



ANÁLISE DE PESTICIDAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADA A CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-EM)

Alvaro Carlos Galdos-Riveros¹, Alicia Greyce Turatti Pessolato¹, Miryam Guillermina Palomino-Rodriguez², Durvanei Augusto Maria³

1. Pós-graduando em Ciências pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (alvarogaldos@usp.br)
2. Pós-graduanda em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
3. Pesquisador Científico, Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

Os pesticidas são usados mundialmente na proteção de alimentos e geralmente para a saúde humana. Com tudo, o uso e desuso excessivo, especialmente em países em desenvolvimento, volatilidade e o transporte a grandes distâncias resultam eventualmente na propagação da contaminação ambiental. O objetivo deste trabalho é a determinação de 12 pesticidas através da análise dos espectros obtidos por GC/MS. Entre os pesticidas encontrados, tem-se os pertencentes aos grupos de trihalometanos e organofosforados. Este estudo apresentou boa precisão o qual será de importância para estudos posteriores sobre pesticidas em amostras biológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Pesticidas, agrotóxicos, saúde humana, alimentos, doenças.

ANALYSIS OF PESTICIDES BY MASS SPECTROMETRY COUPLED GAS CHROMATOGRAPHY (GC-MS)

ABSTRACT

Pesticides are used globally for the protection of food, and more generally for human health. However, their excessive use/misuse, especially in developing countries, volatility and long-distance transport eventually results in widespread environmental contamination. The aim of this work is determination of 12 pesticides by GC/MS. Among the pesticides found, we pertaining to the groups of trihalomethanes and organophosphates. This study showed good accuracy which be of importance for further studies on pesticides in biological samples.

KEYWORDS: Pesticides, human health, food, disease

INTRODUÇÃO

No cenário mundial, a FAO (órgão das nações unidas para a alimentação e agricultura) e o banco mundial foram os maiores promotores da difusão do pacote tecnológico da revolução verde. No Brasil, uma série de políticas levada a cabo por diferentes governos cumpriu o papel de forçar a implementação da chamada “modernização da agricultura”, processo que resultou em altos custos sociais, ambientais e de saúde pública devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos e

pesticidas (LONDRES, 2011).

O ingresso dos agrotóxicos no Brasil esteve vigente até 1989 (quando foi aprovada a lei 7.802), que facilitou o registro de centenas de substâncias tóxicas, muitas das quais já proibidas nos países desenvolvidos (SILVA *et al.*, 2005; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2009). Mas foi na última década que o uso de agrotóxicos no Brasil assumiu as proporções mais assustadoras com venda de quase US\$ 7 bilhões, quando foi alcançada a triste posição de consumidor mundial de venenos. Já em 2009, foi alcançado ainda, um nível maior ainda, que corresponderia a 5,2 Kg de veneno por habitante (LONDRES, 2011).

A maioria dos estudos não considera a interação que os diversos compostos químicos podem estabelecer entre si e os diversos sistemas biológicos orgânicos, sendo que essa interação pode até mesmo modificar o comportamento tóxico de um determinado produto, acarretando efeitos diversos sobre a saúde de grupos de trabalhadores expostos (SILVA *et al.*, 2005). Os pesticidas utilizados com diversos fins são fabricados a partir dos mesmos princípios ativos dos agrotóxicos. Trata-se de carbamatos, piretróides e organofosforados, que provocam os mesmos efeitos negativos sobre a saúde que os agrotóxicos usados no campo (LONDRES, 2011).

Estes pesticidas incluem uma série de organoalogenados persistentes como os inseticidas DDT e seu metabólito DDE, toxafeno, dieldrin, bifenilas. Os pesticidas compreendem um grupo de substâncias produzidas com o objetivo de eliminar um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo. Todos os pesticidas têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Devido à grande diversidade de produtos existentes (somente no Brasil são cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações comerciais diferentes), os pesticidas podem ser classificados de acordo com sua função (inseticidas, herbicidas, fungicidas, algicidas), e com seu poder tóxico. Esta segunda classificação é fundamental para o conhecimento da toxicidade aguda de um determinado pesticida (TOMINAGA; MIDIO, 1999; MANSILHA *et al.*, 2010)

A intensa utilização dos agrotóxicos, o seu potencial tóxico, a persistência no ambiente e acumulação nas cadeias alimentares mostram a necessidade do monitoramento de resíduos nos alimentos e em matrizes ambientais. Atenção especial deve ser dada a água potável, pois o consumo diário de água contaminada com resíduos de agrotóxicos pode causar efeitos tóxicos, como câncer testicular (MCGLYNN; TRABERT, 2012), anencefalia (ALBERTO *et al.*, 2010), gastrosquise (CHABRA; GLEASON, 2005) e danos no sistema renal (ROBBIANO *et al.*, 2004; SIDDHARTH *et al.*, 2012).

