

AValiação de Resíduos de Atrazina e Ametrina em Amostras de Grãos de Milho, e Validação de Método Analítico*

Joaquim Bartolomeu Rassini¹
Vera Lúcia Lanchote²
Odo Primavesi¹

INTRODUÇÃO

Atualmente a garantia da produção de alimentos depende consideravelmente do uso de insumos que estimulam o desenvolvimento e reduzem a competição interespecífica a favor da cultura de interesse, destacando-se entre estes os herbicidas. A utilização destes produtos químicos sintéticos pode contribuir significativamente para a contaminação do ambiente, particularmente solo e águas superficiais e subterrâneas (EKSTRÖM & KOVACICOVÁ, 1993), bem como dos produtos agrícolas gerados e da cadeia trófica.

Os resíduos de herbicidas em grãos geralmente não implicam em sérios riscos, no entanto a transferência de resíduos de Atrazina, entre outros herbicidas, para o leite e a manteiga tem sido descrita com alguma frequência. No Brasil, a tolerância de resíduos de Atrazina em milho é de 0,2 mg/kg, e de Ametrina, 0,05 mg/kg (RODRIGUES, 1995). Considerando o uso extensivo de herbicidas na prática agrícola e a documentação da ocorrência de resíduos em grãos, torna-se

*Trabalho realizado no projeto 11.0.95.661-02, do Programa Qualidade Ambiental/EMBRAPA, e FINEP-FNDCT 4290016000.

¹ Pesquisador da EMBRAPA, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339, 13.560-970 - São Carlos, SP.

² Pesquisadora da USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Campus da USP, 14.040-903 - Ribeirão Preto, SP.

importante o monitoramento sistemático de herbicidas nessas matrizes (BATTISTA et al., 1989; TEKEL & KOVACICOVÁ, 1993).

As s-triazinas são consideradas os herbicidas mais comumente usados no mundo, representam aproximadamente 30% de todos os herbicidas aplicados na agricultura. Consequentemente, e também em razão da relativa estabilidade no ambiente, as s-triazinas são os herbicidas mais frequentemente encontrados em amostras ambientais (TEKEL & KOVACICOVÁ, 1993).

Os métodos analíticos para resíduos de herbicidas em grãos incluem procedimentos de extração, de purificação ("cleanup") e emprego de técnicas cromatográficas. A cromatografia em fase gasosa com a utilização de colunas capilares é a técnica de escolha na determinação de resíduos em grãos, particularmente milho. As s-triazinas são analisadas com a utilização do detetor nitrogênio-fósforo (NPD) e a identidade dos resíduos confirmada pelo detetor de espectrometria de massas (MS) (BATTISTA et al., 1989; PARDUE, 1995; TEKEL & KOVACICOVÁ, 1993; TUINSTRA et al., 1991).

Os limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos não devem ser superiores a 10-50% do Limite Máximo Permissível de resíduos. Considerando que muitos países da Europa adotam 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como a Concentração Máxima Permissível de resíduos em produtos agrícolas, os métodos analíticos devem apresentar sensibilidade para quantificar concentrações tão baixas quanto 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EKSTROM & AKERBLUM, 1989; BATTISTA et al., 1989; PARDUE, 1995; TEKEL & KOVACICOVÁ, 1993)

No presente estudo foi desenvolvido, validado e aplicado em amostras ambientais um método de determinação sequencial de Atrazina e Ametrina em grãos de milho. O método foi desenvolvido com o emprego de acetonitrila como solvente de extração e purificação em coluna de fase sólida. O extrato purificado foi analisado para clorotriazina (Atrazina) e triazina não halogenada (Ametrina) em um sistema com detector por nitrogênio-fósforo com capacidade de detecção de compostos que apresentem nitrogênio na molécula. Ao mesmo tempo foi verificado o grau de contaminação de grãos de milho

destinado a silagem, para alimentação de gado bovino leiteiro, que poderia constituir uma fonte potencial de contaminação do leite destinado ao consumo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

A) Campo

Os trabalhos de produção de milho foram realizados na Microbacia Hidrográfica do Ribeirão Canchim, localizado na Fazenda Canchim, em São Carlos, SP, a 860 m do nível do mar, latitude de 21°57' S e longitude 47°50' W. A precipitação pluvial no período foi de 911 mm, a evapotranspiração real de 673 mm, o déficit hídrico 0, e a temperatura média de 23,5°C.

