

DIVULGAÇÃO DE METODOS

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ apresenta, neste número, normas e métodos adotados num de seus Serviços — Serviço de Química Aplicada da Divisão de Bromatologia e Química — e sob sua inteira responsabilidade.

Este Serviço espera contribuir para a divulgação de tais métodos, atendendo ao mesmo tempo, às muitas solicitações que lhe são feitas e contornar alguns problemas que surgem da necessidade da atualização em certas áreas especializadas, em constante desenvolvimento.

A técnica apresentada é a da *Pesquisa e Determinação de Pesticidas Clorados em Alimentos*.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EM ALIMENTOS *

DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A presença de quantidades mínimas de substâncias tóxicas e persistentes em alimentos, provindas do uso dos pesticidas ou defensivos agropecuários (ou da contaminação de solos, águas, plantas e animais, pelos mesmos), trouxe nova preocupação à Bromatologia.

Resíduo de pesticida em alimentos

Entende-se por resíduo de pesticida qualquer substância remanescente das usadas no controle de pragas e doenças, na produção, transporte, armazenamento, mercado e elaboração de alimentos; estão incluídas as substâncias relacionadas àquelas por processos de degradação ou metabolismo. Não se incluem os antibióticos, fertilizantes e reguladores de crescimento. As quantidades são expressas em partes por peso de substância por milhão de partes de alimento (ppm).

Resíduo não intencional

Quando o resíduo provém de circunstâncias não ligadas ao emprego de pesticidas na produção e proteção de alimentos, ele é um resíduo não intencional.

Dose diária aceitável

É a quantidade expressa em mg de substância por kg de peso corpóreo, que, usada durante toda a vida de um indivíduo, não apresentaria risco apreciável à sua saúde — em face dos fatos conhecidos e estudados até o momento.

Limites para os resíduos de pesticidas

Baseados nos conhecimentos da ação toxicológica dos diferentes pesticidas e na dose diária aceitável, foram estabelecidos limites para os resíduos de pesticidas em alimentos:

Tolerância — É o máximo de concentração do resíduo de pesticida permitida no alimento, num estágio específico de sua produção, armazenamento, transporte, mercado e preparação até o consumo. A concentração é expressa em partes por peso de resíduo de pesticida por um milhão de partes em peso do alimento (p.p.m.).

Limite prático — É considerado um limite prático de resíduo de pesticidas no alimento o máximo de resíduo não intencional que ele pode apresentar.

Lembrando que esses estudos são feitos com animais e/ou homens em experiências onde não se tem todas as variáveis de influência no efeito toxicológico, eles podem sofrer revisão e, muitas vezes são *temporários*, até um resultado de experiências a maior prazo.

A determinação de resíduos de pesticidas em alimentos constitui, pois, um tipo particular de análise em que há diversificação muito grande nos dois aspectos — o de alimentos e o de pesticidas. Por outro lado, trata-se de analisar quantidades muito pequenas de uma substância (10^{-9} g) contidas em produtos que são por si próprios misturas complexas.

O desenvolvimento da cromatografia em fase gasosa, resolveu parte do problema pois tornou possível a determinação de quantidades de substâncias na ordem de nanogramas. Ela é, entretanto, a fase final de todo um processo analítico que se inicia na amostragem e tem seu ponto crítico na extração dos resíduos, variando esta, não só em função da amostra, como do tipo de resíduo em questão.

Amostra

Deverá ser válida, representativa e suficiente.

* Elaborado por Walkyria H. Lara, Chefe da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

A amostragem tem grande significado. Conhecendo-se o histórico da mesma, pode-se escolher o método a ser empregado; não se conhecendo nada sobre a mesma, tem-se que escolher entre diferentes possibilidades e não se tem um método geral aplicável a todos os casos.

Amostra subjetiva — Considera-se amostra subjetiva a que é ligada a um conhecimento prévio, isto é, tomada sabendo-se qual o pesticida a ser determinado como resíduo.

Amostra objetiva — É a que é tomada ao acaso, sem nenhuma indicação de qual seja o resíduo de pesticida.

Classificação dos pesticidas

Numa classificação química podemos separar os compostos usados como pesticidas em duas grandes classes:

Natureza inorgânica — como os compostos de arsênico: arsenitos de Cu, Na, Ca; arseniados de Ca, Pb, Cu; compostos de cobre: sulfato, oxiclurato; compostos de enxofre: poli-sulfato de Ba, Ca; etc.

