

USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL PARA AVALIAR RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL

USE OF SEQUENTIAL MASS SPECTROMETRY TO EVALUATE WASTE PESTICIDES IN SAMPLES OF ANIMAL FEED

RESUMO

A alimentação animal (AA) pode ser uma das fontes de contaminação do leite e carnes e por essa razão vários países estabelecem limites máximos residuais (LMR) em agrotóxicos e os monitoram nessas matrizes. O Codex Alimentarius especifica LMR para diferentes AA. No Brasil, a legislação vigente prevê o uso de 26 ingredientes ativos de diferentes classes agrônomicas e químicas em pastos, forragem e cereais sem especificar a utilização se para consumo humano ou animal.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o método QuEChERS para a determinação analítica de resíduos de agrotóxicos no milho e soja, principais matérias-primas utilizadas na produção de AA. Foram estudados 173 agrotóxicos de multi-classes químicas e agrônomicas, sendo sua determinação efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas. Foram avaliados os parâmetros: seletividade, efeito matriz, recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação. Os testes realizados demonstraram que o método proposto é viável para determinar e quantificar 140 das 173 substâncias estudadas em amostras de milho e soja.

Palavras-chave: Alimentação animal, QuEChERS, resíduos de agrotóxicos

ABSTRACT

Animal feed (AF) has been identified as one of the sources of pesticide contamination in milk and meat and, thus, many countries have established maximum residual limits (MRL) for these matrices based on the Codex Alimentarius recommendations. Brazilian legislation concerns 23 different chemical and agronomical classes in feed and cereals, without discriminating if they are to be consumed by humans or animals.

This study aims at evaluating the suitability of the QuEChERS method for the analytical determination of pesticide residues in corn and soy. These cereals are the main raw materials of AF used to feed bovine. 172 pesticides belonging to different chemical and agronomical classes were studied using high performance liquid chromatography with mass spectrometry. The following parameters were studied: selectivity, matrix effect, recovery, repetitivity and limits of detection and quantification. The tests performed demonstrated that the QuEChERS method is suitable for the determination of 140 of the total pesticides studied.

Keywords: Pesticides, QuEChERS, LC-MS/MS, animal feed, LC-ESI-MS/MS

INTRODUÇÃO

A alimentação animal (AA) pode ser uma das fontes de contaminação do leite e carnes - surge como um ponto crítico de

controle em processos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC nas indústrias alimentícias e, por essa

Lucia Helena Pinto Bastos
Adherlene Vieira Gouvêa
Maria Helena Wohlers Morelli
Cardoso
Michele Reis da Silva
Armi Wanderley Nóbrega
Silvana do Couto Jacob

Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ) / Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde
(INCQS). Laboratório de Resíduos
de Agrotóxicos em Alimentos.
Departamento de Química

Correspondências:

Lucia Helena Pinto Bastos
lucia.bastos@incqs.fiocruz.br

razão, vários países já possuem limites estabelecidos e controlam os resíduos de agrotóxicos em AA (KAN; MEIJER, 2007).

O *Codex Alimentarius* especifica LMR em diferentes produtos usados em AA considerando separadamente os de forragem, os provenientes de resíduos agroindustriais de frutas e cereais, entre outros (CODEX, 2008). No Brasil, a legislação vigente permite o uso de 26 diferentes ingredientes ativos em pastos e forragem, de diferentes classes agrônomicas e químicas (ANVISA, 2012; BASTOS, 2011).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o método QuEChERS para a determinação analítica de resíduos de agrotóxicos no milho e soja, principais matérias-primas utilizadas na produção de AA. Foi estudado um grupo representativo de agrotóxicos de multiclassas químicas e agrônomicas, sendo sua determinação efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS) utilizando a cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-ESI-MS/MS).

Em determinações analíticas de multirresíduos é necessário escolher uma matriz para representar uma categoria de produtos alimentícios de modo a minimizar o número de experimentos necessários para estabelecer os parâmetros de validação do método analítico. O *Codex Alimentarius* (CODEX, 2003) estabelece critérios para esta representação, sendo o milho representante do grupo cereal. Assim, neste trabalho o milho triturado foi usado representando os cereais com baixo teor de gordura e a soja aqueles com alto teor de gordura.

O método de extração QuEChERS (ANASTASSIADES et al, 2003) e parâmetros de validação foram estudados para as matrizes milho e soja

Neste trabalho foram avaliados parâmetros de validação e critérios de aceitação comumente presentes em trabalhos nacionais e internacionais: seletividade, efeito matriz, recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação (QUEIROZ et al., 2012; SANCO, 2012; ANVISA, 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Foram utilizados:

- acetonitrila, álcool metílico e acetato de etila - solventes orgânicos de alta pureza e grau cromatográfico (Merck e Tedia);
- MgSO₄ PA (Merck);
- sorvente BONDESIL-PSA 40 μm (Varian);
- C₁₈ 35-75μ (Alltech);
- Al₂O₃, 90, neutro 70-230 # ASTM (Merck), previamente muflado a 550°C por 3 horas antes do uso;
- Na(C₂H₃O₂) anidro (Spectrum), seco a 220°C por 3 horas antes do uso.

