,80% e de zero a 1,43% respectivamente, valores estes insatisfatórios.

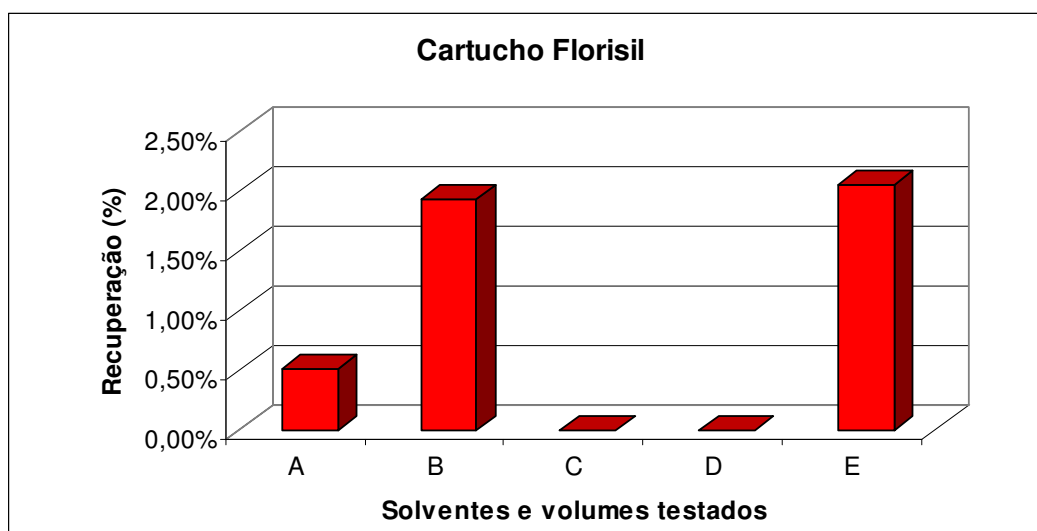
Com o cartucho CN (ciano), as recuperações variaram de 0,67% a 2,25%, valores também demasiadamente baixos para que o método seja adotado na prática laboratorial.

Para o cartucho Florisil (Mg₂SiO₃), de 1000 mg de preenchimento, as condições testadas e suas respectivas recuperações estão representadas na Tabela 13 e na Figura 23.

Tabela 13: Extrações em fase sólida realizadas com cartucho Florisil, e suas respectivas recuperações.

	<i>Condicionamento</i>	<i>Eluição</i>	<i>pH</i>	<i>Volume de amostra (mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
A	2 x 3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN	3	250	0,51
B	2 x 3mL ACN + 3mL água	2 x 6 mL ACN	3	100	1,93
C	2 x 3mL MeOH + 3mL água	2 x 5 mL MeOH:solução acético 30% (9:1)	3	100	0
D	2 x 3mL MeOH + 3mL água	2 x 5 mL MeOH:solução acético 30% (9:1)	3	250	0
E	5mL clorofórmio:acetona (2:1) + 5mL água	5 x 6 mL clorofórmio:acetona (2:1)	3	100	2,05

Figura 23: Recuperações obtidas para o cartucho Florisil.



O cartucho Florisil também apresentou recuperações demasiadamente baixas o que inviabiliza seu uso para a extração de metamidofós da água, nas condições testadas. Os valores não passaram de 2,05%.

Para o cartucho Oasis HLB, com duas massas distintas de preenchimento (200 mg e 100 mg), as condições testadas foram:

- Condicionamento: 1 mL diclorometano + 1mL metanol + 1mL água;
- Eluição: 2 mL metanol:diclorometano (10:90);
- pH: alcalino;
- Volumes de amostra: 5mL e 20mL;
- Concentrações de fortificação: 0,8µg/L, 0,4 µg/L e 0,26 µg/L.

As recuperações obtidas individualmente, as recuperações médias, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) estão representados na Tabela 14 e nas Figuras 24 e 25.

Tabela 14: 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			
20	0,26	0	2	0,04243	173,20
		0			
		7,35			

Figura 24: Recuperações obtidas para o cartucho Oasis HLB (médias).

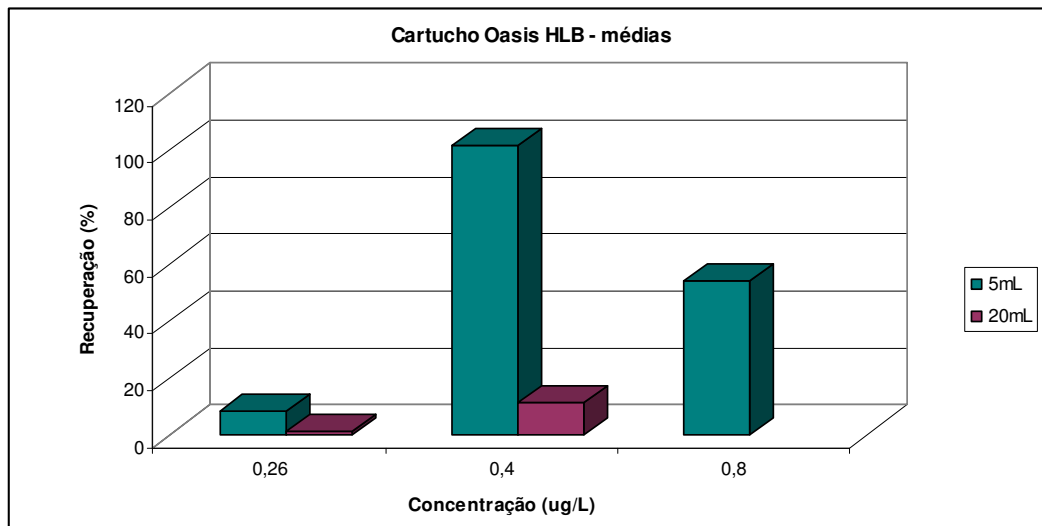
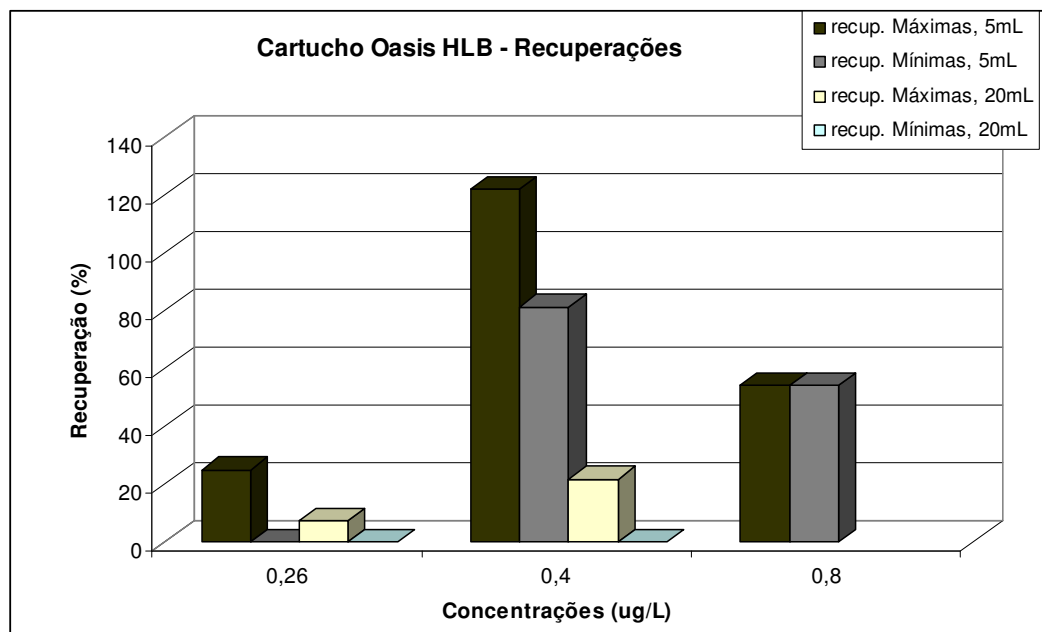


Figura 25: Recuperações obtidas para o cartucho Oasis HLB.



