

Eficiência e Viabilidade de adaptações em métodos analíticos para investigação de Endosulfan- α em mel por CG- μ ECD

Efficiency and feasibility of adjustments in analytical methods for Endosulfan - α research into honey by GC- μ ECD

Kaíque Mesquita Cardoso¹, Paloma Silva Oliveira², Ésio de Castro Paes³, José Soares dos Santos² e Maria Lúcia Pires dos Santos²

¹ Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG - *Araçuaí*), Fazenda do Meio Pé da Serra, S/N, BR 367, km 278, Araçuaí – MG.

² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB – *Vitória da Conquista*), Estrada do Bem Querer, km 4 - B. Universitário, Vitória da Conquista -BA

³ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB – *Cruz das Almas*), Centro, R. Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas – BA.

Resumo

Objetivou-se neste trabalho verificar a eficiência de métodos analíticos adaptados para a determinação de Endosulfan- α em mel por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, diagnosticando as alterações nos parâmetros analíticos e dispêndios utilizados. Para tal, baseou-se em métodos descritos na literatura, sendo esses modificados com o propósito de economizar gastos. Estudaram-se dois métodos, um com extração somente líquido-líquido e outro em com a extração posterior em fase sólida. Observaram-se alterações no processo de validação metodológica, todavia não comprometeram a qualidade dos métodos. As adaptações permitiram uma maior economia de reagentes e materiais.

Palavras-chave: Cromatografia, pesticida, organoclorado, resíduo.

Abstract

The objective of this article was to verify the efficiency of analytical methods adapted for the determination of Endosulfan - α in honey by gas chromatography with electron capture detector, diagnosing changes in analytical parameters and expenditures that was used. To this, was based on methods described in the literature, these modified in order to save costs. Two methods were studied, one with only liquid-liquid extraction and the other at the rear with solid phase extraction. Changes were observed in the methodological validation process, but did not compromise the quality of the methods. The adaptations have allowed greater economy of reagents and materials.

Keywords: Chromatography , pesticide, organochlorine, residue.

Introdução

Os defensivos agrícolas são utilizados em práticas agrícolas atuais para garantir a produtividade de determinadas culturas. Contudo, o seu uso descontrolado pode causar a contaminação do ambiente e dos alimentos [1]. A classe dos organoclorados estão entre os grupos de pesticidas mais perigosos, uma vez que possuem a capacidade de bioacumulação e persistência no meio [2].

Neste contexto, o mel é um produto natural bastante consumido no mundo, devido a propriedades nutritivas e medicinais que apresenta. Sua utilização perpassa as mais diversas aplicações que vão desde a fabricação de distintos alimentos até o indício de poluição e impactos ambientais.

A contaminação ambiental pode ser entendida durante o processo de coleta do néctar e pólen pelas abelhas. Esses insetos, ao entrarem em contato com diversas partículas, microrganismos e produtos químicos presentes no ar e em espécies florísticas visitadas, podem carregar para a colmeia tais poluentes. Dessa forma, o mel e outros produtos da colmeia, podem ser utilizados como bioindicadores de impacto ambiental, fornecendo por exemplo, informações sobre o uso dos agrotóxicos nas áreas próximas [3].

Apesar dos benefícios que trazem os pesticidas, com o aumento ou a segurança na produção dos alimentos, há muito tempo o uso frequente de agrotóxicos na agricultura vem despertando a atenção frente à questão da potencial presença de resíduos dessas substâncias nos alimentos e no ambiente. Deste modo, devido aos riscos que podem implicar a saúde humana, a comercialização e distribuição de alguns organoclorados no Brasil foram proibidas desde 1985 [4]. Porém, devido a sua persistência no meio ambiente, estes compostos ainda são detectados em alimentos, sendo muito estudados. Apresentam alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e alta resistência à degradação química e biológica [5].