Agrotóxicos avaliados e materiais de referência (MR) utilizados

A escolha dos agrotóxicos utilizados neste trabalho foi feita através dos seguintes critérios:

- Possuírem limites máximos residuais permitidos - LMR, em produtos vegetais potencialmente importantes para a produção de AA como: milho, soja, cevada, sorgo, café (cascas), semente de algodão, arroz, cana, feijão, cevada, trigo, citros, girassol. Para essa gama de produtos os LMRs variam de 0,01 a 10 mg.kg⁻¹.
- De uso permitido em culturas de hortifrutigranjeiros, dentre os quais os cítricos que são comuns pelo uso de seus resíduos na produção de rações.
- Serem avaliados por método multirresíduos e por LC-ESI-MS/MS e estarem disponíveis no laboratório.
- De uso proibido de modo a avaliar a aplicação de boas práticas agrícolas no campo.

Soluções estoque de MR

Soluções estoque foram individualmente preparadas pela dissolução do MR, considerando o grau de pureza, na concentração nominal de 100 μg.mL⁻¹ em solvente acetato de etila. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

Soluções intermediárias de MR

A partir das soluções estoque de 100 μg.mL⁻¹ foram preparadas misturas de soluções intermediárias de trabalho em concentrações que variaram de 1 a 0,001 μg.mL⁻¹ em solvente metanol grau cromatográfico. O estudo do método foi feito com quantificação pontual do MR, dentro de uma variação de medição não superior a 30% conforme referenciado em documento SANCO (2012).

Para preparação do ponto de calibração na matriz, 1 mL do extrato orgânico do branco de milho e soja separadamente foram evaporados sob atmosfera de N₂ em bloco de aquecimento a temperatura de 40°C e, após a secagem, dissolvido em 1 mL da solução intermediária do agrotóxico com concentração correspondente ao ponto da curva analítica.

Solução intermediária para controle do equipamento

Foi utilizada uma solução da substância quinalfós na concentração de 0,04 μg.mL⁻¹ preparada em solvente metanol.

Soluções intermediárias para estudo do método

Para este estudo foi utilizada uma mistura dos 173 MR de agrotóxicos (S173) de diferentes classes químicas na concentração nominal de 1 μg.mL⁻¹ preparada em solvente metanol. Essa mistura foi fornecida pelo laboratório de resíduos de agrotóxicos do ITEP-PE. Os agrotóxicos avaliados encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Agrotóxicos estudados nas matrizes milho e soja pertencentes a mistura S173

Agrotóxicos avaliados			
Acefato	dimetomorfe	hexitiazoxi	pirazofós
Acetamiprido	diclorvós	imazalil	piridabem
Aldicarbe	dimoxistrobina	imidacloprido	piridafentiona
Aldicarbe sulfona	diniconazol	indoxacarbe	piridato
Aldicarbe sulfóxido	dissulfotom	iprovalicarbe	pirifenox
Ametrina	diurom	isoprotiolona	pirimetanil
Azaconazol	dodemorfe	isoxaflutol	pirimicarbe
Azametifós	epoxiconazol	isoxationa	pirimicarbe desmetil
Azinfós-etílico	espinosade A	linurom	pirimifós-etílico
Azinfós- metílico	espiroxamina	malationa	pirimifós-metílico
Azoxistrobina	etiofencarbe-sulfona	mefenacete	piriproximifem
Benalaxil	etiofencarbe-sulfóxido	mefosfolan	procloraz
Bitertanol	etiona	mepanipirim	profenofós
Boscalida	etiprole	mepronil	propargito
Bromuconazol	etirimol	metalaxil	propiconazol
Bupirimato	etofenproxi	metamidofós	propizamida
Buprofenzina	etoprofós	metconazol	propoxur
Butocarboxim	etrinfós	metidationa	quinalfós
Butocarboxim sulfoxido	famoxadona	metiocarbe	tebuconazol
Carbaril	fenamidona	metiocarbe sulfona	tebufenosida
Carbendazim	fenamifós	metiocarbe sulfóxido	tebufenpirade
Carbofurano	fenarimol	metobromuron	terbufós
Carbosulfano	fenazaquina	metomil	tetraconazol
Carpropamida	fenbuconazol	metoxifenosida	tiabendazol
Ciazofamida	fenhexamida	metoxurom	tiacloprido
Cimoxanil	fostiazato	mevinfós	tiametoxam
Ciproconazol	fenoxicarbe	miclobutanil	tiobencarbe
Ciprodinil	fenpiroximato	monocrotofós	tiodicarbe
Ciromazina	fenpropimorfe	monolinuron	tiofanox sulfona
Clofentezina	fentiona	muarimol	tiofanox sulfóxido
Clorbromuron	fentiona sulfóxido	nitempiram	tolclofós metílico
Clorfenvinfos	fentoato	ometoato	tolifluanida
Clorpirifos	fluazifope-p-butílico	oxadixil	triadimefom
Clotianidina	flufenacete	oxamil	triadimenol
Cresoxim-metílico	fluquinconazol	oxamil oxima	triazofós
Demetom-S-metílico	flusilazol	oxicarboxina	triclozol
Desmedifam	flutriafol	paclobutrazol	triclórforon
Diazinona	fosalona	pencicurom	trifloxistrobina
Diclofluanida	fosmete	penconazol	triflumizol
Dicrotofós	fostiazato	picoxistrobina	triticonazol
Dietofencarbe	furatiocarbe	pimetrozina	vamidotiona
Difenoconazol	halofenosideo	piperonil butóxido	zoxamida
Dimetoato	hexaconazol	piraclostrobina e *metabólito	3-OH-carbofurano

*Metabolito da piraclostrobina : N[1-(4-clorofenil)pirazol-3-il]oxil-o-tolil]carbamato

No desenvolvimento do trabalho, outras quatro misturas de agrotóxicos (**S141**, **S148** e **S150**) foram utilizadas com inserções e retiradas de analitos em relação à mistura **S173**. As misturas foram identificadas ao longo do trabalho para cada teste realizado.

