

ASPECTE PRIVIND DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PLANTE ȘI PRODUSE VEGETALE

ASPECTS FOR DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN PLANTS AND PLANT PRODUCTS

Cătălina BLOJ, Adela MEGHEȘAN-BREJA

UF Mureș

Abstract:

An overview of extraction and determination methods of pesticides residues from fruits and vegetables was presented. Also, a short presentation of

„Laboratory for determination of pesticide residues from plants and plant products” activity from Târgu Mureș that use some of these methods was made.

Termenul de “pesticide” este adesea utilizat ca sinonim cu produsele pentru protecția plantelor (plant protection products-PPP), care sunt utilizate, în principal, în agricultură pentru a preveni și combate îmbolnăvirea și infestarea culturilor.

Regulatorii de creștere (utilizați pentru influențarea procesului de creștere a plantelor) și erbicidele (care controlează plantele nedorite-buruienile) sunt cuprinși și ei în categoria PPP din punctul de vedere al legislației UE.

Pesticidele utilizate la protecția culturilor, înainte și după recoltare, pot fi regăsite ca reziduuri în produsele finale. Reziduurile de pesticide reprezintă orice substanță sau amestec de substanțe existente în hrana pentru oameni sau animale, rezultate din utilizarea pesticidelor. Termenul include derivați specifici ai pesticidelor, cum sunt produși de transformare sau degradare, metaboliți, produși de reacție și impurități, cu semnificație toxicologică.

Este necesar ca aceste reziduuri de pesticide să nu fie găsite în produse de origine vegetală, alimente sau furaje la nivele care să reprezinte un risc de îmbolnăvire pentru om.

În consecință Comisia Europeană a stabilit nivele maxime de reziduuri (Maximum Residue Levels –MRLs sau limite maxim admise - LMA) care să asigure protecția consumatorului față de o expunere la nivele inacceptabile de reziduuri de pesticide.

Regulamentul (CE) nr. 396/2005 al Parlamentului European și al Consiliului privind conținuturile maxime aplicabile reziduurilor de

pesticide din sau de pe produse alimentare și hrana de origine vegetală și furaje și de modificare a Directivei 91/414/CEE, cu modificări și completări ulterioare, este comun tuturor țărilor din Uniunea Europeană și este obligatorie respectarea acestuia.

Conform Protocolului încheiat între autoritățile implicate în monitorizarea reziduurilor de pesticide din produse vegetale, produse animale și hrana pentru copii, MADR prin Planul Național de Monitorizare, verifică prin analize de laborator conținutul în reziduuri de pesticide al produselor alimentare de origine vegetală din producția autohtonă.

MATERIALE ȘI METODE

Evoluția tehnicilor de analiză permite detectarea din ce în ce mai ușoară a moleculelor aflate în cantități infime.

Peste 800 de substanțe active sunt formulate în mii de pesticide, aceste substanțe formând peste 100 de clase chimice dintre care cele mai importante ar fi: benzoilureati, carbamați, compuși organofosforici (OP), organoclorurați (OC), piretroizi (PYR), sulfonilureați, triazine, ditiocarbamați, azoli, fenoxi acizi. Proprietățile lor fizice și chimice diferă foarte mult, fapt pentru care determinarea reziduurilor acestor pesticide devine destul de dificilă din orice matrice și cauzează probleme în dezvoltarea unei metode "universale" de determinare analitică a reziduurilor, ceea ce ar fi cel mai dorit lucru.

A) EXTRAȚIA PESTICIDELOR DIN PROBELE DE ANALIZAT

S-a estimat că etapa de pregătire a probelor consumă, în cele mai multe determinări, aproximativ 60 – 70% din timpul total necesar pentru analiză. În analize de rutină, aceasta etapă trebuie să fie în măsură să producă rezultate analitice precise, să fie eficientă din punct de vedere economic și în plus, să fie sigură și ușor de realizat și să se aplice pentru o mare varietate de pesticide: organoclorurate, organofosforice, piretroizi, ș.a.

Cele mai multe metode de pregătire a probelor pentru determinarea gaz cromatografică (GC) și lichid cromatografică (LC) includ următorii pași:

1. Proba este omogenizată sau amestecată pentru a obține o matrice uniformă.
2. Aceasta va fi urmată de extracția cu solvenți a reziduurilor de pesticide.