Desta forma, observou-se melhores recuperações com o cartucho Oasis HLB. Em média, as recuperações obtidas para as concentrações 0,8 $\mu\text{g/L}$ e 0,4 $\mu\text{g/L}$ foram 54,13% e 101,66%, respectivamente, o que evidência uma boa eficiência de

extração. Porém, os coeficientes de variação obtidos foram muito altos o que indica que o método não é reprodutível e não deve ser utilizado na prática laboratorial. Para a concentração mais baixa, as recuperações variaram de zero a 25,04%, denotando um coeficiente de variação elevado (155,74%).

Tais resultados inviabilizaram o uso da extração em fase sólida para os propósitos deste trabalho.

Desta forma, como os métodos de extração, tanto líquido-líquido quanto em fase sólida, não se mostraram eficientes e/ou reprodutíveis 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.

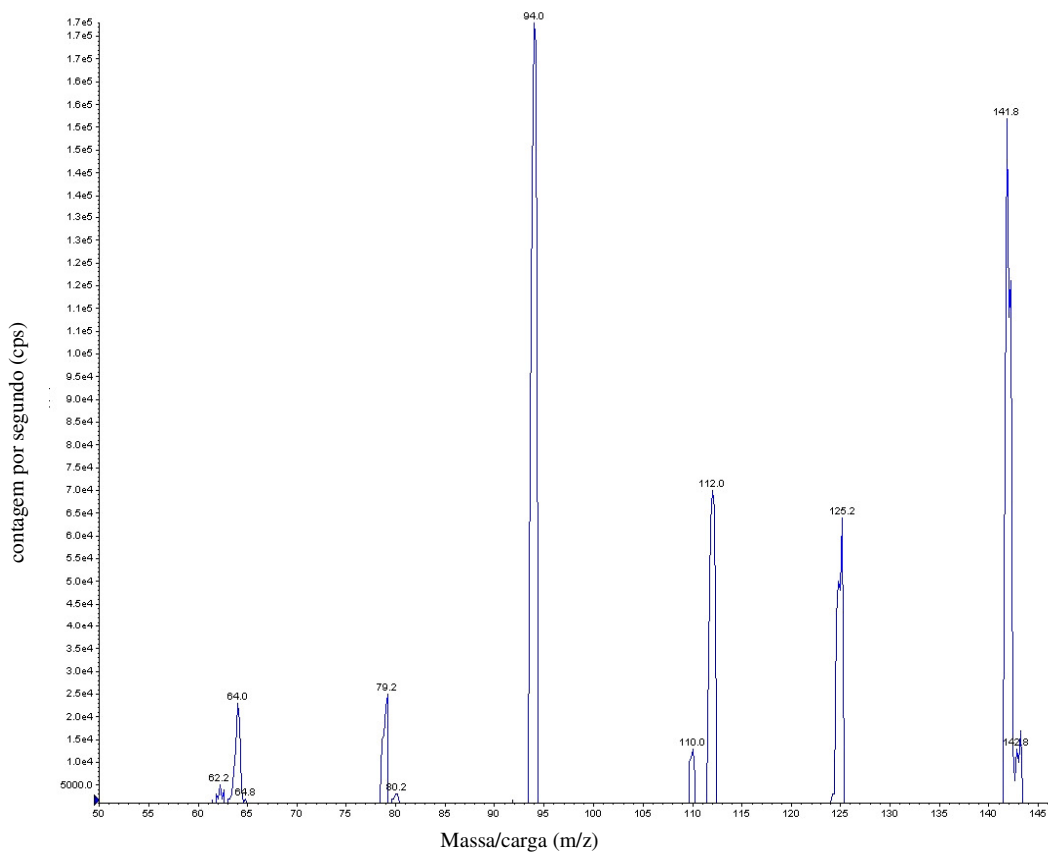
5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

Baseando-se nos resultados de INGELSE, 2001, optou-se por aumentar o volume de injeção de amostra no equipamento, o que respondeu muito bem, e o método foi, então, estabelecido.

5.2.1 Otimização das condições no espectrômetro de massas

Na Figura 26 está representado o espectro de massa do metamidofós obtido por ionização através de electrospray, no modo positivo (ESI+).

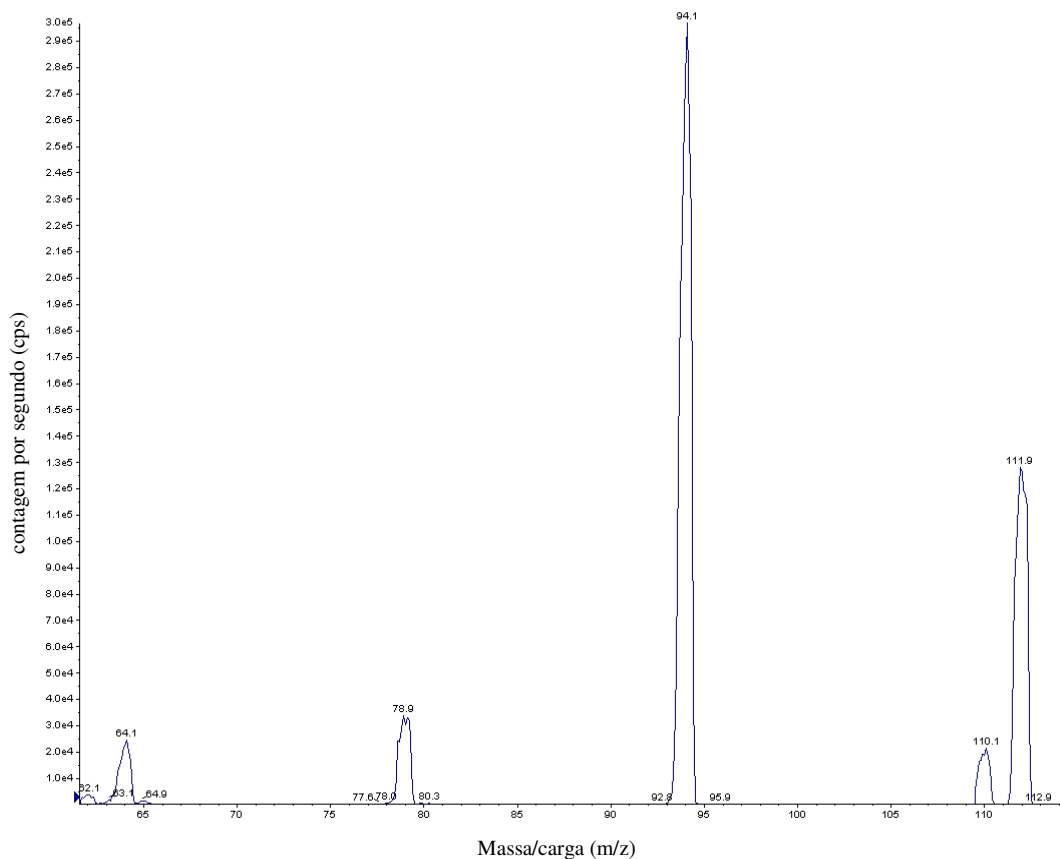
Figura 26: Espectro de massa do metamidofós, obtido por ionização através de electrospray, no modo positivo.



