DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBOFURAN EM VEGETAIS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) *

RENATO ZANELLA**

ROGÉRIO MARCOS DALLAGO***

CRISTIANE VIEIRA PRESTE****

O pesticida carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimethyl-7-benzo-furanyl-N-methylcarbamate) é um inseticida-nematicida de amplo espectro de aplicação, sendo empregado em escala crescente em muitos países tropicais, devido a sua eficácia contra numerosos insetos e pestes de frutas, vegetais e grãos. Apresenta natureza polar e aromaticidade que tornam a determinação por HPLC com detecção no UV atrativa. A análise foi efetuada em cromatógrafo Shimadzu com detector espectrofotométrico ajustado em 275 nm. Na separação foi empregada uma coluna Nucleosil C-18 (250 x 4 mm, 5 µm) e metanol-água (50:50, v/v; 1 mL/min). O volume injetado foi de 20 µL. A eficiência do procedimento foi investigada com amostras de tomate e batata fortificadas com carbofuran em 0,1 e 1,0 mg/kg. As amostras foram trituradas em metanol. Após procedeu-se extração líquido-líquido com diclorometano. Para remover coextrativos ácidos foi empregada lavagem com hidróxido de sódio diluído. As recuperações variaram entre 94,7 e 98,3% para tomate e entre 95,3 e 97,2% para batata. O limite de detecção de 0,14 mg/L corresponde a concentração mínima detectável de 0,011 mg/kg em vegetais após a extração de 25 g de amostra. Estes resultados indicam o grande potencial do método descrito na determinação de resíduos de carbofuran nos vegetais estudados.

* Trabalho apresentado no IUPAC/GARP Workshop on Pesticides Uses and Environmental Safety in Latin America, São Paulo (SP), 13-16/10/1996.

** Dr. em Química Analítica, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS) Brasil.

*** Aluno de Mestrado em Química da UFSM.

**** Aluna do Curso de Química Industrial da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

O carbofuran, apesar de menos persistente que os pesticidas organoclorados, é mais tóxico (ratos oral LD_{50} = 11 mg/kg), atuando como inibidor da colinesterase (1). Assim sendo, a determinação dos seus resíduos em alimentos é de grande importância. O limite máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde para resíduos de carbofuran em vegetais comestíveis é de 0,1 mg/kg (2). No Brasil, o limite de tolerância para carbofuran em batata é de 0,5 mg/kg (3).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a determinação de carbofuran em diferentes amostras de água. Entretanto, poucos métodos foram publicados sobre a determinação de carbofuran em amostras de vegetais. Estes métodos geralmente envolvem técnicas cromatográficas. A cromatografia gasosa (CG) tem sido empregada para a análise direta do carbofuran (4-9) ou após a derivatização deste (10-12). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi descrita para separar e determinar resíduos de carbofuran em vegetais empregando derivatização pós-coluna para a detecção por fluorescência (13-21) ou sem derivatização, quando a detecção é efetuada espectrofotometricamente (1, 22-26).

A natureza polar do carbofuran, como pode ser visto na Figura 1, torna sua análise por HPLC atrativa, e a aromaticidade assegura boa resposta para a detecção no ultravioleta (UV). O carbofuran apresenta uma banda intensa em 205 nm e uma banda alargada, menos intensa, próximo a 280 nm (27).

No presente trabalho desenvolveu-se um procedimento para a extração e quantificação de resíduos de carbofuran em amostras de vegetais (tomate e batata) com o auxílio da HPLC e detecção no UV.

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CARBOFURAN

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES, SOLVENTES E PADRÕES

As soluções padrões de carbofuran empregadas foram preparadas a partir de diluições na fase móvel de solução estoque de 100 mg/L do composto certificado (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg). Metanol (Merck, para análise de resíduos), água destilada purificada usando sistema Milli-Q, diclorometano (Merck, p.a.). Os demais reagentes empregados foram de qualidade analítica.

A fase móvel, os padrões e as amostras analisadas foram previamente filtradas através de filtros de membrana de 0,45 μ m.

2.2 DETERMINAÇÃO POR HPLC-UV

A determinação foi efetuada em cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, equipado com detector espectrofotométrico. Realizou-se a detecção em

275 nm, apresentando cromatogramas com muito menos sinais que poderiam interferir na identificação do sinal do carbofuran do que quando utiliza-se comprimentos de onda próximos a 205 nm. Os sinais foram integrados em área do pico com um integrador Shimadzu C-R6A.