Natureza orgânica — como os derivados de petróleo: óleo mineral; compostos naturais: Piretro, Rotenona, Nicotina; carbidretos clorados: DDT, BHC, Aldrin, Heptacloro, Clordana; ésteres fosforados: Paration, Malation Diazinon, TEPP, Fosdrin, Ronel; carbamatos: Ziran, Maneb, Carbaril, Baygon; produtos vários: triazinas, nitrofenóis, derivados de clorofenoxiacético, etc.

É fácil compreender a diversificação de métodos necessários para a análise desses compostos todos. Há, entretanto, aspectos comuns nos vários métodos, principalmente nos empregados para os compostos orgânicos.

Estes aspectos se referem à extração do princípio ativo, purificação do extrato, concentração do extrato, determinação do princípio ativo:

Extração do princípio ativo — É feita com solventes, de acordo com a amostra e com o princípio a ser extraído; a extração pode ser:

- A frio, direta, por imersão.
- Com desidratantes (Na_2SO_4).
- Maceração com um ou mais solventes.
- Com extratores tipo Soxhlet.
- Codestilação.

A grande dificuldade na extração é a formação de emulsões o que torna a recuperação muito baixa. A maioria dos métodos diminui esse efeito utilizando Na_2SO_4 anidro ou processos de codestilação, geralmente álcool isopropílico.

Purificação do extrato — Como sempre é extraído material estranho ao princípio ativo (corantes vegetais, proteínas) é necessária a purificação do extrato, a qual pode ser feita por:

- Partição entre solventes — para gordura e corantes.
- Cromatografia de coluna — com Florisil, alumina, Celite, celulose, carvão ativo.
- Tratamento químico.
- Codestilação.

Concentração do extrato — Pode ser feita por evaporação do solvente em:

- Banho de vapor de água com ou sem arraste de gás.
- Pressão reduzida e rotação.
- Com concentradores tipo Kuderna-Danish.

Determinação do(s) princípio(s) ativo(s) — São usadas técnicas de:

Espectrofotometria — Ultra-violeta, Visível e Infra-vermelho.

Cromatografia — Em papel, camada delgada, gás.

Método múltiplo — Um método é assim chamado quando pode levar à determinação de toda uma série de resíduos de pesticidas.

Método confirmatório — Sempre é necessário confirmar os resultados obtidos por intermédio de outro método, chamado então *confirmatório*. Assim, quando se usar cromatografia em fase gasosa, podem-se confirmar os resultados por cromatografia em camada delgada, espectrometria de massa, ou infra-vermelho.

O método usado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz está baseado no método descrito no "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.", 11 ed. 1970, e em outros descritos no "Guide to the Analysis of Pesticide Residues" do U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1965.

MÉTODO GERAL PARA PESTICIDAS ORGANOCORORADOS

Princípio

A amostra é extraída com solvente. Aliquota dos extratos é diluída e os resíduos de pesticidas são extraídos com éter de petróleo. Segue-se uma purificação dos extratos por cromatografia em coluna de Florisil e eluição com misturas de éter etílico e éter de petróleo. Após concentração, os eluatos são usados para a determinação e identificação dos resíduos, por cromatografia em fase gasosa.

Material

- Homogeneizador de alta velocidade ou equivalente (liquidificador).
- Colunas cromatográficas de vidro com torneira de Teflon e placa porosa, de 22 mm de diâmetro interno por 300 mm de altura.
- Concentrador Kuderna-Danish, de 500 ml, com receptores de tubos graduados de 5 ml.
- Coluna Snyder ou coluna de Vigreux.
- Funis de separação de 1.000 e 125 ml, com torneira de Teflon.
- Cromatógrafo com detector de captura de elétrons (fonte de trítium ou níquel) provido com coluna de vidro com 10% de DC-200 em Cromosorb WHP, ou 2,5% de QF-1 e 2,5% de DC-200, em Varaport 30, 80-100 mesh.

As colunas devem ser condicionadas a 250-260°C, durante 48 horas, com fluxo de nitrogênio de cerca de 100 ml/min.