3. O etapa de purificare este necesară uneori pentru a elimina interferențele componentelor matricei
4. Eluarea și / sau fracționarea analiților extrași
5. Concentrarea eluentului și reconstituirea într-un solvent care este compatibil condițiilor GC sau LC.
6. În cele din urmă, soluția care conține pesticide poate fi introdusă în GC sau LC.

Primul pas în procesul de pregătire a probelor pentru analiză este obținerea unei probe omogene și a unui amestec omogen. Conform reglementărilor în vigoare legumele și fructele proaspete trebuie să fie mărunțite cel puțin 5 minute într-un mixer vertical. Numeroase studii demonstrează ca omogenitatea probei și cantitatea probei supusă analizei (10-25g) are influență asupra reproductibilității rezultatelor.

Extracția cu un blender sau un omogenizator încă este cea mai utilizată metodă pentru separarea pesticidelor neionice din matricea plantelor.

Cu toate că există numeroase metode de analiză și detecție a reziduurilor de pesticide, metodele de extracție utilizate sunt aceleași ca în primele zile ale introducerii (nașterii) analizelor de pesticide, aducându-li-se diverse modificări și îmbunătățiri.

Numeroși solvenți organici sau amestecuri de solvenți sunt utilizați pentru a extrage o mare varietate de pesticide cu proprietăți fizico-chimice diferite. Predominant în analizele multireziduale cei mai utilizați solvenți de extracție sunt acetonitrilul, acetona și acetatul de etil, fiind utilizați atât la începuturile analizelor de reziduuri de pesticide cât și în publicații recente pentru extracția atât a pesticidelor nepolare cât și a celor polare dintr-o mare diversitate de matrici agricole. Din fericire noile tehnologii dezvoltate reduc aceste deficiențe ale metodelor de extracție, parametrul de care se ține cont în elaborarea acestora și care este esențial este selectivitatea. Dacă inițial majoritatea pesticidelor erau analizate prin tehnica GC, în ultimii ani tehnica LC câștigă tot mai mult teren, iar detectorii clasici, selectivi sunt înlocuiți cu un detector universal, spectrometrul de masă, care prezintă calități selective și de confirmare.

B) METODE DE ANALIZĂ A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PLANTE ȘI PRODUSE VEGETALE

În funcție de scopul determinării, conținutul de pesticide poate fi o analiză țintită sau nețintită. Un exemplu de analiza țintită este inspecția

LMA-urilor în legume , fructe și alimente ; analiții relevanți sunt fixați a fi determinați în funcție de definițiile date de reglementările LMA (limita maximă admisă). Aceste definiții ale pesticidelor trebuie să includă și metaboliții relevanți sau produșii de degradare ai pesticidelor, ceea ce în regulamentele UE pentru fructe și legume dar și pentru alimente nu sunt realizate în toate cazurile.

Înainte de 1970 determinarea câtorva pesticide din diferite clase chimice se făcea prin tehnica gazcromatografică cuplată cu detectori selectivi ECD (detector cu captura de electroni), NPD (detector pentru azot si fosfor) și FPD (detector flamfotometric). Începând cu acest an este introdusă tehnica GC-MS care este și astăzi cea mai utilizată metodă în analiza pesticidelor, fiind preferată deoarece prin intermediul acesteia se poate face simultan atât determinarea reziduurilor cât și confirmarea rezultatelor obținute cu un singur instrument și într-o singură injectare.

În *cromatografia de gaze* numită și *gazcromatografie* eluentul (un gaz inert din punct de vedere chimic, ex. azot, heliu, hidrogen, ș.a.) trece prin dispozitivul de introducere a probei (unde proba este volatilizată), o preia și o introduce în coloana cromatografică, care este sediul procesului de separare. Datorită interacțiunilor dintre componenții probei, cu faza staționară și/sau faza mobilă, aceștia rămân în urma eluentului, migrând prin coloană cu viteze diferite ,datorită diferențelor dintre coeficienții de repartiție ai celor 2 faze. Astfel se produce o diferență a vitezelor de migrare a componenților , suficient de mare pentru ca la ieșire, aceștia să fie separați, apoi duși de către eluent la detector.