A identificação de compostos é realizada através da cromatografia, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura por interação dos seus componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel (CARLOS *et al.*, 2011).

Vários pesticidas, bem como muitos de seus metabólitos, estão comprovadamente relacionados com alterações no sistema endócrino, observadas em estudos envolvendo ensaios *in vitro* e *in vivo*, sobretudo de espécies animais provenientes de ambientes aquáticos (TOMINAGA; MIDIO, 1999). O objetivo deste trabalho é a determinação e verificação de 12 pesticidas através da análise dos espectros obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas GC/MS.

METODOLOGIA

Reagentes e soluções

A partir das soluções estoque individuais, foram preparadas 12 soluções estoque contendo os 12 pesticidas em diversos solventes. Estas soluções foram estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações adequadas.

Amostras

Os pesticidas foram adicionados em frascos de vidro de 44 mL equipados com tampa de teflon e septo de silicone. Estes frascos foram totalmente preenchidos com água milli-Q, evitando a formação de bolhas e mantidos sob-refrigeração, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A extração e análise cromatográfica foram realizadas no mesmo dia da coleta.

Análises cromatográficas

Para determinação dos trihalometanos e dos agrotóxicos organoclorados foi empregado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 2014, com detector por captura de elétrons. As condições cromatográficas de análise foram: temperatura do injetor $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do forno da coluna $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), com rampa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo esta temperatura mantida por dois min e temperatura do detector de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; vazão do gás de arraste (N_2) de $1,2\text{ mL min}^{-1}$ e divisão de fluxo (*split*) de 1:5. A fibra ficou exposta no injetor por 10 min.

Para as análises por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) utilizou-se um equipamento da Shimadzu, modelo GC-2010, com uma coluna Rtx-5MS, Restek (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 mm de espessura de filme). O injetor foi mantido a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, com a razão de divisão de fluxo (*split*) de 1:5. A temperatura do forno da coluna foi mantida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguida de rampas de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e de $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo esta temperatura mantida por dois min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste empregando uma vazão de $1,2\text{ mL min}^{-1}$. A fibra ficou exposta ao injetor durante 10 min.

Para a detecção por espectrometria de massas utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI-70 eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado no modo varredura linear (*scan*) 40-500 *m/z* para identificação dos compostos. A interface foi mantida a $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a fonte de íons a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$

Validação

O método foi validado baseando-se nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade INMETRO,(2003), Agencia Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA (2003), Agencia Reguladora dos Estados Unidos FDA, (2001), e Conferência Internacional em Harmonização ICH, (1996) que estabeleceram critérios de validação de métodos analíticos. Os parâmetros analíticos avaliados foram: precisão, linearidade, faixa de trabalho, seletividade e limites de detecção e de quantificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados os espectros de 12 pesticidas orgânicos em água com seus respectivos tempos de retenção e estão apresentados através das figuras de números 1 a 12. O tempo de análise foi de 10 min. por amostra. Na Figura 1 estão representados os cromatogramas obtidos após análise de água Milli-Q, fortificada com pesticidas (trialometanos, organoclorados).

O maior problema analítico é sempre pela complexidade da matriz (FÜGEL; CARLE; SCHIEBER, 2005) que combinado com outros interferentes potenciais, mas neste estudo não teve este problema porque as amostras foram analisadas por separado.

Os Trihalometanos (THM's) são alguns dos compostos incluídos neste estudo; são organohalogenados que se formam durante o tratamento da água. A razão fundamental da desinfecção no tratamento de água para consumo humano prende-se com a destruição de alguns organismos potencialmente patogênicos e que são responsáveis pelas chamadas doenças hídricas (ALPENDURADA; MOURÃO, 1994). Os desinfetantes mais utilizados são o hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, ozono e cloraminas. Em países como Portugal, que pela facilidade de utilização quer pelo ponto de vista econômico, é o hipoclorito de sódio o composto de eleição para a desinfecção da água destinada ao abastecimento público.

