

MODIFICACIONES AL METODO DE AVERELL-NORRIS
PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PARATHION
EN HORTALIZAS Y FRUTAS ¹

PEDRO WAINSTEIN ²

SALVADOR GONZÁLEZ ³

AGUEDA M. SAMPERI ⁴

ABSTRACT

*Modifications to the Averell-Norris Method for the Estimation of
Parathion Residues in Vegetables and Fruits*

The clean-up procedure of the plant material extracts, starting from the acid hydroalcoholic solution obtained after the AOAC official method (10th edition, 1965, p. 403), before its filtration with Filter-Cel, has been modified.

Modifications are as follows: The extract is diluted to 50 ml, followed by the addition of 1,5 g Filter-Cel, then cooled in ice for 30 min, shaken and filtered by suction on Büchner of an internal diameter of 7 cm or less through a small pore filter paper previously soaked and suction drained. In this way, more than 46 ml of filtrate is obtained. The excedent of this volume is eliminated and the 4 ml of the reagents stated by the method are added. Both blank and parathion standard solutions are treated in the same way.

Extracts from about 180 plant material samples representing almost the whole amount of its corresponding benzene extractions were obtained. These extracts resulted limpid and colorless, free from interfering substances. Recoveries of added amounts of parathion to benzene extracts surpassed 94%. The resulting calibration curve was linear.

¹ Trabajo realizado en la Cátedra de Química Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

² Ingeniero agrónomo, profesor titular interino de Química Agrícola.

³ Bachiller enólogo, Auxiliar de Investigación, Cátedra de Química Agrícola.

⁴ Farmacéutica, Personal Técnico de la Cátedra de Química Agrícola.

Aun cuando los métodos colorimétricos empleados para la determinación de residuos de plaguicidas tienden a ser reemplazados por las modernas técnicas cromatográficas, en especial las de fase gaseosa, en los casos de plaguicidas de amplio uso que al mismo tiempo revisten gran peligrosidad por su elevada toxicidad, como el paratión, se requiere la disponibilidad de métodos que estén al alcance de laboratorios químicos o bioquímicos corrientes no equipados con instrumental de alto costo, para poder estimar sus concentraciones en productos liberados al consumo.

El método colorimétrico de AVERELL-NORRIS¹, tal como se lo describe en la edición 1965 de la AOAC², y utilizado por primera vez en nuestro medio por BONINO *et al*³, establece dos etapas en el proceso de purificación del extracto vegetal conteniendo el residuo del plaguicida. En la primera (solución bencénica), mediante la mixtura adsorbente (arcilla "Attaclay" - carbón activado "Nuchar" - tierra de diatomeas "Filter-Cel" - Na₂SO₄ anhidro). En la segunda, en una solución alcohólica ácida, por agitación con "Filter-Cel" para coagular las sustancias interferentes (grasas, ceras, pigmentos y afines) no removidas en la etapa anterior, y subsiguiente filtración seguida de lavado del filtro, para efectuar por último la colorimetría.

Se admite, sin embargo —y así lo hemos comprobado en nuestra experiencia— que el líquido obtenido después de la filtración puede resultar ligeramente turbio, o bien no del todo incoloro, fenómenos atribuidos a una purificación incompleta y ligados a la cuantía de sustancias interferentes en el extracto bencénico antes de purificar. En tales casos, el método recomienda repetir las operaciones (agregado de HCl 0,5N y polvo de Zn, destilación del solvente, incorporación de etanol, ebullición a reflujo, agregado de "Filter-Cel", agitación, filtración y lavado) partiendo de una alícuota menor del extracto bencénico purificado, en el intento de superar tales inconvenientes.

La causa aparente de los fenómenos apuntados podría explicarse, tal vez, teniendo en cuenta que, con el lavado del filtro (con agua) se diluye la concentración alcohólica del filtrado, y los restos de sustancias cerosas, etc. que pudiera contener este último como solutos, estarían expuestos a precipitar al variar la composición del medio, dando lugar a la opalescencia que a veces aparece al final de la operación, impidiendo efectuar adecuadamente la colorimetría. Ello obliga a realizar repeticiones trabajando con menor alícuota, lo cual, en muchos casos disminuye la precisión de la técnica. Por otra parte, la filtración y lavado a través del papel del filtro Whatman N° 44 o equivalente recomendado, de poro muy fino, es muy lenta, siendo necesario, además, limitarse al uso de no más de 15 ml de agua de lavado, con el riesgo de que la operación resulte incompleta.

LAMB *et al*⁴ informan haber utilizado el método con las siguientes modificaciones: La muestra fue extractada con isopropanol-benceno.