Na Figura 27 está o espectro de massa obtido por espectrometria de massa sequencial da molécula protonada do metamidofós ($m/z=142$), com identificação dos fragmentos iônicos mais intensos. A transição iônica (íon precursor > íon produto) escolhida para a quantificação do metamidofós foi m/z $142 > 94$ uma vez que foi a que resultou num sinal mais intenso em MRM.

Os espectros de massas mostrados nas Figuras 26 e 27 tem a finalidade de demonstrar o comportamento do metamidofós quando submetido às condições de análise no espectrômetro de massas, identificando seu padrão de fragmentação que será utilizado pelo método de pesquisa e identificação deste composto, nas amostras de água.

Figura 27: Espectro de massa do metamidofós, com identificação dos fragmentos iônicos mais intensos.



A partir da infusão direta no espectrômetro de massas, de solução analítica padrão de metamidofós, na concentração de 500 $\mu\text{g/L}$, foi possível otimizar suas condições ideais, estabelecendo-se:

- ☞ modo de ionização da fonte: electrospray no modo positivo;
- ☞ voltagem do cone: 31 volts
- ☞ energia de colisão: 15 eV
- ☞ temperatura da fonte: 350° C

5.2.2 Descrição das condições cromatográficas de trabalho

Dentre as diversas fases móveis testadas e expressas no item 4.2.6, e suas diferentes proporções, a que forneceu um tempo de retenção mais adequado, associado a boa simetria e altura do pico, foi a mistura A e D, na proporção 25% : 75%. O tempo total de análise foi de 5 minutos.

Considerando-se as vazões de fase móvel testadas e expressas no item 4.2.6, a que forneceu melhores condições de simetria de pico e tempo de retenção foi 250 μ L por minuto. Optou-se por não variar a vazão durante a corrida.

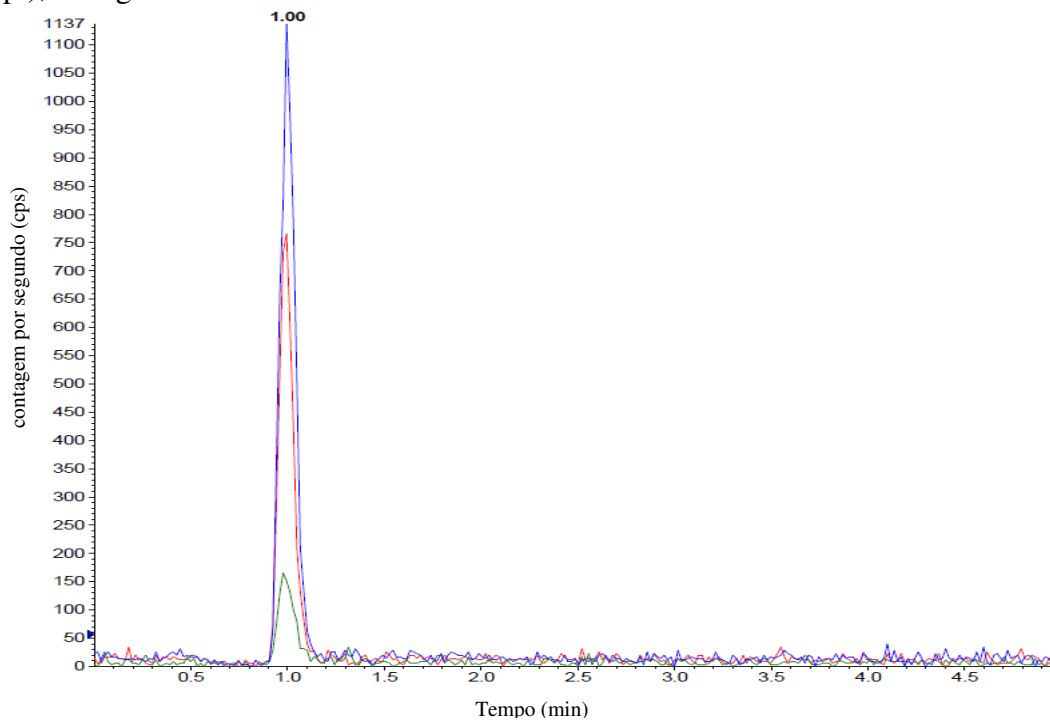
Os volumes de injeção testados foram decisivos para estabelecer um método com sensibilidade adequada para análise de resíduos de metamidofós em água. O volume de injeção de amostra adotado foi 60 μ L, que representou um excelente ganho de sinal sem afetar a simetria do pico.

Com estas condições, obteve-se o cromatograma representado na Figura 28, a partir da injeção de um padrão de metamidofós, em água, à 100 ng/L (ppt) de concentração. A presença de três picos coincidentes, em cerca de um minuto, demonstra a presença de metamidofós, com suas três transições iônicas, o que é importante para a identificação de tal substância nas amostras de água dos rios.

O tempo de retenção do composto foi de 1,00 minuto. Apesar de métodos cromatográficos clássicos trabalharem com tempos de retenção mais elevados, o uso do LC-MS/MS não exige elevada retenção na coluna já que a separação do composto de interesse de outros componentes da matriz não depende exclusivamente da cromatografia, ocorrendo seleção do analito no próprio espectrômetro de massas, mais especificamente no primeiro quadrupolo.

Uma vez que o objetivo do método foi alcançado com sucesso, partiu-se então para a validação analítica.

Figura 28: Cromatograma do padrão de metamidofós. Concentração de 100 ng/L (ppt), em água.