A **S141** não continha os seguintes MR: butocarboxim, carpropamida, diclofluanida, dicrotofós, dietofencarbe, dimoxistrobina, diuron, etofenproxi, fentoato, halofenosídeo, hexaconazol, mepamirim, metoxurom, monolinurom, nuarimol, nitempiram, oxamil, oxicarboxina, penconazol, pirifenox, pirimicarbe desmetil, pirimifós-etílico, tebuconazol, tebufenosídeo, tiobencarbe, tiofanós-sulfóxido, tolclofós-metilico, tolifluanida, triadimefom, triadimenol, triciclozol e vamidotona.

A **S148** não continha os seguintes MR: bitertanol, butocarboxim, carpropamida, diclofluanida, dicrotofós, dietofencarbe, dimoxistrobina, diuron, espiroxamina, fentoato, halofenosídeo, hexaconazol, mepanipirim, metoxurom, monolinurom, nitempiram, nuarimol, oxamil, oxicarboxina, penconazol, pirifenox, pirimicarbe desmetil, tiobencarbe, tiodicarbe, tiofanox sulfóxido, tolclofós metílico, tolifluanida, triadimefom, triadimenol, triciclozol. Foram incluídos nesta mistura os agrotóxicos: abamectina, cadusafós, carbosulfano, coumafós e fentiona.

A **S150** não possui os seguintes MR: bitertanol, butocarboxim, carpropamida, diclofluanida, dicrotofós, dietofencarbe, dimoxistrobina, espiroxamina, etofenproxi, fentoato, halofenosídeo, hexaconazol, imazalil, mepanipirim, metoxurom, monolinurom, nitempiram, nuarimol, oxamil, oxicarboxina, penconazol, pirifenox, pirimicarbe desmetil, tiobencarbe, tiofanox sulfóxido, tolclofós metílico, tolifluanida, triadimefom, triadimenol, triciclozol. Foram incluídos nesta mistura os agrotóxicos: abamectina, cadusafós, carbosulfano, coumafós, fentiona.

A maioria dos MR presentes nas misturas foram preparados com padrões da marca Dr. Ehrenstorfer-Augsburg (Alemanha), exceto os MR - difenoconazol, cresoxim-metilico, metomil e flutriafol da Sigma Aldrich, aldicarbe, procloraz e tiodicarbe da ChemService e o metabólito da piraclostrobina fornecido pela Bayer. A pureza dos MR utilizados nas misturas foi superior a 97% para a maioria das substâncias utilizadas.

Equipamentos utilizados

Foram utilizados o moinho de faca marca Brabender® Duisburg e o liquidificador industrial, a centrífuga Hitachi-himac CF7D2 e o Agitador rotatório marca IKA® modelo Ms3 digital, balança analítica, com resolução de 10^{-5} g e o evaporador de N_2 , cromatógrafo de ultraeficiência acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo por eletronebulização (HPLC-ESI-MS/MS) modelo Quattro Premier XE, Waters.

Otimização das condições do espectrômetro de massas e HPLC

As condições de operação do espectrômetro de massas, voltagens de cone e colisão foram otimizadas no modo MRM, através da indicação dos íons precursores e íons fragmento obtidos em diferentes trabalhos analíticos (AGUILERA-LUIZ

et al, 2011; HIEMSTRA & KOK, 2007; LEDOUX, 2011; PA-REJA et al, 2011, PIZZUTTI et al, 2007) e ajustados com a mistura para diferentes programas de gradiente. Os íons foram separados em 15 janelas de tempo contendo no máximo 32 transições por janela, por MRM e o íon de maior e menor abundância selecionados para a quantificação e confirmação, respectivamente.

Na Figura 1 está descrita a distribuição MRM em janelas de tempo baseada no tempo de retenção dos agrotóxicos avaliados.

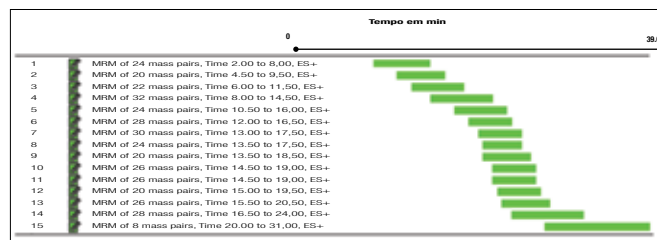


Figura 1. Representação das 15 diferentes janelas de tempo programado para aquisição de dados no método LC-ESI-MS/MS

Os íons precursores, os íons de quantificação, o valor do cone e colisão para os analitos estudados foram ajustados no HPLC-MS/MS e encontram-se descritos na Tabela S1 (apresentada no material suplementar na versão digital disponível no site www.revistaanalytica.com.br).