O bromodiclorometano (BDCM) tem sido considerado como possível agente cancerígeno em humanos. Diversos testes *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidade de BDCM deram resultados tanto positivos como negativos. Em testes de genotoxicidade o BDCM induz adenomas e adenocarcinomas renais em ratas de ambos sexos e em camundongos machos, tumores pouco comuns no intestino grosso (pólipos adenomatosos e adenocarcinomas). A exposição a BDCM esta relacionada com um possível aumento de efeitos sobre a reprodução (maior risco de aborto espontâneo) (ROBBIANO *et al.*, 2004; OMS, 2005; SIDDHARTH *et al.*, 2012)

Os pesticidas organoclorados estão presentes em alguns alimentos essenciais da dieta humana como leite (CISCATO; GEBARA; SPINOSA, 2004). Neste estudo foram avaliados o clorobenzeno, etilbenzeno, 1-bromo, 3-fluorbenzeno. Estes pesticidas possivelmente induzem problemas durante a gestação e no parto. Além do efeito sobre o sistema da tiróide nas crianças, que ainda não tem estudos realizados do efeito deste pesticida (FREIRE *et al.*, 2012)

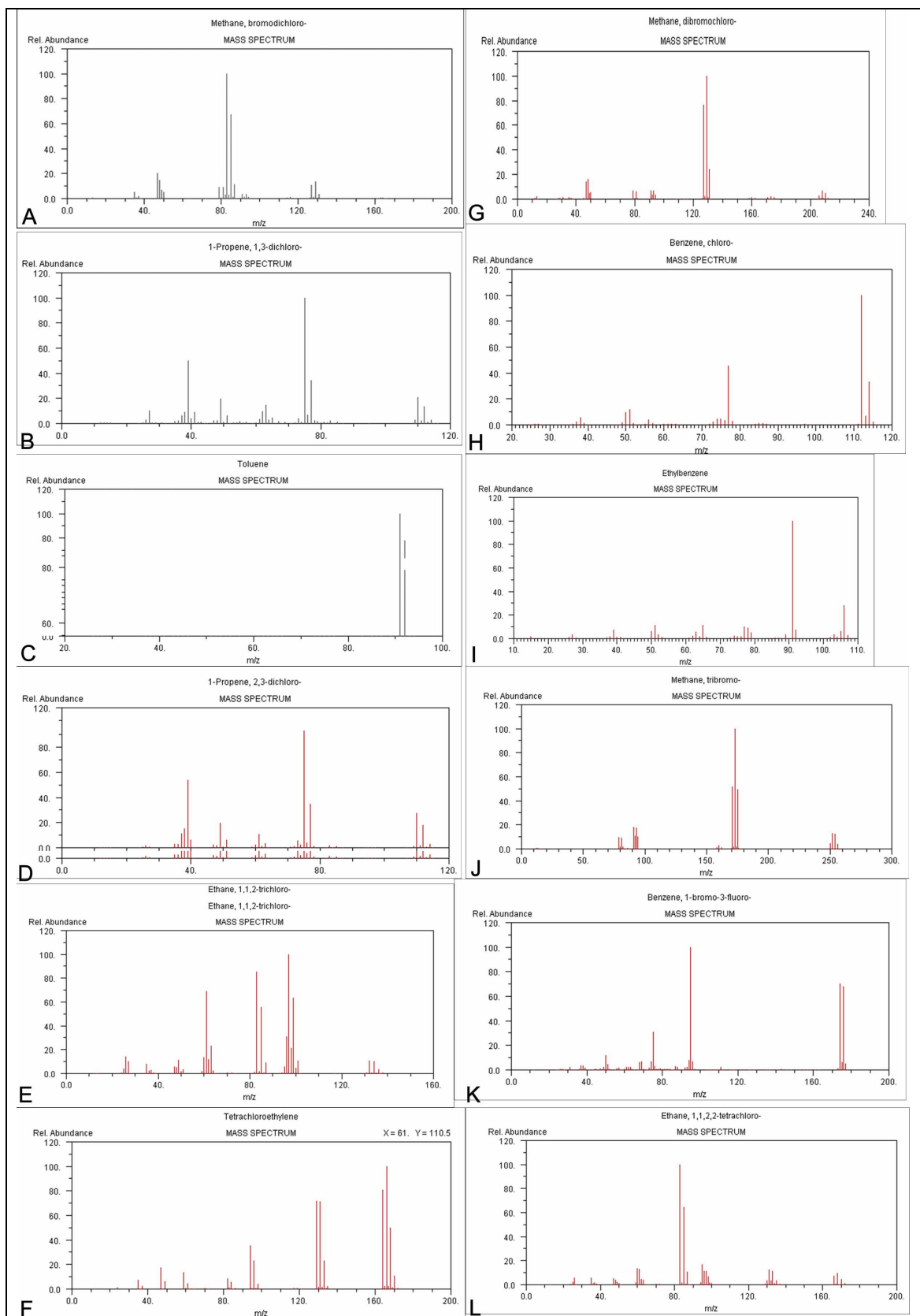
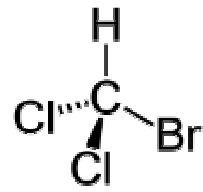