Condições selecionadas para as análises:

- Coluna analítica: Nucleosil C-18 (250 x 4 mm ID, 5 μ m);
- Pré-coluna: Nucleosil C-18 (40 x 4 mm ID, 5 μ m);
- Fase móvel (1 mL/min.): metanol-água (50:50, v/v), desgaseificada com hélio;
- Volume injetado: 20 μ L.
- Detecção: UV em 275 nm.

A quantificação dos resíduos de carbofuran foi efetuada pelo procedimento de padrões externos, usando-se a calibração com múltiplos pontos.

2.3 PERFORMANCE ANALÍTICA DO PROCEDIMENTO

Com as condições selecionadas (ver item 2.2), o carbofuran apresentou tempo de retenção de 9,4 minutos, permitindo assim sua separação dos picos interferentes. A quantidade mínima detectável, considerando relação sinal-ruído da linha base igual a 3 : 1, foi de 2,8 ng de carbofuran, a qual para o volume injetado de 20 μ L corresponde a 0,14 mg/L. A resposta é linear do limite de detecção até pelo menos 100 ng de carbofuran injetado, ou seja 5 mg/L. A curva de calibração foi obtida com

uma série de soluções padrões de carbofuran com concentrações entre 0,5 e 5 mg/L, preparadas na fase móvel empregada.

2.4 PROCEDIMENTO PARA DETERMINAR CARBOFURAN EM VEGETAIS

A determinação de resíduos de pesticidas em vegetais, visando garantir a saúde dos consumidores, requer a homogeneização das partes comestíveis dos mesmos.

O procedimento empregado para a obtenção do extrato para análise por HPLC-UV foi o seguinte: uma amostra representativa (50 g), após a pesagem foi transferida para um homogeneizador, juntamente com 150 mL de metanol. Homogeneizou-se a mistura por 5 min em média velocidade e filtrou-se com sucção através de funil de vidro de média porosidade. Transferiu-se a amostra totalmente para funil, lavado com metanol até o filtrado atingir a marca de 200 mL de um balão volumétrico. Misturou-se 100 mL do extrato, correspondendo a 25 g de amostra, e 12 mL de Na₂SO₄ 4% em um funil de separação de 500 mL. A mistura foi extraída com 4 porções de 50 mL de DCM. Os extratos combinados de DCM foram lavados duas vezes com 150 mL de NaOH 0,2 M e a fase aquosa descartada. Evaporou-se a fase orgânica com cuidado (T < 40°C) até secagem sob vácuo. O resíduo após a evaporação foi então diluído com a fase móvel até volume apropriado (por exemplo: 2 a 10 mL para a determinação por HPLC-UV).

2.5 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

A eficiência do procedimento foi investigada usando-se diferentes amostras não tratadas de tomate e batata, as quais foram fortificadas, antes da extração, com 0,1 e 1,0 mg de carbofuran por kg de amostra. As fortificações foram obtidas pela adição de pequenos volumes de solução estoque de carbofuran em mistura de metanol-água (50:50, v/v), resultando nas quantidades de carbofuran necessárias para o estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação cromatográfica em coluna do tipo RP-18 apresentou boa performance. A detecção em 275 nm, embora menos sensível do que a leitura em 205 nm, resulta em cromatogramas mais adequados para a quantificação de carbofuran em amostras reais, pois o número de sinais que poderiam interferir na quantificação do carbofuran é bem menor. A curva analítica obtida sob as condições cromatográficas selecionadas está representada na Figura 2.

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação, representados na Tabela 1, indicam que o procedimento de extração empregado produz resultados satisfatórios, reprodutíveis e com boa exatidão. As recuperações ($n = 4$) variaram entre 94,7 e 98,3% para amostras de tomate e entre 95,3 e 97,2 % para amostras de batata. A lavagem alcalina dos extratos foi eficiente na remoção dos coextrativos ácidos, sem entretanto hidrolisar o carbofuran extraído.