O equipamento foi operado em MRM com ionização por eletrospray no modo íon positivo. A Tabela 2 mostra as condições utilizadas para o estudo das matrizes milho e soja em resíduos de agrotóxicos em (ES⁺).

Tabela 2. Condições utilizadas para o estudo das matrizes milho e soja em resíduos de agrotóxicos em (ES⁺)

Cromatógrafo líquido	
Coluna analítica	Alltima C18, 5 µm, 150 x 3,2 mm
Temperatura da coluna	40 °C
Fluxo da fase móvel	0,3 mL/min
Volume de injeção	5 µL
Fase móvel A	5mmol/L formato de amônio em água (10% metanol)
Fase móvel B	Metanol
MS/MS	Fonte (ES ⁺)
Voltagem capilar	0,98 kV
Temperatura da fonte	100°C
Interface	eletrospray (Z-Spray)TM
Fluxo do gás do cone	50 L/h de nitrogênio
Temperatura de dessolvatação	400°C
Gás de dessolvatação	Nitrogênio ultra puro
Gás de colisão e pressão	Argônio (3,5 x10 ⁻³) mbar

O gradiente de eluição utilizado foi: Fase móvel A (5mmol/L formato de amônio em água (10% metanol) inicialmente com 82,5%(v/v) com rampa linear até atingir 5,5% da mesma fase em curva linear. O tempo total de análise foi trinta nove minutos.

Método de Extração QuEChERS

As etapas envolvidas neste método são: extração com acetonitrila seguida de partição, promovida pela adição de sais (sulfato de magnésio-MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl) e ou acetato de sódio (Na(C₂H₃O₂)) e limpeza da amostra com sorventes como C18, alumina, PSA (*primary secondary amine*) e carbono grafitado (para uso em amostras com clorofila) (ANASTASSIADES et al, 2003).

A utilização do solvente acetonitrila permite a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e quando acidificada favorece a extração de substâncias que apresentam problemas de estabilidade em meio básico. A utilização do método surgiu com amostras de frutas e hortifrutigranjeiros, amostras com alto teor de água, necessária para permitir a etapa de partição.

Para a utilização deste método em amostras secas, como cereais, foi efetuada a introdução de água ao meio com a formação de uma lama (*slurry*) na amostra de milho e soja. A quantidade de água utilizada foi de 2,5 e 2,0 mL para o milho e a soja, respectivamente. Para ambas as matrizes foram pesadas cerca de um grama do produto moído, adicionou-se água mantendo contato por 30 minutos, suficiente para permitir a hidratação da amostra.

Após o período de descanso, iniciou-se o processo de extração que consistiu em duas etapas dispersivas. Na primeira etapa foi adicionado 6,0g de MgSO₄ + 1,5g Na(C₂H₃O₂) homogeneizado por cerca de 30s em agitador de tubo vortex e posteriormente centrifugado durante 7 minutos a temperatura ambiente. Para a segunda etapa foi retirado 2 mL do sobrenadante e adicionado 300mg MgSO₄ + 100mg de alumina sendo novamente homogeneizado em agitador *vortex*, 1 mL do extrato orgânico foi retirado seco sob atmosfera de nitrogênio e ressuspenso na fase móvel A.

Estudos preliminares realizados no método QuEChERS

Para a determinação do método multirresíduos de agrotóxicos em milho e soja foram avaliados: branco de amostra para a avaliação da seletividade, efeito matriz, recuperação, repetitividade e limites de quantificação e detecção.

Branco de amostra na avaliação da seletividade

Produtos orgânicos de milho e soja foram adquiridos no comércio do RJ para serem usados como branco nos estudos do método.

O critério de aceitação utilizado para considerar as amostras branco foi conter uma concentração igual ou inferior a

0,001 mg.kg⁻¹ do agrotóxico estudado na matriz, nas condições analíticas estabelecidas. Além do limite da concentração foram utilizados outros critérios de confirmação dos analitos estipulados no documento SANCO (2012). As amostras branco de milho e soja foram avaliadas em relação aos agrotóxicos contidos na mistura S173.

Critérios para a confirmação dos agrotóxicos avaliados nas amostras

Os critérios de identidade para a técnica LC-ESI-MS/MS discutidos no documento SANCO (2012) e avaliados foram:

1. O tempo de retenção obtido nas amostras em relação ao tempo de retenção dos (MR) em matriz. O critério de tolerância entre o tempo de retenção (t_r) do MR e amostra ser de ± 2,5%.
2. A intensidade relativa dos íons detectados na amostra avaliada e no material de referência, expresso como porcentagem de intensidade do íon mais abundante com o íon correspondente do MR, medido na mesma concentração e condições analíticas foi a tolerância máxima permitida para a intensidade íons detectados na amostra e no MR e estão descritos na Tabela 3.
3. Razão S/N maior que 3:1 adotados para brancos e amostras analisadas.

