

VALIDAÇÃO DE MÉTODO EM CG-EM PARA DETERMINAÇÃO DE PROFENOFOS EM ÁGUAS

Ediano Duarte de Lima¹
Railson de Oliveira Ramos²
Christian Patrick Pereira Andriola³
Mário César Ugulino de Araújo⁴
Wilton Silva Lopes⁵

RESUMO

O pesticida organofosforado profenofós (PFF) é um inseticida foliar não sistêmico e acaricida com ampla faixa de aplicações. Nos Estados Unidos este produto é de uso restrito, podendo apenas ser empregado em culturas de algodão. No Brasil é empregado em culturas de amendoim, batata, cebola, café, algodão, ervilha, feijão, pepino, repolho, melancia, soja, tomate e trigo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a molécula de PFF como detentora de toxicidade moderada (Classe toxicológica II) em contato dérmico ou ingestão do produto. A Portaria 2914 de 2011, que estabelece o padrão potabilidade de água, regulamenta o valor máximo permitido de PFF em $60 \mu\text{g.L}^{-1}$, que é uma concentração extremamente baixa em relação às concentrações que podem ser encontradas em mananciais e em solos nas proximidades de locais onde se aplicam este pesticida. O presente estudo apresenta a validação de um método por CG-EM para determinação de PFF em águas. Foram obtidos como resultados: linearidade $R^2 0,9973$, limite de detecção $7,82 \text{ ng.mL}^{-1}$, limite de quantificação $26,09 \text{ ng.mL}^{-1}$, faixa linear $26,09 \text{ ng.mL}^{-1}$ a 1000 ng.mL^{-1} e precisão (CV% médio) 8,5%. Todos os parâmetros validados atendem as preconizações do INMETRO no documento DOQCGCRE-008 de 2006.

Palavras-chave: Profenofós, Pesticidas, CG-EM, Validação de Método.

INTRODUÇÃO

O pesticida organofosforado Profenofós (PFF) é um inseticida foliar não sistêmico e acaricida com ampla faixa de aplicações. Nos Estados Unidos este produto é de uso restrito, podendo apenas ser empregado em culturas de algodão. No Brasil é empregado em culturas de amendoim, batata, cebola, café, algodão, ervilha, feijão, pepino, repolho, melancia, soja, tomate e trigo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a molécula de profenofós como

¹Doutorando em Engenharia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, ediano_duarte@hotmail.com;

²Doutorando em Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, railson_uepb@outlook.com;

³Graduando de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, christian.andriola17@hotmail.com;

⁴Prof. Dr. de Química da Universidade Federal da Paraíba - UEPB, mariougulino@gmail.com;

⁵Prof. Dr. de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, wiltonuepb@gmail.com.

detentora de toxicidade moderada (Classe toxicológica II) em contato dérmico ou ingestão do produto (MALGHANI et al., 2009).

A nomenclatura da molécula do profenofós é *O*-4-bromo-2-clorofenil-*O*-etil-S-propil, com fórmula química descrita por $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$, possui $373,63 \text{ g.mol}^{-1}$ de massa molar. Na Figura 1 a seguir, é possível observar três grupos R distintos, ligados ao fósforo por átomos de oxigênio e enxofre. Um dos três grupos é um anel aromático alogenado, de difícil degradação.

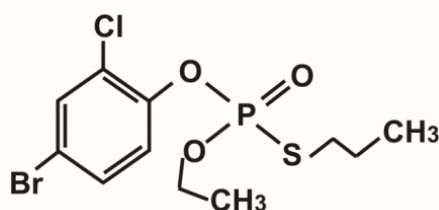


Figura 1: Estrutura molecular do pesticida organofosforado Profenofós. Fonte: (GANI, 1995).

A Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011, que estabelece o padrão potabilidade de água, regulamenta o valor máximo permitido de Profenofós em $60 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esta concentração é significativamente baixa em relação as concentrações que podem ser encontradas em mananciais e em solos nas proximidades de locais onde se aplicam este pesticida. Neste estudo, um método para determinação de PFF em águas por CG-EM foi desenvolvido. Os parâmetros validados foram seletividade, especificidade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e intervalo.

