

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS E DO SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO PIRIDINOL EM TOMATE

CAROLINE S. PRUDENCIO¹, RICARDO AUGUSTO DE OLIVEIRA², CAROLINA LOURENCETTI³

¹ Graduanda em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Matão, carolprudencio@outlook.com

² Graduanda em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus Matão, ricardooli1999@gmail.com

³ Docente (Doutora em Química), IFSP, Câmpus Matão, carollourencetti@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 5.07.01.05-3 Toxicologia e Resíduos de Pesticidas em Alimentos

Apresentado no 10º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP 27 e 28 de novembro de 2019- Sorocaba-SP, Brasil

RESUMO: Clorpirifós (CP), com uso permitido para tomate rasteiro, foi reportado em tomate de mesa no último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos da ANVISA (2013-2015). Além do risco do CP, seus produtos de degradação, como o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), apresentam risco à saúde humana. Este trabalho, como continuidade de um projeto já desenvolvido, visa comparar os adsorventes celite, bagaço da cana de açúcar e carvão ativo para a purificação do extrato em método de determinação de CP e TCP em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Diferentes massas dos adsorventes (15, 30, 40, 18 e 120 mg) foram usadas após a extração por sonicação de 20 g de tomate triturado e fortificado (~1 mg/kg) com acetonitrila (10 mL), ácido acético (0,2 mL) e os sais MgSO₄, C₂H₃NaO₂ e NaCl. O uso do carvão ativado foi inviável. A recuperação do TCP foi satisfatória (70 e 120%, RSD < 20 %) quando celite (15, 30 e 120 mg) e bagaço (40 mg) foram empregados. Melhor recuperação para o CP foi obtida para 40 mg de ambos adsorventes, 65 ± 1,2 % (celite) e 60 ± 3,4 % (bagaço).

PALAVRAS-CHAVE: agrotóxico; tomate; CLAE-DAD; método analítico.

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD TO DETERMINE CHLORPYRIFOS AND ITS DEGRADATION PRODUCT PYRIDINOL IN TOMATO

ABSTRACT: Clorpirifós (CP), with allowed use for ground tomato, was reported in table tomatoes in the last report from the ANVISA' Program on Pesticide Residues Analysis in Food (2013-2015). In addition to the risk of CP, its degradation products, such as 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) present a risk to human health. This work, as a continuation of a project already developed, aims to compare the adsorbents celite, sugarcane bagasse and activated carbon for the purification of the extract in determination method of CP and TCP in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by high performance liquid chromatography with diode array detection. Different amount of adsorbents (15, 30, 40, 18 and 120 mg) were employed after sonication extraction of 20 g of ground and fortified tomatoes (~ 1 mg / kg) with acetonitrile (10 mL), acetic acid (0,2 mL) and salts MgSO₄, C₂H₃NaO₂ and NaCl. The use of activated carbon was not suitable. TCP recovery was satisfactory (70 and 120%, RSD <20%) when celite (15, 30 and 120 mg) and bagasse (40 mg) were employed. Better recovery for CP was obtained for 40 mg of both adsorbents, 65 ± 1.2% (celite) and 60 ± 3.4% (bagasse).

KEYWORDS: pesticide; tomato; HPLC-DAD; analytical method

INTRODUÇÃO

No Brasil, utilizam-se intensamente os agrotóxicos para manter as altas taxas da produção agrícola. Em virtude do potencial tóxico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que administra e controla a utilização de agrotóxicos considerando o risco à saúde humana, desde o seu modo de aplicação até aos limites máximos de resíduos (LMR), criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos (PARA) para avaliar os níveis de agrotóxicos nos alimentos que chegam à mesa do consumidor (ANVISA, 2019a). No último relatório do PARA, período de 2012 a 2015, averiguou-se irregularidades em diversos alimentos, dentre eles, o agrotóxico clorpirifós (CP) em tomate de mesa (*Solanum lycopersicum* L.), sendo que seu uso é permitido apenas em tomate rasteiro (LMR = 0,5 mg/kg) para uso industrial (ANVISA, 2019b, 2019c). Esses resultados são preocupantes, principalmente quando se leva em consideração que os produtos de degradação do CP, como o piridinol (TCP), apresentam maior potencial tóxico (PENG et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos simples e eficientes, que priorizem dados de validação como precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação dessas substâncias são fundamentais. Adsorventes como carvão ativado e terra diatomácea (HERTZOG et al., 2015) para a purificação dos extratos para posterior determinação cromatográfica tem sido apresentados na literatura. O uso do bagaço da cana de açúcar tem sido estudado para a remoção de corantes (GITA, 2017) e avaliado como adsorvente para o preparo de amostra de tomate para análise cromatográfica (SILVA, LOURENCETTI, 2018). Este trabalho tem como objetivo comparar os adsorventes celite, bagaço da cana de açúcar e carvão ativado para a etapa de purificação do extrato em método de determinação de CP e TCP por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD).

