

MFN: 102

Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas

Waldemar F. Almeida



Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud
Programa de Salud Ambiental
Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud

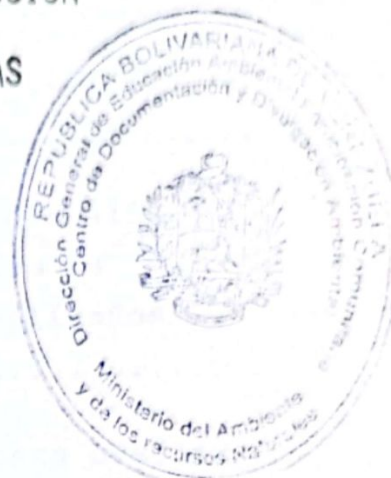
Metepec, México

1987

MPN= 102
Nº INV.= 00404

OPs
1

MÉTODOS PRÁCTICOS PARA DETECCIÓN
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS



Waldemar F. Almeida (Ed.)

Elizângela Puga e Silvana Rubano - Determinação
de resíduos de inseticidas através de bioensaios
com Drosophila melanogaster
Ana C. Faria e Elaine Noce - Testes enzimáticos

MARN
Centro de Documentación y
Divulgación Educativa
RECIBIDO
FECHA: 19-11-01
Nº de inventario: CO 122

CENTRO PANAMERICANO DE ECOLOGIA HUMANA Y SALUD

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

. Waldemar F. Almeida - Introdução	v
. Nilda A. G. G. de Fernícola - Técnicas rápidas para detección de plaguicidas	1
. Carlos A. Gotelli - Plaguicidas y toxicología analí- tica de urgencia: Estudio comparativo de los diferentes métodos analíticos aplicados a la investigación de plaguicidas	11
. Zelia de Oliveira Soares - Microcurstáceos para avaliar toxicidade de águas de abastecimento	21
. Carlos A. Gotelli - Técnicas para la determinación de plaguicidas organo-clorados en medios biológicos	31
. Flavio Rodrigues Puga e Silvana Rubano - Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com <u>Drosophila melanogaster</u>	37
. Mauro V. de C. Faria e Elaine Noce - Testes enzimáticos "in vitro" para a detecção de metais pesados e praguicidas em águas de abastecimento público...	45
. N. Izmirova - Métodos analíticos rápidos para residuos de praguicidas	51



INDICE DE AUTORES

Página

Faria, Mauro V. de C.	45
Fernícola, Nilda A.G.G.	1
Gotelli, Carlos A.	11,31
Izmirova, N.	51
Noce, Elaine	45
Puga, Flavio Rodrigues	37
Rubano, Silvana	37
Soares, Zelia de Oliveira	21

INTRODUÇÃO

Métodos de alta sensibilidade para detectar quantidades mínimas de pesticidas, da ordem de picogramas e mesmo de milésimos de picogramas já têm sido desenvolvidos, utilizando aparelhagem de alto custo. Estes métodos são de grande valor quando a meta é realmente a detecção destes teores tão baixos.

Entretanto, em grande número de casos, busca-se detectar uma quantidade de pesticidas que possa apresentar um risco agudo para a saúde humana ou para a manutenção do equilíbrio ecológico de um ecossistema. Nestas situações, a utilização de uma metodologia complexa com o emprego de aparelhos sofisticados representa um custo desnecessariamente elevado, além de acarretar demora na apresentação dos resultados.

Por conseguinte, é de grande interesse avaliar e difundir metodologias simples que permitam detectar resíduos de pesticidas em quantidades que realmente causem problemas para a saúde humana ou para a cadeia trófica. Vários destes métodos eram utilizados no passado e foram abandonados quando surgiram os métodos com maior sensibilidade e também maior precisão.

Neste sentido foi realizado um seminário no Rio de Janeiro, Brasil, 2-6 dezembro de 1985, para trazer à tona estes métodos simples, práticos e rápidos, de especial interesse para países em desenvolvimento. Este seminário foi organizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde -INCQS/FIOCRUZ- com o patrocínio do Centro Pan-americano de Ecologia Humana e Saúde -ECO/OPS/OMS- em apoio ao Programa Internacional de Segurança de Substâncias Químicas PISSQ/OMS-PNUMA-OIT.

Como consultores internacionais e conferencistas participaram: Dra. Nilda A. G. G. de Fernícola, toxicóloga do Centro Pan--americano de Ecologia Humana e Saúde, com sede no México; Dr. Carlos A. Gotelli, da Universidade de Buenos Aires, Argentina; e Dra. N. Izmirova, do Instituto de Higiene e Saúde Ocupacional de Sofia, Bulgária.

Vários técnicos brasileiros apresentaram também alguns métodos práticos de grande utilidade.

Em resumo, foram discutidos e avaliados os seguintes métodos:

1. Análises por reações coloridas;
2. Papéis impregnados com reagentes;
3. Uso de enzimas para detecção de resíduos de pesticidas (ATPase para inseticidas clorados orgânicos e acetilcolinesterase para inseticidas inibidores desta enzima);
4. Teste com Drosophila melanogaster;
5. Teste com microcrustáceos (Daphnia);
6. Cromatografia em camada delgada.

Estes métodos foram considerados adequados, alguns deles para os laboratórios que possuem apenas condições mínimas para funcionamento, em geral localizados em pequenas cidades afastadas de grandes centros urbanos, ou mesmo situados em áreas agrícolas ou rurais. Outros são úteis para laboratórios que já possuem algum recurso técnico. Todos eles, entretanto, são de grande interesse para países em desenvolvimento onde os recursos humanos e financeiros são escassos.

É muito importante difundir estes métodos e estimular seu uso amplo, a fim de ser possível uma avaliação dos resultados em futuro próximo. Neste particular, deveria ser estimulada a formação de uma rede, constituída por núcleos, laboratórios e instituições interessados e ativos nestes assuntos na América Latina, com permuta de metodologias, de informações e também com análises periódicas de amostras distribuídas para controle de qualidade analítica.

WALDEMAR F. ALMEIDA
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Rio de Janeiro, Brasil

TECNICAS RAPIDAS PARA DETECCION DE PLAGUICIDAS

Nilda A.G.G. de Fernícola

Consultora en Toxicología

Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud

Organización Panamericana de la Salud

México

GENERALIDADES

La técnica más simple de análisis es aquella que se realiza mezclando una gota de la sustancia desconocida con una gota de la solución reactivo. Serían las denominadas reacciones a la gota (spot test). La reacción se realiza sobre un soporte poroso, papel de filtro, o sobre una superficie no porosa, vidrio o porcelana.

El uso de un medio poroso impregnado con reactivos solubles o insolubles en agua, aumentan la sensibilidad de la prueba.

Las reacciones a la gota son frecuentes en análisis clínicos y en análisis para determinar la calidad del agua. Se usan tiras de celulosa absorbente que están impregnadas con la solución reactivo. La porción impregnada está, a veces cubierta con una membrana semipermeable para evitar coloración propia de la muestra, por ejemplo cuando se trata de sangre. El análisis se realiza sumergiendo la tira de papel en la solución que se desea analizar y comparando el color con una escala.

Otro tipo de reacciones rápidas, emplea uno de los reactivos en forma sólida. Así por ejemplo, en algunos análisis clínicos. Se sumerge una tableta reactivo en la solución de la muestra a analizar y se observa la formación de un precipitado o aparición de color.

El material requerido para reacciones rápidas o a la gota es, aquel material de vidrio, metal, plástico o porcelana de uso frecuente en el laboratorio analítico e instrumental como balanzas, baños de agua, etc...

En general no se requiere medida del volumen pelo ello favorece una estimación semicuantitativa.

Para la detección de agentes contaminantes en ambientes de trabajo el uso de tubos detectores es común. Esos tubos contienen en su interior un reactivo impregnado en un soporte inerte. Cuando el tubo se conecta a una bomba de vacío, o a una bomba accionada en forma manual, el aire pasa a través del reactivo y produce color.

2. ANALISIS RAPIDOS EN TEJIDOS VEGETABLES Y EN ALIMENTOS

La presencia de nitratos, fósforo y potasio puede ser detectada en la savia de plantas frescas por reacciones rápidas. El resultado de estos análisis sirve de guía para conocer la cantidad de nutrientes absorbidos por la planta.

Feigl indica la realización de reacciones a la gota o el uso de papeles reactivos que se aplican directamente sobre un corte del tejido vegetal, para la detección de nitrato, fósforo y potasio.

En las técnicas agrícolas actuales se hace uso de agentes químicos para proteger los cultivos, de insectos o microorganismos. Estos agentes químicos, plaguicidas, cuando presentes en los alimentos pueden producir efectos sobre la salud.

El uso de aditivos para conservar alimentos soluciona por un lado el problema de su deterioro pero crea otros, por ejemplo aquellos relacionados con la toxicidad de esos aditivos. Algunos de esos agentes químicos pueden ser detectados por técnicas simples, aunque la mayoría de los métodos analíticos que satisfacen las normas para calidad de alimentos son muy complicados.

En algunas muestras seleccionadas, así todo hay alguna posibilidad de usar pruebas simples, poco sofisticadas. El objetivo de tales pruebas es el control de calidad con el mínimo de gasto y de recursos. A veces es un gasto inútil el destinar recursos para alcanzar una precisión y exactitud más allá de lo necesario.

El análisis cualitativo que indica la presencia de agentes químicos no permitidos o el estado del alimento tiene su valor. Por ejemplo, análisis simples y rápidos que detectan la presen-

cia de ciertos ácidos volátiles permiten determinar si una conserva de atún está en condiciones no aceptables para el consumo. El análisis cualitativo que indique la presencia en alimentos de orina o materia fecal es un resultado válido para el rechazo de los mismos.

Se evidencia, aún en el escaso número de ejemplos, que el resultado analítico cualitativo, positivo o negativo, tiene valor decisivo para aceptar un alimento.

Estos análisis rápidos son considerados solo como preliminares y en muchos casos se requiere un método analítico más exacto.

