
PROPOSTA PARA UTILIZAÇÃO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO NA IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DO HERBICIDA PARAQUAT,
SEGUINDO OS PASSOS DA VALIDAÇÃO METODOLÓGICA. I PARTE.

PROPOSITION FOR THE USE OF A COLORIMETRIC METHOD FOR IDENTIFICATION AND
QUANTIFICATION OF PARAQUAT,
ACCORDING TO THE STEPS OF VALIDATION METHODOLOGY. I PART.

GABRIEL, P. M. K. C.²; GABRIEL, M. M.¹; LOPES, M.^{1,2}; ESCORSIN, J.²

1. Universidade Federal do Paraná

2. Instituto Médico Legal do Paraná, PR, Brasil

RESUMO

A validação metodológica nas análises toxicológicas tem por objetivo, fornecer maior segurança, credibilidade e assegurar qualidade no trabalho analítico, proporcionando a obtenção de resultados mais confiáveis. A criação de um protocolo de validação de métodos prevê três etapas que são o delineamento experimental, a padronização analítica e o controle de qualidade dos resultados. Este trabalho visa apresentar a primeira etapa do protocolo de validação de métodos é o delineamento experimental, onde inclui a adequação da metodologia às condições laboratoriais, os estudos relativos às propriedades físico-químicas e os dados toxicocinéticos da substância em estudo. Sendo o Paraná um estado agrícola é de grande importância metodologias acessíveis uma vez que a metodologia proposta é mais simples que a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa.

Palavras-chave: paraquat, validação, método de validação

ABSTRACT

The main purpose of method validation in toxicological analysis is to provide assurance, credibility and guarantee quality to the analytical procedure. The development of a validation protocol comprehends three stages, which are the experimental draft, the analytical standardization and the quality control of the results. This paper presents the first stage of the validation protocol, proposed above, including in it, the method adjustment to the laboratory's work conditions, paraquat's physicochemical properties and its toxicokinetic data. Accessible analytical methodologies are very important, and the one presented in this paper is more simple than HPLC and CG

Key words: paraquat, validation, method validation

1 INTRODUÇÃO

O Estado do Paraná localizado na região sul do Brasil, ocupa 199.324 Km²; o que equivale a 2,3% do território brasileiro. Seu setor agrícola constitui a principal atividade econômica do estado¹².

Com uma agricultura diversificada é o principal estado agrícola do país, respondendo por 22,6% da produção nacional de grãos. É importante destacar a supremacia do estado na produção de alguns produtos, pois é o primeiro produtor nacional de milho, feijão, soja, trigo, aveia, e o segundo produtor de mandioca, cevada e batata¹².

Para manter dados satisfatórios na produção de grãos, foi necessária a utilização de uma vasta variedade de praguicidas. Existem cerca de 1200 marcas comerciais de praguicidas em todo o país, mas no Paraná através de legislação específica de órgãos competentes, são liberados ou liberados com restrição cerca de 694 marcas comerciais¹¹.

O acesso fácil a essas substâncias permitem relatos crescentes de intoxicações ocupacionais e mesmo suicidas, por isso, torna-se de grande importância a utilização de metodologias acessíveis para a identificação e quantificação de praguicidas.

As técnicas de grande desempenho como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, possuem um custo elevado para a realidade econômica dos laboratórios forenses, por outro lado a metodologia colorimétrica é mais acessível. Em virtude da grande incidência de intoxicações com o herbicida Paraquat, selecionamos uma técnica colorimétrica que nos permite identificar e quantificar este herbicida³.

Para assegurar a qualidade do trabalho analítico, dar segurança ao analista, visando reduzir erros e auxiliando na descoberta de pontos variáveis no decorrer da análise, decidiu-se aplicar nesta padronização a validação metodológica^{1,2}.

O processo da validação envolve especificações pré-determinadas e atributos onde a qualidade é constante, quando seguimos diretrizes de aspectos gerais como⁴:

- a qualificação das instalações, onde os equipamentos e os sistemas subordinados estão em constante harmonia dentro de limites estabelecidos;
- a qualificação de desempenho, onde se observa que o método é efetivo e reprodutivo;
- a qualificação do método onde se verifica a funcionabilidade e a segurança dos resultados obtidos e acima de tudo a capacitação do analista.