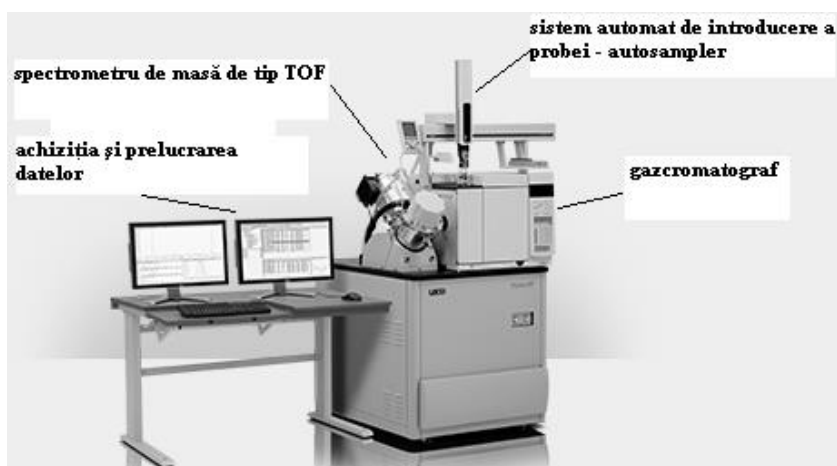


Figura 1 . Gazcromatograf cuplat cu spectrometru de masă de tip TOF

Cromatograful de gaze poate fi cuplat cu detector cu ionizare in flacara (FID), detector cu captură de electroni (GC-ECD), cuplat cu spectrometru de masă GC-MS (triplu cuadrupol, TOF – “time of flight”- timp de zbor sau trapă ionică), cuplat cu spectrometru de masă de înaltă rezoluție (HRGC-HRMS).

Spre deosebire de cromatografia de gaze în care faza mobilă (gazul) joacă rol doar de “cărăuș” în transportul componentelor prin coloană , în cazul *Cromatografiei de lichide*, faza mobilă (un lichid) participă la procesul de separare, prin interacțiuni mult mai complexe (adsorbție , repartiție, schimb ionic, excluziune sterică). Pe de altă parte, faza mobilă lichidă participă nemijlocit la selectivitatea procesului de separare .

În determinarea reziduurilor de pesticide cromatograful de lichide sau lichid cromatograful (LC) poate fi cuplat cu detectori UV-VIS (HPLC UV-VIS) sau cuplat cu spectrometru de masă(cu triplu cuadrupolQQQ, trapa ionică sau TOF –timp de zbor).

Principiul spectrometriei de masă constă bombardarea substanței investigate cu un fascicul de electroni, urmată de accelerarea ionilor pozitivi și de separarea lor în funcție de masă, mai corect în funcție de raportulmasă/sarcină.

Cele trei funcții esențiale ale spectrometrului de masă , și componentele răspunzătoare pentru îndeplinirea acestora sunt:

1. O mică cantitate de probă este ionizată prin bombardare cu electroni , formându-se ,de obicei, cationi prin pierderea unui electron . **Sursa de Ioni**
2. Ionii sunt sortați și separați în funcție de masă și încărcare. **Analizorul de masă**
3. Ionii separați sunt detectați și înregistrați, iar rezultatele sunt afișate sub forma unor grafice. **Detectorul**

Spectrul de masă reprezintă înregistrarea maselor și a abundențelor relative ale ionilor obținuți. Semnalele ionilor sunt prezentate sub formă de linii verticale aflate la valorile m/e corespunzătoare și a căror înălțime este proporțională cu intensitățile (abundențele) ionilor. Din motive practice, aceste abundențe sunt recalculate funcție de semnalul cel mai intens (numit și pic de bază, *base peak*), căruia i se atribuie valoarea de 100 % .

În ceea ce privește rezoluția unui spectrometru de masă, din construcție spectrometrele de masă pot determina valoarea raportului

m/z cu o precizie de patru zecimale, astfel că pot face diferența între diferite formule care au aceeași masă nominală.