3. DETECCION DE PLAGUICIDAS

Entre los agentes químicos que están destinados al combate de plagas, los plaguicidas, se encuentran varios insecticidas, fungicidas, rodenticidas, herbicidas, que son aplicados en la producción de alimentos para controlar insectos, hongos, roedores, hierbas. El uso de alguno de los plaguicidas puede dejar residuos en los alimentos.

Varios plaguicidas tienen su uso restringido, en diversos países, lo que significa que será válido un resultado de análisis, cualitativo, que indique su presencia.

Al grupo de plaguicidas organoclorados pertenece: aldrín, clordano, DDD, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, lindano, metoxicloro y toxafeno.

Se dispone de reacciones que son específicas que pueden usarse en caso de mezclas, y lo suficientemente simples como para ser realizadas en casos de rastreo.

Algunos de estos plaguicidas pueden ser detectados por métodos simples y así Johnson (1), ha publicado un interesante trabajo sobre indentificación por técnicas analíticas rápidas de insecticidas organoclorados. Jungreis (2), hace mención en su libro a ese trabajo. Con el objetivo de verificar la presencia o no de algunos plaguicidas, en el ítem 5 se indica la técnica usada en esas dos publicaciones para los insecticidas que se mencionaron.

Posteriormente, en el ítem 6, se hace referencia al trabajo de Karanth y col. (3) sobre la técnica indicada por esos

autores para la detección rápida de residuos de insecticidas organoclorados con el uso de papeles reactivos cromogénicos.

4. MATERIAL Y REACTIVOS

4.1. Material

Tubos de ensayo

Tubos de ensayo con tapa

Erlenmeyer con tapa

Erlenmeyer, boca esmerilhada, con refrigerante condensador

Baño María

Baño de hielo

Calentador eléctrico

Papel Whatman No. 1

4.2. Reactivos

n-hexano

Piridina

Solución 0,1N de hidróxido de potasio en metanol

Solución 0, 1N de hidróxido de potasio en etanol

Solución 0,5N de hidróxido de sodio etanol

Anhídrido acético

Acido sulfúrico

Acido nítrico

Solución sulfonítrica A: 50 ml de ácido sulfúrico agregar 1
gota de ácido nítrico

Benceno

Tetracloruro de carbono

Anilina redestilada

Xileno p.a.

Solución de ácido sulfúrico fumante: mezclar una parte
de ácido sulfúrico fumante al 30% con cuatro partes de
ácido sulfúrico concentrado

Solución sulfonítrica B: mezclar partes iguales de ácido sulfú-
rico y ácido nítrico

Azufre en polvo

Solución de o-tolidina al 1% en acetona. Esta solución
debe ser de preparación reciente.

5. REACCIONES RAPIDAS PARA DETECTAR PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS

5.1. Toxafeno

Canfeno clorado, muy usado como insecticida

Disolver la muestra en 50 ml de n-hexano en un erlenmeyer con tapa. Dejar decantar. Transferir 1 ml de la solución a un tubo de ensayo que contiene 5 ml de piridina: Agregar 0,5ml de la solución 0,1N de hidróxido de potasio en metanol y colocar el tubo en el baño María, 15 s. Transferirlo enseguida a un baño de hielo y dejarlo 1 min.

La aparición de color rosa o rojizo después de 10 s de calentar a baño María, indica la presencia de toxafeno.

5.2. DDD

El DDD (diclorodifenildicloroetano) resulta de la pérdida de un átomo del cloro del DDT.

Extraer la muestra con n-hexano. Transferir una alícuota a un tubo de ensayo. Evaporar a sequedad en baño María. Agregar tres gotas de la solución 0,5N de hidróxido de sodio en etanol. Evaporar a sequedad. Enfriar. Agregar 2 ml de la solución sulfonítrica A.

En presencia de DDD aparece color rojo brillante que dura 1 minuto. El metoxicloro interfiere en la reacción. Se puede reconocer la presencia del metoxicloro por la persistencia, durante 10 min, del color rojo. Además, cuando se adicionan algunas gotas de agua, el color desarrollado por el DDD desaparece mientras que permanece aquel debido al metoxicloro. Sensibilidad: 3-5 μg DDD.

5.3. Método alternativo para detección de DDD

Extraer la muestra con benceno y transferir una alícuota a un tubo de ensayo. Adicionar 2-3 gotas de la solución 0,5N de hidróxido de sodio en etanol. Evaporar a sequedad en baño María. Enfriar y agregar 4 gotas de anhídrido acético y 2 ml de ácido sulfúrico.

La aparición de color naranja indica la presencia de DDD. El DDT produce color naranja claro. La adición de ácido nítrico al tubo produce cambio de color, a rojo, en caso de DDD y a verde pálido con DDT. El metoxicloro no interfiere.

5.4. DDT

Extraer la muestra con n-hexano. Transferir una alícuota a un tubo de ensayo. Agregar tres gotas de la solución 0,5N de hidróxido de sodio en etanol. Evaporar a sequedad en baño María. Enfriar. Disolver el residuo en 4-5 gotas de tetracloruro de carbono. Agregar 2 ml de la solución sulfonítrica A. Agitar para mezclar. Después de 5 s de agitación aparece, en presencia de DDT, color verde que persiste alrededor de 1 min.

El DDD y el metoxicloro, interfieren débilmente en la reacción. Ambos producen color rojo. El color producido por el DDD desaparece después de 5 s de adicionada la solución ácida. El color producido por el metoxicloro, en cantidades de 3 mg o menores, es enmascarado por el color producido por el DDT.

El límite de sensibilidad para el DDT es 50 µg. Se aumenta la sensibilidad de la reacción y se demora la descoloración cuando se agrega la mezcla sulfonítrica enfriada en baño de hielo.

5.5. Heptacloro

Extraer la muestra con benceno. Transferir una alícuota a un tubo y agregar 5 gotas de anilina redestilada y 2 gotas de solución 0, 1N de hidróxido de potasio en metanol. Colocar el tubo, durante 15 s en baño María. Retirar del baño María y agregar 1 ml de piridina. Colocar nuevamente el tubo en baño María 10 s.

La aparición de color verde oscuro después de 1 a 3 min de la adición de piridina indica la presencia de heptacloro.

La reacción es específica del heptacloro pero grandes cantidades de otros insecticidas organoclorados inhiben el desarrollo de color.

5.6. Heptacloro en presencia de otros insecticidas organoclorados

En casos de que otros insecticidas organoclorados estén presentes junto con heptacloro puede ser usada la reacción siguiente.

Extraer la muestra con benceno. Transferir una alícuota a un tubo de ensayo. Agregar 1 ml de solución 0, 1N de hidróxido de potasio en etanol y calentar, 30 s, en baño María. Agregar 1 ml de benceno. Aparece color rosa o violeta en presencia de heptacloro. Límite de detección 1 mg.

5.7. Aldrín, dieldrín y endrín

La técnica que se detalla a continuación es selectiva para alguno de los tres compuestos y ninguno de los otros insecticidas organoclorados, interfiere. Esta técnica es especialmente recomendada para identificar dieldrín. Para aldrín y endrín existen otras técnicas alternativas que se mencionan después.

Extraer la muestra con xileno. Transferir 2 gotas del extracto a un tubo de ensayo con tapa y agregar 1 ml de la solución de ácido sulfúrico fumante. Agitar con cuidado, 30 s. En presencia de:

. dieldrín aparece color rojo inmediatamente después de la adición de la solución ácida; el límite de detección es 50 μg ;

. aldrín, aparece color rosa después de 10 s de agitación, que se transforma en rojo con agitación continuada; el límite de detección es 20 μg ;

. endrín, aparece lentamente color rojo después de unos 15 s de agitación; el límite de detección es 50 μg .

5.8. Aldrín en presencia de dieldrín y/ou endrín

Extraer la muestra con benceno. Transferir dos o tres gotas a un tubo con tapa. Agregar 2 ml de la solución de ácido sulfúrico fumante y agitar. Agregar 2 o 3 gotas de xileno y agitar 30 s. En presencia de 2 mg o más de aldrín, aparece color rosa que pasa a rojo.

5.9. Endrín en presencia de dieldrín y/o aldrín

Extraer la muestra con n-hexano. Transferir una alícuota del extracto a un tubo. Agregar 2 ml de ácido sulfúrico y agitar fuertemente. Colocar el tubo en baño María durante 30-40s. Enfriar en baño de hielo. En presencia de endrín o clordano aparece color rosa o rojo. Añadiendo una gota de la solución sulfonítrica B y agitando, aparece color azul verdoso en presencia de endrín. El límite de detección es 0,2mg de endrín.

5.10. Dieldrín y endrín

La reacción que se detalla a continuación no diferencia entre los compuestos mencionados.

Extraer la muestra con benceno. Transferir una alícuota del extracto a un erlenmeyer de boca esmerilhada. Evaporar el benceno colocando el erlenmeyer en un baño María. Agregar 20 ml de la solución 0,5N de hidróxido de sodio en etanol para disolver el residuo. Agregar 30 mg de azufre y conectar el condensador refrigerante. Calentar a ebullición, sobre un calentador eléctrico, durante 15 min. Retirar y dejar enfriar alrededor de 30 min, agitando ocasionalmente. La aparición de color rosa o rojo naranja indica la presencia de dieldrín, endrín o de ambos.

Grandes cantidades de clordano y heptacloro producen color marrón. Los demás insecticidas organoclorados no dan color.

6. USO DE PAPELES REACTIVOS PARA DETECCION DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS

Impregnar con el reactivo, o-tolidina al 1% en acetona , tiras de papel Whatman No. 1 y dejar secar a temperatura ambiente. Conservar las tiras de papel reactivo protegidas de la luz, de esta forma se pueden guardar por varios días.

Los insecticidas que son detectados con este papel reactivo son los siguientes:

HCH (hexaclorociclohexano) produce color azul; el límite de detección es 0,3 µg; DDT, color verde claro con cantidades de alrededor de 0,5 µg; con 5 µg, o más se produce color verde hoja; otros plaguicidas producen color con el papel reactivo, en cantidades superiores a 5 µg. Así el aldrín produce color verde amarillento; el clordano da color amarillo verdoso y el endosulfano produce color amarillo.