Para que o desenvolvimento da pesquisa seja realizado com sucesso é necessário um protocolo de validação bem definido, ou seja, um plano escrito que relate como a validação será executada. Este protocolo escrito deve especificar

procedimentos e testes a serem realizados, como por exemplo o número necessário de análises realizadas para demonstrar a reprodutibilidade e a variabilidade das análises sucessivas^{1,2,5}.

2 OBJETIVO

A proposta deste trabalho para a pesquisa do herbicida paraquat por método colorimétrico é apresentar a primeira etapa do protocolo de validação que é o delineamento experimental, onde inclui a adequação da metodologia às condições do laboratório, os estudos relativos às propriedades físico-químicas, os dados toxicocinéticos da substância em estudo e a elaboração dos procedimentos operacionais padrões (POPs).

3 DESENVOLVIMENTO

A criação do protocolo de validação de métodos prevê 3 etapas que são o delineamento experimental, a padronização analítica e o controle da qualidade dos resultados^{1,2}.

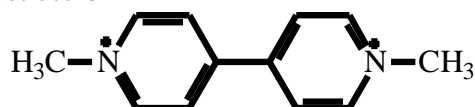
A seguir apresentaremos a primeira parte já desenvolvida do protocolo de validação, o delineamento experimental.

3.1 PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO PARTE I

3.1.1 Delineamento Experimental:

3.1.1.1 Propriedades físico-químicas:

Fórmula estrutural



- PM = 257.18
- sólido cristalino branco, higroscópico e deliquescente.
- Solubilidade: solúvel em água, pouco solúvel em metanol e insolúvel em solventes orgânicos não polares.
- Estabilidade: é estável em soluções ácidas e neutras e decompõe-se em meio alcalino. Sofre decomposição foto-química e microbiológica, promovendo fragmentação molecular, formando diversos compostos como o ácido hidróxi-4-picolínico, a N-formilglicina, o 4,4'-bipiridil, o íon 4-carboxi-1-metilpiridona, oxalato e succinato^{6,7,8,9,10}.

3.1.1.2 Aspectos Toxicocinéticos:

A Absorção ocorre principalmente pela via oral, dérmica e respiratória, esta especialmente em indivíduos que trabalham na aplicação de herbicidas. A absorção oral do paraquat no homem corresponde a cerca de 10 % da dose administrada.

A distribuição do paraquat no organismo humano ocorre de maneira uniforme por todos os tecidos, com maior concentração especialmente nos rins, fígado, pulmões, baço pâncreas, cérebro e músculos^{6,7,8,9}. Exemplo de distribuição do paraquat em mg/g no organismo humano, em três casos fatais de ingestão de aproximadamente 100ml do produto comercial contendo 5 % de paraquat, gráfico 1^{9,10}.

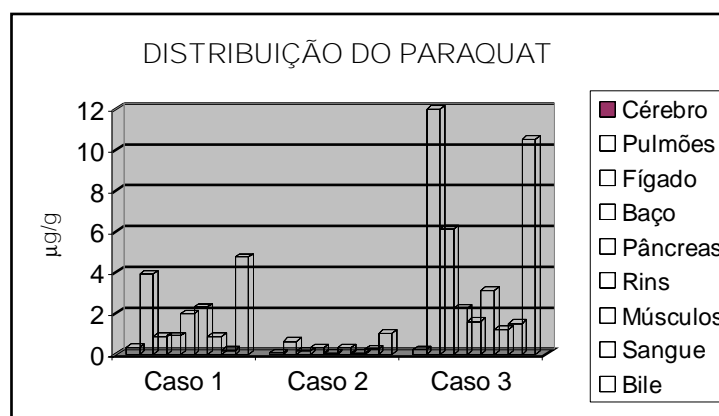


GRÁFICO 1: Distribuição do paraquat

3.1.1.3 Adequação do método às condições do Laboratório:

3.1.1.3.1 Após pesquisa bibliográfica escolhemos o método, levando em consideração os materiais e reagentes já existentes no laboratório;