MATERIAL E MÉTODOS

As condições cromatográficas obtidas para o cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo (CLAE-DAD, Prominence Liquid Chromatograph 20A, da marca Shimadzu, software LC Solution) para separação, identificação e quantificação do CP e TCP consistiram de coluna C8 (BDS Hypersil 150 mm, 4 mm diâmetro interno e 5 µm tamanho da partícula e 120 Å tamanho do poro, Thermo Scientific), fase móvel, vazão de 0,5 mL/min, com modo de eluição gradiente iniciando com acetonitrila:água (H₂O a 0,02% de ácido acético) na proporção 60:40 (v/v), alterando para 40:60 (v/v), de 0 a 7 min, 10:90 (v/v) de 7 a 10 min, mantendo essa condição até o tempo 15 min, com alteração para 60:40 (v/v) entre 15 e 18 min e permanecendo nessa condição para equilíbrio até o tempo 25 min. Essas condições foram obtidas após a variação da proporção dos solventes, porcentagem de ácido acético e vazão da fase móvel, o que totalizou 12 condições avaliadas. A quantificação e confirmação dos picos cromatográficos do CP e TCP foram feitas a partir do comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) identificados no espectro de absorbância dos picos de CP (288 nm) e TCP (299 nm) dos cromatogramas obtidos a partir de injeções no CLAE-DAD de soluções padrão preparadas a partir de padrões do clorpirifós (99,7%, Fluxa Pestanal[®]) e do piridinol (99,5%, Fluxa Pestanal[®]) em acetonitrila (grau HPLC, Tedia). As curvas de calibração nestes comprimentos de onda e o estudo da linearidade do equipamento também foram obtidos.

Como continuidade do trabalho de Silva e Lourencetti (2018), estudo de adição e recuperação foram realizados com amostra de tomate orgânico da espécie Italiano, da marca Caisp[®] – Orgânicos com nível de fortificação correspondente a duas vezes o LMR do CP para tomate rasteiro (0,969 mg/kg para CP e 0,996 mg/kg para TCP). Cerca de 0,5 kg de amostra de tomate foi limpa com detergente neutro, seca com papel toalha, triturada em um liquidificador industrial (6 L) e mantida em recipientes de alumínio devidamente fechada e identificada até as análises. O procedimento de extração (20 g amostra) e purificação avaliado (modificado de Silva e Lourencetti (2018) (Figura 1) consistiu de extração com acetonitrila (10 mL) e ácido acético (0,2 mL) na presença dos sais sulfato de magnésio (6 g), acetato de sódio (1,5 g), e cloreto de sódio (1,5 g). Após homogeneização em vórtex (30 seg), extração por sonicação (20 min, 40 kHz) e centrifugação (10 min, 9000 r.p.m), a fase orgânica foi transferida para um balão de 10 mL, sendo o volume ajustado com acetonitrila. Em seguida, retirou-se uma alíquota (1 mL) a qual foi adicionada em um tubo Falcon (15 mL) contendo os adsorventes em diferentes quantidades: celite e bagaço de cana de açúcar (15, 30, 40, 80 e 120 mg) e carvão ativado (40, 80 e 120 mg). Os tubos contendo o extrato e adsorvente foram agitados em vórtex (30 seg), centrifugados (10 min, 9000 r.p.m) e os extratos filtrados com filtro PTFE hidrofílico de 45

µm, 13 mm de diâmetro e os analitos determinados por CLAE-DAD. A quantificação dos analitos foi feita usando-se como referência o extrato da amostra controle, para cada condição experimental testada, fortificado com a mistura dos padrões antes da injeção no CLAE-DAD. A eficácia das condições avaliadas foi averiguada utilizando os valores das porcentagens de recuperação e desvio padrão relativo obtidos do estudo de adição e recuperação das amostras fortificadas (n = 2).