La sensibilidad de la reacción para HCH y DDT son debidas a los átomos de cloro lábiles. El cloruro de sodio o el agua a la que se ha agregado cloro, no producen color, aún en concentraciones a nivel de mg.

Técnica

Cortar los alimentos vegetales en rebanadas de alrededor de 2 cm de espesor. Colocar un papel reactivo sobre la superficie humedecida de la rabanada, durante 30 s. Retirar el papel y exponerlo a la luz solar. Aparecen manchas coloradas según el plaguicida, y de acuerdo a lo indicado anteriormente.

7. REFERENCIAS

1. JOHNSON, D.P.-Qualitative tests for rapid identification of hydrocarbons in insecticides formulations. Assoc. Off. Agric. Chem. 39 (2), 490-497; 1956
2. JUNGREIS, E.-Spot test analysis. John Wiley and sons. New York, 1985
3. KARANTH, N.G.K.; SRIMATHI, M.S.; MAJUMDER, S.K.-A chromogenic paper for ultrarapid detection of organochlorine insecticide residues in vegetables. Bull Environ. Contam. Toxicol. 28, 221-224; 1982

PLAGUICIDAS Y TOXICOLOGIA ANALITICA DE URGENCIA

Estudio comparativo de los diferentes métodos analíticos aplicados a la investigación de plaguicidas.

Carlos Alberto Gotelli

Cátedra de Toxicología

Facultad de Medicina - U.N.B.A.

Buenos Aires, Argentina

Sin lugar a dudas, es en el campo de la Toxicología Clínica donde la ayuda del laboratorio analítico constituye un aliado de singular importancia y en muchos casos de gravitación decisiva sobre la conducta a seguir frente a un intoxicado.

Clínica e química toxicológicas constituyen una asociación estrecha, indisoluble, que debe funcionar en perfecta armonía y constante intercomunicación para el logro de los fines comunes.

El incesante crecimiento en el número de sustancias, compuestos, asociaciones de fármacos, etc. que bajo múltiples formas incorpora día a día la tecnología a los distintos aspectos de la vida del hombre (fabriles, industriales, agropecuarios, médicos, hogareños, etc.) ha ampliado significativamente el contacto de la población con sustancias potencialmente tóxicas que, consecuentemente han incrementado también el número y variedad de los cuadros actuales de intoxicación.

Este crecimiento acelerado y a veces descontrolado, por falta de normas o cuidados especiales en el uso de los distintos productos, obliga a que el trabajo del clínico y el químico toxicólogo constituya una labor de equipo, con el objeto de establecer rápidamente la etiología de la intoxicación e implantar el tratamiento adecuado que permita neutralizar el efecto tóxico y lograr la recuperación del paciente.

El constante y acelerado progreso de la tecnología ha repercutido sensiblemente sobre la toxicología analítica y es en éste campo donde el análisis instrumental, moderno capítulo de la analítica en general, tiene mayor vigencia y aplicación.

La clásica metodología convencional fué reemplazada paulatinamente por la introducción de equipos e instrumentos de gran sensibilidad y precisión que hacen posible la identificación indubitable de una sustancia en corto tiempo. Pero, debemos tener presente que ésta tecnología de avanzada requiere el apoyo de laboratorios de alta complejidad, de personal especializado y de un gran número de otros elementos, que en su conjunto demandan un costo operativo muy alto.

Para el tema concreto que nos ocupa o sea el de los plaguicidas, cuyo uso masivo se circunscribe al medio rural, ámbito en el que se incrementa la frecuencia de intoxicaciones por dichas sustancias, la posibilidad de contar con laboratorios de avanzada es poco frecuente como así también es notoria la carencia de profesionales especializados en el tema, circunstancias éstas que nos han inducido a reevaluar y ajustar las clásicas metodologías analíticas para poder poner al alcance del analista, carente de equipos ultramodernos, técnicas sencillas pero confiables capaces de conducir certeramente a la identificación de un tóxico.

Desde el punto de vista de la Toxicología de Urgencia, la premisa básica para la elección de un método analítico es la rapidez en su ejecución; si a ésta condición le sumamos sensibilidad y especificidad y demostramos que la técnica se ajusta a los mismos, indudablemente que nos encontramos frente a un método de singular utilidad.

Teniendo en cuenta que generalmente una intoxicación aguda está relacionada con una ingesta significativa del tóxico, y que la intervención médica se produce dentro de un corto tiempo posterior a la intoxicación, la posibilidad de encontrar el tóxico en algún humor biológico, aplicando métodos analíticos de mediana sensibilidad, es muy grande.

Los métodos que estudiamos en general son ciegos a los residuos de pesticidas clorados y en algunos casos a los niveles de impregnación (no tóxicos) derivados de una exposición profesional a la sustancia.

En todos los casos tuvimos en cuenta la rapidez en la ejecución, la sensibilidad y la especificidad como condiciones básicas para la selección y estudio de cada técnica.

Rapidez en la ejecución: La posibilidad de obtener un resultado útil en el menor tiempo posible es la base del éxito para un correcto diagnóstico y tratamiento de una intoxicación aguda.

Para que una técnica analítica sea rápida en su ejecución, debe fundamentalmente emplear reactivos sencillos, de fácil preparación y estables; contará con pocas operaciones y no requerirá materiales y/o equipos de manejo complicado.

Sensibilidad: Es la mínima concentración de una sustancia que puede revelarse mediante un método analítico con el máximo grado de seguridad.

Especificidad: Es la característica del método para distinguir con certeza la sustancia que se investiga, diferenciándola con precisión de otras similares en sus propiedades o comportamiento.

Basados en estos tres pilares y fijando como condiciones operativas mínimas las propias de un laboratorio de análisis clínicos del medio rural, como así también contemplando la dificultad en el entrenamiento y apoyo bibliográfico de los profesionales encargados de los mismos, procedimos al estudio en primer término de los diferentes métodos, sus posibilidades de utilización, sus costos de montaje y mantenimiento, sus capacidades resolutivas y su utilidad para el análisis químico toxicológico, analizando en segundo término las técnicas analíticas específicas para cada pesticida de uso común en nuestro medio.

Nuestro objetivo consistió en efectuar un estudio comparativo entre métodos diversos de análisis químico toxicológicos, aplicados especialmente a la investigación de plaguicidas, teniendo en cuenta:

1. Su costo por infraestructura y por análisis expresado en dólares al año 1980.
2. Sensibilidad de cada método en relación a los resultados obtenibles.
3. Sensibilidad relacionada con la rapidez de ejecución impuesta por la emergencia toxicológica.
4. Especificidad que permita un diagnóstico cuali-cuantitativo de certeza.

La única manera de contar con estadísticas veraces en intoxicaciones por pesticidas, consiste en una recolección de casos basada en comprobaciones de laboratorio.

La sospecha o el diagnóstico diferencial quedan así aventa dos de toda duda o sobrenominación matemática.

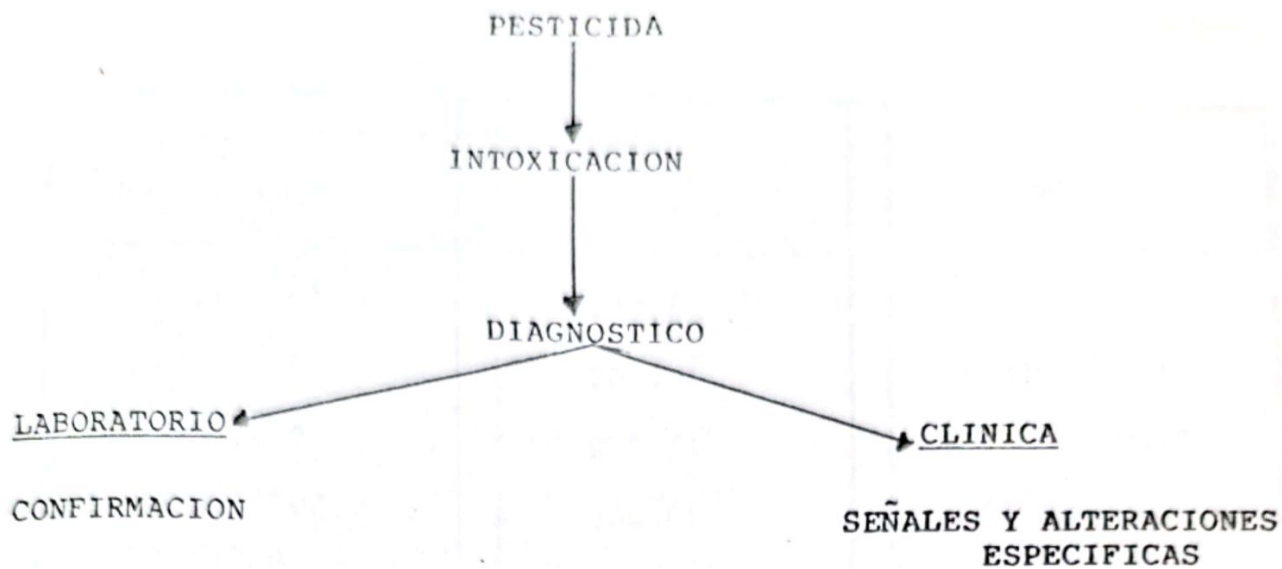
En este punto crucial, el laboratorio resulta indispensable desde el punto de vista de la salud del posible afectado y también de una auténtica y veraz recolección de datos.

Los métodos tradicionales cuentan con los siguientes ventajas:

1. Experiencia por parte de los técnicos,
2. Simplicidad y accesibilidad económica,
3. Posibilidad de realización en medios no equipados con adelantos sofisticados o de investigación.

No involucra en ninguna forma no acceder a las nuevas técnicas, sino establecer claramente que finalidad se persigue y cuál debe ser el camino más idóneo y realista para concretar los objetivos establecidos.

La urgencia toxicológica exige un laboratorio rápido y certero; éste es el objetivo trascendente, de interés médico-social que debe tenerse siempre en cuenta, pues puede darse la paradoja de no intentar diagnósticos fáciles, económicos, veraces y rápidos por entender que solamente la analítica instrumental de avanzada es la única arma de batalla en el laboratorio toxicológico.