Vários métodos são relatados para a determinação de diversos pesticidas em mel. Entretanto, essas análises de agrotóxicos são difíceis e onerosas, pois se trata de uma matriz complexa pela presença de pigmentos, açúcares e outros compostos [1]. Assim, a cromatografia gasosa surge como um instrumento capaz de detectar e quantificar diversos compostos em uma matriz, de maneira rápida, segura e sensível. Por ser uma técnica de extrema sensibilidade, a cromatografia necessita de processos de extração eficientes na eliminação de interferentes e conservação do analito.

Diversos detectores têm sido analisados e empregados em separações cromatográficas [6]. O detector de captura de elétrons é interessante para análises de pesticidas clorados, devido a sua seletividade a haletos [7]. É considerado extremamente sensível e apresenta a vantagem de não alterar as amostras [8]. O objetivo deste trabalho foi verificar as oscilações nos parâmetros analíticos, provocados pelas adaptações de métodos descritos na literatura, com o propósito de tornar mais viáveis as análises de organoclorados em amostras de alimentos como o mel, através da cromatografia a gás utilizando um detector de captura de elétrons.

Material e Métodos

A instrumentação utilizada foi um cromatógrafo a gás, Perkin Elmer, modelo Clarus 500, com detector de captura de elétrons e coluna de separação capilar de cobre, com 30 metros de comprimento e 0,25 milímetros de diâmetro interno. O solvente utilizado foi acetona grau HPLC (Vertec) e o padrão de Endosulfan-Alfa 99,6% de pureza (Sigma-Aldrich).

Para a otimização instrumental do sistema cromatográfico utilizou-se o solvente puro com adição do padrão. Primeiramente foi preparada uma solução-estoque do padrão do agrotóxico de 10 mg L⁻¹, em seguida uma solução-mãe a 1 mg L⁻¹ e posteriormente soluções de trabalho para injeção no aparelho em concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹, sendo injetado 1,5 µL. As condições operacionais do cromatógrafo foram: Nitrogênio como gás de arraste (fluxo 1,75 mL min⁻¹); Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura da coluna de separação programada inicialmente com 100°C, aumentando 25°C por minuto até atingir 280°C, permanecendo assim até o final da corrida; Temperatura do detector: 300°C; Vazão do gás makeup: 28 mL.

Em relação a validação dos métodos, desenvolveram-se figuras de mérito propostas pela legislação como: seletividade, linearidade da curva analítica, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação). Utilizaram-se dois métodos com extração diferentes, sendo o método A: Extração líquido-líquido e o método B: Extração em fase sólida.

A preparação do método A, baseado no método de extração para organoclorados proposto por Marciel (2005) [9] consistiu-se na pesagem de 10 gramas da amostra em erlenmeyer, onde foi adicionado 50 mL de diclorometano grau HPLC (Vertec) e com o auxílio de um bastão de vidro, agitou-se manualmente por 2 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em um kitassato com auxílio de papel filtro nº 45.

Passado o processo anterior, lavou-se o erlenmeyer com 30 mL de diclorometano, filtrado e adicionado ao filtrado anterior. Levou-se ao evaporador rotativo à vácuo com temperatura de 40°C. O resíduo foi recolhido com 10 mL de acetona grau HPLC (Vertec), novamente filtrado com filtro de seringa (25 mm de diâmetro e 0,2 micrômetro de diâmetro de poro) e então analisado por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons.

Para o método B baseou-se nos métodos de extração proposto por Rissato et al. (2007) [3] e Tsipi et al. (1999) [2]. A priori foi fundamentada por uma metodologia líquido-líquido e em seguida realizou-se a extração em fase sólida (SPE). Na extração (líquido-líquido), pesou-se 12 gramas de mel em erlenmeyer, adicionou 40 mL de metanol-água (70:30 v/v) (Merck KGaA), homogeneizou em agitador magnético por 10 minutos e acrescentou mais 50 mL de metanol-água, constituindo o extrato da amostra a ser utilizado na extração SPE. Para a extração em fase sólida utilizaram-se cartuchos C18 condicionados com 10 mL de metanol e 5 mL de água. Em seguida passou-se 26 mL do extrato da amostra prosseguida pela secagem do cartucho ao ar por 20 minutos, sendo a eluição realizada com 3 mL de hexano (Vertec). Por fim, repassou-se o hexano a fim de eluir completamente o analito e só assim analisado por CG-ECD.