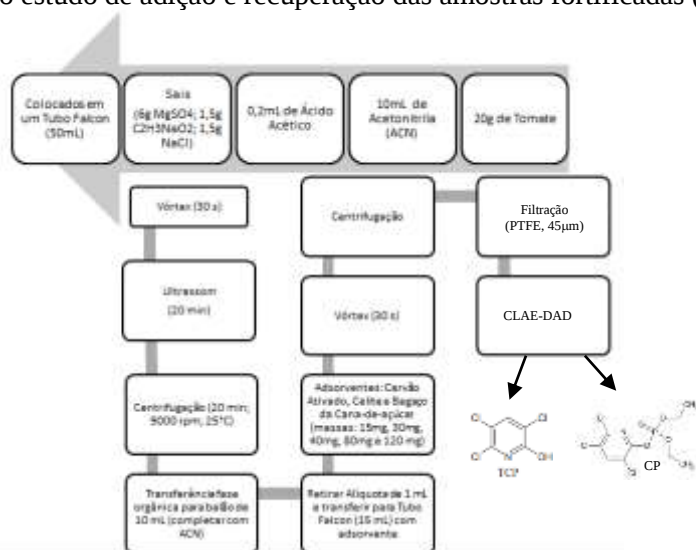


Figura 1. Esquema do procedimento experimental para determinação do CP e TCP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de calibração foram construídas a partir do programa de edição de planilhas Microsoft Office Excel, utilizando os valores de concentrações das soluções padrões e as áreas dos picos cromatográficos nos comprimentos de onda de 288 nm (CP) e 299 nm (TCP), obtendo-se coeficiente de determinação maior do que 0,9989 no intervalo de trabalho de 0,25 a 15 mg/mL para o CP e 0,25 a 8 mg/mL para o TCP.

O uso dos sais para a extração dos analitos foi fundamental para permitir a recuperação dos mesmos, pois com o aumento da força iônica do sistema, diminui-se a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa, favorecendo passagem destes para a fase orgânica. Já o uso do meio ácido, devido a diminuição da polaridade do TCP, permitiu a sua extração para a fase orgânica (nenhuma recuperação havia sido obtido em meio neutro). O uso da fase ácida para a fase móvel possibilitou o aumento da interação do TCP com a coluna cromatográfica, diminuindo assim a possibilidade de coeluição com coextrativos do tomate. O uso do carvão ativo não resultou em recuperação dos analitos. Apesar de ter apresentado o extrato mais claro e cromatogramas mais “limpo”, eliminando maior quantidade de coextrativos, a sua alta área superficial resultou na retenção dos analitos.

A recuperação do TCP foi satisfatória, enquadrando-se nas porcentagens de recuperação aceitáveis (entre 70 e 120%) e desvio padrão relativo menor do que 20 %, de acordo com recomendação de Thier e Zeumer (1987), quando celite (15, 30 e 120 mg) e bagaço de cana de açúcar (40 mg) foram utilizados (Figura 2). Melhores porcentagem de recuperação para o CP foram obtidas quando 40 mg de ambos os adsorventes foram usados, 65 % (1,2%) para celite e 60 % (3,4%) para bagaço de cana de açúcar. A filtração dos extratos das condições que receberam a adição das massas 80 mg e 120 mg de bagaço de cana de açúcar (Figura 2-B) não resultou em volume suficiente para a determinação cromatográfica devido à retenção pelo material sólido.

Comparando-se os cromatogramas obtidos com o uso dos adsorventes celite (Figura 3) e bagaço de cana de açúcar (Figura 4) para o uso da massa 40 mg (melhor resultado de recuperação para o CP), pode-se averiguar que, ao se comparar os controles fortificados com as amostras fortificadas, observa-se que o adsorvente celite apresenta picos melhor resolução cromatográfica em comparação ao bagaço de cana (Figura 4). Foi observado também que o bagaço de cana apresenta coextrativos na região de tempo entre 10 a 15 min, que provavelmente se originam do próprio bagaço.