TOXICOLOGIA DE URGENCIA

LABORATORIO

RAPIDEZ

SENSIBILIDAD

ESPECIFICIDAD

ESPECTROFOTOMETRIA

TIPO	COSTO POR EQUIPO US\$	COSTO POR DETERMINACION US\$
VISIBLE	3.000	0.10 - 1.00
ULTRAVIOLETA	10.000	0.20
INFRAROJO	15.000	0.30
ABSORCION ATOMICA	30.000	0.50 - 1.20

CROMATOGRAFIA

TIPO	COSTO POR EQUIPO US\$	COSTO POR DETERMINACION US\$
COLUNA	250	0.50 - 1.00
PAPEL	150	0.30
CAPA FINA (TLC)	1.200	0.40 - 1.00
FASE GASEOSA (GLC)	12.000	1.00 - 2.00
LIQUIDO-LIQUIDO (LLC)	20.000	N/D

TECNICAS ELECTROMETRICAS

TIPO	COSTO POR EQUIPO US\$	COSTO POR DETERMINACION US\$
ELECTROGRAVIMETRIA	3.500	0.60
POTENCIOMETRIA	3.000	0.10
CONDUCTIMETRIA	5.000	0.10
POLAROGRAFIA	8.000	0.40
AMPEROMETRIA	3.500	0.10
ELECTROFORESIS	1.800	0.50

INMUNOANALISIS

TIPO	COSTO POR EQUIPO US\$	COSTO POR DETERMINACION US\$
TECNICA DE RADICALES LIBRES	23.000	0.50
RADIOINMUNOENSAYO	15.000	0.50
INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION	100	0.20
INHIBICION ENZIMATICA (EMIT)	10.000	0.75

OTRAS

TIPO	COSTO POR EQUIPO US\$	COSTO POR DETERMINACION US\$
FLUOROMETRICA	20.000	0.10
ACTIVACION NEUTRONICA	N/D	N/D

CRITERIOS TENIDOS EN CUENTA PARA EL CALCULO DE COSTOS

Tiempo de amortización del equipo: 5 años

Número de determinaciones diarias: 20

El costo consignado se refiere unicamente al gasto de reactivos. No se consideran los gastos operativos (servicios, impuestos, mantenimiento, etc) ni los correspondientes al personal (sueldos, viáticos, honorarios, etc.)

TIEMPO DE EXECUCION

METODO	PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS	PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS
COLORIMETRIA	7 horas	3 horas
CROMATOGRAFIA EN PAPEL	20 horas	15 horas
CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA (TLC)	1 hora	1 hora
CROMATOGRAFIA FASE GASEOSA (GLC)	4 horas	3 horas

CRITERIOS TENIDOS EN CUENTA PARA EL CALCULO DEL TIEMPO DE EJECUCION

Técnica controlada y puesta a punto.
Operador convenientemente entrenado.

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

CROMATOGRAFIA

TIPO	SENSIBILIDAD	INTOXICACION AGUDA	
		SANGRE	ORINA
COLUNA	150 μ g	> 2 μ g/ml	> 5 μ g/ml
PAPEL	1 μ g		
CAPA FINA(TLC)	0.1 μ g		
FASE GASEOSA (GLC)	1 pg		
LIQUIDO-LIQUIDO (LLC)	N/D		

PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

CROMATOGRAFIA

TIPO	SENSIBILIDAD	INTOXICACION AGUDA	
		SANGRE	ORINA
COLUNA	100.0 μ g	> 1 μ g/ml	> 5 μ g/ml
PAPEL	5.0 μ g		
CAPA FINA(TLC)	1.0 μ g		
FASE GASEOSA (GLC)	0.1 pg		
LIQUIDO-LIQUIDO (LLC)	N/D		

MICROCRUSTÁCEOS PARA AVALIAR A TOXICIDADE DE ÁGUA

Zelia de Oliveira Soares
FEEMA, Rio de Janeiro, Brasil

INTRODUÇÃO

Atualmente, na maioria dos países, seja ele uma grande potência ou um país em desenvolvimento, além de graves problemas econômicos, sobressai-se a enorme evidência da "contaminação ambiental".

No Brasil, após a expansão da indústria química, foram introduzidos no mercado centenas de produtos químicos, os quais atendem aos mais diversos setores da atividade humana.

É evidente que a fabricação e utilização destes produtos apresentam grande significado para a economia do país, porém não se pode negar que representam grande potencial de risco para o ambiente, particularmente para os sistemas aquáticos, corpos receptores dos efluentes industriais e/ou dos esgotos, em geral.

A complexidade dos produtos químicos impossibilita avaliar, quantitativa e qualitativamente, a toxicidade dos resíduos industriais, acrescentando-se que a caracterização química de todas as substâncias tóxicas componentes dos despejos industriais torna-se impraticável, dos pontos de vista analítico e econômico.

A toxicidade dos efluentes industriais e substâncias tóxicas, no ecossistema, é influenciada pelas interações entre os seus componentes individuais, por outros despejos ali presentes, por suas formas químicas e outros fatores, como a presença de minerais, de origem natural, dissolvidos, do ânion que o metal esteja associado; de substâncias tóxicas de origem orgânica (terpenos, PCBs, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, etc...).

As substâncias tóxicas presentes na água podem agir por meio de um efeito conjunto, ou seja, como se formassem uma "mistura", e a toxicidade é chamada aditiva. Quando a toxicidade de uma "mistura" é superior à soma das toxicidades de

cada componente, o efeito é mais que aditivo, ou seja, ele tem sinergia ou potencialização. Isto é, quando o todo é maior do que a soma das partes. Quando a toxicidade da "mistura" é inferior a soma das toxicidades de cada componente, o efeito é menos que aditivo, ou seja, ele tem antagonismo. Isto é, quando o todo é menor do que a soma das partes.

A avaliação da toxicidade do efluente industrial torna-se significativa, tendo-se em vista o controle da qualidade da água para o sistema aquático, ou seja, preservação de flora e fauna, quando são aplicados bioensaios. Estes testes, utilizando-se organismos, possibilitam verificar e mensurar o efeito tóxico sobre a biota.

Cabe ressaltar que a maioria dos laboratórios não analisa, rotineiramente, os compostos orgânicos tóxicos, os quais, seguramente, devem estar presentes em determinados efluentes industriais. Entre estes compostos considera-se prioritários: terpenos, PCBs, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, nitrosaminas, nitrofenóis, ésteres do ácido ftálico, cloreto de vinila e outros. Estes contaminantes são considerados de maior impacto para o meio aquático, como também metais pesados, cianetos, fenol, etc..., devido à grande quantidade de resíduos sintéticos introduzidos no meio e a inability da maioria dos organismos aquáticos para sobreviver, ou manter a normalidade de suas funções vitais, na presença destes materiais essencialmente químicos.

Os bioensaios, portanto, aplicados ao controle da poluição da água, permitem avaliar os efeitos dos principais poluentes do meio ambiente, frente a organismos aquáticos (marinhos ou dulcícolas), pertencentes a diferentes níveis tróficos destes ecossistemas.

Os testes de toxicidade possibilitam avaliar o efeito das substâncias tóxicas (ou efluentes ou esgotos), nas nossas condições climáticas, frente a organismos-padrão, exóticos ou não, desde que se aclimatem às condições físico-químicas da água utilizada para a manutenção da cultura, a qual deve se aproximar ao máximo àquela da região em estudo. Esse procedimento facilitará o desenvolvimento de critérios e padrões de

qualidade (limites de emissão, concentração de tóxicos) com flexibilidade suficiente para atender às variações ambientais das diversas regiões do país.

OBJETIVOS

Os bioensaios, no que tange ao controle da qualidade da água, são desenvolvidos tanto para o reconhecimento da complexidade da contaminação causada por diferentes tóxicos, de origem natural ou artificial, como também para fixação e fiscalização de normas e padrões referentes ao controle de poluição, entre outros, dependendo das finalidades dos estudos a serem implantados.

Os objetivos dos testes de toxicidade (qualidade da água), abaixo relacionados, demonstram a diversidade de programas e rotinas que podem ser desenvolvidos em um órgão de proteção ambiental, em suas funções de monitoramento e fiscalização:

- Determinação da toxicidade relativa de substâncias e/ou compostos tóxicos;
- Avaliação da bioacumulação de substâncias tóxicas em organismos aquáticos, visando estabelecer critérios e padrões para o recurso hídrico;
- Determinação da toxicidade de despejos sobre uma determinada espécie, usada como biorreagente;
- Determinação da carga poluidora de efluentes de baixa carga orgânica;
- Avaliação da eficiência de tratamento de efluente industrial de alta complexidade química, com o objetivo de remoção de toxicidade;
- Fornecimento de subsídios para determinação de padrões de emissão de efluentes.
- etc...

TIPOS DE TESTES

De acordo com os objetivos, a adequação do laboratório, as adaptações da tecnologia empregada, etc., os bioensaios podem ser desenvolvidos através de testes de toxicidade aguda e/ou toxicidade crônica, classificação dependente do intervalo de dosagem e do período de exposição ao tóxico.

De acordo com a renovação da solução-teste, os testes de toxicidade podem ser:

A. Testes Estáticos:

Estes testes desenvolvem-se, utilizando-se uma concentração definida da substância tóxica, sem renovação durante toda a duração do mesmo. A duração depende do organismo testado, com exemplo a seguir:

Daphnia spp	- 24/48h (toxicidade aguda)
Chlorella sp	- 10 dias (toxicidade aguda)
Pseudomonas putrida	- 16 horas (toxicidade aguda)
Lemna valdicensis	- 10 dias (toxicidade aguda)
Brachydanio rerio	- 96 horas (toxicidade aguda)

É adequado para substâncias, compostos ou efluentes que não interfiram na demanda de oxigênio (DBO baixa), sejam estáveis, não sejam voláteis, não estejam sujeitos a precipitação ou detoxificação pelos organismos.

B. Testes de Fluxo-Contínuo:

Estes testes requerem uma renovação contínua da solução-teste (geralmente através de um diluidor).

As substâncias, compostos ou efluentes podem apresentar alta demanda bioquímica de oxigênio, instabilidade, volatilização ou degradabilidade.