1) Solo: Latossolo Vermelho-Escuro distrófico, A moderado, textura argilosa, fase floresta tropical subcaducifolia, em declive de 8-15% (EMBRAPA-CNPS, 1996). Suas características químicas, na camada de 0-0,20 m, foram: pH-água = 7,1, pH-CaCl₂ = 5,7, M.O. (g.dm⁻³)=19, P-resina(mg.dm⁻³)=15, tendo os cátions trocáveis (mmolc.dm⁻³) K=1,0, Ca=22, Mg=13, Al=0,3, a CTC=57, e a saturação por bases de 63%. O solo foi preparado com uma aração e duas gradagens. Foi realizada adubação mineral com 432 kg/ha da fórmula 4-30-16+Zn, no sulco da semeadura.

2) Cultura: Milho (*Zea mays*) híbrido Pioneer 3041, semeado em linhas espaçadas de 0,80m, com densidade de plantio de 7 plantas/m, no dia 01.12.95, com emergência em 05.12.95. A colheita ocorreu em 24.04.96.

3) Tamanho das áreas tratadas: 448 m² (7 linhas de 80 m),

4) Tratamentos:

- a) Testemunha, submetida a capina manual,
- b) Atrazina, com aplicação de 5 L/ha de Gesaprim 500,
- c) Ametrina, com aplicação de 3 L/ha de Gesapax 500.

5) Aplicação dos produtos: em 20.12.95, com pulverizador Jacto, modelo Condor, com vazão de 350 L/ha de solução aquosa, sobre plantas de milho com 0,20 a 0,30 m de altura, com o 2o ou 3o par de folhas. As plantas invasoras apresentavam do 1o ao 2o par de folhas. O solo estava úmido.

6) Avaliação do efeito dos herbicidas: 7 dias após a aplicação, segundo critério adotado pela SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS (1995):

a) controle A = controle excelente ou total da comunidade invasora,

b) fitotoxicidade a = sem injúria, não tendo efeito sobre a cultura,

c) fitotoxicidade d = injúrias severas e/ou redução de crescimento com lenta recuperação (os efeitos promovem redução de rendimento da cultura).

7) Amostragem do material: Coletou-se uma espiga em 50 pontos aleatórios por área. As espigas foram debulhadas, e os grãos homogeneizados. Retirou-se uma amostra de 1 kg/tratamento de grãos, que foi enviada ao laboratório (02.05.96), para a análise de resíduos. A umidade dos grãos foi de 22,8% na área testemunha, 19,9% na área com Ametrina e 19,1% na área com Atrazina.

B) Laboratório

Laboratório de análises toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, SP.

1) Soluções-padrão

A solução estoque de Atrazina (100%, Supelco) e Ametrina (100%, Supelco) foi preparada na concentração de 1 mg/mL de acetona (grau análise de resíduos, Omnisolv®). Esta solução foi diluída para obtenção de soluções nas concentrações 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$ de acetona.

2) Análise cromatográfica

Foi empregado um cromatógrafo a gás equipado com injetor split/splitless e detector nitrogênio-fósforo (NPD). A Atrazina e a Ametrina foram separadas em coluna capilar DB-5, 30 m X 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm (J & W Scientific) nas seguintes condições: $t_{\text{vaporizador}}=240^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{detector}}=280^{\circ}\text{C}$ com corrente de fundo de 30pA e $t_{\text{coluna}}=60^{\circ}\text{C}$ durante 1 min; $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 150°C e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250°C . O gás de arraste hélio foi empregado na vazão de 1,6 mL/min. A técnica de amostragem utilizada foi “splitless” com tempo de amostragem de 0,75 min e volume de injeção de 1 μL .

3) Preparo da amostra

As amostras de milho foram moídas (moinho manual) e, a seguir, passadas em tamis de 15 mm.