Se usó 5 g de la mixtura adsorbente por cada 100 ml de extracto bencénico. En la filtración final, el filtro fue lavado y el filtrado llevado a volumen con etanol 50% en lugar de agua. Se efectuó una lectura en blanco a cada muestra antes de la adición del reactivo final. Procediendo de este modo, la recuperación de cantidades de paratión agregado a muestras de espinaca no tratada osciló entre el 74 y el 88%. Si bien los autores no mencionan las razones que los llevaron a efectuar tales modificaciones, presumimos que el reemplazo del agua por alcohol 50% y la lectura previa en blanco estuvieran vinculados a la problemática expuesta.

MODIFICACIONES INTRODUCIDAS Y DISCUSION

Antes de proceder al filtrado con el "Filter-Cel", diluir el líquido a 50 ml (en esa etapa es hidroalcohólico ácido y contiene el polvo de Zn) empleando un tubo tipo Nessler largo, marcado a ese volumen, y transferirlo a erlenmeyer de 250 ml. Agregar "Filter-Cel" en cantidad de 1,5 g, agitar y enfriar dentro de un recipiente con hielo durante 30 minutos, agitando ocasionalmente. Al bajar la temperatura, precipitan al máximo las sustancias cerosas, etc. que pudieran encontrarse presentes. Cumplido el lapso indicado, agitar vigorosamente y filtrar por succión empleando embudo Büchner de 7 cm o menos de diámetro interno, a través de papel de filtro poro fino previamente humedecido con agua y drenado por succión. La filtración es rápida, debiendo suspenderse la succión una vez finalizada aquella para evitar pérdida de líquido por evaporación. El filtro es desechado sin lavar. Guardando los detalles indicados (cantidad de "Filter-Cel" y medida de Büchner) el volumen obtenido supera los 46 ml. Transferir seguidamente el líquido al tubo Nessler (que se ha marcado también a 46 ml), eliminar del mismo el excedente de ese volumen e incorporar los 4 ml de reactivos establecidos en el método. Tratar el blanco y la serie de soluciones patrón de paratión de igual manera, empleando embudos y papeles de filtro de iguales medidas. La diferencia de volumen de 4 ml, al ser uniforme para todas las muestras y soluciones patrón, no afecta los resultados reales.

COMPORTAMIENTO DE LA TECNICA

En nuestra experiencia con unas 180 muestras comerciales comprendiendo alcauciles, lechugas, tomates, porotos tiernos, pimientos y duraznos (Cuadro 1), y 3 muestras experimentales de alcauciles tratados con paratión (Cuadro 2), hemos realizado las siguientes comprobaciones:

- 1) La técnica es comparativamente rápida y de manejo sencillo.

Cuadro 1. — RESIDUOS DE PARATION EN MUESTRAS COMERCIALES

Muestra Vegetal	Nº Muestras	Resultado Negativo		Resultado Positivo		Valores extremos en ppm.	
		Nº	%	Nº	%	máx.	mín.
Alcauciles	57	46	81	11	19	0,26	0,02
Lechugas	40	28	72	12	28	0,27	0,03
Tomates	35	26	74	9	26	0,041	0,007
Porotos tiernos . . .	31	27	87	4	13	0,016	0,011
Pimientos	5	5	100	—	—	—	—
Duraznos	8	6	75	2	25	0,37	0,01
TOTALES . .	176	138	77,5	38	22,5	0,37	0,007

Cuadro 2. — RESIDUOS DE PARATION EN ALCAUCILES TRATADOS

TRATAMIENTO	Fecha Trat.	Fecha Anál.	Paratión hallado ppm.
Sobre una mesa de laboratorio fueron rociados 6 alcauciles con una formulación líquida conteniendo 1% de paratión técnico. Fueron divididos en 3 pares, pesados cada uno en fresco, expuestos al aire, y analizados en las fechas indicadas.	17/11	18/11	6,81
	"	20/11	3,06
	"	25/11	1,62

Cuadro 3. — RECUPERACION DE PARATION DE EXTRACTOS DE LECHUGA ENRIQUECIDOS

Paratión agregado	Paratión obtenido	Porcentaje recuperado
0,5 ppm	0,472 ppm	94,4 %
1,0 "	0,976 "	97,6 "
2,0 "	1,858 "	92,8 "
3,0 "	2,646 "	88,2 "
4,0 "	3,984 "	99,6 "
Promedio de recuperación:		94,5 %

2) El filtrado final es totalmente límpido e incoloro, libre de sustancias interferentes.

3) Los resultados analíticos revelan gran sensibilidad al poder detectarse concentraciones del orden de 0,01 ppm de paratión en la muestra vegetal (Cuadro 1).