Tabela 3. Padrão de tolerâncias máximas permitidas para a intensidade de íons em CLAE-MS/MS

Intensidade Relativa (% do pico base)	Varição aceitável (%)
> 50%	± 20%
> 20 a 50 %	± 25 %
> 10 a 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Fonte: SANCO, 2012

Estudo do efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz

O efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida (efeito matriz - EM) observado pode causar aumento (EM-AR) ou diminuição da resposta (EM-DR) do detector de um analito presente no extrato da amostra, quando comparado ao mesmo analito presente em solvente orgânico gerando erros na determinação analítica (CARDOSO, 2010). Especificamente na técnica de LC-ESI-MS/MS, o EM é observado provavelmente devido à quantidade de interferentes presentes na amostra, ocasionando influência na ionização dos analitos (RODRIGUES et al, 2011). Para a avaliação do efeito matriz do milho e soja foi realizada uma comparação entre as áreas obtidas dos agrotóxicos contidos na mistura preparados em metanol e em extrato branco, de milho e soja respectivamente, anteriormente testado. O estudo foi realizado com o extrato em matriz pós-extração com ressuspenção da mistura do MR.

Para os cálculos das recuperações obtidas utilizou-se a equação 1:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{(X_1 - X_2) \times 100}{X_2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

X_1 = Média das áreas da solução analítica dos agrotóxicos em extrato orgânico na matriz milho ou soja.

X_2 = Média das soluções analíticas dos agrotóxicos em metanol.

Através dessa avaliação na concentração estudada é possível verificar se a matriz exerce algum efeito no nível analítico positivo (aumento de sinal) ou negativo (perda de sinal). Resultados de efeito matriz superior ou inferior a 20% foram considerados (KRUVE et al, 2008; PIZZUTTI et al, 2007).

A avaliação do EM foi realizada com a mistura S150 na concentração nominal de 0,06 mg.kg⁻¹. A solução utilizada continha 51 diferentes classes químicas, a distribuição do número de agrotóxicos, pelas principais classes químicas, representada entre parênteses são: organofosforados (40), carbamatos e metil carbamatos (25), triazol (17), estrobilurina (5), neonicotinóide (5), uréia (4), estrobilurina (4); imidazol (3), anilino pirimidina (2); benzamida (2); benzimidazol (2); espinosinas (2); fosforotioato (2), morfolina (2), piretróide (2), pirimidina (2), oxiacetamida (2) e oxazolidinone (2). Os analitos restantes pertencem a 33 diferentes classes químicas.

Estimativa do limite de detecção e de quantificação para as matrizes

Os limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) foram estabelecidos com base na relação sinal/ruído (S/R), no qual se aceita a estimativa de 3:1 para o LD e de 10:1 para o LQ. Esta relação (S/R) foi calculada pelo software MassLynx, versão 4.0 Waters do equipamento ultraeficiência acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo por eletronebulização (HPLC-ESI-MS/MS) modelo Quattro Premier XE, Waters (Milford, MA,USA).

Para estabelecer essa relação para os valores dos LDI e LQI utilizou-se uma concentração conhecida com aproximadamente 0,02 µg.mL⁻¹ dos agrotóxicos pertencentes à mistura S150 em matriz (extrato branco de milho e soja em metanol), analisados em seis replicatas (n = 6).

Os resultados obtidos foram utilizados para estabelecer a relação (S/R). Em seguida, foram calculadas as médias, os desvios-padrão dos resultados e os valores dos limites LDI, LQI, LDM e LQM.

Para confirmação dos LQM calculados utilizou-se um branco da amostra contendo concentração de cada analito

referente aos LQM calculados. Os analitos cujos valores S/R não foram iguais ou superiores a 3:1, tiveram suas concentrações individuais aumentadas, o que permitiu valores mais fidedignos para o LDM e LQM.

Determinação da recuperação e da repetibilidade dos analitos presentes nas matrizes milho e soja

O estudo buscou verificar, dentro de uma faixa de concentrações compatíveis com os LMRs de cereais (Tabela S4), a recuperação e repetibilidade dos agrotóxicos em diferentes misturas citadas em cada estudo realizado.

Matriz milho

As concentrações consideradas para a avaliação do método foram:

- Para a matriz milho, com a mistura S173, foram estudados dois níveis de fortificação 0,25 e 0,50 mg.kg⁻¹ em 4 replicatas e 2 injeções de cada amostra.
- Com a mistura S141 o estudo foi realizado com nível de fortificação e duas repetições de injeções na concentração 0,1 mg.kg⁻¹.
- Utilizando a S162 foi feita a fortificação na concentração de 0,01 mg.kg⁻¹.
- Durante o processo de avaliação de amostras (*on-going*), foram feitas seis replicatas em diferentes dias na concentração de 0,05 mg.kg⁻¹ Estas recuperações com concentrações mais baixas visam a confirmação do LQM obtido pelo critério sinal ruído.

Matriz soja

Foram feitas duas replicatas de fortificação com a mistura S148 na concentração nominal de 0,05 mg.kg⁻¹.

Como critério de aceitação utilizou-se o documento SANCO (2012), o qual indica recuperações de 70 a 120% e reprodutibilidade avaliada como CV(%) < 18%.

Garantia da qualidade dos resultados analíticos

Como garantia da qualidade dos resultados analíticos obtidos foi utilizado um controlador do equipamento LC-ESI-MS/MS - o agrotóxico quinalfós. Este foi adicionado à amostra a ser analisada na concentração de 0,02 µg.mL⁻¹ quantificado pontualmente. Foi avaliada a razão de íons obtida entre o quinalfós adicionado e a razão obtida no MR em cada amostra analisada. O critério de aceitação da razão de íons obtida para o quinalfós é de <15% e caso esta condição não seja obtida dentro do procedimento analítico, o sistema deverá ser avaliado e a amostra reavaliada.