METODOLOGIA

Foi utilizado um Cromatógrafo TRACE 1300 system da Thermo Scientific, acoplado a um Espectrometro de Massas Single quadruple Mass Spectrometer. No preparo dos padrões foi empregado PFF com pureza de 99,999 (Sigma Alderish). Água ultra-pura tipo 1+ ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Master System MS 2000, Gehaka) foi usada no preparo das soluções padrão. As misturas para injeção foram preparadas através da adição de $90 \mu\text{L}$ do padrão em $300 \mu\text{L}$ de metanol. Estas diluições foram realizadas para obtenção das concentrações 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng.mL^{-1} de PFF. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de operação do cromatógrafo gasoso e do espectrômetro de massas.

Tabela 1 - Parâmetros de operação do CG e do EM.

Parâmetros do EM	
Temperatura da linha de transferência do	250 °C
Temperatura da fonte de ionização	200 °C
Modo de Ionização	Impacto de Elétrons
Modo de monitoramento	SIM
Picos monitorados (<i>m/z</i>)	63 e 208
Tempo de corte de solvente	5 min
Parâmetros do CG	
Temperatura de Injeção	200°C
Modo	Splint less
Razão do splint	5
Fluxo da purga	10 ml.min ⁻¹
Gradiente de temperatura da coluna	40 ° (permanece 1 min), subindo até 50° em 20°/min (permanece 2 min), subindo para 150° em 10° por min (permanece 5 min)
Tipo de coluna	5MS, comprimento de 30 m e 0, 25 m de diâmetro.

Parâmetros para validação de método

A determinação da Seletividade/Especificidade foi realizada através do monitoramento dos picos característicos do PFF descritos na literatura, que leva em consideração a razão massa/carga (*m/z*) do mesmo.

A linearidade foi determinada avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração, sendo estabelecida em função da reta de calibração e do coeficiente de correlação.

O método empregado para determinação dos limites de detecção e quantificação foi a construção de 3 curvas de calibração com concentrações próximas ao possível limite de detecção do método.

A determinação da precisão foi realizada através do método da repetitividade (precisão intra-corrída), que avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A certificação do intervalo avaliou se o a concentração limite de PFF para águas de abastecimento público, e 120% deste valor, estão dentro da faixa de trabalho obtida. A portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde descreve que a concentração máxima permitida de profenofos em água de abastecimento público é de 60 ng.mL⁻¹. Neste

sentido, os limites analíticos deste método devem compreender concentrações entre 60 ng.mL^{-1} (valor estabelecido como concentração máxima em águas potáveis) e 72 ng.mL^{-1} (120% de 60 ng.mL^{-1}). Todas as determinações seguiram as preconizações do INMETRO no documento DOQCGCRE-008 de 2006.

DESENVOLVIMENTO

A necessidade de dados analíticos confiáveis, que são garantidos através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, nos permitem evitar conclusões errôneas de vários estudos que nos levam a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação (PEREZ, 2010). O INMETRO no documento DOQCGCRE-008 de 2006 e a ANVISA com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos de 2003, citam os requisitos mínimos para a validação de um método analítico. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, especificidade, linearidade, precisão, intervalo, limite de detecção e quantificação, adequada à análise.

Seletividade/Especificidade

A ANVISA (2003) define seletividade/especificidade como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. É de extrema importância para o desenvolvimento e validação de um método, a verificação da existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método em identificar os analitos de interesse

Este é um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método, uma vez que se a especificidade/seletividade não for assegurada, a linearidade e a precisão poderão estar seriamente comprometidas (BANSAL e DESTEFANO, 2007; CASSIANO et al., 2009).

Linearidade

A linearidade estima-se avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração, sendo estabelecida em função da reta de calibração e do coeficiente de correlação. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) deve ser 0,98 (INMETRO, 2006).

A ANVISA (2003), define linearidade como a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta relação é obtida através de uma expressão matemática bem definida que relaciona concentração do analito na amostra com uma resposta do método de detecção, e pode ser expressa matematicamente pela equação de reta, conforme a Equação 1.

$$y = a x + b \quad \text{Equação (1)}$$

Em que: (y) é a resposta medida (altura ou área do pico), variável dependente; (x) concentração do analito, variável independente; (a) inclinação da curva de calibração (coeficiente angular); (b) intersecção com o eixo y (coeficiente linear).

Precisão

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), conforme a Equação 2.

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 20% (INMETRO, 2006).

Limiares Analíticos: limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limiares analíticos especificam e definem os extremos inferior e superior da curva de calibração. Assim os extremos inferiores correspondem a concentrações que permitem saber quais as capacidades de detecção do respectivo método para esses níveis de concentração, temos os limites de decisão, de detecção e de quantificação. Os limiares analíticos do método são constituídos pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ) (INMETRO, 2006).