4) La curva de calibración obtenida empleando esta técnica corresponde sensiblemente a una escala lineal (figura adjunta).

PRUEBAS DE RECUPERACION

Partes alícuotas de un extracto bencénico de lechuga fueron enriquecidas con paratión antes de su primera purificación y procesadas subsiguientemente de acuerdo a la técnica descripta, partiendo de 60 ml —en cada caso— de extracto bencénico tratado y filtrado. Los resultados figuran en el Cuadro 3.

APARATOS Y ALGUNOS DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS

Fotocolorímetro "SPECTRONIC 20" de BAUSCH & LOMB.

Batidora "WEMIR".

Solvente: Benceno puro "SINTORGAN".

Para la mixtura adsorbente: fue utilizada la bentonita de uso enológico en sustitución de "Attaclay". Asimismo, el carbón vegetal activado "PUREST" de origen norteamericano, en lugar de "Nuchar".

Material filtrante "Filter-Cel" (tierra de diatomeas) de JOHNS MANVILLE, (atención Quimicuy, Mendoza).

Paratión técnico 98,5%, provisto por INTI (atención CITEF, Mendoza).

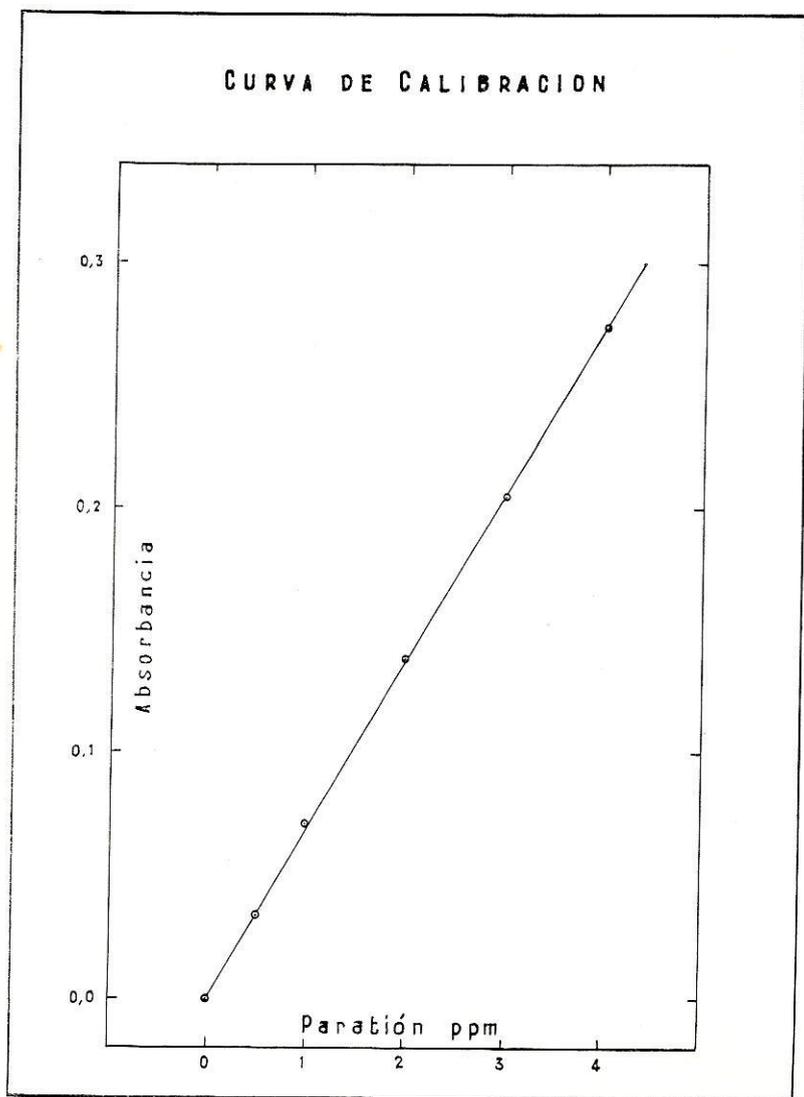
ALGUNOS DETALLES DE LA TECNICA UTILIZADA

Extracción del plaguicida. — Para tomates, pimientos, porotos tiernos y duraznos: se agitó la muestra de 300-500 g con 100-150 ml de benceno durante 10 min.

Para alcauciles: 300-500 g de alcauciles cortados en cuartos se maceraron en 150-300 ml de benceno. Luego se agitó el conjunto durante 10 minutos.