Outro controle dos dados analisados (QC) foi feito usando as matrizes fortificadas com os agrotóxicos avaliados. Estas amostras analisadas no mesmo intervalo de tempo do QC são consideradas adequadas quando recuperações na faixa

de 60 a 130% e repetibilidade inferior a 20% foram obtidas (SANCO, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Determinações multirresíduos representam um meio efetivo de avaliar um grande número de agrotóxicos em um período de tempo relativamente pequeno. Entretanto, devido às grandes diferenças das propriedades físico-químicas dos analitos avaliados torna-se praticamente impossível obter recuperações adequadas para todos os componentes da mistura avaliada (HASJSLOVÀ et al, 1998) sendo necessária sempre a avaliação de fortificada nas matrizes em estudo.

Resultados do estudo do branco na matriz milho e soja

O branco de milho e soja mostraram-se eficientes na avaliação do método para todos os agrotóxicos pertencentes à mistura, exceção aos agrotóxicos propargito, confirmado nas amostras branco de milho e soja e tebuconazol para a soja. Os analitos identificados foram confirmados dentro dos critérios de qualidade SANCO (2012) conforme demonstrado na Tabela 4.

Como consequência, a presença do propargito nas amostras branco de milho e de soja e do tebuconazol na soja, os resultados das AA para estes agrotóxicos deverão ser avaliados com restrições e considerando concentrações em níveis superiores aos obtidos no branco de matriz. O agrotóxico propargito tem o seu uso permitido no Brasil não sendo permitido para cultura do milho e soja pela ANVISA - órgão responsável pelo estabelecimento do LMR. Entretanto, o MAPA, para fins de monitoramento, estabelece um LMR de 0,1 mg.kg⁻¹ para cultura do milho. O tebuconazol tem o seu uso permitido para cultura da soja (LMR = 0,1 mg.kg⁻¹). Com as amostras branco avaliadas foi possível dar prosseguimento aos testes de: avaliação de EM, recuperação, repetibilidade e estimativa dos LDM e LQM.

Resultados obtidos na avaliação do EM

Considerando o critério de aumento ou diminuição de resposta de 20%, foi observado EM, na mistura **S150** (0,02

µg.mL⁻¹) em 15 e 7% dos agrotóxicos avaliados nas matrizes milho e soja, respectivamente.

Na matriz milho (15% EM) foram observados, deste percentual, 34% EM-AR e 65% com EM-DR. Para a soja (7% EM), foram observados 81% com EM-AR e 19% EM-DR.

O agrotóxico imazalil apresentou o maior EM-AR (74%) e o clorpirifós metil apresentou o maior EM-DR na matriz milho (-240%).

Na matriz soja, o maior EM-AR (25%) foi observado para o agrotóxico ciproconazol e o maior EM-DR (-60%) para o clorpirifós etil.

Uma maneira de atenuar os problemas de EM-AR nas determinações analíticas é a utilização de matriz branco na curva de calibração com o MR. Entretanto, esta estratégia não resolve a situação de EM-DR comumente observada em análises de LC-ESI-MS/MS. Outra estratégia é o aumento da limpeza da amostra (*clean-up*).

Nesta situação sugere-se que o método seja avaliado com cautela quanto à perda de sensibilidade para agrotóxicos que apresentem EM-DR. Essa avaliação deve ser efetuada durante a etapa de estudo da recuperação do método podendo também ser realizado concomitantemente à determinação analítica das amostras com a utilização de QC.

Devido à presença do EM observado para um grande número de agrotóxicos comprovando a interferência na ionização dos analitos, a quantificação de todos os agrotóxicos foi realizada através de superposição da matriz.

Estudos da recuperação do método QuEChERS em milho

Milho 0,25 mg.kg⁻¹

A média dos resultados das quatro replicatas da fortificação obtidas para a mistura mostrou-se adequada dentro dos critérios adotados, recuperação 70 a 120% e repetibilidade avaliada como CV(%) <18%, para 153 substâncias entre os 173 estudados.

Os agrotóxicos que não atenderam a esses critérios de qualidade, com os valores de recuperação e CV representados entre parênteses, expressos em percentagem, foram: demeton-S-metílico (50, 32), diclofluanida (87, 24), diclorvós (55, 21), dimetomorfe (120, 21), dissulfotom (70, 36), etiofen-

Tabela 4. Avaliação da identidade dos agrotóxicos propargito e tebuconazol nas amostras branco de milho e soja

Agrotóxico	Matriz	RT (%)	S/N	Abundância Amostra	Faixa de Abundância	ng.mL ⁻¹	Conclusão
propargito	milho	0,05	16	74	51,86 a 77,8	5	Atende critérios
propargito	soja	0	31	61	49,85 a 74,77	1,6	Atende critérios
tebuconazol	soja	0,25	7	8	2,86 a 8,58	1,8	Atende critérios

S/N: sinal ruído

carbe sulfóxido (210, 21), fosmete (207, 10), nitenpiram (49, 22), tiodicarbe (86 19). Não foi observada resposta para os agrotóxicos: fenarimol, fentiona, imazalil, metiocarbe sulfona, pirifenox, procloraz, isoxaflutol e tiobencarbe.