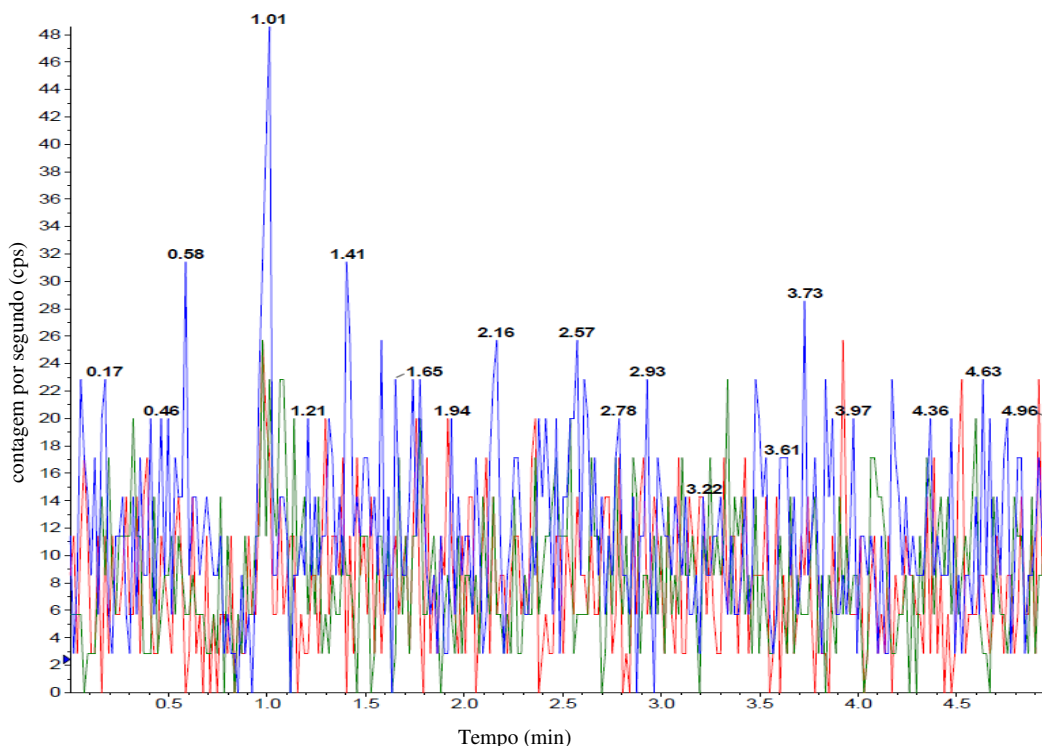
5.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA AMOSTRAS AQUOSAS

5.3.1 Seletividade e especificidade

A técnica de espectrometria de massas sequência já é, por si só, uma técnica específica uma vez que a massa molecular do composto de interesse, e somente esta massa, é selecionada no primeiro quadrupolo, percorrendo o restante da estrutura do equipamento, sendo fragmentada e seus fragmentos característicos serão selecionados em um terceiro quadrupolo para, por fim, serem detectados.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na injeção de brancos, analisando-os sob as condições descritas no item 5.2. Isso está expresso na Figura 29.

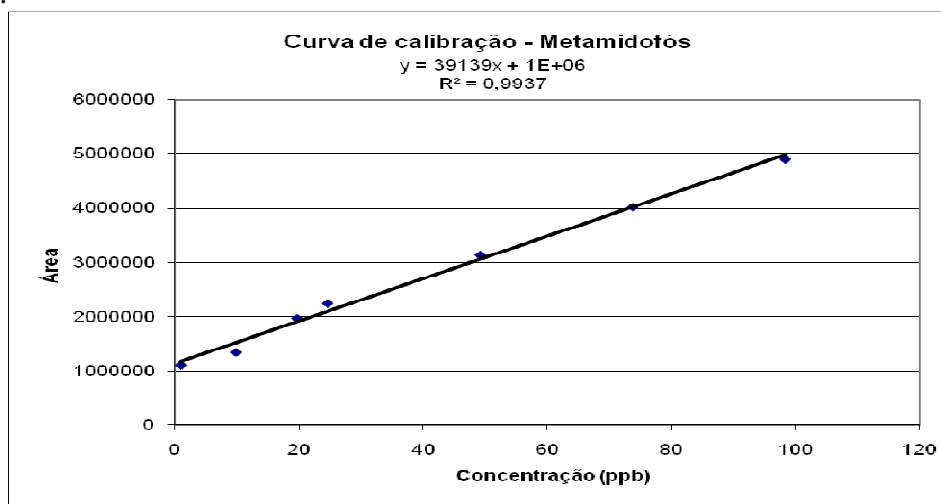
Figura 29: Cromatograma do branco.



5.3.2 Linearidade e intervalo

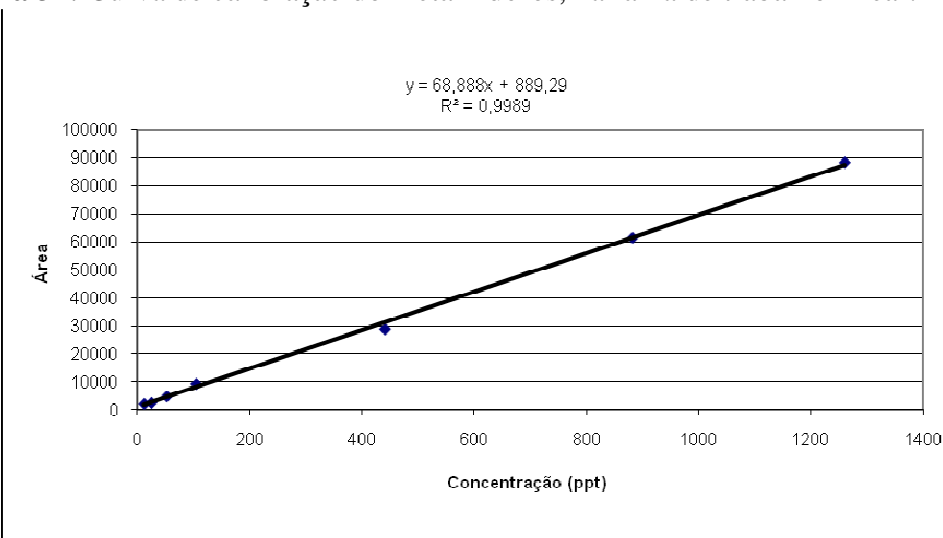
Para a faixa de concentração de 0,98 a 98 $\mu\text{g/L}$ (ou ng/mL), a curva de calibração, obtida a partir da análise de sete concentrações diferentes dos padrões, está mostrada na Figura 30. Foi obtido um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9937 e um coeficiente de correlação (r) de 0,9968. Estes valores foram satisfatórios uma vez que a ANVISA preconiza valores de r superiores a 0,99, o INMETRO aceita r maior que 0,90 e Lanças indica que r^2 deve ser no mínimo 0,98.

Figura 30: Curva de calibração do metamidofós, na faixa concentração: 0,98 a 98 µg/L.



Para a faixa de concentração de 12,59 a 1259,53 ng/L (ou pg/mL), a curva de calibração, obtida a partir da análise de sete concentrações diferentes dos padrões, está mostrada na Figura 31. Foi obtido um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9989 e um coeficiente de correlação (r) de 0,9994. Estes valores foram satisfatórios, conforme abordado anteriormente.

Figura 31: Curva de calibração do metamidofós, na faixa de trabalho linear.



Como as quantidades de metamidofós esperadas para análise de água são muito baixas, considerou-se a variação de 12,59 a 1259,53 ng/L (ou pg/mL) como sendo a faixa de trabalho linear.

5.3.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada para seis concentrações distintas do metamidofós, distribuídas ao longo da faixa de trabalho linear, cada uma analisada em quintuplicata, todas no mesmo dia. O coeficiente de variação (CV%) mínimo obtido foi 1,43% e o máximo, 16,41%.

A precisão intermediária foi estudada em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), dentro da faixa de trabalho linear, também em quintuplicata, variando-se o dia de análise. O coeficiente de variação (CV%) mínimo obtido foi 5,33% e o máximo, 6,41%.

Os coeficientes de variação obtidos tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária foram satisfatórios. Ribani e Brito afirmam que, para análise de traços ou impurezas, como por exemplo a análise de resíduos de praguicidas, são aceitos valores de coeficiente de variação de até 20% (BRITO et al, 2003).