FIGURA 2 - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOFURAN

TABELA 1 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

AMOSTRA	CARBOFURAN ADICIONADO Mg/Kg	CARBOFURAN RECUPERADO %	RECUPERAÇÃO MÉDIA % (SD)
tomate	0,1	92,4	94,7 (2,4)
		97,1	
		93,7	
		94,5	
	1,0	99,8	98,3 (3,2)
		96,9	
		94,5	
		101,9	
batata	0,1	95,8	95,3 (2,5)
		92,6	
		98,5	
		94,2	
	1,0	96,8	97,2 (1,7)
		98,3	
		98,7	
		94,9	

SD = Desvio padrão.

O limite de detecção absoluto de 0,14 mg/L corresponde a concentração mínima detectável de carbofuran de 0,011 mg/kg em vegetais após extração. Se o resíduo final obtido após a extração for dissolvido em volume reduzido de fase móvel, e isto é possível, então este limite pode ser ainda mais baixo.

4 CONCLUSÃO

De modo geral os resultados indicam o grande potencial da metodologia desenvolvida para a análise de resíduos de carbofuran em diferentes amostras de vegetais. O procedimento de extração do carbofuran apresentou alta recuperação do pesticida. O limite de detecção de 0,14 mg/L obtido com o auxílio da HPLC-UV corresponde a um limite de quantificação de 0,011 mg/kg de amostra, permitindo assim o emprego da metodologia apresentada para a detecção de resíduos de carbofuran em vegetais, em níveis abaixo dos limites máximos permitidos.

Abstract

Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl-N-methyl carbamate) is a broad-spectrum insecticide-nematocide used in pest control in many tropical countries. The polar nature and the presence of aromatic compounds make its analysis by HPLC attractive. HPLC analysis was carried out in a Shimadzu chromatograph, equipped with a UV detector set at 275 nm. The separation was performed with a Nucleosil C-18 column [(250+40) x 4 mm, 5 µm], using methanol-water (50:50, v/v) at 1 mL/min. The injection volume was 20 µL. The efficiency of the procedure was investigated using untreated tomato and potato samples fortified at 0.1 and 1.0 mg/kg, prior to the extraction. Samples were chopped and mixed thoroughly in methanol. A preconcentration step based in a liquid-liquid extraction with methylene chloride was used. A base wash removes acidic coextractives without extracting or hydrolyzing carbofuran. Recoveries from four replicate analysis for each tomato or potato sample varied from 94.7 to 98.3% and from 95.3 to 97.2%, respectively. The detection limit of 0.14 mg/L corresponds to a minimum detectable concentration of 0.011 mg/kg in vegetables after the extraction using 25 g of sample. The recovery efficiencies obtained were acceptably high and consistent through the range of the concentration studied. The results indicate a great potential to apply the developed method to the analysis of carbofuran residues in vegetables.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CRAMER, P.H., DRINKWINE, A.D., GOING, J.E., CAREY, A.E. Determination of carbofuran and its metabolites by high-performance liquid chromatography using on-line trace enrichment. *J. Chromatogr.*, v. 235, p. 489-500, 1982.
- 2 FAO/WHO. **Evaluation of some pesticide residue in food.** 1977. p 135-186.
- 3 ZANDONÁ, M.S., SABÓIA ZAPPÍA, V.R. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: resultado de cinco anos de monitoramento realizado pela Secretaria de Saúde do Paraná. *Pesticidas R. Téc. Cient.*, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 49-95, 1993.
- 4 WILLIAMS, I.H., BROWN, M.J. Determination of carbofuran and 3-hidroxy-carbofuran residues in small fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 21, p. 399-404, 1973.
- 5 CHAPMAN, R.A., ROBINSON, J.R. Simplified method for the determination of residues of carbofuran and its metabolites in crops using gas-liquid chromatography-mass fragmentography. *J. Chromatogr.*, v. 140, p. 209-218, 1977.
- 6 NELSON, T.R., COOK, R.F. Determination of carbofuran and 3-hidroxy-carbofuran residues in plant tissue by nitrogen selective gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 28, p. 98-102, 1980.
- 7 LEPPERT, B.C., MARKLE, J.C., HELT, R.C., FUJIE, G.H. Determination of carbosulfan and carbofuran residues in plants, soil, and water by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 31, p. 220-223, 1983.
- 8 ARCHER, T.E., CHU, Y.Y., ENGEBRETSON, J.A. Investigation of carbofuran and its metabolites by gas-liquid chromatography in green and dry hops. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 7, p. 897-905, 1988.
- 9 MATTERN, G.C., SINGER, G.M., LOUIS, J., ROBSON, M., ROSEN, J.D. Determination of several pesticides with a chemical ionization ion trap detector. *J. Agric. Food Chem.*, v. 38, p. 402-407, 1990.