C. Testes Semi-Estáticos ou de Renovação Contínua:

Estes testes requerem renovação periódica da solução-teste, permitindo uma concentração uniforme da substância tóxica (compostos ou efluentes), mesmo sendo instáveis ou voláteis.

ORGANISMOS - PADRÃO: Daphnia Magna e D. Similis.

Phylum: Arthropoda

Classe: Crustacea

Sub-classe: Brachiopoda

Ordem: Cladocera

Os crustáceos são amplamente utilizados em ensaios de toxicidade aguda; são abundantes no meio aquático, possuem papel importante na cadeia alimentar (como presa e predadores); ocupam diferentes níveis tróficos; certos microcrustáceos, como Daphnia spp e Artemia salina podem ser cultivados em laboratório, obtendo-se culturas homogêneas, que apresentam uma sensibilidade definida.

MÉTODOS DE CULTIVO - MICROCRUSTÁCEOS: Daphnia spp.

Podem ser aplicadas várias metodologias, entre elas: ISO (International Standardization for Organization), ASTM (American Society for Test Materials), AFNOR (Associação Francesa de Normalização), etc...

De acordo com a metodologia ISO, os organismos são cultivados numa sala com fotoperiodismo (16h - luz; 8h - obscuridade), temperatura controlada (D. magna - $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), intensidade luminosa de ± 200 lux, mantidos em cristalizadores de 4 l, preenchidos com 2 l de água reconstituída (mole ou dura) ou natural (isenta de cloro e de substâncias tóxicas). A água utilizada para a cultura é chamada água de manutenção e pode ser:

- a) Para D. magna - Água dura, conforme metodologia ISO/82
- b) Para D. similis - água mole, conforme metodologia ASTM.

Os organismos devem ser alimentados com uma ressuspensão de algas (ex.: Chlorella vulgaris) e com um volume de alimento tal que quantifique $1,4 \times 10^5$ cels/ml.

A limpeza dos cristalizadores pode ser feita por sifonamento do fundo e troca parcial da água de manutenção.

MÉTODO DE CULTIVO - Chlorella vulgaris

A partir de uma cultura preparada em meio sólido (agar x agar x L.C. Oligo) inocular 100 ml de meio líquido (L.C. Oligo) e incubar durante 4 dias a uma temperatura de $\pm 24^{\circ}\text{C}$, com agitação contínua e intensidade luminosa de $\pm 5\,000$ lux. Quando a absorbância (A^{440}) atingir entre 0,3 a 0,5 U. Ab. inocular um fermentador (por ex.: de 9l, contendo 5 l de meio nutritivo, autoclavado durante 1 h, 120°C , 1 ATM). Quando o fermentador atingir entre 0,3 a 0,8 U.Ab. A^{440} , mantido numa sala com temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com intensidade luminosa contínua, retirar a cada 2 dias 2 litros da cultura, que serão centrifugados (10°C) para fornecer alimentação à cultura de microcrustáceos e inocular, imediatamente, mais 2 litros do meio L.C.Oligo, para manter a curva de crescimento da Chlorella vulgaris e impedir o aparecimento da substância tóxica cloreli na (prejudicial à cultura de Daphnia spp). O fermentador, geralmente, mantem-se por 25 a 30 dias.

1. Cálculo do volume de alimento :

- a) Leitura do fermentador a A^{440} entre 0,3 a 0,8 U.Ab.
- b) Centrifugação (10°C) de 2 litros de cultura de alga
- c) Ressuspensão do centrifugado, elevando o volume a 100 ml
- d) Retirar 1 ml da ressuspensão e elevar o volume a 10 ml
- e) Leitura no espectrofotômetro do ressuspendido a 10 ml A^{440}
- f) O resultado da leitura do ressuspendido a 10 ml é multiplicado por 2,48 (y)
- g) Divide-se 2,8 por (y) - obtem-se o volume de alimento indicado, ou seja $1,4 \times 10^5$ ml

Para se atingir a concentração de $1,4 \times 10^5$ cels/ml, que é a concentração desejada, é necessário que se adicione $2,8 \times 10^8$ cels/2l .

2. Meio L.C. Oligo:

A- Preparo soluções-estoque:

Solução 1: 4 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - diluir água deionizada; elevar o volume a 100 ml

Solução 2: 10 g de KNO_3 - idem

Solução 3: 3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - idem

Solução 4: 4 g de K_2HPO_4 - idem

Solução 5: 30 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

60 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

60 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

60 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

60 mg de $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

60 mg de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - diluir em água deionizada e elevar o volume a 1000ml.

Solução 6: 1,625g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

0,625g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,625g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - diluir em água deionizada e elevar o volume a 1000 ml

Solução 7: 15g de NaHCO_3 - diluir em água deionizada e elevar o volume a 1000 ml.

B- Preparo do Meio de Cultura:

Solução de 1 a 4 - 1,0 ml

Solução de 5 e 6 - 0,5 ml

Solução 7 - 1,0ml - elevar o volume para 1000 ml (água deionizada)

autoclavar 120°C , 1 ATM/20min
pH $7,1 \pm 0,1$

ajustar c/ HCl ou NaOH

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

1. Teste Estático Preliminar ou Exploratório

O teste é desenvolvido colocando-se a amostra a ser testada em tubos de vidro neutro, marcados em 8 e 10ml, preenchidos até a 2ª marcação (10ml) com 5 (cinco) organismos-teste, geralmente, sem réplicas.

O objetivo do teste, que tem duração de 24h, geralmente, é determinar a faixa de concentração a ser testada no teste definitivo - a concentração mínima que imobiliza 50% dos indivíduos e a concentração máxima inócua dos mesmos.

Teste Estático Preliminar

A. Preenchimento dos tubos com a amostra

% ou Concent.	Nº do tubo	Amostra ml	Diluição amostra 1/10(ml)	Diluição amostra 1/100(ml)	Diluição amostra 1/1000(ml)	Água de diluição (ml)
90	1	9	-	-	-	-
35	2	3,5	-	-	-	4,5
10	3	1,0	-	-	-	7,0
3,5	4	-	3,5	-	-	4,5
1,0	5	-	1,0	-	-	7,0
0,35	6	-	-	3,5	-	4,5
0,1	7	-	-	1,0	-	7,0
0,035	8	-	-	-	3,5	4,5
0,01	9	-	-	-	1,0	7,0
Controle	10	-	-	-	-	8,0

B. Após o preenchimento os tubos são agitados, para homogeneização das diluições da amostra.

- C. Preenchimento do tubo com os 5 organismos e do volume (completar os 10ml).
- D. Acondicionamento dos tubos na câmara incubadora a 20°C (D. magna) e 22°C (D. similis).
- E. Leitura após 24 h de incubação.

2. Teste definitivo:

Após 24h e a leitura do teste preliminar, calcula-se a faixa para aplicação do teste definitivo, que é a faixa do teste preliminar ampliada numa progressão geométrica de razão 1,3. O teste deve ser feito com 4 réplicas.

Ex.: 80 - 62 - 48 - 37 - 29 - 22 - 17 - 13 - 10
 8 6,2 4,8 3,7 2,9 2,2 1,7 1,3 1,0
 0,8 0,62 0,48 0,37 0,29 0,22 0,17 0,13 0,1
 etc...

Obtem-se, então, conforme o índice de toxicidade, a concentração que atingiu 50% dos organismos testados.

No caso de Daphnia, o índice de toxicidade é o de imobilização e expressa-se como: CE(I) 50-24h (ou 48h); ou seja é a concentração efetiva inicial que imobiliza 50% dos organismos testados.

3. Validade dos resultados:

Os resultados são considerados válidos quando:

- a) a percentagem de imobilização do controle é menor ou igual a 10%
- b) A CE(I) 50-24h (48h) de Dicromato de potássio estiver entre 0,9 e 2,0 mg/l;
- c) O teor de oxigênio dissolvido medido no final do teste for maior ou igual a 2 mg/l.

4. Expressão dos Resultados

Expressar a CE(I) 50-24h (48h) em:

- a) Percentagem, ou em mililitro por litro (ml/l) em casos de efluentes;
- b) Miligramas por litro (mg/l) - em caso de substâncias químicas.

TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS ORGANO-CLORADOS
EN MEDIOS BIOLOGICOS

Carlos A. Gotelli

Cátedra de Toxicología-Facultad de Medicina-UNBA

Buenos Aires, Argentina

El problema que se plantea en primera instancia ante un cuadro de intoxicación aguda, es la necesidad de efectuar un diagnóstico químico-toxicológico rápido y seguro, que permita descartar cualquier otra etiología y oriente sobre el tratamiento que debe implantarse; el éxito del mismo dependerá, en gran parte, de la celeridad con que se halla determinado la presencia del agente tóxico.

En el caso concreto de la investigación de plaguicidas clorados en medios biológicos de un intoxicado, la búsqueda de los mismos implica la tenencia de equipos ultrasensibles y de alto costo, tales como cromatografía en fase gaseosa con detector de captura electrónica. Desgraciadamente las posibilidades de contar con equipos adecuados están circunscriptas a escasos laboratorios, que generalmente se hallan en los centros densamente poblados. En contraposición a lo expuesto, el empleo de los pesticidas en gran escala se realiza en las zonas rurales, carentes de centros especializados capaces de efectuar determinaciones de plaguicidas en forma rápida y certera.

En los últimos cuatro años han aparecido un considerable número de procedimientos analíticos simples que utilizan como método resolutivo la cromatografía en capa delgada. De todos ellos, el publicado por Luckens y colaboradores en el año 1970, es el que más se adapta a las necesidades de un laboratorio toxicológico de urgencia.

En el Laboratorio de la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Medicina, pusimos a punto dicha técnica e introducimos modificaciones que lo hacen más accesible y práctico.

CONSIDERACIONES PREVIAS

La sangre y la orina son los fluídos corporales que se pueden conseguir más rápidamente en un supuesto intoxicado. Es de esperar que la orina contenga el compuesto órgano-clorado en su estado normal o bien uno o más metabolitos provenientes de su degradación. La sangre revela la cantidad de pesticida circulante, la concentración total del mismo es la resultante del equilibrio entre el plaguicida libre y el fijado en los elementos propios de la sangre y tejidos irrigados. Por medio de la manipulación selectiva se puede determinar la cantidad de tóxico libre, de tóxico fijo o bien la concentración de tóxico total.