O Limite de detecção pode ser calculado com base na relação entre desvio padrão e coeficiente angular da curva de calibração, como apresentado na Equação 3.

$$LD = \frac{Dpa}{Ca} \times 3 \quad \text{Equação 3}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. CA é o coeficiente angular da curva de calibração. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela Equação 4.

$$LQ = \frac{Dpa}{Ca} \times 10 \quad \text{Equação 4}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. CA é o coeficiente angular da curva de calibração (INMETRO, 2006).

Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seletividade/Especificidade

É um parâmetro de validação indireta e pode ser definido como a capacidade de um método analítico para determinar e discriminar inequivocamente o analito em estudo de outros compostos que possam estar presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, excipientes, metabolitos ou outros componentes da amostra (matriz) (CASSIANO et al., 2009). Neste sentido, a determinação desse parâmetro em sistemas analíticos com espectrômetro de massas foi desnecessária, uma vez que, cada analito possui uma razão massa/carga (m/z) característica. Desta forma, componentes diferentes, mesmo que parecidos, não são detectados como um mesmo componente por um espectrômetro de massas.

Linearidade

A Figura 2 apresenta a curva analítica resultante da média de 3 repetições, das leituras dos padrões de profenofos. Foi obtido um coeficiente de correlação linear de 0,9973 para a Equação 5. De acordo com o documento do IMETRO DOQCGCRE-008 de 2006, o valor mínimo requerido para uma linearidade confiável é de 0,98. Desta forma, a curva de calibração obtida está em conformidade com as exigências da ANVISA.

$$y = 2400,2x - 24853$$

Equação 5

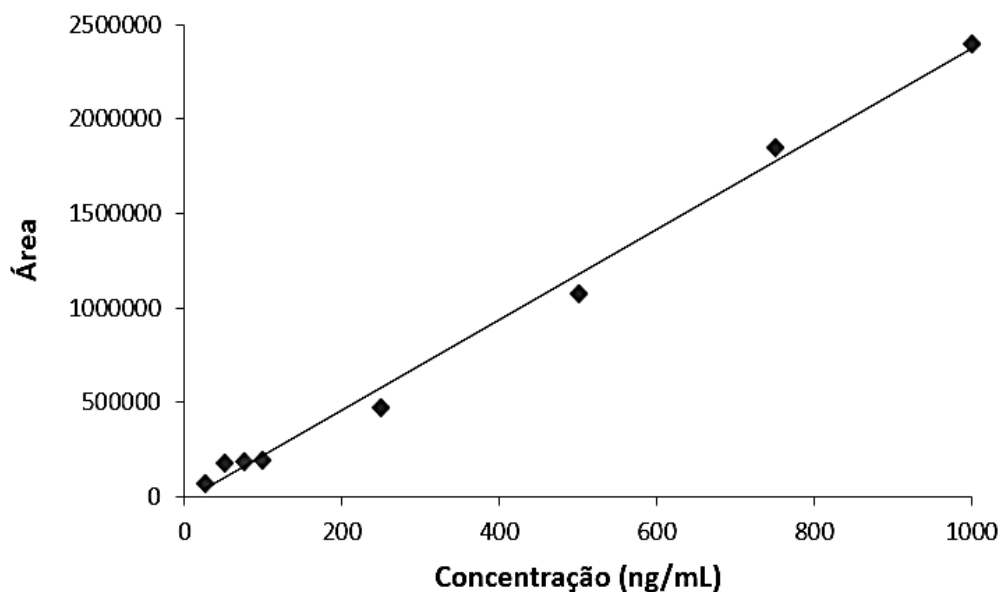


Figura 2: Curva analítica para profenofos por CG-MS.

Precisão

Os padrões em cada nível de concentração foram analisados em triplicata. Os sinal analítica de cada análise, os valores médios obtidos, o desvio padrão entre a resposta das três repetições e os respectivos coeficientes de variação são apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de concentração, área, média das injeções, desvio padrão e coeficiente de variação utilizados na análise da precisão em CG-MS.