3.1.1.3.2 Determinamos a metodologia com os parâmetros de validação já desenvolvidos, pois isto facilitará o desenvolvimento do trabalho realizado no laboratório;

3.1.1.3.3 Verificamos que os equipamentos disponíveis no laboratório são compatíveis com os utilizados no método original;

3.1.1.3.4 Adequamos o volume de material biológico utilizado na extração do paraquat:

- método original volume de 1ml, leitura realizada em microcubetas de quartzo³.
- método modificado volume de 5ml, leitura realizada em cubeta padrão de quartzo.

3.1.1.3.5 Preparamos os reagentes: cálculos, verificamos sua estabilidade, acondicionamento e conservação;

3.1.1.3.6 Criação dos procedimentos operacionais padrão (POPs)

Foram desenvolvidos os procedimentos operacionais padrão para:

- recebimento de material biológico suspeito de exposição ao Paraquat;
- para utilização do equipamento UV-1601 PC;
- para preparação de reagentes;
- para extração do herbicida Paraquat do material biológico.

Apresentamos a seguir os procedimentos operacionais padrões desenvolvidos para a metodologia proposta:

a) Procedimento operacional padrão para o recebimento de material biológico suspeito de exposição ao Paraquat:

- material biológico corretamente acondicionado em frasco de vidro, bem tampado, com isolamento para a variação de temperatura e identificado (nome do paciente, data de coleta, local de origem);
- verificar o nome do produto comercial;
- verificar a concentração da formulação;
- verificar nome e concentração de qualquer outro praguicida presente no produto comercial;
- verificar o tipo de formulação utilizada na exposição (líquida, gel ou granular)
- idade do paciente ;
- verificar as circunstâncias da intoxicação (acidental / suicida);
- obter informações sobre a possível quantidade ingerida do produto;
- verificar se houve qualquer tratamento antes da coleta de material biológico (quanto tempo de demora para o início do tratamento, duração, procedimentos).
- tempo de demora entre a última alimentação e a ingestão do produto.

b) Procedimento operacional padrão para a preparação dos reagentes para análise do herbicida paraquat:

- O preparo dos reagentes deve ser realizado semanalmente e mantidos sobre refrigeração;
- Pesar todos os sais conforme a concentração utilizada no método e dissolver cuidadosamente na respectiva quantidade de solvente;
- Algumas soluções são exotérmicas, por isso devem ser preparadas lentamente para evitar acidentes;
- Rotular os frascos colocando o nome da solução , a concentração, a data de preparação, o volume preparado e as iniciais de quem preparou;
- A solução de ditionito sódico 10 % é a única que deve ser preparada no momento da leitura no espectrofotômetro pois é muito sensível.

Obs.: A solução de ditionito sódico alcalino é estável por um período máximo de 3 horas³, mas no decorrer do desenvolvimento do trabalho verificamos uma variação significativa

de perda da atividade dessa solução nas análises com o decorrer do tempo.

c) Procedimento operacional padrão para a extração do herbicida paraquat em material biológico:

- Verificar funcionamento da centrífuga;
- Separar ponteiras, tubos, pipetas automáticas, pipetas graduadas, papel de filtro;
- Aferir os volumes das pipetas automáticas;
- Verificar funcionamento do banho-maria e fluxo de ar;
- A primeira etapa do método deve ser realizada com cautela, pois ocorre a desproteção do sangue com clorofórmio/etanol e sulfato de amônio.
- A etapa seguinte é da evaporação do etanol da camada aquosa em banho-maria fervente com fluxo de ar.
- A extração do paraquat da camada aquosa é feita com o fenol.
- A adição de ditionito sódico alcalino ao extrato fenólico promove a reação colorida;
- O radical azul do paraquat produzido foi determinado diretamente pela medida da absorção da camada fenólica;
- Os reagentes e o material a ser analisado devem estar na temperatura ambiente;

d) Procedimento operacional padrão para a utilização do equipamento UV-1601 PC na análise do herbicida paraquat