Para lechuga: se dividió la muestra en trozos, se homogeneizó, y 100 g fueron desintegrados con la batidora. Luego se agitó con 100 ml de benceno, durante 10 minutos.

En todos los casos, la solución bencénica separada fue agitada durante 5 minutos con la mixtura adsorbente, en razón de 1 g de ésta por cada 10 ml, y filtrada a través de papel de filtración rápida.



Destilación del solvente y reducción al derivado aminado. — Se operó en la forma descrita en el método AOAC², utilizando el dispositivo indicado provisto de termómetro, *sobre la mayor parte* del extracto disponible, colocando previamente los 20 ml de HCl 0,5N y 0.1 g de polvo de Zn prescriptos. Luego de incorporar los 10 ml de etanol, mediante agitador de vidrio se dispersó el polvo de Zn que en esa etapa se encontraba formando un agregado globular, para aumentar la superficie de contacto del mismo con el medio líquido.

Filtración y determinación. — La filtración se realizó en la forma descrita más arriba, y la determinación como se prescribe en el método original, vale decir, incorporando 1 ml de solución de NaNO₂ al 0,25 %, seguido 10 minutos después de 1 ml de solución de sulfamato de amonio al 2,5 % para destruir el exceso del reactivo anterior, y por último, después de otros 10 minutos, 2 ml de solución de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina al 1%. Esta última sustancia se altera fácilmente en solución, adquiriendo un tinte rosado y originando blancos coloreados. En nuestra experiencia hemos utilizado la droga Merck, la solución fue preparada en la cantidad necesaria inmediatamente antes de usar, como lo indica AOAC, y las colorimetrías se cumplieron sin ningún inconveniente.

CONCLUSIONES

Las modificaciones introducidas al método hacen del mismo una técnica asequible para trabajo de rutina, permitiendo efectuar colorimetrías seguras sin necesidad de repeticiones por inconvenientes propios del mismo. Su sencillez, su relativa rapidez, gran sensibilidad y buena recuperación, unido a la ausencia de requisitos especiales o de aparatos de alto costo, hacen que su manejo esté al alcance de todo laboratorio químico o bioquímico.

RESUMEN

Se ha modificado el procedimiento de purificación del extracto vegetal a partir de la solución hidroalcohólica ácida, obtenida según método oficial AOAC, 10^a edición (1965), p. 403, antes de la filtración con Filter-Cel.

Modificaciones: El extracto es diluido a 50 ml seguido de adición de 1,5 g de Filter-Cel, enfriado con hielo durante 30 minutos, agitado y filtrado por succión sobre Büchner de 7 cm o menor, a través de papel poro fino previamente humedecido y drenado por succión. En esas condiciones se recoge una cantidad de filtrado que supera los 46 ml. Se elimina el excedente de ese volumen y se incorporan los

4 ml de reactivos prescriptos en el método. El blanco y las soluciones patrón de paration son tratados de la misma forma.

Los extractos así obtenidos de unas 180 muestras vegetales, que estuvieron constituidos por la casi totalidad de sus respectivas extracciones bencénicas separadas, resultaron límpidos e incoloros, libres de sustancias interferentes. La recuperación del paration de extractos bencénicos enriquecidos superó el 94 %. La curva de calibración resultante es lineal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Fernando José Martínez, Jefe del Departamento Veterinaria e Higiene de la Alimentación (Ministerio de Bienestar Social de la Provincia), y al Dr. Raúl E. Rodríguez Minola, Director de Salud Pública e Inspección General (Municipalidad de Guaymallén, Mendoza), por el envío de las muestras comerciales de hortalizas y frutas, extraídas periódicamente por sus respectivos cuerpos de inspectores, lo que ha hecho posible la concreción del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- 2 AVERELL, P. R. and M. V. NORRIS. — 1948. *Estimation of small amounts of O,O—Diethyl O,p—Nitrophenyl Thiophosphate*. Anal. Chem. 20, p. 753-756.
- 2 ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. — 1965. *Official Methods of Analysis*. 10ª edición, p. 403.
- 3 BONINO, A. F., A. E. REARTE, D. R. CATANIA, H. H. QUIROGA, M. F. BOCKLET, H. ESTRELLA y M. JAMIESON. — 1969. *Residuos de Parathion y Metilparathion en alcauciles frescos y enlatados*. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Vol. 9 nº 1, p. 131. Valencia (España).
- 4 LAMB, C. F., R. P. FARRAW, E. R. ELKINS, J. R. KIMBALL and R. W. COOK. 1968. *Removal of DDT, Parathion and Carbaryl from spinach by Commercial and Home preparative methods*. J. Agr. Food Chem. 16 (nº 6), p. 967-973.