Estudou-se a eficiência do método analítico pelos parâmetros de validação, mostrando a qualidade através das medições analíticas, sendo eles a linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade), exatidão (recuperação) e seletividade. A viabilidade inferiu-se pelo estudo dos dispêndios obtidos em uma análise, sendo eles: quantidade de amostra requerida, volume total dos solventes orgânicos utilizados, gás de arraste e extrato da amostra.

Resultados e Discussão

Eficiência

O tempo total da corrida analítica foi de 9,45 minutos, com o tempo de retenção do analito em 8,33 minutos para ambos os métodos. Todos os parâmetros utilizados no processo de validação se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Valores dos parâmetros utilizados no processo de validação dos métodos originais e adaptados.

Parâmetros de Validação	Método A	Método B	Marciel, 2005	Rissato et al., 2005	Tsipi et al., 1999
Faixa linear	0,01 – 0,2	0,02 – 0,2	0,05 – 1,6	0,01 – 2,0	0,0002 – 0,04
Linearidade (r)	0,993	0,996	0,997	0,997	0,999
LD	0,00298	0,00698	0,003	0,0004	0,00012
LQ	0,00904	0,021167	0,01	0,0015	0,000396
Precisão (CV%)	7,4 – 16,3	16,0 – 20,0	3,4 – 6,7	6,4 – 7,2	4,0 – 6,0
Recuperação (%)	78,3– 83,66	72,0 – 107,5	75 – 96	91 - 93	56 - 73
T. retenção (min)	8,33	8,33	29,0	26,11	18,42
Detector	ECD	ECD	ECD	MS	ECD

Para a faixa de linearidade, o método A mostrou-se superior ao método original proposto por Marciel (2005) [9], em que a metodologia adaptada pode quantificar diretamente, sem a necessidade de etapas de pré-concentração, quantidades inferiores a 0,02 mg L⁻¹. Os coeficientes de determinação, os quais revelam a linearidade analítica, todos os métodos foram viáveis, que segundo [10] são aceitos coeficientes de correlação igual a 0,99 para a ANVISA e um valor acima de 0,90 para o IMETRO. Em relação aos limites de detecção e quantificação, o método A novamente obteve resultados satisfatórios, mostraram-se inferiores ao método original, bem como o limite de quantificação inferior a 0,01 mg L⁻¹, permitindo inferir que é possível a quantificação de resíduos com concentrações inferiores aos limites máximos estabelecidos de agrotóxicos em alimentos [11 - 12].

A precisão, obtida pelas medições sucessivas de um mesmo método em replicatas (repetitividade), para todos os métodos mostraram-se viáveis, uma vez que em métodos de análises de traços e complexidade amostral são aceitos RSD de até 20% [10]. Para conferir a exatidão dos métodos, todos os materiais utilizados possuem certificados de referência (CRM) e os ensaios de recuperação para todos os métodos encontram-se entre 70 e 120% [10].

O tempo de retenção foi o parâmetro que melhor mostrou o diferencial das adaptações metodológicas, ele está diretamente relacionado aos gastos da análise, quando se tem um maior tempo, espera-se maior dispêndio do gás e energia para o funcionamento do instrumento. Nos métodos adaptados, houve uma redução de 200 a 300% no tempo de retenção do analito e consequentemente em análise. Contudo, tal fato pode estar relacionado a escolha de apenas um composto nos métodos adaptados, diferente da determinação multiresíduo nos métodos originais. A seletividade do método é alcançada ao garantir que o pico de resposta seja somente do analito em estudo [10-13]. Assim, para observar a especificidade do método realizaram-se ensaios em branco, ou seja, amostras livres do agrotóxico, não observando assim nenhum interferente quando aplicadas os métodos adaptados (Figuras 1A e 1C).