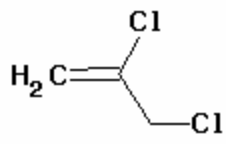


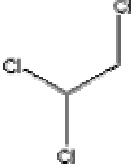
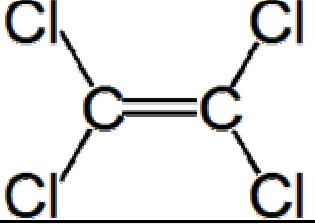
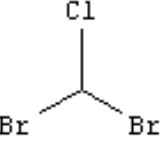
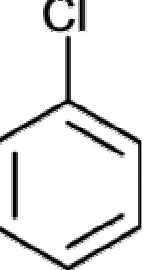
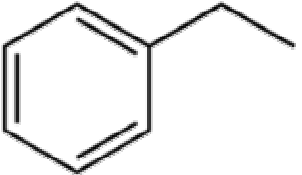
FIGURA 1 - Espectros obtidos dos 12 compostos analisados por CG/MS, pode-se observar: A: Bromodiclorometano; B: 1,3-dicloro-1-propeno ; C: Tolueno; D: 2,3-dicloro-1-propeno; E: 1,1,2-tricloroetano; F: Tetracloretileno; G: Dibromoclorometano; H: Clorobenzeno; I: Etilbenzeno; J: Tribromometano; K: 1-bromo, 3-fluor-benzeno; L: Tetracloreetano.

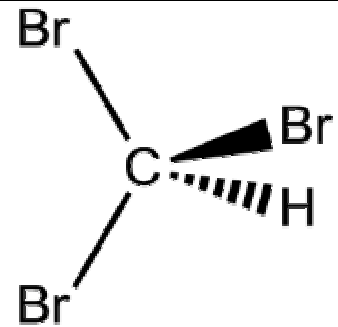
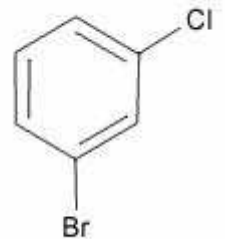
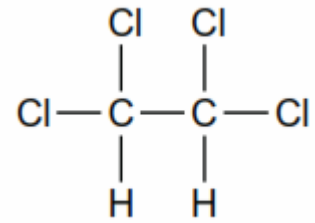
O tolueno é um pesticida que nas últimas décadas tem tornado-se importante porque está relacionado com a saúde do sistema respiratório. FUJIMAKA *et al.*, (2007) estudaram a incidência das concentrações de tolueno do meio ambiente em camundongos e descobriram que a exposição ao tolueno induz resposta inflamatória no tecido pulmonar.

Os efeitos neurotóxicos provocados pela exposição a compostos orgânicos voláteis são bem conhecidos. O tolueno é conhecido como um neurotóxico, embora o mecanismo de suscetibilidade na exposição ainda não tenha sido esclarecido. A exposição a este pesticida pode levar a problemas na pele e no trato gastrointestinal (WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2010)

TABELA 1 Tempos de retenção (t_R) e estrutura química dos compostos analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

Composto	Formula Global	Massa molecular g/mol	Estrutura	t_R (min)
Bromodiclorometano	CHBrCl ₂	163,8		0,35
1,3-dicloro-1-propeno	C ₃ H ₄ Cl ₂	110,9		1,45
Tolueno	C ₇ H ₈	92,1		2,11
2,3-dicloro-1-propeno	C ₃ H ₄ Cl ₂	110,9		2,55