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi estabelecida para seis concentrações conhecidas e distintas, contemplando parte da faixa de trabalho linear, sendo obtidos valores de recuperação entre 83,71% e 117,08%.

De acordo com Ribani e Lanças, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%. Deste modo, os valores de exatidão

obtidos para o método em questão, na faixa de concentração de 12,59 ng/L a 1259 ng/L, estão dentro do aceitável.

A Tabela 15 reúne os dados de exatidão e precisão obtidos para a análise de metamidofós em água, sob as condições propostas.

Tabela 15: Valores de recuperação (%) e do coeficiente de variação (%) obtidos em repetibilidade e precisão intermediária.

Concentração (ng/L)	Repetibilidade (% recuperação ± CV)	Precisão intermediária (% recuperação ± CV)
12,59	83,71 ± 15,26	-
25,19	93,85 ± 5,96	-
52,45	117,08 ± 3,96	107,28 ± 5,33
104,89	116,23 ± 16,41	-
629,76	101,55 ± 1,43	-
1259,52	100,9 ± 6,94	100,9 ± 6,41

5.3.5 Sensibilidade (limite de quantificação e limite de detecção)

A menor concentração do metamidofós determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas, foi 12,59 ng/L (ou pg/mL, ou ainda ppt), sendo esta considerada como limite de quantificação (LOQ) do método.

O limite de detecção (LOD) do método foi 2,46 ng/L (ou pg/mL ou ainda ppt), que foi a menor concentração testada e cujo sinal cromatográfico correspondeu a cerca de três vezes o ruído da linha de base, no tempo de retenção do composto de interesse.

Tanto o limite de quantificação quanto o limite de detecção atingiram valores baixos o suficiente para atender normativas internacionais e propostas de normativas nacionais.

5.3.6 Robustez

A robustez do método foi estabelecida, em três níveis de concentração: 53,3 ppt, 448 ppt e 1280 ppt, com sucesso para variações pré-estabelecidas de fluxo e temperatura. Já a variação da composição da fase móvel não foi tolerada.

Tabela 16: Dados dos testes de robustez.

	Variação 1	Variação 2	Varição máxima no tempo de retenção (%)	CV máximo (%)	Varição máxima na recuperação (%)
Fase móvel	A : D (23%:77%)	A : D (27%:73%)	0,90	16,90	71,46
Fluxo	252,5 µL/min	247,5 µL/min	2,02	2,36	5,04
Temperatura	21 °C	19 °C	0,80	3,25	6,41

Desta forma, verificou-se que o método, apresentou:

- ✓ Seletividade adequada, por não apresentar sinal (ou seja ‘pico’) no tempo de retenção esperado para o analito, quando da injeção de um branco;
- ✓ Linearidade satisfatória para análise de resíduos, demonstrada através do coeficiente de determinação (r^2) de 0,9989 e do coeficiente de correlação (r) de 0,9994;
- ✓ Precisão aceitável para níveis residuais, mostrada através dos coeficientes de variação máximos obtidos tanto para a repetibilidade, 16,41%, quanto para a precisão intermediária, 6,41%.

- ✓ Exatidão dentro dos intervalos aceitáveis, de acordo com Ribani e Lanças, explicitada pelas recuperações obtidas, que variaram de 93,85% e 116,23%;
- ✓ Sensibilidade alta, já que o limite de quantificação obtido foi de 12,59 ng/L (ou pg/mL, ou ainda ppt) e o limite de detecção, de 2,46 ng/L (ou pg/mL ou ainda ppt), valores esses adequados para atender normativas internacionais e propostas de normativas nacionais;
- ✓ Robustez estabelecida para o método, sendo toleradas pequenas variações de fluxo e de temperatura. Não foram toleradas, porém, as variações na composição da fase móvel testadas. Isso se deve ao fato que a ionização da molécula a ser analisada varia dependendo, dentre outros fatores, da composição da fase móvel (MORAES e LAGO, 2003).

5.4 ANÁLISE DAS ÁGUAS DOS RIOS

De fevereiro de 2010 a janeiro de 2011, mensalmente, foram colhidas águas dos rios Sorocamirim, Sorocabuçu, Una e Sorocaba, nos pontos de coleta especificados no item 4.1.2.

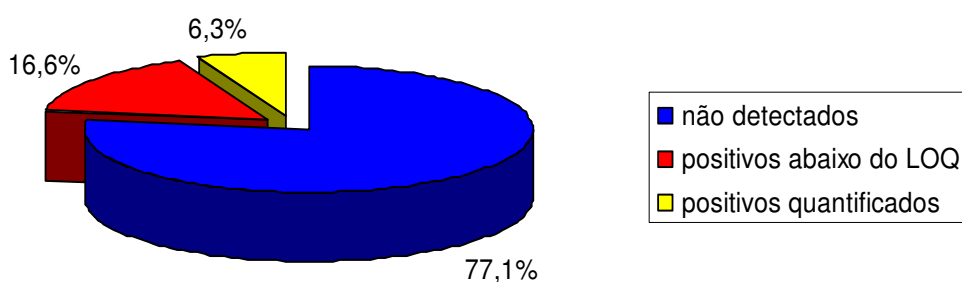
As amostras de água foram analisadas diretamente, ou seja, sem tratamento prévio, através da metodologia analítica desenvolvida e validada de acordo com os itens 4.2.5, 4.2.6, 4.2.7, 5.2 e 5.3.

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 17 e na Figura 32.

Tabela 17: Resultados obtidos do monitoramento das águas dos rios.

	<i>Rio Sorocamirim</i>	<i>Rio Sorocabuçu</i>	<i>Rio Una</i>	<i>Rio Sorocaba</i>
fev-10	n.d.	26,59 ng/L	n.d.	n.d.
mar-10	pos	n.d.	12,72 ng/L	n.d.
abr-10	n.d.	n.d.	18,77 ng/L	n.d.
mai-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
jun-10	n.d.	n.d.	pos	n.d.
jul-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ago-10	pos	pos	n.d.	n.d.
set-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
out-10	pos	pos	n.d.	n.d.
nov-10	n.d.	pos	n.d.	n.d.
dez-10	pos	n.d.	n.d.	n.d.
jan-11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Observação: n.d.: não detectado; pos: positivo, porém abaixo do limite de quantificação.

Figura 32: Distribuição percentual dos resultados.

Os resultados expressos na Tabela 17 mostraram a presença do metamidofós em amostras de águas superficiais colhidas dos principais afluentes do Rio Sorocaba.

Para o Rio Sorocamirim, foram obtidos resultados positivos nos meses de março, agosto, outubro e dezembro. Todavia, as quantidades encontradas foram baixas, não

podendo ser quantificadas por estarem abaixo do limite de quantificação do método utilizado.