Milho 0,5 mg.kg⁻¹

A média dos resultados das quatro replicatas da fortificação obtidas para a mistura S173 mostrou-se adequada dentro dos critérios adotados, para 158 substâncias de um total de 173 estudados. Os agrotóxicos que não atenderam aos critérios de qualidade, com os valores de recuperação e CV representados entre parênteses expressos em percentagem foram: clofentezina (64, 71), diclorvós (46, 45), dimetomorfe (132, 23), etiofencarbe sulfóxido (164, 18), fosmete (81, 43), isoxaflutol (60, 46), nitenpiram (74, 42), piridato degradação (72, 29), tiodicarbe (67, 37). Não foi observada resposta para os agrotóxicos: fentiona, imazalil, metiocarbe sulfona, procloraz, e tiobencarbe.

Milho 0,1 mg.kg⁻¹

O valor médio das replicatas da fortificação obtidas para a mistura S141 foi adequado quanto aos critérios de recuperação e reprodutibilidade para 137 agrotóxicos dentre os 141 avaliados. Os ingredientes ativos que não atenderam aos critérios, com os seus valores de recuperação e CV representados entre parênteses, expressos em percentagem foram: aldicarbe (62, 20), ciromazina (43, 5), demetom-S-metilico (36, 47), diclorvós (24, 18), dissulfotom (30, 22), fentiona (61, 10), imazalil (54, 0,5), mevinfós (60, 12) tebuconazol (93, 20), terbufós (62, 14) tiodicarbe (41,10). Não foi observada resposta para o agrotóxico carbosulfano.

Valores obtidos na avaliação para o LDM e LQM

Matriz milho

Os valores de LDM e LQM para os agrotóxicos presentes na mistura S150 foram avaliados na matriz milho e obteve-se os menores valores para o agrotóxico acetamiprido (0,0004 e 0,001 mg.kg⁻¹) e os maiores valores para a vamidotona (0,16 e 0,53 mg.kg⁻¹).

De uma forma geral, o maior número de agrotóxicos (115 em 150) exibiu valores de LD e LQ próximos ou inferiores a concentração de 0,05 mg.kg⁻¹.

Matriz soja

Utilizando a mistura S150 foram obtidos menores valores de LDM e LQM para o agrotóxico acetamiprido (0,001 e 0,002 mg.kg⁻¹) e maiores valores para o tebuconazol (0,11 e 0,35 mg.kg⁻¹).

De uma forma geral, o maior número de agrotóxicos, 113 agrotóxicos em 150 avaliados, obteve valores de LDM e ou LQM próximos ou inferiores à concentração de 0,05 mg.kg⁻¹.

Resultados obtidos nas recuperações para a confirmação dos LDM e LQM

Matriz milho

Para confirmar os valores de LQM obtidos no teste de avaliação dos limites obtidos no S/N foi feito um estudo de recuperação utilizando a mistura S162 em milho na concentração de 0,01 mg.kg⁻¹.

Os valores de recuperação foram adequados em 126 dos 162 agrotóxicos avaliados. As substâncias que não atenderam ao critério de qualidade para valores de recuperação, representados em percentagem entre parênteses, foram: aldicarbe (55), bromoconazol (42), carpropamida (58), ciromazina (33), clorpirifós (128), cresoxim-metilico (39), diclofluanida (28), epoxiconazol (689), etiprole (181), etoprofós (49), etrinfós (146), fenamifós (52), fenarimol (136), fenhexamida (58), fenoxicarbe (43), fluquinconazol (51), flusilazol (46), fosmete (206), isoxationa (39), mepanipirim (60), nitenpiram (59), penconazol (50), picoxistrobina (58), pirifenox (1354), pirimetanil (58), tebuconazol (48), tolifluanida (33) e zoxamida (58).

Na concentração de 0,01 mg.kg⁻¹ nas condições analíticas estudadas um grande número de analitos não se mostrou adequado. Por essa razão, optou-se por realizar novos testes de recuperação em um maior nível de concentração. Foram feitas fortificações na matriz milho na concentração de 0,05 mg.kg⁻¹.

Resultados obtidos para matriz milho 0,05 mg.kg⁻¹

Os resultados obtidos com a mistura S148 para as sete replicatas genuínas realizadas em quatro diferentes dias mostraram valores de recuperação (%) e de CV (%) adequados para 137 entre os 148 analitos avaliados. Agrotóxicos que apresentaram limites diferenciados a esses valores, expressos entre parênteses, foram: abamectina (103, 19), aldicarbe (61, 23), ciromazina (35, 19), demetom-S-metil (30, 26), diclorvós (26, 13), fluquinconazol (82, 22), metomil (148, 21), profenofós (102, 19), quinalfós (92, 21), tiodicarbe (29, 29), zoxamida (90, 21). Todos os resultados das recuperações efetuadas estão descritos na tabela S2 (apresentada no material suplementar na versão digital disponível no site www.revistaanalytica.com.br). Com este estudo de recuperação e repetitividade obtida foi possível confirmar os valores de LQM para 137 agrotóxicos avaliados dentro da mistura S148.

Resultados obtidos na matriz soja 0,05 mg.kg⁻¹

Os resultados da fortificação obtidos foram adequados em relação à recuperação e ao CV para 141 analitos dentre os 148 avaliados. Os agrotóxicos que apresentaram limites diferenciados a esses valores, expressos entre parênteses, foram: abamectina (89 e 28), aldicarbe (76, 26), ciromazina (44, 3), diclorvós (25, 31), famoxadona (88, 32) e metomil (176, 2). O agrotóxico tiodicarbe não apresentou resposta nas con-

dições avaliadas. Na Tabela S3 encontram-se todos os resultados das recuperações na matriz soja para S148.