1,1,2-tricloroetano	$C_2H_3Cl_3$	133,4		3,15
Tetracloroetileno	C_2Cl_4	165,8		3,21
Dibromoclorometano	$CHBr_2Cl$	208,3		4,01
Clorobenzeno	C_6H_5Cl	112,6		5,16
Etilbenzeno	C_8H_{10}	106,2		5,40

Tribromometano	CHBr_3	252,7		7,10
1-bromo, 3-fluor-benzeno	$\text{C}_6\text{H}_4\text{BrF}$	175		8,01
Tetracloroetano	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	167,9		8,39

CONCLUSÕES

Neste estudo foi demonstrado o alto rendimento na determinação dos compostos, assim apresentamos alguns dos mais importantes pesticidas usados tanto na agricultura como no cotidiano de cada indivíduo da sociedade. Futuros estudos devem ser desenvolvidos para avaliar a presença destes nos principais alimentos da dieta da população brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**: secondary title. ANVISA, 2003. 899.

ALBERTO, M. V.; GALDOS, A. C. R.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, J. M. Anencefalia: Causas de uma malformação congênita. **Rev Neurocienc**, v. 18, n. 2, p. 244-248, 2010.

ALPENDURADA, M. F.; MOURÃO, M. R. Determinação de trihalometanos na água distribuída no concelho do Porto pelo método de injeção aquosa directa. **Rev. Port. Farm.**, v. XLIV, n. 4, p. 183-187, 1994.

CARLOS, E. A.; NEVES, A. A.; REIS, C.; QUEIROZ, M. E. L. R. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRIHALOMETANOS E AGROTÓXICOS EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA. **Quimica Nova**, v. 34, n. 2, p. 272-278, 2011.

CHABRA, S.; GLEASON, C. A. Gastroschisis: Embryology, Pathology, Epidemiology. **NeoReviews**, v. 6, n. 11, p. 493-499, 2005.

CISCATO, C.; GEBARA, A. B.; SPINOSA, H. S. Resíduos de pesticidas em leite bovino e humano. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 14, n., p. 25-38, 2004.

CONFERÊNCIA INTERNACIONAL EM HARMONIZAÇÃO. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline**: secondary title. Brasil, 1996.

FREIRE, C.; KOIFMAN, R. J.; SARCINELLI, P.; ROSA, A. C.; CLAPAUCH, R.; KOIFMAN, S. Long term exposure to organochlorine pesticides and thyroid function in children from Cidade dos Meninos, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 117, n. 0, p. 68-74, 2012.

FÜGEL, R.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 10, p. 433-441, 2005.

FUJIMAKI, H.; YAMAMOTO, S.; TIN TIN WIN, S.; HOJO, R.; SATO, F.; KUNUGITA, N.; ARASHIDANI, K. Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 2, p. 132-139, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, I. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**: secondary title. Brasil, 2003.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil - um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: RBJA, 2011, v.1. 188 p.

MANSILHA, C.; MELO, A.; REBELO, H.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; DOMINGUES, V.; PINHO, C.; GAMEIRO, P. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. **J Chromatogr A.**, v. 1217, n., p. 6681-6691, 2010.

MCGLYNN, K. A.; TRABERT, B. Adolescent and adult risk factors for testicular cancer. **Nat Rev Urol**, v. 9, n. 6, p. 339-349, 2012.

OMS. **Trihalomethanes in drinking-water**: secondary title. Ginebra: Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/05.08/64). , 2005. 2012.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. **A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente**: secondary title. São Paulo/SP, 2009. 1, 22 p.

ROBBIANO, L.; BARONI, D.; CARROZZINO, R.; MERETO, E.; BRAMBILLA, G. DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. **Toxicology**, v. 204, n. 2-3, p. 187-195, 2004.

SIDDHARTH, M.; DATTA, S. K.; BANSAL, S.; MUSTAFA, M.; BANERJEE, B. D.; KALRA, O. P.; TRIPATHI, A. K. Study on Organochlorine Pesticide Levels in Chronic Kidney Disease Patients: Association with Estimated Glomerular Filtration Rate and Oxidative Stress. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 241-247, 2012.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saude Colectiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposição humana a trihalometanos presentes em agua tratada. **Rev. Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 413-421, 1999.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine**: secondary title. Brasil: FDA, 2001.

WIN-SHWE, T.-T.; FUJIMAKI, H. Neurotoxicity of toluene. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 93-99, 2010.