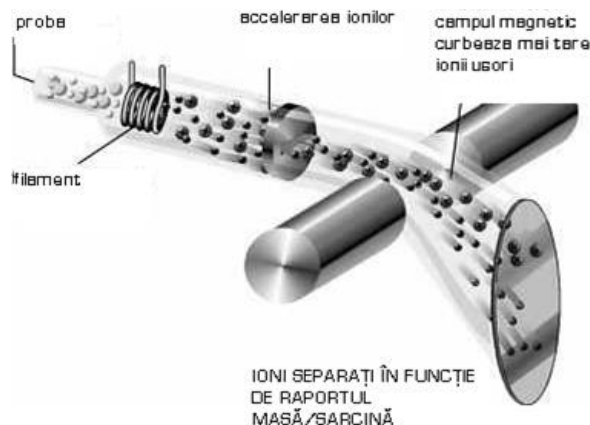


Figura 2 . Schema de principiu a unui spectrometru de masă

Cel mai adesea un spectru de masă se prezintă sub forma unei histograme de forma:

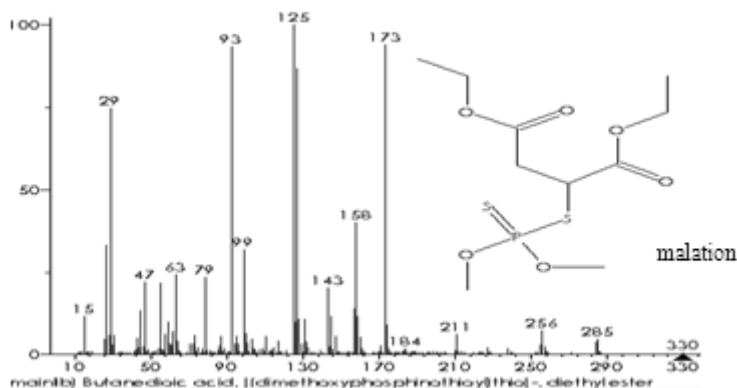


Figura 3. Spectrul de masă al malationului

Clasele de pesticide care se pot determina prin gascromatografie sunt compușii organofosforici (OP), organoclorurați (OC), piretroizii (PYR), triazinele și cloroacetanilidele. De asemenea pot fi determinați prin GC și unii produși de transformare ai OP, PYR și erbicidelor fenoxiacide.

Un mare număr de clase de pesticide în general foarte polare, sunt dificil de analizat pe GC datorită performanțelor cromatografice slabe,

ionizării slabe din sursa MS sau instabilității în injectoarele GC, coloane sau în spectrometrul de masă. Pentru aceste pesticide cât și pentru a elimina derivatizările în metodele GC, s-au dezvoltat metodele lichidcromatografice (LC) cuplate cu spectrometru de masă.

Detectorii LC convenționali cum ar fi UV, nu au suficientă selectivitate pentru analiza pesticidelor din matrici complexe. În plus, detectori selectivi ca detectorul de fluorescență și electrochimic, pot fi utilizați doar când pesticidele sau derivații lor îndeplinesc anumite cerințe. Cuplarea LC cu un detector sensibil și universal cum este MS-ul, a fost recunoscută acum 40 de ani, însă doar recent a devenit o practică de rutină.

Comparativ cu detectorii tradiționali și tehnica de ionizare electrospray (ESI) sau APCI în combinație cu MS au ridicat sensibilitatea detecției cu câteva grade de magnitudine; în plus nu mai este nevoie de o serie de alte modificări ex. (tehnica “switching”, de schimb, a coloanelor) și nici de procedurile intensive de spălare a probelor.

Principalele clase de pesticide care pot fi analizate prin LC-MS includ erbicidele fenoxiacide și erbicidele cu N substituit(bromoxinil) care adesea sunt folosite în formulări cu carbamați, piretroizi, fenilureați, sulfonilureați și o întreagă listă de ditiocarbamați. Pe lângă azoli, erbicidele fenoxiacide ,carbamații, PYR și OP pot fi determinate atât prin GC-MS cât și prin LC-MS.

Aplicabilitatea analizelor GC-MS este prezentată în manuale de analiză a pesticidelor, în aplicații de la producătorii de instrumente sau studii științifice. Există o mare diversitate de baze de date cu spectre de masă prezentate sub formă de biblioteci de spectre masă pentru tehnica GC cu impact electronic (EI), pentru mai multe pesticide (ex. Ehrenstorfer 2005, NIST / EPA / NIH 2005). Prezentări analoage pentru tehnica LC-MS de determinare a reziduurilor de pesticide sunt foarte puține.