Una cantidad significativa de los pesticidas organoclorados circulantes se halla ligada a los hematíes (1). Weikl y col., en una serie de experimentos in vitro, determinaron los siguientes porcentajes de fijación:

para el DDT.....	38-40%
para el Lindano.....	60-65%
para el Dieldrin.....	34-39%

Kadis y Jonasson (2) demostraron en el año 1965 que el Aldrin se halla asociado a la hemoglobina y a un constituyente no determinado de los eritrocitos. En base a estas consideraciones, la determinación de los pesticidas organoclorados en sangre total, ofrece datos y resultados más representativos que los hallados en la determinación de dichos pesticidas en plasma o suero.

MATERIAL E MÉTODOS

- a) Equipo: el habitual para la realización de cromatografía en capa delgada. Nosotros empleamos como soporte portaobjetos conteniendo un depósito de adsorbente de 2 mm de espesor, constituido por una mezcla en partes iguales de óxido de aluminio G y sílica gel G (Merck), al 30% en una solución de nitrato de plata al 1% en agua destilada.

- b) Líquido resolutivo: n-hexano saturado con N-N-dimetil-formamida y conteniendo 0.1% de acetona.
- c) Revelado: Comprende dos etapas; 1) observación a la LUV
2) aspersión de una solución de o-toluidina al 1% en alcohol.

TECNICA OPERATORIA

Extracción: los insecticidas organoclorados son altamente lipofílicos, motivo por el cual, cuando se procede a su extracción con fines analíticos, se produce la extracción simultánea de los lípidos presentes en el medio.

Tales extractos generalmente no son satisfactorios para la aplicación de técnicas cromatográficas, ya sea en fase gaseosa o en capa delgada, debido a la presencia de cantidades excesivas de pigmentos y lípidos que interfieren en la determinación. Este inconveniente se subsana mediante la ejecución de operaciones de limpieza que demandan demasiado tiempo. Cuando se desea acortar el tiempo de la determinación, el analista debe sacrificar la recuperación máxima del pesticida, empleando un sistema de solventes que extraigan la mínima cantidad de sustancias interferentes, con una recuperación razonable del tóxico.

El n-hexano es el solvente que más se adapta a esta segunda posibilidad, dado que permite la extracción máxima de insecticida, acompañado de un pequeño porcentaje de sustancias interferentes. Este extracto sin embargo, contiene suficientes elementos como para interferir en la resolución cromatográfica en capa delgada. La hemólisis previa a la extracción eliminó este problema y permite contar con un extracto que se puede cromatografiar directamente sin proceso previo de limpieza.

TECNICA

A 5 ml de sangre total, extraída usando oxalato de potasio como anticoagulante, se adicionan 15 ml de agua destilada, agitando fuertemente durante 30 segundos para favorecer la

hemólisis. Posteriormente se agrega 5 ml de n-hexano (Merck o similar) y se agita energicamente durante un minuto; separar por decantación o centrifugación y evaporar a sequedad en baño maria la fase orgánica. El residuo se disuelve en 0,05ml de n-hexano puro.

Las placas preparadas según la técnica descripta, se activan entre 90-100° durante 30 minutos y luego se siembran alícuotas de 5,10 y 20 microlitros del extracto y se colocan en la cuba, previamente saturada con el solvente.

El corrimiento insume de 10 a 15 minutos, transcurridos los cuales, las placas se secan al aire y se procede a la localización de las manchas con la ayuda de la luz ultravioleta.

Posteriormente, mediante la aspersión de una solución de o-toluidina al 1% en alcohol, se procede al revelado, apareciendo los plaguicidas organoclorados como manchas de color amarillo.

La siembra simultánea de cantidades conocidas de los plaguicidas más comunes (DDT, aldrin, dieldrin, etc.), permite obtener información aproximada acerca de la concentración del pesticida en la muestra analizada.

DISCUSION

El método descripto permite detectar concentraciones del orden de 0,1 ppm de pesticidas organoclorados en sangre u orina. Dicha técnica es ciega a las concentraciones habituales de plaguicidas organoclorados en la población.

Los ensayos de recuperación efectuados, arrojaron un resultado de 85% para valores conocidos de DDT, 92% para dieldrin y 80% para aldrin.

Mediante la adaptación de un simple dispositivo de muestreo, se puede abordar, con éxito, la determinación de pesticidas en ambientes laborales.

La sencillez, rapidez y efectividad de la técnica descripta, son cualidades suficientes para que se implante en todos los centros asistenciales cercanos a las zonas de producción

agrícola, cubriendo de esta forma una necesidad impostergable y contribuyendo positivamente a evaluar en su verdadera dimensión, los trastornos e inconvenientes provocados por el mal uso de los plaguicidas.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS ATRAVÉS DE
BIOENSAIO COM DROSOPHILA MELANOGASTER

Flavio Rodrigues Puga
Silvana Rubano
Instituto Biológico
São Paulo, Brasil

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de investigação, cujo objetivo é o controle dos praguicidas como poluentes ambientais e contaminantes de alimentos, constituem um dos campos de maior relevância no panorama das avaliações toxicológicas e têm recebido a constante atenção das autoridades governamentais e sanitárias em todo o mundo.

Os ensaios biológicos constituem um dos recursos mais eficientes como método de triagem para a identificação de resíduos de inseticidas em regiões onde o alto custo e as elevadas despesas operacionais tornam inviáveis métodos que exigem o uso de aparelhos de alta precisão. Um dos requisitos básicos exigidos destes bioensaios é que tenham sensibilidade necessária para detectar níveis de resíduos na faixa de 0,1 a 1,0 mg/kg ou menos. Dentre os organismos mais usados, destaca-se a mosca das frutas (Drosophila melanogaster, Meig.)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - PREPARAÇÃO DO MATERIAL

2.1.1 - INSETICIDAS

Para a determinação da DL_{50} de um inseticida, diferentes concentrações são preparadas em solventes orgânicos usando, como fator de progressão geométrica, 2 ou $\sqrt{2}$ ($=1,41$) ou $\sqrt[3]{2}$ ($=1,26$), conforme a precisão desejada.

2.1.2 - MATERIAL BIOLÓGICO

- . Picar o material em pequenos pedaços.
- . Pesar 50 gramas.
- . Homogeneizar com 150ml de mistura acetonitrila e água (65:35).
- . Agitar fortemente durante 5 minutos.
- . Filtrar através de papel de filtro.
- . Separar 50ml do extrato.
- . Evaporar o extrato através de corrente de ar até reduzir o volume a 20ml.
- . Transferir o extrato para funil de separação e acrescentar 5ml de éter de petróleo.
- . Agitar fortemente e aguardar a completa separação das camadas.
- . Separar e guardar a camada superior e repetir a operação anterior com a camada inferior duas vezes.
- . Juntar as camadas superiores e evaporar através de corrente de ar até reduzir a 2ml.

2.2 - MOSCAS: Drosophila melanogaster

2.3 - MEIO DE CULTURA

. Em um balão volumétrico de 1000ml colocar 30g de ágar e 500ml de água deionizada.

. Autoclavar a 120°C por 30 minutos.

. Juntar 15ml de solução fungicida (80ml de ácido fosfórico, 800ml de ácido propiônico e 1120ml de água deionizada) , 100g de levedura em pó e 60g de açúcar previamente dissolvidos em 500ml de água sob aquecimento brando.

. Manter o balão em banho-maria a 60°C por 10 minutos.

. Distribuir o meio (60ml/frasco) em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampão de gaze e previamente esterilizados. Mantê-los em geladeira até o momento de uso.

2.4 - MANUTENÇÃO DAS MOSCAS

Frascos contendo meio de cultura e, em média, 100 moscas por frasco, são colocados em estufa a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade relativa. A umidade é mantida através da colocação de placas de Petri com água, no interior da estufa.

2.5 - CONTROLE DA IDADE E DO SEXO DAS MOSCAS

Após serem mantidas em estufa por 24 horas, as moscas são transferidas para novos frascos contendo apenas meio de cultura, permanecendo no frasco original apenas os ovos depositados. Quando as moscas, originadas destes ovos, atingirem 5 dias de idade, são separadas por sexo, o que é feito pela observação do tamanho e das características do abdomen (Figura 1).

2.6 - REALIZAÇÃO DA PROVA

2.6.1 - PREPARO DOS FRASCOS DE PROVA

. Alíquotas de 1ml das amostras são aplicadas em tiras de papel Whatman nº 1 (52x46mm) colocadas no interior de frascos de vidro (50mm de altura por 19mm de diâmetro).

. Evaporar o solvente através de fluxo de ar; os frascos usados como controle devem conter apenas solvente.

. Acrescentar a cada frasco 0,5g do meio de cultura.

2.6.2 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE X MORTALIDADE

. Anestesiar moscas de 5 dias por 3 minutos com éter etílico.

. Colocar cerca de 50 fêmeas em frascos de prova, cujas bocas devem ser fechadas com tiras de lenço de papel fixadas com elástico.

. Colocar os frascos na estufa a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade.

. Observar os sintomas de intoxicação após 3-6 e 24h.

. Depois de 24 horas de exposição, determinar as porcentagens de mortalidade.

. Os resultados são apresentados em curvas dose x mortalidade, calculados de acordo com Bliss (1935).

2.7 - DOSE LETAL 50%

A título de exemplo, na Tabela 1, são apresentadas as DL_{50} de vários inseticidas para Drosophila melanogaster, expressas em miligramas do produto por frasco de prova.