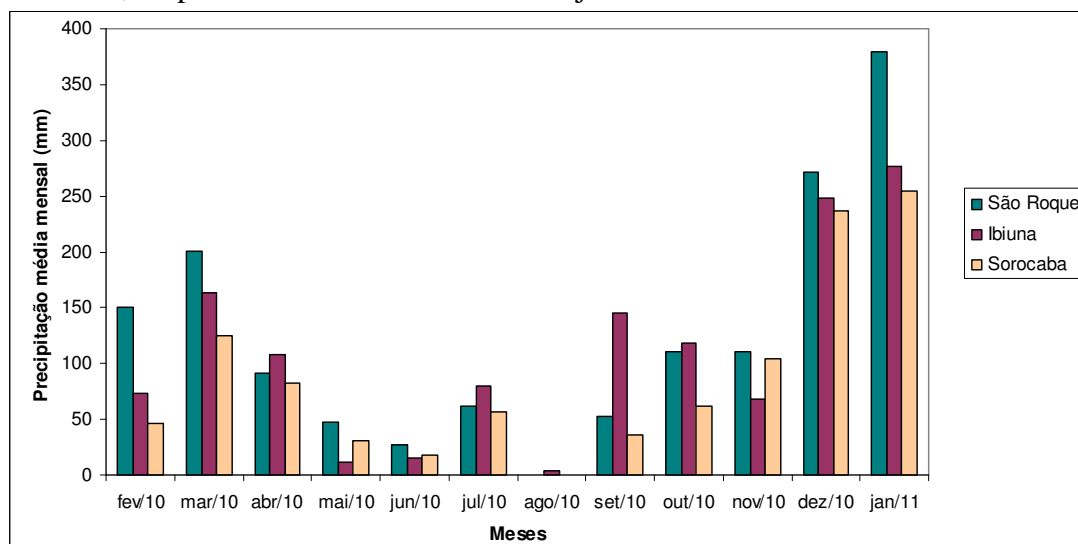
No Rio Sorocabuçu, o metamidofós esteve presente nos meses de fevereiro, agosto, outubro e novembro, obtendo-se para o mês de fevereiro uma concentração de 26,59 nanogramas de metamidofós a cada litro de água. Nos outros meses, a concentração também ficou abaixo do LOQ.

A presença do metamidofós no Rio Una foi confirmada em março (12,72 nanogramas de metamidofós por litro de água), abril (18,77 nanogramas de metamidofós por litro de água) e junho (concentração abaixo do LOQ).

O metamidofós não foi detectado em nenhuma das coletas realizadas no Rio Sorocaba.

Para o período entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011, a pluviosidade nos municípios sede dos pontos de coleta, variou conforme mostrado na Figura 33.

Figura 33: Precipitação média mensal (mm) nas cidades de São Roque, Ibiúna e Sorocaba, no período de fevereiro de 2010 a janeiro de 2011.



Fonte: CIAGRO, 2010 e 2011.

Através da comparação da pluviosidade média nas cidades com os resultados obtidos, não foi possível observar uma tendência de aparecimento do metamidofós nos períodos de pluviosidade menor ou maior.

O Rio Sorocamirim, cujo ponto de coleta encontrava-se no município de São Roque, apresentou metamidofós tanto no mês de menor pluviosidade registrada para o período - agosto, quanto nos meses de pluviosidade média a alta - março, outubro e dezembro.

No Rio Sorocabuçu, cujo ponto de coleta encontrava-se no município de Ibiúna, foi encontrada uma maior quantidade de metamidofós no mês de fevereiro, mês este de pluviosidade média. Já em agosto, o mais seco do período, o metamidofós esteve presente, porém em quantidades abaixo do LOQ. O mesmo foi verificado em outubro e novembro.

Para o Rio Una, cujo ponto de coleta também se encontrava no município de Ibiúna, as quantidades de metamidofós encontradas foram maiores nos meses de março e abril (12,72 ng/L e 18,77 ng/L, respectivamente), ambos de pluviosidade mediana, aparecendo em menores quantidades em junho, mês de pluviosidade menor.

Esses resultados estão concordantes com os obtidos por VELINI, no monitoramento das águas da Represa de Itupararanga, conforme citado no item 4.3.

Em tal estudo, o metamidofós foi detectado tanto na época de seca (meses de junho e julho), quanto nas chuvas (dezembro), sendo inclusive maior o número de resultados positivos em dezembro, bem como quantidades maiores de metamidofós.

Ao se comparar as concentrações de metamidofós encontradas nos afluentes do Rio Sorocaba, verificou-se que as quantidades detectadas foram menores do que as encontradas por VELINI no Reservatório de Itupararanga. Tal fato pode ser explicado pelo regime lântico da Represa, que tende a concentrar não somente a água, mas também outras substâncias que a estejam contaminando. Além disso, é razoável afirmar que a Represa mantenha o metamidofós em regime lântico por tempo suficiente para ser degradado, não atingindo o Rio Sorocaba, uma vez que no monitoramento mensal realizado no presente trabalho, entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011, o metamidofós não foi detectado.

Adicionalmente, os resultados obtidos no presente estudo, no que diz respeito tanto aos locais de detecção do praguicida quanto ao seu aparecimento em ciclos, provavelmente em períodos próximos a sua aplicação, evidenciam o uso do metamidofós na agricultura local, e mais ainda, sugere que as regiões de aplicação estejam concentradas na região de drenagem dos Rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, a montante dos pontos de coletas.

Isso é coerente com dados da literatura que relatam o uso de metamidofós na região, e com dados do SIRAH, que constataram resíduos de metamidofós em frutas, legumes e hortaliças provenientes da sub-bacia do Alto-Sorocaba, culturas essas para as quais o uso do metamidofós não é permitido.

É importante ressaltar que o desenvolvimento de uma metodologia analítica extremamente sensível foi de fundamental importância para a detecção e quantificação do metamidofós nas águas superficiais estudadas, o que permitiu conhecer suas reais condições, no que diz respeito à presença deste composto.

Algumas limitações devem, no entanto, serem discutidas.

O presente estudo fez uma avaliação pontual dos rios estudados, uma vez que foram analisadas amostras coletadas de pontos únicos em seus respectivos leitos. Além disso, devido à indisponibilidade de tempo e recursos, foi realizada tão somente uma análise por mês, durante um ano, sendo que as datas de coleta foram estipuladas aleatoriamente.

Desta forma, os resultados podem não refletir a dinâmica real do metamidofós na região, já que é possível que um monitoramento mais intenso, tanto no que diz respeito à frequência e período total de amostragens, quanto à diversificação dos pontos de coleta, poderia fornecer resultados diferentes e mais significativos, quando considerada a saúde da população local que se utiliza desta água.

Adicionalmente, a Represa de Itupararanga não foi estudada nesta pesquisa, sendo utilizados os dados de outro pesquisador, VELINI, somente como uma aproximação que permitiu discutir e comparar com os resultados obtidos.

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As atividades agrícolas desenvolvidas na região do estudo, bem como os dados da literatura e de monitoramento de alimentos e da Represa de Itupararanga levam a crer que o metamidofós é um agrotóxico amplamente utilizado na região de Sorocaba. Sua alta toxicidade aguda e seus efeitos crônicos somados ao provável uso na região motivaram a realização desta pesquisa.

Levando-se em consideração os recursos disponíveis para o desenvolvimento deste trabalho, os diversificados resultados encontrados na literatura consultada a respeito da eficiência de métodos de pré-concentração das amostras e a indisponibilidade de metodologias analíticas capazes de analisar metamidofós em água, em níveis de traços, foi desenvolvida e validada metodologia analítica adequada para tal.

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.