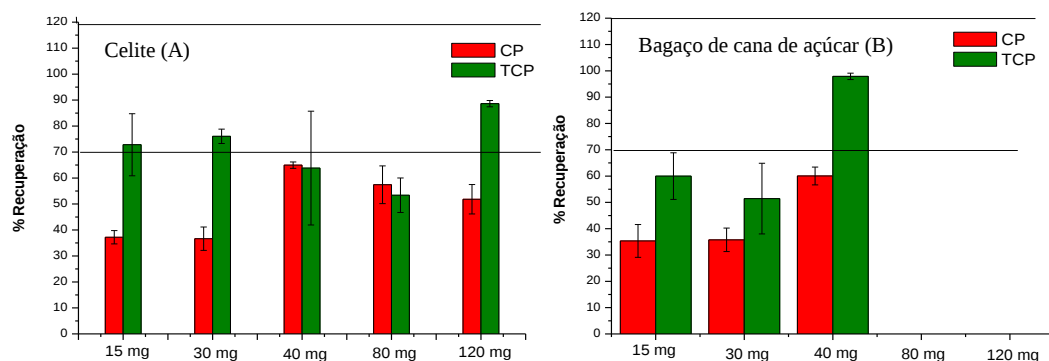


Figura 2. Porcentagem de recuperação para clorpirifós (CP) e piridinol (TCP) utilizando celite (A) e bagaco e cana de açúcar (B) como adsorventes.

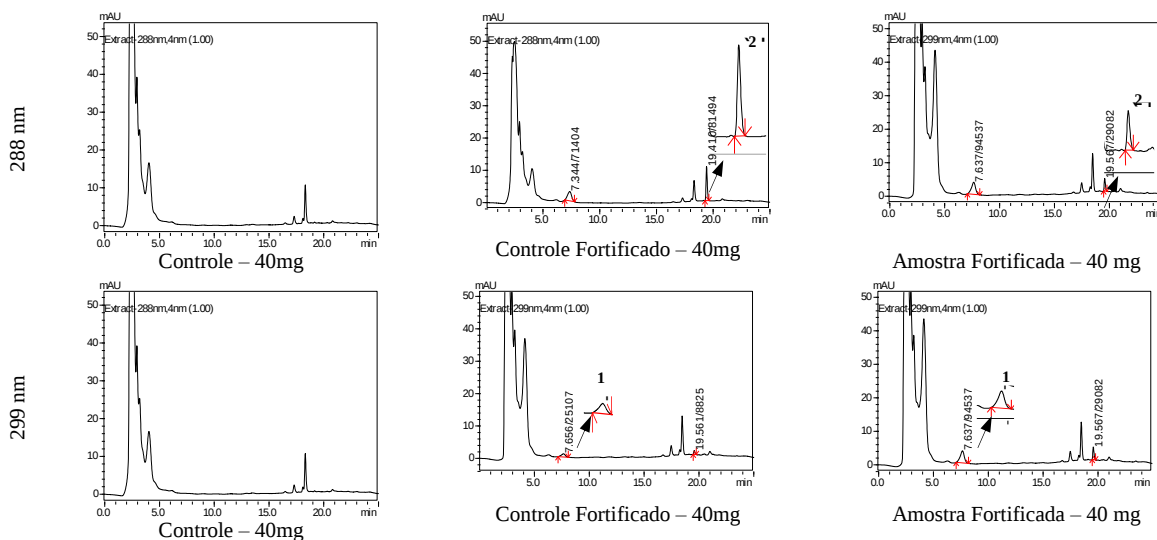


Figura 3. Exemplos de cromatogramas da condição experimental utilizando celite como adsorvente (40 mg) para a purificação do extrato. 1-TCP ($\lambda_{\max} = 299$ nm). 2-CP ($\lambda_{\max} = 288$ nm).