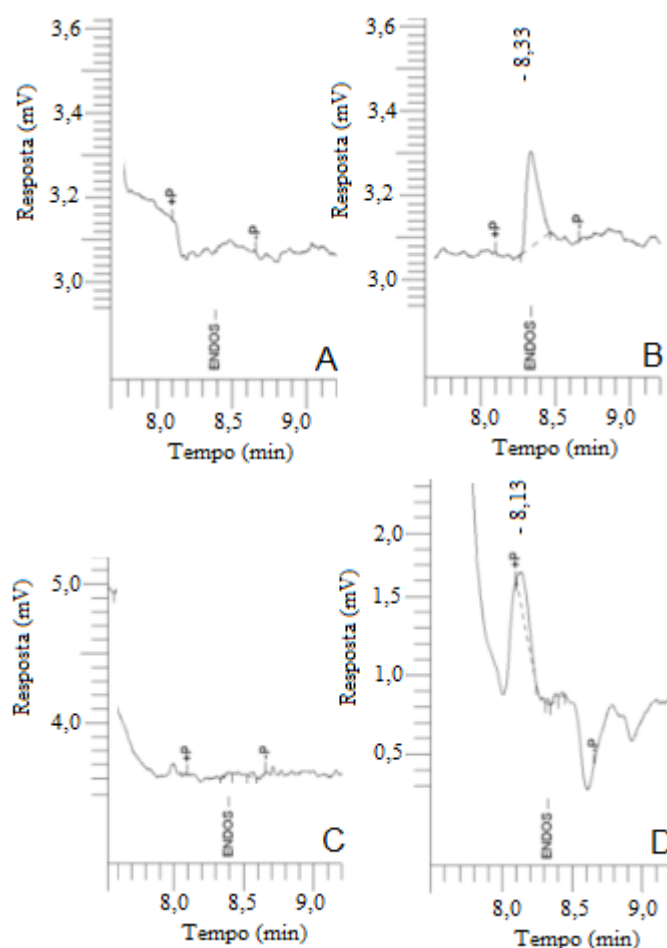


Figura 1. Especificidade do analito observado pelos cromatogramas: A e C (Branco dos métodos A e B, respectivamente) e B e D (Amostras fortificadas dos métodos A e B, respectivamente).

Viabilidade

No processo final de adaptação metodológica, todos os materiais utilizados mostram-se quantidades inferiores aos métodos originais, com exceção da utilização da amostra em extrato para injeção no aparelho, em que nos métodos adaptados obteve um acréscimo de 0,5 μ L (Figura 2). Contudo, é

compensado quando se observa a massa de amostra requerida para a fase primária de extração no método A, ocorre uma redução de 100% da quantidade de amostra. A distinção entre o tipo de matriz pode ter favorecido esse resultado, visto que no método original se utiliza fruta ao invés do mel. O volume de solventes orgânicos utilizado foi também inferior e está diretamente relacionado à quantidade de amostra (mel), devido a solubilidade e diluição da matriz. Para o gás de arraste, observou-se uma maior economia e isto pode ser relacionado ao tempo de retenção do analito. Nos métodos adaptados induziu-se um aumento de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ na vazão do gás, mostrando que é viável uma maior vazão quando se reduz o tempo de análise.