Reagentes

Todos os solventes devem ser purificados e a destilação final feita em aparelho todo de vidro. Devem também ser testados da seguinte maneira:

Evaporar 300 ml de reagente em um concentrador tipo Kuderna-Danish com coluna de Vigreux até 5 ml; destes, injetar 5 microlitros no cromatógrafo nas condições de análise. Não deve aparecer nenhuma defle-

xão maior que 1 mm, na linha de base, de 2 a 60 minutos após a injeção.

a) Acetonitrila

Acetonitrila técnica pode ser purificada: adicionar a 4 l de acetonitrila 1 ml de H_3PO_4 mais 30 g de P_2O_5 e destilar entre 81-82°C.

b) Acetonitrila saturada com éter de petróleo.

Saturar Acetonitrila (item a) com éter de petróleo redestilado.

c) Álcool etílico -- p.a.

d) Éter de petróleo --- redestilado entre 30-60°C.

e) Éter etílico --- redestilado a 34-35°C. Livre de peróxidos. Adicionar álcool até 2%.

f) Florisil — 60/100 mesh ativado a 650°C.

Aquecer por 5 horas a 130°C antes de usar. Conservar em dessecador à temperatura ambiente. Reaquecer a 130°C cada dois dias.

Preparar soluções de padrões de 1 a 4 $\mu g/ml$ em hexana. Testar cada lote de Florisil ativado, colocando 1 ml da mistura de padrões numa coluna preparada e eluir como indicado em: Purificação (clean up) — p. 131. Concentrar os eluatos e determinar por cromatografia em fase gasosa, a recuperação conseguida.

g) Sulfato de sódio — anidro, granulado.

Preparação da amostra e Extração

1. Frutas e legumes

a) Frutas firmes, raízes e legumes de folhas — Picar e bater no liquidificador uma amostra representativa, homogeneizar e proceder como em b.

b) Frutas moles — Se necessário retirar o caroço e picar uma amostra representativa. Pesar 100 g da amostra picada e colocar no liquidificador.

Adicionar 200 ml de acetonitrila e cerca de 10 g de Celite. Bater 2 minutos a alta velocidade. Filtrar por sucção através de um funil de Buchner. Transferir o filtrado para um cilindro graduado e anotar o volume obtido. Transferir o volume medido para um funil de separação de 1000 ml.

- c) Frutas e outros produtos contendo 5 a 15% de açúcar — Adicionar 200 ml de acetonitrila e 50 ml de água a 100 g da amostra, no liquidificador, e bater durante 2 minutos a alta velocidade. Continuar como em *b*, obtendo um volume de cerca de 250 ml (medir exatamente antes de transferir para o funil de 1000 ml).
- d) Frutas e outros produtos contendo 15 a 30% de açúcares (por ex.: uvas) — Aquecer a 50°C a mistura de 200 ml de acetonitrila e 50 ml de água. Adicionar a 100 g da amostra no liquidificador, e proceder como em *b*. Antes de os extratos esfriarem, transferir o volume medido para um funil de separação de 1000 ml. Deixar esfriar a temperatura ambiente.

Extrair com 100 ml de éter de petróleo adicionados ao funil de separação contendo o volume dos extratos (A). Agitar 2 minutos vigorosamente. Adicionar 10 ml de solução saturada de cloreto de sódio e 600 ml de água. Manter o funil em posição horizontal e agitar 30-45 segundos. Deixar separar as camadas. Desprezar a camada aquosa. Lavar com duas porções de 100 ml de água a camada de solvente. Transferir a camada de solvente para um cilindro graduado e medir o volume (B). Adicionar 15 g de sulfato de sódio anidro e agitar vigorosamente. (Não deixar o extrato ficar mais de uma hora em contacto com sulfato de sódio, pois ocasionará perdas por absorção). Concentrar a 5 ml no concentrador Kuderna-Danish. Transferir para a coluna de Florisil ("Clean up").

Nota: Levar em conta a contração do volume, no caso de amostras com 85% de água, usando a fórmula:

$$P \frac{A}{T} \times \frac{B}{100} = n.^{\circ} \text{ de gramas da amostra no eluato}$$

P = n.º de gramas da amostra

A = ml do filtrado

T = total (volume de água na amostra mais ml de acetonitrila adicionado)

B = ml de extrato em éter de petróleo em que os resíduos foram particionados.

Quando 50 ml de água são adicionados à acetonitrila para extração de produtos com açúcar, o volume T é acrescido de 45.

