

Validação de método para determinação de resíduos de etileno tiouréia em feijão

Thaís Valéria MILANEZ, Irani Cristiane da SILVA, Heloísa H.C. BARRETTO
Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais.

Etileno tiouréia (ETU) é um metabolito, bem como um produto da decomposição dos fungicidas etilenobisditiocarbamatos (EBDC), que são largamente utilizados em várias culturas. Segundo a literatura estes compostos são instáveis seja em meio alcalino ou ácido, na presença de oxigênio ou de água, podendo durante o armazenamento, processamento e cozimento dos alimentos tratados onde este tipo de fungicida foi utilizado, a quantidade do produto principal (EBDC) decrescer e a quantidade de ETU aumentar^{2,5}.

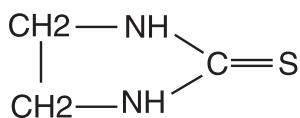


Figura 1. Fórmula estrutural do ETU

ETU, cuja fórmula estrutural se encontra na Figura 1, é rapidamente absorvido, metabolizado e excretado, preferencialmente pela urina e seu acúmulo no organismo se dá preferencialmente na tireóide e no fígado^{3,5}. De acordo com a IARC (International Agency for Research on Cancer) a carcinogenicidade de ETU é grau 2B, isto significa que há evidência suficiente de carcinogenicidade para animais entretanto esta evidência é inadequada para seres humanos^{1,5}.

A decomposição metabólica do EBDC é complexa e os produtos finais da decomposição são dissulfeto de carbono (CS₂), sulfeto de hidrogênio (H₂S) e ETU.

Na literatura não se encontram muitos trabalhos sobre a presença de ETU em leguminosas como feijão, a maior parte deles se concentra na pesquisa de ETU em frutas e verduras crus e processados.

O objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia para determinação de resíduos de ETU em amostras de feijão devido ao seu uso intensivo nesta cultura.

Primeiramente foi traçada a curva analítica utilizando-se padrão de ETU da Sigma-Aldrich (98% pureza). Foram preparadas soluções de concentrações variando de 0,04 a 1,00 mg/mL. Para quantificação foi utiliza-

da a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições:

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu 10Avp com detector de ultravioleta a 240nm.

Coluna Spherisorb ODS 1 fase reversa (C18) 25 cm de comprimento x 4,6 cm de diâmetro, tamanho de partícula 5µm.

Fase móvel 1: acetonitrila (2%) água (98%)

Fase móvel 2: água (100%)

Fluxo da fase móvel: 0,7 mL/min

A Figura 2 traz a curva de calibração de ETU, que se mostrou linear na faixa de 0,04 a 1,00 mg/mL.

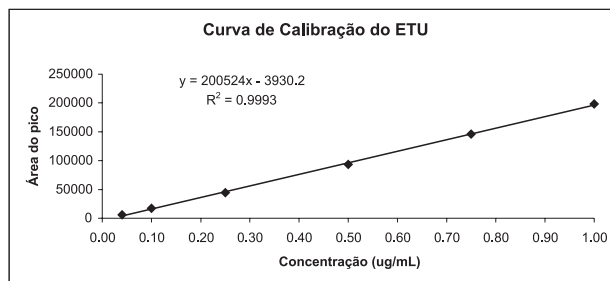


Figura 2. Curva de Calibração do ETU.

Uma vez obtida a curva de calibração foram realizados os ensaios de recuperação utilizando amostras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Rubi, onde não foram detectados resíduos de ETU.

Foram retiradas alíquotas de 20g das amostras homogeneizadas e estas foram fortificadas no nível de 0,10 mg/kg de ETU em quadruplicatas. Após a adição de 100mL de metanol as amostras foram agitadas por 1 min em ultra turax e centrifugadas por 30 min. Após filtração em funil contendo algodão, seguiu-se a extração com 50 mL de metanol. Este processo foi repetido mais uma vez. As alíquotas metanólicas foram concentradas em rotavapor a 50° C a aproximadamente 10mL. Ao atingirem a temperatura ambiente, o pH foi ajustado a 8,5 e os extratos foram transferidos para colunas de purificação de Extrelut seca (Colunas Extrelut NT20, Merck, lote 19040). Após 15 minutos estas colunas foram eluídas com 220 mL de diclorometano. Aos eluatos foram adicionados 5mL de água purificada para cromatografia líquida de alta eficiên-