TABELA 1

DL₅₀ de inseticidas para Drosophila melanogaster

Inseticida	Exposição (24 horas) (mg/frasco)	Autor da Prova
Aldrin	0,2	Knobel
Clordano	0,02	Rodrigues-Puga
DDT	175	Karlog
Dieldrin	0,8	Karlog
Endrin	0,9	Karlog
Heptacloro	0,2	Karlog
Endossulfan	1,0	Rodrigues-Puga
Triclorfon	1,8	D. Mello
Paration	0,4	Rodrigues-Puga
Mevinfós	1,6	Rodrigues-Puga



3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bliss, C.I., The Calculation of the Dosage-mortality Curves. The Annals of Applied Biology. Cambridge 22:134-67. 1935
- Demerec, M.; Kaufmann, B.P., Drosophila Guide. Introduction to the Genetics and Cytology of Drosophila melanogaster, Carn. Inst. of Washington, 1964, 44p. apud Azevedo, J.L. de; Costa, S.O.P. da - Exercícios Práticos de Genética . São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1973, 288p.
- Joseph, Henry; Knobel, M.G.; Estudo preliminar da sensibilidade de moscas Drosophila melanogaster a diversos pesticidas organoclorados. Rev. Inst. Adolfo Lutz 40 (1): 43-47, 1980
- Karlog, O.; Weihe, M. - Biologisk pavisning of insekticidrester ved hjælp af bananfluer (Drosophila melanogaster)-NORD, VET. MED. 15, 637 - 644, 1964
- Oliveira, J. V.; Batista, G. C. - Avaliação quantitativa de resíduos de inseticidas organofosforados em couve (Brassica oleracea var. acephala) pela Bioanálise com larvas de Aedes aegypti (L. 1762). (Diptera Culicidae)
- Ecossistema vol. 1 julho de 1976 pág. 45 - 53

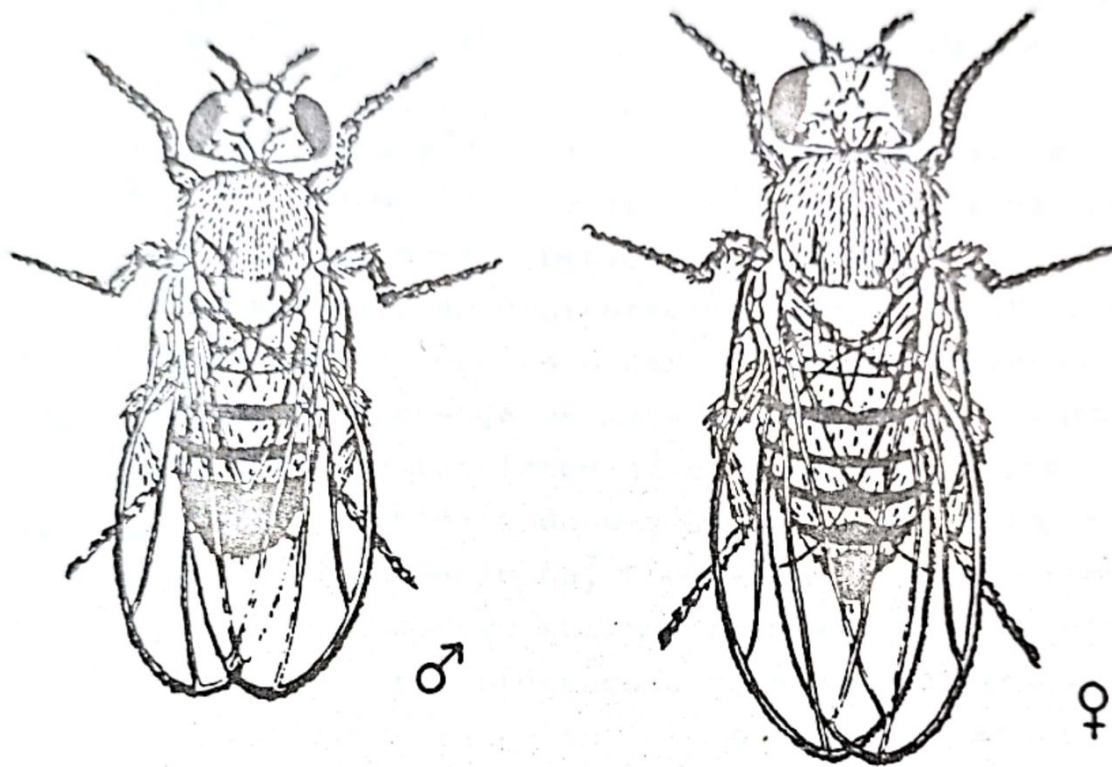


Figura 1 - Representantes macho e fêmea de Drosophila melanogaster (segundo Demerec e Kaufmann, 1964).

TESTES ENZIMÁTICOS "IN VITRO" PARA A DETECÇÃO DE METAIS PESADOS E AGROTÓXICOS EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

Mauro V. de C. Faria

Univ. Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

e Elaine Noce

Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente

FEEMA - Rio de Janeiro

As enzimas (Na^+, K^+) -ATPase e acetilcolinesterase são enzimas "alvo" da atuação de muitos tóxicos. A enzima (Na^+, K^+) -ATPase é inibida por metais pesados e agrotóxicos clorados. A acetilcolinesterase, ao contrário da (Na^+, K^+) -ATPase é inibida por agrotóxicos fosforados e carbamatos não sofrendo nenhuma inibição quando em presença de metais pesados e agrotóxicos clorados. Com base nestes fatos já evidenciados por vários autores, foi desenvolvida toda uma metodologia para a produção de preparações ricas em Na^+, K^+ -ATPase e acetilcolinesterase e, para a utilização dessas enzimas em teste "in vitro" com finalidade de detectar a presença desses contaminantes químicos. Os testes enzimáticos "in vitro" são altamente sensíveis uma vez que expõem as enzimas diretamente à ação dos tóxicos. Sua sensibilidade e rapidez permite o uso de forma rotineira para avaliar a qualidade da água de abastecimento público.

A resposta dos testes enzimáticos baseiam-se na percentagem de inibição da atividade enzimática resultante da atuação de tóxicos, tomando para fins de comparação, a análise com água pura (deionizada) como controle.

1. Teste enzimático "in vitro" com (Na^+, K^+) -ATPase para a detecção de metais pesados e agrotóxicos clorados

1.1. Reagentes utilizados para a determinação (Na^+, K^+) ATPase.

- Substrato Tampão

Solução A: - Pesar 120 mg de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$; 642 mg de NaCl; 149 mg de KCl e 606 mg de Tris (Merck). Dissolvê-los um de cada vez, nos mesmos 8 ml de H_2O . Ajustar o pH a 7,4 com gotas de HCl concentrado. Levar o volume a 10 ml com H_2O .

Solução Uso - Dissolver 28 mg de ATP (ácido adenosino-trifosfórico, sal dissódico) por ml de sol. A. Ajustar o pH 7,4 com Tris em pó.

NOTA: A sol. A é estável indefinidamente. A solução Uso é estável, refrigerada, por 1 a 2 semanas.

- Reativo de Cor

Solução A: Pesar 10 g de Molibdato de amônio. 4 H_2O e adicionar 1,0 ml de hidróxido de amônio ($d=0,90$). Completar com H_2O a 100 ml.

Solução B: Pesar 0,235 g de Metavanadato de amônio (Merck) e dissolver em 40 ml de água quente ($\pm 90^\circ C$). Resfriar, juntar solução de ácido nítrico (0,61ml de HNO_3 concentrado + 1,4 ml de H_2O). Completar com H_2O a 100 ml.

Solução C: Dissolver 20g de duodecil sulfato de sódio (SDS) em 80 ml de H_2O . Completar o volume a 100 ml.

- Reativo de Uso: Misturar as soluções A,B,C (100 ml de cada) adicionar 37 ml de ácido nítrico concentrado. Levar o volume a 1000 ml com H_2O .

NOTA: O reativo de uso é estável indefinidamente no ambiente.

- EDTA 20 mM pH 7,4 - Pesar 7,44 de ácido etileno-diaminotetracético, sal dissódico (EDTA, Na_2), dissolver em 800 ml de H_2O , ajustar o pH a 7,4 com Tris em pó e completar o volume a 1000 ml com H_2O (durabilidade ilimitada quando refrigerada).

1.2. Dosagem da (Na^+, K^+) -ATPase para a Detecção de Metais Pesados

- Preparação de Suspensão de Enzima

A - Suspender 5,25 mg de liofilizado em 3 ml de água destilada (aprox. 0,35 mg de proteína por ml) - suficiente para cerca de 30 determinações.

B - Suspender 5,25 mg de liofilizado em 3 ml de EDTA 20mM pH 7,4.

Procedimento

ENSAIO 1	ENSAIO 2	BRANCO
6,0	6,0	6,0 ml de H_2O deionizada
-	-	0,05 ml de enzima A
1,0	1,0	1,0 ml reativo de cor incubar 2,5 min: a 10 min. 37°C
0,1	0,1	0,1 ml de substrato tampão (partida na reação)
0,85	0,85	0,85 ml de água*
0,05	0,05	- ml de enzima A**

- Ler dentro de 15 min. a 350 nm. Calcular a % de inibição em relação ao controle.

* Água a testar - adicionar 0,2 ml de HCl concentrado para cada 2,5 ml de água; aquecer até a ebulição, esfriar, adicionar tris em pó até pH 7,4 e usar imediatamente. Usar água destilada no controle.

** Caso haja inibição - repetir o procedimento com a enzima B. O desaparecimento da inibição reforça a indicação da presença de metais pesados.

1.3. Dosagem de (Na^+, K^+) -ATPase para Detecção de Organoclorados

- Preparação da suspensão de enzima - idêntica ao item 1.2.B - 5,25 mg de liofilizado em 3 ml de EDTA 20 mM pH 7,4 (suficiente para cerca de 3 determinações).

- Procedimento: Idêntico ao utilizado na detecção de metais pesados, incluindo-se uma pré-incubação de 30 minutos, a 37°C.

CONTROLE	ENSAIO	BRANCO
6,0	6,0	6,0 ml de H ₂ O deionizada
-	-	0,05 ml de enzima
1,0	1,0	1,0 ml de reativo de cor incubar 2,5 min. 37°C
0,1	0,1	0,1 ml de substrato tampão (partida da reação, incubar 30 min. 37°C)
0,05	0,05	- ml de enzima
0,85	0,85	0,85 ml de água (pH 7,4 - 7,5) (água destilada no controle)

Ler dentro de 15 min. a 350 nm. Calcular a % de inibição em relação ao controle.