2. Alimentos contendo gordura

- a) Óleos e Gorduras — Quando sólidos aquecer até liquefazer e filtrar através de filtro seco.
- b) Manteiga — Aquecer a 50°C até separar a gordura e decantar através de filtro seco.
- c) Leite — Adicionar a 100 ml de leite (leite evaporado deve ser diluído 1+1 com água) em um frasco de centrífuga de 500 ml, 100 ml de álcool metílico e 1 g de oxalato de sódio. Adicionar 50 ml de éter e agitar vigorosamente 1 minuto. Adicionar 50 ml de éter de petróleo e agitar 1 minuto. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 15 minutos. Retirar a camada de solventes e colocar em um funil de separação de 1000 ml contendo 500-600 ml de água e 30 ml de solução saturada de cloreto de sódio. Re-extrair a camada aquosa do frasco de centrífuga duas vezes, com porções de 50 ml de éter etílico e éter de petróleo (1 + 1), centrifugando e retirando a camada de solventes para o funil de separação após cada extração.

Adicionar água ao funil. Desprezar a camada aquosa. Lavar a camada de solventes com duas porções de 200 ml de água, desprezando a camada aquosa. (Se houver formação de emulsão, adicionar cerca de 5 ml de solução saturada de cloreto de sódio à camada de solventes).

Passar a solução dos solventes através de uma coluna de 25x50 mm de sulfato de sódio anidro e coletar o eluato em um bequer de 400 ml. Lavar a coluna com pequenas porções

de éter de petróleo. Reunir ao bequer de 400 ml. Evaporar em banho-maria sob uma corrente de Nitrogênio, afim de obter a gordura.

d) Queijo — Colocar 25 a 100 g (o correspondente a 3 g de gordura) da amostra picada em um liquidificador. Adicionar 2 g de oxalato de sódio, 100 ml de álcool metílico e bater 2 a 3 minutos. Transferir para um frasco de centrifuga de 500 ml. Adicionar 50 ml de éter, agitar um minuto. Adicionar 50 ml de éter de petróleo e agitar mais um minuto. Continuar como em c a partir de "centrifugar a 1.500 r.p.m."

e) Conservas de carne — Homogeneizar a amostra, retirando toda a gordura aderente ao recipiente. Peser 120 g de amostra em bequer de 600 ml. Adicionar 20 g de sulfato de sódio anidro granulado, misturando até homogeneizar. Adicionar 100 ml de éter de petróleo. Agitar. Aquecer ligeiramente a 50°C. Transferir a camada etérea para outro bequer e repetir a extração com 2 porções de 100 ml de éter de petróleo. Evaporar os extratos obtidos a 50°C em corrente de Nitrogênio, até que todo o éter evapore. Deixar à temperatura ambiente a gordura obtida.

Partição com Acetonitrila — Transferir 3 g de gordura para um funil de separação de 125 ml com o auxílio de éter de petróleo (o volume total não deve exceder 15 ml). Adicionar 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Agitar vigorosamente um minuto. Deixar as camadas se separarem. Transferir a camada de acetonitrila para um funil de separação de 1000 ml contendo 650 ml de água, 40 ml de solução saturada de sulfato de sódio, e 100 ml de éter de petróleo. Extrair a solução em éter de petróleo, no funil de 125 ml com três porções de 30 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo, agitando vigorosamente um minuto, em cada vez. Reunir todos os extratos ao funil de separação de 1000 ml. Manter o funil de 1000 ml em posição horizontal e agitar por 30-45 segundos. Deixar as camadas se separarem e transferir a camada aquosa para um segundo funil de separação de 1000 ml. Adicionar 100 ml

de éter de petróleo ao segundo funil e agitar vigorosamente 15 segundos. Deixar as camadas se separarem. Desprezar a camada aquosa e transferir a camada de éter de petróleo ao primeiro funil. Lavar com duas porções de 100 ml de água. Desprezar as camadas aquosas. Transferir a camada de éter de petróleo através de uma coluna de sulfato de sódio anidro de 25x50 mm, para o concentrador Kuderna Danish. Lavar o funil e depois a coluna com três porções de 10 ml de éter de petróleo. Reunir ao éter de petróleo no concentrador. Evaporar a cerca de 5 ml.