DISCUSSÕES GERAIS

É conhecida pelos laboratórios da área de resíduos de agrotóxicos a dificuldade na obtenção de MR. Por essa razão, os autores acharam importante a divulgação dos resultados em diferentes misturas nos diferentes testes.

O estudo do método realizado mostrou ser viável a avaliação de um grande grupo de agrotóxicos pelo Método QuEChERS em cereais utilizando LC-ESI-MS/MS. Os agrotóxicos diclorvós e ciromazina apresentaram problemas em todas as etapas de recuperação realizadas. Isto se deve a possíveis perdas do diclorvós no processo de evaporação sob atmosfera de N₂ e problemas na solubilização do MR da ciromazina após estocagem. Estes analitos deverão ser avaliados em outras condições de trabalho.

Para os agrotóxicos de uso não permitido no país, a legislação do MAPA indica que os LQM devem ser de 0,01 mg.kg⁻¹ e esse limite não foi confirmado para 13 agrotóxicos. Os agrotóxicos que não cumpriram esses requisitos, bem como os valores das recuperações obtidas ou ausência de resposta, estão descritas na Tabela S4.

Para os agrotóxicos que possuem LMR estabelecidos foram observadas baixas recuperações (<70%) para os agrotóxicos: clofentezina e alta concentração (>120%) para o metomil. Para a matriz milho baixas recuperações foram obtidas para aldicarbe, demetom-S-metil, dissulfotom e tiodicarbe. Nas mesmas condições analíticas estudadas, para a matriz soja, os agrotóxicos isoxaflutol e piridato também apresentaram um baixo desempenho.

Um quadro geral dos LQM e das recuperações encontradas para níveis na faixa de 0,01 e 0,05 mg.kg⁻¹ comparados aos LMRs permitidos encontram-se na Tabela S4 (apresentada no material suplementar na versão digital disponível no site www.revistaanalytica.com.br).

CONCLUSÃO

Os testes realizados mostraram que a técnica de extração QuEChERS é viável para analisar matrizes de milho e soja e avaliar diferentes subprodutos da AA. A validação completa com todos os agrotóxicos em todos os requisitos de qualidade é desejável pois não foi feita neste trabalho por limitações de MR. Fica clara a necessidade da realização de estudos mais aprimorados com a matriz soja, dada a sua importância econômica nacional e ao grande uso na AA e humana.

REFERÊNCIAS

AGUILERA-LUIZ, M., M.; BOLANOS-PLAZA, P., GONZÁLEZ-ROMERO, R.; VIDAL, M., J., L.; FRENICH, G., A. comparison of efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v399, p2863-2875, 2011.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J.; STAJNBAER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [on-line]. 2009. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acesso em 02 de dezembro de 2012.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [on-line]. 2007. Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/reblas/publica.htm>>. Acesso em 02 de dezembro de 2012.

BASTOS, L, H, P; CARDOSO, M.W.; NÓBREGA, A. W. N.; JACOB, S. C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. *Cadernos de. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 19 (1), p. 51-60, 2011.

CARDOSO, M.H.W.; GOUVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30 (1), p. 63-72, 2010.

REFERÊNCIAS

- CODEX 2011. Alimentarius FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, [on-line] 2008. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.org/standards/pesticides-MRLs/en>>. Acesso em 02 de dezembro de 2012.
- CODEX Alimentarius. Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis: CAC/GL 40-1993, Rev. 1-2003. Rome: FAO/WHO Joint Publications, 2003. V. 2A. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf. Acesso em 10 dezembro de 2012.
- DG-SANCO, EUROPEAN UNION COMMISSION, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. Document n° SANCO/10684/2009, 01 jan 2012.
- HAJŠLOVA, J. Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. *Journal of Chromatography A*, v 800, n°2, p283-295, 1998
- HIEMSTRA, M.; KOK DE A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, v. 1154, p. 3-25, 2007.
- LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticides residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, v1218, p1021-1036, 2011;
- PAREJA, L.; CESIO, V.; HEINZEN, H.; FERNANDES-ALBA, A. R. Evaluation of various QuEChERS based methods based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. *Talanta*, v. 83, p. 1613-1622, 2011.
- PIZZUTTI, I. R. ; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, v. 1142, p. 123-136, 2007.
- QUEIROZ, S. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. *Química Nova*, v. 35, n.1, p. 185-192, 2012.
- KAN, A. C.; MEIJER, L. A. G. The risk contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and terminology*, v. 133, p. 84-108, 2007.
- KOVALCZUK, T.; LACINA, O.; JECH, M.; POUSTKA, J.; HAJŠLOVÁ, J. Novel approach to fast determination of multiple pesticides using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, v. 25 (4), p. 444-457, July 2007.
- KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, p. 58-65, 2008.
- RODRIGUES, A. S.; CALDAS, S. S.; FURLONG, B. E.; PRIMEL, G. E. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. *Química Nova*, v. 34, (5), p. 780-786, 2011.
- ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, G. A.; VIDAL, M. J. L.; PRESTES, O. D; GRIJO, S. L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1477-1485, 2011.