4) Extração

Uma alíquota de 5g de milho pulverizado foi adicionada de 20 mL de acetonitrila em frasco *erlenmeyer* de 250 mL. Os herbicidas foram extraídos durante 30 min em ultra-som à temperatura ambiente, 16 h a 50°C em banho-maria com agitação (tipo “Dubnoff”) e novamente em ultra-som por 30 min à temperatura ambiente. A fase orgânica foi transferida para tubo cônico com rolha esmerilhada, centrifugada (1800 g, 5 minutos) e um volume definido de 10 mL foi novamente transferido para outro tubo cônico com 10 mL de água. A acetonitrila (fase orgânica) foi evaporada sob fluxo de ar à temperatura de 37°C , e a fase aquosa remanescente foi submetida ao procedimento “cleanup” (concentração) em coluna de extração em fase sólida, C18 (Envi-18, Supelclean, Supelco).

A coluna de extração foi previamente condicionada com 2 mL de metanol e 5 mL de água. A seguir, a amostra aquosa foi percolada através da coluna durante 8 min em sistema a vácuo. Os herbicidas foram eluídos com 1 mL de acetato de etila (grau análise de resíduo). O eluato foi centrifugado (1800g, 5 min) e um volume de 500 μL foi transferido para tubo cônico e evaporado à secura sob fluxo de ar em temperatura ambiente. O resíduo foi retomado com 50 μL de acetona

(grau análise de resíduo) e uma alíquota de 1 μL foi analisada por cromatografia.

5) Curvas de calibração

As curvas de calibração para a Atrazina e a Ametrina foram construídas com os dados analíticos, em duplicata, de alíquotas de 5 g de milho "branco" (milho cultivado sem a aplicação de herbicidas) enriquecidas com 100 μL de cada uma das soluções-padrão dos herbicidas.

Para a construção das curvas de calibração, as concentrações dos herbicidas (em $\mu\text{g}/\text{kg}$) foram lançadas no eixo das abscissas (0x), enquanto as alturas dos picos do cromatograma (em mV) foram indicadas no eixo das ordenadas (0y).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No campo, observou-se, 7 dias após a aplicação dos herbicidas, que a Atrazina e a Ametrina propiciaram controle excelente da comunidade infestante. Porém a Ametrina provocou injúrias severas à cultura de milho, o que não ocorreu com a Atrazina (sem injúrias). Isto sugere que sua aplicação deveria ter ocorrido em estágio mais avançado da cultura, ou seja, com 0,50 a 0,60 m de altura, numa aplicação pós-emergente tardia.

A análise de resíduos de herbicidas em grãos requer a utilização de procedimentos especiais de extração e "cleanup" com o objetivo de separar os herbicidas dos constituintes co-extraídos da matriz complexa.

A utilização do método de extração em fase sólida propiciou extratos com menor interferência de componentes co-extraídos da matriz em relação àqueles obtidos por partição líquido-líquido. O cromatograma referente ao milho "branco" mostrou que as regiões de eluição dos herbicidas estão livres de interferentes da matriz.

A recuperação da Atrazina adicionada em amostras de milho nas concentrações de 4,0 e 16,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi de 74,4%. O limite de quantificação da Atrazina, definido como a menor concentração quantificada com erro igual ou inferior a 15%, foi de 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A curva de calibração apresentou linearidade até a maior concentração experimentada, ou seja 16,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (r) para o intervalo de concentrações de Atrazina (4,0 a 16,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amostra de grãos de milho) foram: $y = -0,1908 + 0,44781x$ ($r = 0,9991^{**}$). Os limites de confiança do método foram compatíveis com a análise de resíduos de Atrazina em milho em razão da adequada recuperação e do baixo limite de quantificação. O método desenvolvido pode ser considerado mais sensível que o método multi-resíduos de herbicidas triazínicos em milho, desenvolvido por PARDUE (1995), no qual a recuperação da Atrazina em milho foi estudada na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

O método validado foi aplicado na análise de amostras de milho coletadas de cultura experimental tratada com Atrazina. Não foram detectadas concentrações de Atrazina iguais ou superiores a 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ou seja, iguais ou superiores ao limite de quantificação do método.