cia (CLAE) e concentrados em rotavapor a 50° C até que não fossem mais visualizadas as duas fases. Ao atingirem temperatura ambiente, os extratos foram transferidos para balão de 5mL avolumando-os com água purificada para CLAE. Após passarem por filtro de membrana de celulose de 0,45µm foram injetados no cromatógrafo líquido. A concentração de ETU presente na amostra foi determinada utilizando-se a curva analítica construída com padrões.

Os dados obtidos estão relacionados na Tabela 1. Como pode-se observar o método apresentou dados adequados tanto de recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação. A média da recuperação para 0,10 mg/Kg foi 70% e seu coeficiente de variação de 8,0% . Estando estes valores dentro do que se considera adequado para resíduos na faixa de mg/Kg, que é de 70 a 120% de recuperação e coeficiente de variação de até 15%⁴.

O limite de quantificação foi 0,10 mg/kg e observou-se linearidade de 0,04µg/mL até 1,00 µg/mL, que corresponde a faixa de contaminação por ETU de 0,02 mg/Kg a 0,50mg/Kg.

As condições cromatográficas foram otimizadas para se obter uma boa resolução do ETU sendo o seu tempo de retenção de cerca de 11,5min nas condições descritas anteriormente.

Tabela 1. Dados de recuperação, desvio padrão e coeficiente angular da fortificação de feijão com ETU 0,10 mg/Kg.

Valor encontrado (mg/kg)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão Médio (±)	Coeficiente de variação (%)
0,08	80			
0,07	70			
0,07	70	70	0,006	8
0,06	60			

De acordo com normas estabelecidas⁴, um método é considerado validado quando o limite de quantificação proposto (LQ proposto) for maior que o limite de quantificação estatístico (LQ estatístico). Sendo o LQ estatístico considerado como 10 vezes o valor obtido como desvio padrão. Neste caso:

$$\text{LQ estatístico} = 10 \times Dp = 10 \times 0,006 = 0,06$$

$$\text{LQ proposto} = 0,1$$

Portanto LQ proposto > LQ estatístico.

O limite mínimo de quantificação para o método aqui descrito na matriz estudada foi de 0,10mg/kg de ETU. Foi encontrado um único interferente, com distância de retenção próxima ao do pico do ETU, entretanto com uma pequena alteração da fase móvel 1 para fase móvel 2, apenas água, houve resolução dos picos, sem mais interferência na determinação.

A legislação brasileira estabelece Limite Máximo de Resíduo (LMR) para EDBC expressos em CS₂ total, mas não define LMR para ETU. A Suécia estabelece LMR de 0,05mg/Kg para ETU em frutas, verduras e legumes e para Bélgica e a Holanda o LMR para ETU é 0,02mg/Kg em frutas e vegetais, que presume-se serão consumidos sem processamento. Não existe LMR estabelecido para grãos e nem para leguminosas. Por sugestão do JMPR, grupo assessor do Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1994), a ingestão diária aceitável (IDA) de ETU é de 0,002 mg/kg de ETU por peso corpóreo.

REFERÊNCIAS

1. IARC International Agency for Research on Cancer. Genetic and related effects. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Suppl.** 1987; 6: 304-7.
2. Mestres, R.; Mestres, G. Ethylenebisdithiocarbamate and ethylenethiourea residues in food. **Rev. Bras. Toxicol.**, 4(1/2): 11-8, 1991.
3. Nebbia, C. et al. Pathologic changes, tissue distribution and extent of conversion to ethylenethiourea after subacute administration of zinc ethylene-bis-dithiocarbamate (zineb) to calves with immature rumen function. **Am. J. Vet. Res.**, 52: 1717-22, 1991.
4. Toledo, H.H.B. et al. Associação GARP. **Manual de procedimentos, Estudo dos Resíduos com Plantas.** Parte A., 2002, p.53.
5. WHO World Health Organization. **Environmental Health criteria 78.** Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. Geneva, 1988.