Purificação (Clean-up) em coluna de Florisil

Preparar uma coluna de 22 mm de diâmetro interno com Florisil ativado, de modo a ter cerca de 10 cm de altura após sedimentar. Colocar cerca de 1 cm de sulfato de sódio granulado sobre o Florisil. Umedecer a coluna com 40-50 ml de éter de petróleo. Transferir os extratos de éter de petróleo (ou o concentrado obtido na partição com acetonitrila) para a coluna, deixando passar à razão de 5 ml por minuto. Eluir com 200 ml de uma solução a 6% de éter etílico em éter de petróleo, na mesma razão de 5 ml por minuto, recolhendo em frasco receptor. Trocar o receptor e eluir com 200 ml de solução a 15% de éter etílico em éter de petróleo.

Concentrar cada um dos eluatos em concentrador Kuderna-Danish até 5 ml.

O primeiro eluato, de 6%, contém os pesticidas clorados: Aldrin, BHC, DDE, o, p' e p.p', DDT, Eptacloro, Eptacloroepóxido, Lindana e Metoxicloro. Geralmente está pronto para cromatografia em fase gasosa mas, se for necessário, poderá ser repetida a purificação usando nova coluna de Florisil. O segundo eluato, de 15%, conterá Dieldrin e Endrin. Se for necessário, deverá ser purificado em coluna de magnésio ou saponificação..

Técnicas de concentração — Usar banho de vapor para aquecimento. Após atingir cerca de 5 ml remover o tubo calibrado do concentrador e evaporar sob corrente de nitrogênio. Nunca evaporar os extratos purificados até a secagem.

Deteção e Identificação

Injetar uma alíquota conveniente (3 a 5 microlitros) do eluato concentrado, no cromatógrafo, nas condições otimizadas previamente, para se ter a separação dos picos correspondentes aos pesticidas. Identificar os picos obtidos por comparação dos tempos de retenção com os dos padrões. Para medida de área, cromatografar o padrão (ou padrões) imediatamente após cada amostra e procurar ter os picos do padrão e da amostra o mais possível de tamanhos iguais.

As condições de operação, quando se usa uma coluna 2,5% de DC-200 e 2,5% QF-1 são: temperatura do injetor — 200°C; temperatura da coluna — 190°C; temperatura do detector — 200°C, fluxo de nitrogênio — 30 ml por minuto.

A identificação deve ser confirmada, usando outro tipo de coluna e comparados os tempos de retenção obtidos nessa outra coluna para os padrões e a amostra.

Relacionamos abaixo, publicações ligadas ao assunto e periódicos onde constantemente são publicadas modificações e novos métodos para determinação de resíduos de pesticidas.

Publicações de interesse geral

BARRY, H. C.; HUNDLEY, J. G. & JOHNSON, L. Y. — Pesticide analytical manual. Washington, 1969. v. 1 e 2. U. S. Dept. of Health, Education and Welfare.

BURCHFIELD, H. P. — Guide to the analysis of pesticide residues; 2nd. ed. Washington, Govt. Print Off., 1965.

CHICHESTER, C. O. — Research in pesticides. New York, Academic Press, 1965.

FREAR, D. E. H. — Pesticide index. 4th ed. Pennsylvania, College Science Publishers, 1969.

METCALF, R. L. — Advances in pest control research. New York, Interscience Publishers, 1957-68.

O'BRIEN, R. D. — Insecticides. Action and metabolism. New York, Academic Press, 1967.

SPENCER, E. Y. — Guide to the chemical use in crop protection. 5th ed. Canadá Dept. Agriculture, 1968. [Public. 1093]

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION — Evaluations of some pesticide residues in food. Genève, WHO, 1968. [FAO/PL 1968/M/9/: WHO/FOOD/ADD/ 69.36]

ZWEIG, G., ed. — Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives. New York, Academic Press, 1963-67. v. 1-4.

Periódicos

Analytical Chemistry

Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique

Annali dell' Istituto Superiore di Sanità

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Chromatography

Food and Cosmetics Toxicology

Food Technology

International Pest Control

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Journal of Chromatography

Journal of Chromatography Sciences

Journal of the Association of Official Analytical Chemists

Journal of the Science of Food and Agriculture

Pesticides Monitoring Journal

Residue Reviews

The Analyst

World Reviews of Pest Control.

Recebido para publicação em 5 de agosto de 1971.