2. Método Simplificado de Dosagem da Acetilcolinesterase

O método proposto é baseado na queda do pH do meio de incubação pela formação de ácido acético, produto de hidrólise da acetilcolina.

2.1. Reagentes

Solução A: Tampão Tris-HCl-Mg⁺⁺ (MgCl₂ 1,6M em Tris-HCl 0,16M, pH 7,6). Pesar 8,13 g de MgCl₂ · 6H₂O e 0,48 g de Tris (Merck) e dissolvê-los em 20 ml de água. Ajustar o pH a 7,6 com gotas de HCl concentrado e completar a 25 ml com água (estável indefinidamente no refrigerador).

Solução B: Substrato (Acetilcolina 0,29 M)

Pesar 509 mg de cloridrato de acetilcolina (Merck) e dissolver em 10 ml de água (estável por 1 a 2 semanas quando refrigerado).

2.2. Procedimento Rotineiro

- Em um becker de 50 ml adicionar 3 ml de preparação de enzima, 0,5 ml de solução A e 16 ml de água destilada, no controle, ou água a testar.

- Verificar o pH. Caso necessário, se a água estiver muito ácida ou alcalina, ajustar o pH a 7,5 - 7,6 com gotas de HCl ou NaOH diluídos.
- Incubar, com agitação, 120 min. a 37°C.
- Dar partida na reação, adicionando 0,5 ml de solução B (substrato) mantendo-se agitação contínua com agitador magnético, à temperatura ambiente.
- Esperar o pH cair até 7,3 e anotar, em seguida, com uso de cronômetro, o tempo necessário para o pH baixar de 7,3 a 7,0.
- Cálculo da percentagem de inibição:

$$\% \text{ inibição} = \frac{T_2 - T_1}{T_2} \times 100 \text{ sendo:}$$

T_1 = Tempo gasto pelo controle (água destilada)

T_2 = Tempo gasto pela água a testar

2.3. Procedimento para a Eliminação de Interferentes (Tampões estranhos na água a testar)

Na presença de um tampão de pH estranho na água, o que pode ocorrer quando se usa despejos industriais, um teste prévio precisa ser feito, usando-se uma solução 0,01 M de ácido acético. Anota-se o volume desta solução, necessário, para fazer o pH cair de 7,3 a 7,0 na mistura controle (água destilada), antes da adição da solução B (substrato Acetilcolina). Usualmente este volume está em torno de 1,0 ml. A quantidade de ácido acético 0,01 M determinada neste teste, é então adicionada na mistura contendo água a testar, previamente ajustada a pH 7,3, antes da adição da solução B (substrato). O pH final é então registrado. Determina-se, agora, a atividade da enzima medindo-se o tempo necessário para o pH cair, na mistura contendo água a testar, após a adição do substrato, de 7,3 até o pH final determinado na operação anterior.

3. Avaliação dos Métodos Propostos

Os dois métodos propostos são semi-quantitativos selecionando as classes de tóxicos. No entanto dada as suas características, podem ser extremamente úteis para as seguintes finalidades:

- Indicar se a água de mananciais está em condições de utilização pública, quanto a presença de poluentes.
- Avaliar rotineiramente a contaminação por tais agentes de regiões críticas de cursos d'água.
- Montagem de sistema semi-contínuo de alarme.
- Automatização.

Sugere-se que, em princípio uma inibição superior a 25% da acetilcolinesterase seja considerada como indesejável em águas para abastecimento público. Em relação a metais pesados com qualquer percentual inibição enzimática da (Na^+, K^+) -ATPase deve-se em princípio, colocar a água analisada sob suspeição. Já a inibição por organoclorados não deve ultrapassar a 15%.

MÉTODOS ANALÍTICOS RÁPIDOS E KITS PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS (*)

N. Izmirova

Instituto de Higiene e Saúde Ocupacional
Sofia - Bulgária

Estes métodos qualitativos e semi-quantitativos foram desenvolvidos com a finalidade de facilitar a identificação de grupos de pesticidas e também de alguns compostos, isoladamente, em alimentos, em amostras de ar, água ou solo e, em alguns casos, no soro ou no plasma sanguíneo.

Para os inseticidas fosforados orgânicos e carbamatos utilizou-se o efeito inibitório destes compostos para a acetilcolinesterase. Nos demais casos procurou-se obter uma reação colorida com formação de compostos pouco solúveis.

São apresentados cinco grupos de reações que, após sua padronização, estão preparadas em "kits" com papéis reativos, soluções reagentes, lâminas escavadas e caixa para execução das provas.

Primeiro grupo de pesticidas (NELON - Inh)

Estão incluídos os inseticidas inibidores das colinesterases: compostos fosforados orgânicos (paration, malation, diclorvos, triclorfon, mevinfós, etc.) e carbamatos (carbaril, propoxur, aldicarb, carbofuran, p. ex.).

A reação baseia-se na decomposição de acetilcolina pela colinesterase (1) com produção de colina e ácido acético. Este último altera a cor de um indicador de pH que está incorporado no papel reagente.

Este método é de grande sensibilidade, permitindo detectar teores ao nível de nanogramas do pesticida. Pode ser utilizado para pesquisar resíduos de inseticidas fosforados orgânicos e de carbamatos em frutas, hortaliças e outros alimentos. Serve também para monitoramento biológico das condições de trabalho, tanto nas indústrias de síntese e de formu-

(*) Resumo elaborado por W.F. Almeida, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

lação, como nos trabalhos de aplicação nas lavouras.

No caso dos inseticidas fosforados dos grupos dos tio- e ditio-compostos, sua determinação pode ser feita com as reações coloridas descritas no segundo grupo.

Segundo grupo de pesticidas (NELON-E)

Estão incluídos neste grupo os piretróides (deltametrina e outros), dipiridílicos (paraquat e diquat), compostos tiofosforados (paration, metil-paration, tetraclorvinfós, dime-toato, etc.), fungicidas ditio-carbamatos (maneb, zineb, tiram, etc), e também etileno-tio-uréia, clórfenamidina, ácido nicotínico e pirimicarb.

Um extrato alcoólico, acetônico, ou clorofórmico do pesticida é colocado sobre o papel reativo e secado. Após o desenvolvimento da reação pela adição da solução reagente, aparece uma mancha alaranjada, amarelo-parda ou vermelha, conforme a estrutura química do pesticida.

Terceiro grupo de pesticidas (NELON-S)

As reações deste grupo são específicas para a presença de enxofre na molécula; por este motivo permitem confirmar a presença de inseticidas tiofosfóricos (paration, malation) e ditiofosfóricos (Metidation, forato, fosalone), e de fungicidas ditiocarbâmicos (tiram e ziram).

Um extrato alcoólico, acetônico ou clorofórmico do pesticida é colocado sobre o papel reativo e secado. Em seguida, a cor do papel reativo é desenvolvida em sua colocação em água quente. Mancha bem definida parda ou amarelo-parda (conforme a estrutura e a concentração do pesticida) pode ser vista com a colocação do papel reativo contra fundo branco.

Quarto grupo de pesticidas (NELON-I)

As reações neste grupo são específicas para os pesticidas dos grupos tio- e ditiocarbamatos, etileno-bis-ditio-

carbamatos e dissulfeto de tiram (2). Nestes grupos estão incluídos, por exemplo: maneb, zineb, ziram, nabam, ferbam, tiram e etileno-tio-uréia.

Um extrato clorofórmico ou acetônico é colocado sobre o papel reativo e secado. Em seguida, desenvolve-se a cor (para clara ou escura) por exposição deste papel ao vapor d'água.

Quinto grupo de pesticidas (NELON-ON)

Estão aqui incluídos os inseticidas do grupo dos carbamatos que contêm radicais de fenol ou de naftol substituídos, como, por exemplo, carbaril, propoxur, carbofuran, etc.

O extrato acetônico ou clorofórmico é colocado sobre o papel e secado. Em seguida a cor é desenvolvida com a adição da solução reagente.

COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As superfícies contaminadas (partes do corpo, objetos, hortaliças, frutas, outros alimentos) são friccionadas várias vezes com pequenas porções de algodão previamente umedecido em etanol, acetona ou clorofórmio (3). Esta operação é repetida por 3 vezes com outras porções de algodão, que são, em seguida, guardadas em saquinhos de polietileno.

No laboratório, as várias porções de algodão correspondentes a cada amostra são colocadas em um copo Becher de 25 ml. Adiciona-se clorofórmio ou acetona em quantidade suficiente para cobrir as porções de algodão. Agita-se com um bastão de vidro. Os pedaços de algodão são levados, com o bastão de vidro, acima da superfície de líquido e espremidos com o bastão. Em seguida são lavados com clorofórmio ou acetona. A solução é filtrada em sulfato de sódio anidro e, em seguida, evaporada (com um ventilador ou um fluxo de ar quente).

Redissolve-se o resíduo em 1 ml de clorofórmio ou acetona.

Toma-se 1 microlitro desta solução final e coloca-se no centro de cada fita de papel reagente. Evapora-se até secagem. Adiciona-se a solução reagente por 1 minuto ou a fita é exposta à água quente ou ao vapor d'água, conforme o tipo de reação. Em seguida coloca-se a fita de papel reagente entre duas folhas de papel de filtro, para secá-la.

Uma reação quantitativa ou semi-quantitativa pode ser feita, comparando-se a cor do papel reativo (após reação) com os papéis expostos a diferentes concentrações de uma solução padrão do pesticida que está sendo pesquisado..

REFERÊNCIAS

1. Izmirova N.; Kaloyanova F., Khuneva E., Lobodina M., Ilieva D. - Method for ChEA determination at acidosis and high temperatures; Document for Rationalization Nº II.2864/1979, Bulgaria
2. Izmirova N. - Method for establishment of thio and dithio-compounds. Author Document for an Invention, nº 48316/1981, Bulgaria
3. Izmirova N., Kaloyanova F. - Method for establishment of organophosphorous pesticides norm in glass-houses and field conditions. Author Document for an Invention, nº 31248/1975, Bulgaria