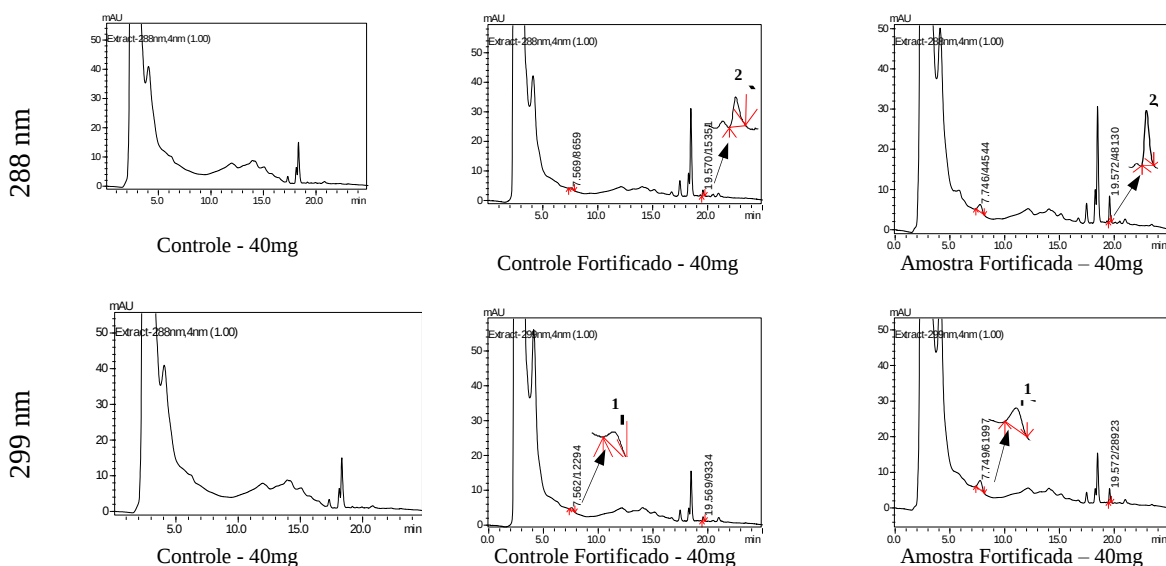


Figura 4. Exemplos de cromatogramas da condição experimental utilizando bagaco de cana de açúcar como adsorvente (40 mg) para a purificação do extrato. 1-TCP ($\lambda_{\max} = 299$ nm). 2-CP ($\lambda_{\max} = 288$ nm).

Outras condições experimentais serão avaliadas empregando menor porcentagem de acidez do solvente extrator, o que pode ter resultado na baixa recuperação do CP. O uso do bagaço de cana de açúcar continuará sendo avaliado e comparado com celite devido ao seu baixo custo e fácil obtenção. Resultados satisfatórios para esse adsorvente, seguido da validação e aplicação do método para amostras reais poderão demonstrar a sua aplicação como um adsorvente mais acessível para o preparo de amostras para análises cromatográficas.

CONCLUSÕES

Através da realização deste trabalho concluiu-se que o uso dos sais e meio ácido são importantes para a extração do produto de degradação TCP. Entretanto, novas condições necessitam ser consideradas para melhorar a recuperação do CP. O uso do carvão ativo se faz inviável, pelo fato deste absorver completamente o analito, mas resultados satisfatórios foram obtidos utilizando celite e bagaço de cana de açúcar como adsorvente, demonstrando a viabilidade da continuidade deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

IFSP – Instituto de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo - Câmpus Matão pela infraestrutura disponível e bolsa PIBIFSP. Aos técnicos do laboratório.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Temas de agrotóxicos da AR 2017/2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/2017-2020/agrotoxicos>>. Acesso em: 02. jul 2019a.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-deagrotoxicos-para>>. Acesso em: 02. jul 2019b.

ANVISA. Monografias autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em 02. jul 2019c.

GITA, S.; SHUKLA, S. P.; CHOUDHURY, T. G.; PRAKASH, C.; SINGH, A. R. A prototype of novel agro-waste based column bed device for removal of textile dye Optilan Red. Water Science and Technology, v. 76, n. 5, p. 1251-1260, 2017.

HERTZOG, G. I.; SOARES, K. L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Study of vortex assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 407, n. 16, p. 4793-4803, 2015.

PENG, et. al. Determination of organophosphorus pesticides and their major degradation product residues in food samples by HPLC – UV. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, p. 19409 –19416, 2016.

SILVA, S. A. S.; LOURENCETTI, C. Estudo das condições experimentais para determinação de clorpirifós em tomate por CLAE-DAD. In: 9º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP. Boituva – SP, 2018. Anais eletrônicos [...]. Disponível em: <<http://ocs.ifsp.edu.br/index.php/conict/9-conict/paper/view/4695/873>>. Acesso em: 02 jul 2019.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. Manual of pesticide residue analysis. New York: Verlag Chemie, 1987. 433 p.