Foi desenvolvido, então, um método analítico direto de injeção das amostras de água no LC-MS/MS. Para serem atingidos limites de detecção e de quantificação da ordem de partes por bilhão ou partes por trilhão (ppb e ppt, respectivamente), foram otimizadas as melhores condições espectrométricas e cromatográficas, e foi utilizado um volume de injeção maior que o usualmente utilizado na prática laboratorial.

O resultado final desta pesquisa foi a obtenção de um método através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas 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.

Em relação à análise das águas dos rios Sorocamirim, Sorocabuçu, Una e Sorocaba, a presença do metamidofós foi constatada. Isso foi possível somente devido ao êxito no desenvolvimento do método analítico capaz de detectar o metamidofós na ordem de partes por trilhão, permitindo-se conhecer a real condição dessas águas no que diz respeito à presença desse contaminante.

As quantidades encontradas, porém, foram extremamente baixas, ficando na sua maioria, em uma faixa de valores que não pode ser quantificada com segurança. Somente três coletas apresentaram valores superiores ao limite de quantificação do método, sendo uma no rio Sorocabuçu e duas no rio Una.

Foi possível inferir que as regiões de aplicações do metamidofós estão nas áreas de drenagem dos rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, a montante dos pontos de coleta, uma vez que foram obtidos resultados positivos nesses três rios. O metamidofós não foi detectado no ponto estudado do Rio Sorocaba.

A ausência de resultados positivos para metamidofós no rio Sorocaba somada à constatação desta substância em seus afluentes e no reservatório de Itupararanga sugerem que o regime lântico da represa retenha os resíduos deste inseticida até sua completa degradação, considerando-se que, devido às características físico-químicas do metamidofós, ele se mantenha na coluna d'água.

As principais limitações do presente trabalho versam principalmente sobre o tamanho da amostra, uma vez que:

- as amostragens se limitaram a uma frequência mensal;
- a duração total do estudo foi de somente um ano;
- não foi prevista a avaliação das águas da represa de Itupararanga.

Deste modo, foi possível verificar que há uma contaminação dessas águas por metamidofós, e que ela se deu a montante dos pontos de coleta que apresentaram resultados positivos, provavelmente devido ao seu uso agrícola. Nada se pode afirmar a jusante destes pontos.

A presença de metamidofós nos afluentes do rio Sorocaba deve ser vista com cautela pois pode não significar, necessariamente, a existência de um problema de saúde

pública para as populações humanas abastecidas por essas águas, e talvez nem para os ecossistemas locais, sendo necessário um estudo específico de avaliação e análise de riscos para elucidar tais questões..

Sendo assim, o presente trabalho tem um papel fundamental de encorajar o desenvolvimento de outros estudos, na região, visto que algumas questões não foram completamente respondidas, como: a correlação direta entre a quantidade de metamidofós utilizada na atividade agrícola da região e a contaminação desses rios; se a concentração de metamidofós varia ao longo dos seus leitos e se é crescente ou decrescente; a análise de outros agrotóxicos utilizados na região, que também podem estar contaminando as águas superficiais; dentre outras.

7 REFERÊNCIAS*

ANDREY, R. E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: an Introduction**. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Procedimentos para análise toxicológica de produtos agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 27 jul. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

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.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias**. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/m10.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2009.

ASI, M. R. **Solid-phase extraction and chromatographic determination of pesticides in food and water samples**. 2003. 191p. Tese (Doutor em Filosofia em Química) – Institute of Chemistry, University of the Punjab, Pakistan, 2003.

BIOTAGE. Disponível em <http://www.biotage.com>. Acesso em: 16 mai. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. *Biblioteca Virtual em Saúde*. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso: 20 ago 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 53, de 18 de março de 2005. p. 58-63.

BRITO, N. M.; AMARANTE O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecoltoxicol. E Meio Ambiente**. Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROWN, G. K., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B. Wastewater analysis by gas chromatography / mass spectrometry. In Morganwalp, D.W., Buxton, H.T. (eds.). **U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report**. Charleston, p. 431-435, 1999.

BURRUEL, V. R. et al Paternal effects from methamidophos administration in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 165, p. 148-157, 2000.

* Normas da ABNT.

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.

CALORE, E. E. et al. Morphometric studies of cardiac miocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 66, p. 447-450, 2007.

CAPDEVILLE, G. O ensino superior agrícola no Brasil. *R. Bras. Est. Pedag.* Brasília, v. 72, n. 172, p. 220-261, set./dez. 1991.

CASTRO, V. L. S., CHIORATO, S. H. Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorthalonil on the development of suckling rats. **Int. J. Hyg. Environ.-Health**. V. 210, p. 169-176, 2007.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**: relatório técnico. São Paulo: CETESB, 2000 até 2009. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Acesso em: 2010.

CORAZZA, M., MARTINELLI, O. J. Agricultura e questão agrária na história do pensamento econômico. **Teoria e Evidência Econômica**. Passo Fundo, v. 10, n. 19, p. 9-15, 2002.

COUTO, E. As normas e o mercado da horticultura: inserção dos agricultores de Ibiúna (SP) nos circuitos socioespaciais. **Campo-Território: revista de geografia agrária**. São Paulo, v. 3, n. 5, p. 138-161, fev. 2008.

EGYPTIAN Environmental Affairs Agency. **Methamidophos**. S.d. Disponível em: <http://www.eeaa.gov.eg>. Acesso em: 19 ago. 2009.

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, p. 877-885, 2007.

EXTOXNET – Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. **Methamidophos**. United States [s. d.]. Disponível em: <S:\IC\CEAP\NAI\Peritos\camila.cdg\Mestrado\EXTOXNET PIP - METHAMIDOPHOS.htm>. Acesso em: 12 mar. 2009.

FARIA, L. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. 61p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2004.

GEIB S.; GEBERT, S. Extraction of highly polar organophosphorous pesticides from water. **Acta hydrochim. hydrobiol.** V. 34, p. 464-473, 2006.

GIRARD, L. Determantion of acephate and its degradation product methamidophos in soli and water by solid-phase extraction (SPE) and GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry.** V. 84, n. 10, p. 739-748, 2004.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para determinação de resíduos de herbicidas em água e solo de cultivo de arroz irrigado.** 2007. 127p. Tese (Doutorado em Química) – Centro de ciência naturais e exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. United States National Library of Medicine. **Methamidophos.** Betesda [s. d.]. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~7zlnqc:1>. Acesso em: 25 abr. 2009.

IMAPES – Instituto Manchester Paulista de Ensino Superior. **O Rio Sorocaba.** Disponível em: <http://www.imapes.br/WEBFILES/gerso/rio/rio.htm>. Acesso em: 19 jun. 2009.

INGELSE, et al. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** V. 918, p. 67–78, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Documento orientativo 008. Revisão 02, jun. 2007.

IPCS – International Programme on Chemical Safety. **Pesticides Residues in Food.** Foint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues. Methamidophos, 2002. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr10.htm>>. Acesso em: 13 abr. 2009.

JICKELLS S., NEGRUSZ A. **Clarke’s analytical forensic toxicology.** 3 ed. 2008.

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://funpecr.com.br/GMR/year2005/vol4-4/gmr0134_full_text.htm>. Acesso em: 22 ago. 2008.

KLAASSEN, C. D. (editor). **Casarett and Doull’s Toxicology – The basic science of poisons.** Nova Iorque : McGraw Hill, 7 ed., 1309p., 2008.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE).** São Carlos : RiMa, 2004.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos : RiMa, 62p., 2004.