Em relação à Ametrina, o herbicida triazínico não halogenado analisado simultaneamente com a Atrazina, o método analítico evidenciou os seguintes limites de confiança: recuperação de 55%, limite de quantificação de 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e linearidade até a maior concentração experimentada de 32,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (r) para o intervalo de concentrações de Ametrina (8,0 a 32,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amostra de grãos de milho) foram $y = 0,20882 + 0,1762x$ ($r = 0,99907^*$). Este método ainda pode ser considerado mais sensível que o reportado por BATTISTA et al. (1989), no qual o limite de quantificação da Ametrina foi de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vegetal, e mais sensível que o método de PARDUE (1995), no qual a recuperação da Ametrina foi estudada na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O método foi aplicado na análise de amostras de milho coletadas de região de cultivo de milho com

aplicação de Ametrina. A análise não revelou resíduos de Ametrina no milho em concentrações iguais ou superiores a 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

CONCLUSÕES

O método de análise simultânea da Atrazina e Ametrina em amostras de milho apresenta sensibilidade compatível com a aplicação na análise de resíduos. Os limites de quantificação de 4,0 e 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente para Atrazina e Ametrina, permitem a detecção e quantificação de concentrações inferiores ao Limite Máximo Permissível de 100,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de herbicidas triazínicos em produtos agrícolas.

A aplicação pós-emergente de Atrazina (Gesaprim 500 - 5 L/ha) e Ametrina (Gesapax 500 - 3 L/ha), na cultura de milho (Pionner 3041), não resultou em concentrações detectáveis dos referidos herbicidas em grãos colhidos com 20% de umidade.

RESUMO

Foi realizada a quantificação de resíduos dos herbicidas Atrazina e Ametrina, aplicados em pós-emergência, em grãos de milho (*Zea mays*), destinados à alimentação de bovinos de leite, através de método analítico com extração em fase sólida, em validação. O método permite detectar níveis de Atrazina e Ametrina de 4,0 e 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Não foram detectados resíduos destes herbicidas nas amostras de grãos de milho analisadas.

Palavras-chave: Herbicidas, Atrazina, Ametrina, resíduos, grãos, *Zea mays*, método analítico.

SUMMARY

EVALUATION OF ATRAZINE AND AMETRINE RESIDUES IN CORN GRAIN SAMPLES AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD

Post-emergency applied Atrazine and Ametryne herbicide residues were analysed in corn grain (*Zea mays*) fed to dairy cows, using a new analytical method, with solid phase extraction, in validation. The method allows the detection of 4,0 e 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Atrazine and Ametryne, respectively. No herbicide residues were detected in the analysed corn grain.

Key words: Herbicide, Atrazine, Ametryne, residues, grain, *Zea mays*, analytical method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATTISTA, M.; A. DI CORCIA & M. MARCHETTI, 1989. Extraction and Isolation of Triazine Herbicides from Water and Vegetables by a Double Trap Tandem System. *Anal. Chem.*, **61**: 935-939.
- EKSTRÖM, G. & M. AKERBLÖM, 1989. Pesticide Management in Food and Water Safety: International Contributions and National Approaches. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **114**: 23-55
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1996. **Levantamento Semidetalhado de Solos da Fazenda Canchim**. Rio de Janeiro. (Mapa, escala 1:10.000).
- ODANAKA, Y.; O. MATANO & S. GOTO, 1991. The Use of Solid Bonded-Phase Extraction as Alternative to Liquid-Liquid Partitioning for Pesticide Residue Analysis of Crops. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**: 368-373.

- PARDUE, J.R., 1995 Multiresidue Method for the Chromatographic Determination of Triazine Herbicides and Their Metabolites in Raw Agricultural Products. **J. AOAC International**, 78: 856-862.
- RODRIGUES, B.N., 1995 **Guia de Herbicidas**. 3.ed. Londrina, IAPAR. 676p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 1995. **Procedimento para Instalação, Avaliação e Análise de Experimentos com Herbicidas**. Londrina. 42p.
- TEKEL, J. & J. KOVACICOVÁ, 1993. Chromatographic Methods in the Determination of Herbicides Residues in Crops, Food and Environmental Samples. **J. Chromatogr.**, 643: 291-303.
- TUINSTRAN, L.G.M.T.; A.H. ROOS; A.M. MATSER; W.A. TRAAG; J.A. van RHIJN, 1991. Development of a Multi-Residue/Multi-Matrix Method for Pesticide Analysis in Agricultural Products. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 339: 384-386.