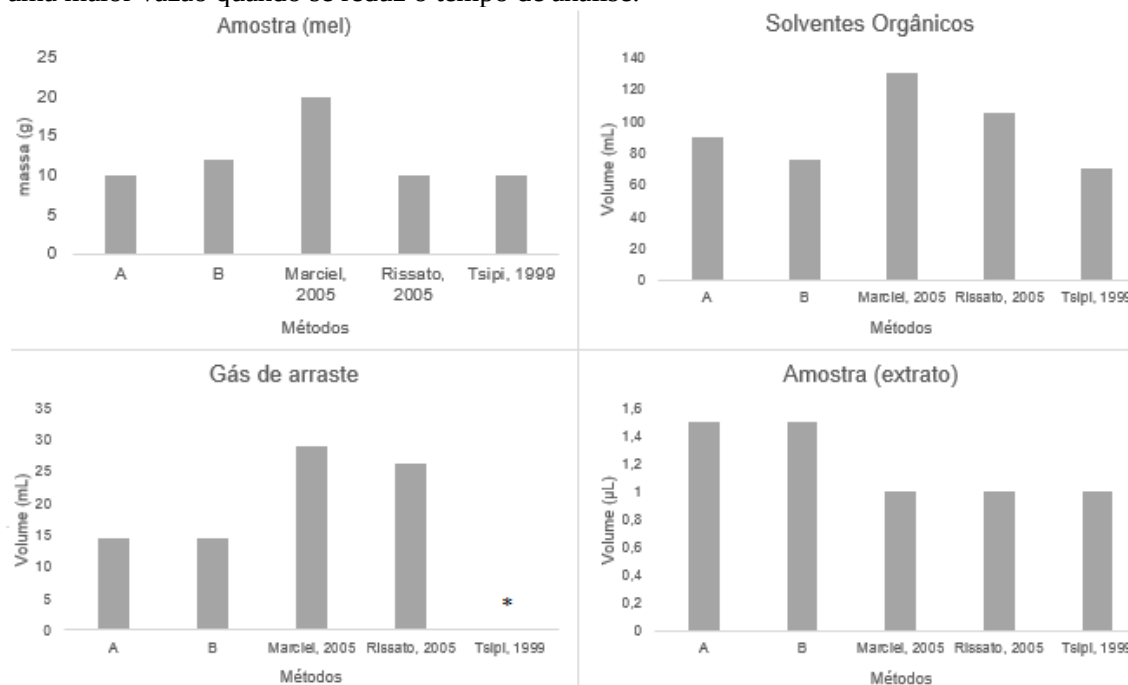


Figura 2. Dispendios em uma análise nos métodos originais e adaptados: * Não observado.

Conclusões

As alterações permitiram uma economia referente a quantidade de reagentes utilizada, bem como a diminuição do tempo de análise.

As adaptações nos métodos provocaram um decaimento dos parâmetros de validação, contudo não foram observadas modificações na qualidade da metodologia, uma vez que se mantiveram dentro das faixas aceitáveis previstas pela legislação.

Referências

- [1] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J. L. Tadeo, Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5828-5835.
- [2] D. TSIPI, M. TRIANTAFYLLOU, A. HISKIA, Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material. *Analyst*, 124 (1999) 473-475.
- [3] S. R. RISSATO, M. S. GALHIANE, M. V. ALMEIDA, M. GERENUTTI, B. M. APON, Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101 (2007) 1719-1726.

- [4] BRASIL, Supremo Tribunal Federal. Portaria n.329 de 2 de setembro de 1985. Ementa da portaria do Diário Oficial [da República Federativa de Brasil], Brasília, v.123, n.168, p.12941, 3 Set. (Seção 1), 1985.
- [5] J. P. M. TORRES, Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais. 1998. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- [6] D. A. SKOOG, D. M. WEST, F. J. HOLLER, R. C. STANLEY, “Fundamentos de Química Analítica”, Thomson, São Paulo, 2007.
- [7] C. H. COLLINS, G. L. BRAGA, P. S. BONATO, “Introdução a métodos cromatográficos”. UNICAMP, Campinas, 1997.
- [8] D. C. HARRIS, “Análise química quantitativa”. LTC, Rio de Janeiro, 2008.
- [9] E. MARCIEL, Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera indica*). Dissertação de Mestrado (2005) USP, Piracicaba-SP.
- [10] M. RIBANI, C. B. G. BOTTOLI, C. H. COLLINS, I. C. S. F. JARDINS, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, 27 (2004) 771-780.
- [11] C.M. Pitella, Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis sp*) por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Dissertação de Mestrado (2009) UFMG, Belo Horizonte, MG.
- [12] T. M. A. OLIVEIRA, Determinação e validação de método analítico para determinação simultânea de sulfonamidas em mel de abelhas africanas da região do Alto Turi (MA), como contribuição para produção de mel orgânico, em “64ª Reunião Anual da SBPC”, UFMA, São Luís, MA, 2012.
- [13] D. ORSO, Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel empregando método quEChERS modificado e GC-ECD. Dissertação de Mestrado (2011) UFSM, Santa Maria, RS.