La noi în țară cele mai complete lucrări în domeniul analizei reziduurilor de pesticide prin tehnicile GC-MS și LC-MS, din punct de vedere al analizei unei game variate de pesticide din diferite clase și matrici de plante și produse vegetale aparțin Laboratorului Național pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide din Plante și Produse Vegetale București, Laboratorului Național pentru Controlul și Siguranța Alimentelor București, ANSVSA București și din 2009 Laboratorului Zonal pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide din Plante și Produse Vegetale Mureș.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale - Agenția Națională Fitosanitară asigură implementarea Planului Național de Monitorizare a reziduurilor de pesticide din legume, fructe și cereale din producția autohtonă, prin Laboratorul pentru Controlul Reziduurilor de Pesticide în Plante și Produse Vegetale (LCRPPPV), din cadrul Laboratorului Central Fitosanitar București (pentru 28 județe și mun. București) și Laboratorul Zonal pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide în Plante și Produse Vegetale (LZDRPPPV), din cadrul Unității Fitosanitare Mureș (pentru 14 județe).

În anul 2013 Laboratorul Zonal pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide în Plante și Produse Vegetale a fost acreditat Renar pentru 40 substanțe active analizate prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

În cadrul laboratorului sunt analizate probe de origine vegetală provenite din 14 județe din centrul și nordul țării, respectiv: Mureș, Brașov, Covasna, Harghita, Bistrița Năsăud, Botoșani, Suceava, Maramureș, Satu Mare, Cluj, Sibiu, Alba, Bihor și Sălaj.

Probele de fructe, legume și cereale sunt prelevate de către inspectorii fitosanitari din cadrul unităților fitosanitare județene și a Municipiului București, conform programelor naționale de monitorizare a reziduurilor de pesticide. Probele au fost recoltate din depozite en gros, supermarketuri, depozite ale producătorilor, piețe și silozuri. Procedura de prelevare este reglementată în Ordinului MAPDR. nr.1256/ 2005 care transpune directiva 2002/63/EU din legislația UE. Datele referitoare la probele primite sunt înregistrate în caietul de înregistrare a probelor, fiecare probă primește un cod de identificare. Buletinele de analiză, fișele de recepție a probelor și procesele verbale de prelevare a probelor sunt arhivate în camera de documente în bibliorafturi, iar în formă electronică sunt înregistrate pe DVD-uri.

Pentru controlul calității rezultatelor laboratorul participă anual la teste de competență interlaboratoare, organizate de laboratoarele comunitare. În anul 2013 laboratorul a participat la testul PT 19 pentru fructe (mere), organizat de BIPEA – Franța și la testul de competență pe struguri IMEP 37, organizat de Comisia Europeană – Institutul pentru Măsurători și Materiale de Referință, iar în 2014 la testul FV 16 pe ardei, organizat de DG SANCO. Rezultatele obținute la teste au fost bune și foarte bune.

În anul 2013 au fost analizate 470 probe: 113 probe fructe, 321 probe legume și 36 probe cereale. Din cele 321 probe de legume, 22 (6.85%) au avut reziduuri de pesticide, dar sub limita maximă admisă. Un număr de 2 probe de spanac au fost neconforme din punct de vedere al recepției acestora (probe deteriorate care nu au putut fi analizate).

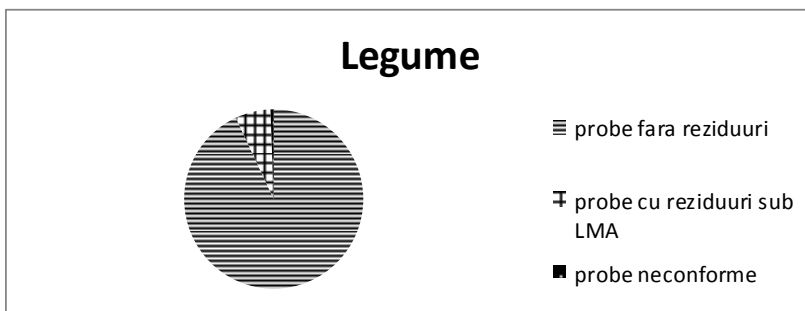


Figura 4. Ponderea pesticidelor sub LMA identificate în legume

În cazul probelor de fructe analizate un procent de 25.66% (29 de probe) au avut reziduuri de pesticide sub limita maximă admisă.