LIMA, F. et al. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: R. ecotoxicol. e meio ambiente**. V. 11, p. 17-34, 2001.

LIMA, F. et al. Análise de resíduos do inseticida metamidofós em soja e determinação final por cromatografia em fase gasosa. **Pesticidas: R. ecotoxicol. e meio ambiente**. V. 13, p. 91-102, 2003.

LIU, et al. Multi-residue analysis of some polar pesticides in water samples with SPE and LC-MS-MS. **Chromatographia**. V. 63, p. 233-237, 2006.

MAJORS, R. E. **Salting-out liquid-liquid extraction (SALLE)**. EUA, 2009. Disponível em: <http://chromatographyonline.finfanalytichem.com>. Acesso em: 15 jan. 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **[AGROFIT] Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 mai. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. **Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento**. Rio de Janeiro : SINITOX, 2007. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 27 ago. 2009.

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.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2009.

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. Carlos, A. em: Perspectivas positivas para a agricultura brasileira. **Gazeta Mercantil**, disponível em <<http://clippingmp.planejamento.gov.br/cadastros/noticias/2009/5/26/perspectivas-positivas-para-a-agricultura-brasileira>>, mai. 2009. Acesso em 14 set. 2009.

MIRANDA, A. C. *et al.* Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 12(1):7, n. 14, p. 7-14, 2007.

MORAES, M. C.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**. V. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOREIRA, J. C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

OGA, S. (Editor). **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo:Atheneu, 2003.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

OLSON, K. R. (Editor). **Poisoning & Drug Overdose**. 5 ed. United States:McGraw-Hill, p. 292-296, 2004.

OMS – Organização Mundial da Saúde / Organização Pan-Americana da Saúde Representação do Brasil. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1997.

PAGANINI, W. S. **A identidade de um rio de contrastes: o Tietê e seus múltiplos usos**. 1 ed. São Paulo : Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2007.

PAGLIUCA, G. et al. Organophosphorus pesticides residues in Italian raw Milk. **Journal of Dairy Research**. V. 73, p. 340–344, 2006.

PASTI, L. et al. GC/MS Analysis of pesticides in the Ferrara area (Italy) surface water: a chemometric study. **Annali di Chimica**. V. 97, p. 359 – 372, 2007.

PATNAIK, P. **A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances**. 3 ed. 2007.

PIHLSTROM, T.; BLOMKVIST, G.; FRIMAN, P.; PAGARD U.; ÖSTERDAHL B. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Anal Bioanal Chem**. V. 389, p. 1773 – 1789, 2007.

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

RODRIGUEZ, R. M. **Estudo da emissão de íons estáveis e metaestáveis (LiF)_nLi⁺ induzida por fragmentos de fissão do ²⁵²Cf**. Dissertação de Mestrado em Física. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2003.

SALLES, M. H. D. et al. Avaliação simplificada dos impactos ambientais na bacia do Alto Sorocaba (SP). **Revista de Estudos Ambientais**. Blumenau, v. 10, n. 01, p. 6-20, jan./jun. 2008.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SARDINHA, D. S. *et al.* Avaliação de balanço anual de cátions e ânions na Bacia do Alto Sorocaba (SP). **Revista Brasileira de Geociências**. Arquivo digital disponível em: <www.sbgeo.org.br>, v. 38, n. 4, p. 730-740, 2008.

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.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. SIGRH - Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos. **Caracterização Geral de UGHRI 10** (Relatório), 2000. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-SMT/258/relsmstseg.pdf>>. Acesso em: 02 mai. 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Madri : McGraw Hill, 5 ed., 1028, 2001.

SMITH, W. S. et al. A bacia do rio Sorocaba: caracterização e principais impactos. **Revista Científica do IMAPES**. Sorocaba, p. 51-57, mai. 2005.

SMITH, F. P. (editor). **Handbook of forensic drug analysis**. USA : Elsevier, 562p., 2005.

SPADOTTO, C. A. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manoel, mai. 2006.

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.

TRAPÉ, A. Z. **Uso de agrotóxicos e a saúde humana**. Workshop tomate na UNICAMP: Perspectivas e Pesquisas. Campinas, mai. 2003.

TREVISAN, L.R.P. **Resíduos de Acefato, de seu metabólito Metamidofós e de Clorotalonil em cultura protegida de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) e**

de campo. 2002. 1p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina. **Extração líquido-líquido**. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br>. Acesso: 13 jul. 2010.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. The determination of organophosphorous pesticides in municipal and industrial wastewater. **Method 1657**. Washington: E.P.A., s.d., 39 p.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Monitoring Strategies for Pesticides in Surface Derived Drinking Water**. FIFRA Scientifica Advisory Panel Briefing Document, Washington: E.P.A., 5 p.

THEIR, H-P.; KIRCHHOFF, J. (Editores). **Manual of pesticide residue analysis**. VCH Wiley – Pesticide comission. German: 1989, 7 p. 2 v. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de>. Acesso em: 29 jul. 2009.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2391-2394, Nov. 2006.

VELINI, E. D. Monitoramento da qualidade da água e concentrações de compostos orgânicos no reservatório de Itupararanga. **Relatório Final**. FEPAF (Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais). Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

VILLARES, G. A.; GOMIERO L. M.; GOITEIN R. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Salminus hilarii Valenciennes 1850* (Osteichthyes, Characidae) em um trecho da Bacia do rio Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci.** Maringá, v. 29, n. 4, p. 407-412, 2007.

WANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, X. Determination of multiclass pesticide residues in apple juice by gas chromatography–mass spectrometry with large-volume injection. **J. Sep. Sci.** V. 29, p. 2330 – 2337, 2006.

WHO – World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. **Methamidophos: Health and Safety Guide**. Geneva, 1993.

YEOH, C. *et al.* Determination of acephate, methamidophos and monocrotophos in crude palm oil. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** V. 108, p. 960–964, 2006.

ANEXO 1

FICHA DE COLETA

LOCAL: _____

DATA: _____ HORA: _____

pH COLETA: _____ pH AJUSTADO: _____

TEMPERATURA: _____

PONTO DE AMOSTRAGEM: _____

PROFUNDIDADE DE AMOSTRAGEM: _____

CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS NAS ÚLTIMAS 24 HORAS:

_____OBSERVAÇÕES: _____

RESPONSÁVEL PELA COLETA: _____



Wanderley da Silva Paganini

possui graduação em Engenharia Civil pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1978), mestrado em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo (1997), doutorado em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo (2001) e livre-docência em saneamento básico e ambiental pela Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo (2006). Atualmente é professor associado da Universidade de São Paulo e Superintendente de Gestão Ambiental da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Tem experiência na área de Engenharia Sanitária, com ênfase em Tratamento de Esgotos, atuando principalmente nos seguintes temas: tratamento de esgotos para pequenas comunidades, disposição de esgotos no solo, saneamento básico, tecnologias de baixo custo, tratamento de águas e gestão ambiental.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 18/04/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/5175772273020198>





Camila Delanesi Guedes

Possui graduação em Farmácia-Bioquímica pela Universidade de São Paulo (2004). Desde 2006 é perita criminal do Instituto de Ciminalística de São Paulo.
(**Texto informado pelo autor**)

Última atualização do currículo em 08/10/2008
Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/9085275191702017>