Conc. (ng.mL ⁻¹)	Área			Média	Desvio padrão	CV%
	1°	2°	3°			
25	78341	59085	65703	67709,6667	9783,57896	14,44931
50	160330	164857	201279	175488,667	22449,4856	12,79256
75	191017	196668	190697	192794	3358,79547	1,742168
100	204391	184683	186475	191849,667	10898,0089	5,680494
250	547008	435463	486744	489738,333	55832,7528	11,40053
500	1075448	1125447	1124611	1108502	28628,6554	2,582644
750	1778621	2079566	1913271	1923819,33	150749,54	7,835951
1000	2069747	2171058	2565104	2268636,33	261697,894	11,53547

Verificou-se que o valor de CV em cada ponto da reta, obtido pela Equação 1, obedeceu ao limite recomendado documento do IMETRO DOQCGCRE-008 de 2006, que deve ser menor que 20%. O CV médio, que equivale a 8,5%, também atende os limites descritos nesta portaria.

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

Limite de detecção e quantificação

Considerando a menor concentração do padrão analítico de menor concentração (25 ng.mL⁻¹), foram construídas três outras curvas, com padrões de concentração 25, 75 e 100 n. mL⁻¹. A Figura 3 apresenta as curvas obtidas. As Equações 6, 7 e 8 apresentam as correlações entre o sinal analítico e a concentração dos padrões, das curvas A, B e C, respectivamente.

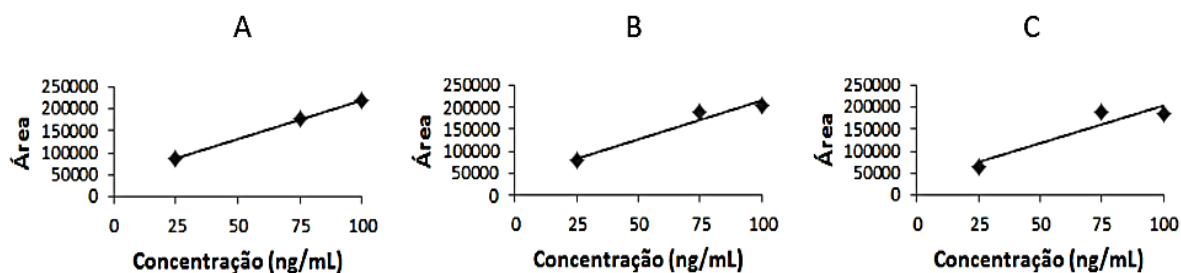


Figura 3: Curvas para determinação dos limites de detecção e quantificação.

$$y = 1758,6x + 44305 \quad (R^2 = 0,999) \quad \text{Equação 6}$$

$$y = 1762,5x + 40416 \quad (R^2 = 0,945) \quad \text{Equação 7}$$

$$y = 1737,4x + 31800 \quad (R^2 = 0,880) \quad \text{Equação 8}$$

Os valores de LD e LQ foram obtidos através das Equações 2 e 3, resultando em 7,82 ng mL⁻¹ para o limite de detecção e 26,09 ng.mL⁻¹ para o limite de quantificação.

Intervalo

A faixa requerida (60-72 ng.mL⁻¹), conforme recomendações do documento do IMETRO DOQCGCRE-008 de 2006, está compreendida na faixa linear de trabalho deste método, que vai do limite de quantificação (26,09 ng.mL⁻¹) até a concentração máxima da curva (1000 ng.mL⁻¹), com R² de 0,99.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de validação em CG-EM para pesticida organofosforado profenofós mostrou-se bastante eficiente, pois todos os parâmetros validados atenderam as preconizações do documento do INMETRO DOQCGCRE-008 de 2006.

O preparo das amostras compreendeu em uma simples dispersão do analito em metanol, de modo que o percentual de água na mistura injetada foi de 3%. Isto representa uma vantagem em relação a outros métodos que envolvem etapas de extração em fase sólida ou técnica de headspace. Mesmo assim, uma maior otimização desse método se faz necessária, pois forneceria ainda mais informações para a detecção e quantificação do analito analisado, representando uma análise mais aprofundada do mesmo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil., Resolução RE nº 899 de 29/05/2003, Brasília (DF), 2003.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **The AAPS Journal**, n. 9, v. 1, 2007.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em Métodos Cromatográficos para a Análise de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

GANI, D.; WILKIE, J. Stereo chemical, mechanistic, and structural features of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 55-63, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento orientativo, DOQCGCRE-008. 35 p., 2011.

MALGHANI, S.; CHATTERJEE, N.; YU, H.; LUO, Z. Isolation and identification of profenofós degrading bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 893-900, 2009.

PEREZ, M. Â. F. Validação de Métodos Analíticos: Como fazer? Por que ela é importante?. **CETEA - Centro de Tecnologia de Embalagem**, v. 22, n. 3, p. 1-9, 2010.

PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011, Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, Ministério da Saúde, Brasília-BR, 2011.