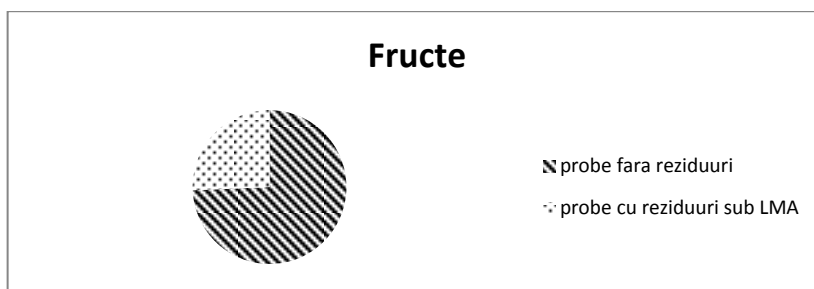


Figura 5. Ponderea pesticidelor sub LMA identificate în fructe

La probele de cereale analizate nu s-au găsit reziduuri de pesticide dintre pesticidele căutate. Nu au fost detectate depășiri ale limitelor maxime admise stabilite în conformitate cu legislația în vigoare.

În anul 2013, au fost analizate un număr de 19 probe ecologice, respectiv 6 legume (mazăre uscată, cartofi, roșii, soia, morcovi), 8 fructe (mere și pere) și 5 cereale (grâu și ovăz). Toate probele ecologice au fost libere de pesticide.

Pentru anul în curs 2014, au fost prevăzute a fi analizate un număr de 635 probe din care, până la momentul actual s-au analizat 600, restul fiind în curs de analizare.

În cadrul laboratorului pot fi identificate și cuantificate 101 substanțe active. Dintre acestea au fost validate un număr de 50, un număr de 13 substanțe active, în urma validării au îndeplinit parțial cerințele ghidului de validare SANCO nr. 12495/2011, iar restul de 38 sunt în curs de validare.

CONCLUZII

Din cele prezentate putem desprinde următoarele concluzii:

- Determinarea reziduurilor de pesticide din legume și fructe presupune ca laboratoarele care efectuează aceste analize să aibă un personal înalt calificat și să fie dotate cu echipamente performante capabile să detecteze reziduurile de pesticide la nivel de urme
- Prezența pesticidelor în legume și fructe în concentrații peste limitele maxime admise indică faptul că nu au fost respectate anumite aspecte legate de timpul de pauză, doză de aplicare recomandată sau faptul că s-a utilizat un produs neomologat pentru cultura respectivă
- Obținerea unor legume și fructe libere de pesticide are efect asupra asigurării stării de sănătate a populației, astfel că se impune respectarea legislației în vigoare referitoare la utilizarea pesticidelor

Bibliografie

1. E.Grou, M.Cicotti, L.Ghinea, V.Rădulescu, E.Goga, Metode pentru determinarea reziduurilor de produse fitofarmaceutice, Editura Ceres, București, 1979
2. SANCO 12571/2013, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Supersedes SANCO/12495/2011, Implemented by 01/01/2014, European Commission, Brussels, Belgium
3. Directorate General for Health & Consumers, Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005
4. Directorate General for Health & Consumers, Active substances Regulation (EC) No 1107/2009
5. F.Moraru, A.Megheșan-Breja, Solul – Mediu Ecologic, Editura Universității „Petru Maior”, Târgu-Mureș, 2011
6. A. Megheșan-Breja, Teză de doctorat, Contribuții la determinarea reziduurilor de pesticide din legume și fructe prin diferite tehnici cromatografice, 2014
7. Raport privind Programul Național de Monitorizare a reziduurilor de pesticide din fructe, legume și cereale, al României pe 2013, în concordanță cu Regulamentul 326/2005 cu modificările și completările ulterioare, LZDRPPV Mureș, 2014
8. L.M.L Nollet, H.S.Rathore, Handbook of Pesticides, Methods of Pesticides Residues Analysis, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010