- Ligar o computador (110 volts);
- Ligar o espectrofotômetro (220 volts);
- Remover o saco de sílica-gel de dentro da câmara do espectrofotômetro;
- Digitar WIN e aperte ENTER; o acesso ao tutorial UV é automático;
- Auto-chechagem entra em operação com duração de 3,5 minutos;
- Terminada a auto-chechagem, clicar sobre a opção ACQUIRE MODE na barra de menu e selecione a opção *Spectrum*;
- Clicar sobre a opção CONFIGURE na barra de menu e selecione a opção *Loads Parameters*;
- Acertar parâmetros para fazer leitura em 614nm:
 - *Configure*
 - *Parameters*
 - *Recording Range*: 0,000- 1,500
 - *Wavelength*: 380 -700
 - *Scan speed*: *Slow*
 - *Slit Width*: 2,0
 - *Sampling interval*: 0,5
 - Ler 614 nm (*Point Pick*)
- Acertar parâmetros para 2ª Derivativa:
 - *Manipulate*
 - *Transforms*
 - *Order* - 2nd
 - Delta lambda 5,000
 - *Scaling Factor* 1

- Set limites:

Y max. 0,001 min -0,001

X max 647,8 min 477,2

- Point pick : 595/ 613

4 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a criação de um protocolo escrito é o elemento básico para a validação de métodos que visa a qualidade laboratorial, onde os procedimentos realizados garantem a confiabilidade das medidas e facilitam ao analista verificar pontos variáveis dentro de uma pesquisa toxicológica, tornando os resultados mais seguros.

A validação de um método é um processo dinâmico e contínuo que exige do analista disponibilidade de tempo para poder desenvolvê-lo de maneira correta, fundamentando-o nos princípios das Boas Práticas de Laboratório e em legislações específicas destinadas à acreditação de laboratórios. Apesar de ser um processo demorado e difícil, defendemos sua utilização no campo da Toxicologia Forense, pois com a criação do protocolo de validação de métodos tornamos as análises mais seguras e passíveis de serem reproduzidas com segurança por toda a equipe do laboratório, uniformizando procedimentos, análises e resultados.

5 REFERÊNCIAS

1. CHASIN, A. A. M; CHASIN, M. & SALVADORI, M. C. Validação de metodologia em análises toxicológicas. Revista Farm.Bioquim. Univ. S. Paulo, v.30, n.2, p. 49-53,1994.
2. CHASIN, A. A. M; NASCIMENTO, E. S; RIBEIRO-NETO, L. M; SIQUEIRA, M. E. P. B; ANDRAUS, M. H; SALVADORI, M. C; FERNÍCOLA, N. A. G; GORNI, R. & SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Revista Brasileira de Toxicologia. v.11, n1, p.1-6, 1998.
3. MATSUOKA, T; OKUDA, J. *Extraction and quantitation of paraquat and diquat. from blood. Forensic Science International.* v. 62, p. 179-186, 1993.
4. FDA, *Guideline on General Principles of process Validation*, maio 1987. www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm
5. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION /INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. *Guide* 25. 3ªed. Geneve, 1990.
6. GOLDFRANK, L; FLOMENBAUM, N; LEWIN, N; WEISMAN, R; HOWLAND, M; HOFFMAN, R. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies.*5ª ed. Connecticut Appleton & Lande, 1994
7. ELLENHORN, M; SCHONWALD, S; ORDOG, G; WASSERBERGER, J. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* 2ª ed.Williams & Wilkins.
8. LEIKIN, J; PALOUCEK, F. *Poisoning & Toxicology Compendium.* Lexi-Comp Inc.Hudson ,Ohio.
9. LARINI, L. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole ,1999.
10. LARINI, L. Toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Manole ,1997
11. SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ – www.pr.gov.br/seab/agrotóxico.
12. SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ - www.pr.gov.br/seab/codopar