- 10 OHNSON, W.G., LAVY, T.L. Organic chemicals in the environment. Persistence of carbofuran and molinate in flooded rice culture. **J. Environ. Qual.**, v. 24, p. 487-493, 1995.
- 11 COOK, R.F., JACKSON, J.E., SHUTTLEWORTH, J.M., FULLMER, O.H., FUJIE, G.H. Determination of the phenolic metabolites of carbofuran in plant and animal matrices by gas chromatography of their 2,4-dinitrophenyl ether derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, p. 1013-1017, 1977.
- 12 ARCHER, T.E., STOKES, J.D., BRINGHURST, R. S. Fate of carbofuran and its metabolites on strawberries in the environment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, p. 536-541, 1977.
- 13 FREI, R.W., LAWRENCE, J.F., HOPE, J., CASSIDY, R.M. Analysis of carbamate insecticides by fluorogenic labeling and high-speed liquid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 12, p. 40-44, 1974.
- 14 LAWRENCE, J.F., LEDUC, R. High-pressure liquid chromatographic analysis of carbofuran and two non-conjugated metabolites in crops as fluorescent dansyl derivatives. **J. Chromatogr.**, v. 152, p. 507-513, 1978.
- 15 KRAUSE, R.T. Resolution, sensitivity and selectivity of a high-performance liquid chromatographic post-column fluorometric labeling technique for determination of carbamate insecticides. **J. Chromatogr.**, v. 185, p. 615-624, 1979.
- 16 LEE, Y.W., WESTCOTT, N.D. Direct analysis of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran in rape plants by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 28, p. 719-722, 1980.
- 17 LAUREN, D.R., AGNEW, M.P. Determination of 2,4-dinitrophenyl ether derivatives of the phenolic metabolites of carbofuran by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 292, p. 439-443, 1984.
- 18 KRAUSE, R.T. Liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. I. Collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 68, p. 726-733, 1985.
- 19 DE KOK, A., HIEMSTRA, M., VREEKER, C. P. Improved cleanup method for the multiresidue analysis of N-methylcarbamates in grains, fruits and vegetables by means of HPLC with postcolumn reaction and fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 24, p. 469-476, 1987.
- 20 KRAUSE, R.T. High-performance liquid chromatographic determination of aryl N-methylcarbamate residues using post-column hydrolysis electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 442, p. 333-343, 1988.
- 21 LEE, S.M., PAPATHAKIS, M.L., FENG, H.C., HUNTER, G.F., CARR, J.E. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 339, p. 376-383, 1991.
- 22 CABRAS, P., MELONI, M., MANCA, M.R., PIRISI, F.M., CABITZA, F., CUBEDDU, M. Pesticide residues in lettuce. 1. Influence of the cultivar. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 92-95, 1988.
- 23 SPITTLER, T.D., MARAFIOTI, R.A. Determination of carbofuran and its metabolites. **J. Chromatogr.**, v. 255, p. 191-198, 1983.
- 24 LAWRENCE, J.F., LEWIS, D.A., MCLEOD, H.A. Detection of carbofuran and metabolites directly or as their heptafluorobutyl derivatives using gas-liquid or high-pressure liquid chromatography with different detectors. **J. Chromatogr.**, v. 138, p. 143-150, 1977.
- 25 LAWRENCE, J.F., LEDUC, R. Direct analysis of carbofuran and two nonconjugated metabolites in crops by high-pressure liquid chromatography with UV absorption detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, p. 1362-1364, 1977.
- 26 LING, C.F., MELIAN, G.P., JIMINEZ-CONDE, F., REVILLA, E. High-performance liquid chromatographic analysis of carbofuran residues in tomatoes grown in hydroponics. **J. Chromatogr.**, v. 643, p. 351-355, 1993.
- 27 KIKTA JR., E.J. Liquid chromatographic determination of carbofuran in technical and formulated products: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 69, p. 915-918, 1986.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro e bolsas concedidas.