

Evento: VII SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

ESTUDO PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS VISANDO A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS AGROTÓXICOS EM HORTALIÇAS¹

STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF AGROTOXIC RESIDUES IN VEGETABLES

Arthur Mateus Schreiber², Laura De Castro³, Alessandro Hermann⁴, Anagilda Bacarin Gobo⁵

¹ Estudo vinculado a pesquisa Institucional Agroindustrialização de hortaliças orgânicas produzidas no noroeste do RS do Grupo de pesquisa Alimentos e Nutrição da UNIJUI

² Aluno do curso de Engenharia Química da UNIJUI, bolsista PIBITI/UNIJUI, arthur.schreiber@hotmail.com

³ Aluna do curso de Engenharia Química da UNIJUI, bolsista PIBIC/UNIJUI, laura-decastro@hotmail.com

⁴ Professor Mestre do departamento de Ciências da Vida, Orientador, Alessandro.h@unijui.edu.br

⁵ Professora Mestre do departamento de Ciências da Vida, agobo@unijui.edu.br

1 - Introdução

A agricultura moderna passou a utilizar diferentes técnicas e insumos a fim de minimizar as perdas na produção e atender a demanda crescente por alimentos, o que possibilita incremento tanto na produtividade quanto em rentabilidade. Entretanto, o uso indiscriminado desses diferentes insumos (agrotóxicos e fertilizantes) pode acarretar diversos prejuízos ambientais (VEIGA, 2006). Estudo desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) referente ao mercado de agrotóxicos revela que no Brasil o ritmo de expansão no consumo de agrotóxicos é maior que no resto no mundo (ANVISA, 2017).

O Dossiê Abrasco (2017) aponta que o consumo de fungicidas em hortaliças atingiu uma área potencial de aproximadamente 800 mil hectares, contra 21 milhões de hectares na cultura da soja. Isso revela um quadro preocupante de concentração no uso de ingrediente ativo de fungicida por área plantada em hortaliças no Brasil. Estudos desenvolvidos em amostras de 22 culturas de frutas e hortaliças, coletadas em todos os 26 estados brasileiros nos últimos 10 anos, evidenciam que resíduos de agrotóxicos foram encontrados em 48% das amostras e 13,2% destas com alguma irregularidade, na maioria dos casos apresentava um ou mais ingredientes ativos não autorizados. Ainda, as culturas com a maior porcentagem de amostras positivas foram maçã, mamão, pimentão e morango (JARDIM e CALDAS, 2012).

Neste cenário a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação dos mais diferentes contaminantes é indispensável, sejam em monitoramentos ambientais ou a fim de garantir informações a respeito da qualidade dos alimentos consumidos no

Evento: VII SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

país além dos produtos oriundos de importação ou destinados à exportação. Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo estudar e desenvolver método analítico para a determinação de multiresíduos de agrotóxicos em hortaliças.

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Agrotóxicos selecionados para estudos

Os agrotóxicos avaliados foram selecionados a partir do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com base nos principais agrotóxicos permitidos e não permitidos nos cultivos convencionais para o trigo, milho e soja, amplamente cultivados na região noroeste do estado do RS, bem como para as culturas avaliadas (abóbora, vagem, cenoura, batata-doce, milho, salsa, cebola e cebolinha), além de levantamento preliminar na região, acerca das formulações mais empregadas.

2.2 - Preparo das soluções analíticas

Foram preparadas soluções individuais na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila grau HPLC a partir de padrões comerciais Sigma-Aldrich. Tendo como base as soluções estoque individuais de cada composto, foi efetuado uma posterior diluição à concentração de 100 mg L⁻¹ também em acetonitrila. A partir das soluções estoque de 100 mg L⁻¹, foram preparadas soluções individuais na concentração de 10 mg L⁻¹ em viais de 1 mL para injeção em sistema cromatográfico. Posteriormente uma mistura de agrotóxicos (MIX) foi preparada na concentração 10 mg L⁻¹. Para isso, volumes apropriados de cada solução estoque foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, já contendo um pequeno volume de acetonitrila, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente.

2.3- Condições cromatográficas

O estudo foi desenvolvido por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas em série com analisador tipo triploquadropolo (GC-(TQ)-MS/MS) Agilent Technologies 7890B/7000C, com amostrador automático modelo 7693. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 mm, bem como a espessura do filme de 0,25 µm, consistindo de fase estacionária de 5% fenil, 95% dimetilsiloxano. As condições para o sistema cromatográfico foram: Temperatura do injetor, 280 °C; Volume de injeção, 1 mL; Modo de injeção, *splitless*; Forno da coluna, temperatura inicial de 70 °C (manutenção da temperatura em 1 min), com taxa de aquecimento de 7 °C min⁻¹ até 170 °C; a partir desta temperatura, a taxa de aquecimento passa a ser de 10 °C min⁻¹ até 270 °C (manutenção desta temperatura por 15 min); Gás de arraste hélio com fluxo constante de 1 mL min⁻¹; Tempo total da corrida, 40,28 min.

2.4 - Condições do espectrômetro de massas

O estudo das condições de operação do espectrômetro de massas para a obtenção dos espectros característicos de cada analito, foi obtido a partir da injeção de 1 µL de uma solução 10

Evento: VII SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

mg L⁻¹ de cada composto individual, no modo *full scan* (íons totais), possibilitando a identificação e avaliação do espectro de massas para cada composto a fim de permitir a escolha dos íons a serem utilizados. As condições do espectrômetro de massas foram: Temperatura da transferline: 280 °C; Temperatura da fonte de ionização: 230 °C; Fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV); Gás de colisão: Nitrogênio com fluxo de 1,5 cm³ min⁻¹.

3 - Resultados e discussões

Para a separação cromatográfica foi avaliada as melhores condições de temperatura do injetor, a partir das temperaturas de ebulição de cada composto a ser estudado, bem como, otimizar as condições para a rampa de aquecimento do forno da coluna visando o maior número de separação possível dos analitos através da técnica de cromatografia em fase gasosa, minimizando os efeitos de coeluição de analitos. Os resultados das injeções da mistura de agrotóxicos (MIX) em GC-(TQ)-MS/MS no modo *full scan* (íons totais) demonstrou que não há coeluição entre os compostos e apresenta picos cromatográficos bem definidos.

Para a operação do espectrômetro no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), foi necessária a seleção/avaliação de íons precursores obtidos no modo *full scan*, para cada composto em estudo neste trabalho. A escolha dos íons a serem utilizados deu-se a partir de suas intensidades de sinal, bem como a ausência do padrão de fragmentação do íon para qualquer composto no mesmo segmento de análise. Os íons selecionados para cada composto foram separados de todos os demais íons produzidos a partir da fragmentação completa do analito em estudo, utilizando o modo *SIM* (do inglês Select Ion Monitoring), desta forma cada íon precursor individual foi separado no primeiro quadrupolo (Q1). A otimização da energia a ser utilizada na célula de colisão do quadrupolo 2 (Q2), com a finalidade de proporcionar um novo padrão de fragmentação do íon precursor já selecionado previamente, influencia diretamente na intensidade e no tipo da nova fragmentação observada. Neste sentido, para cada analito o(s) íon(s) já selecionado(s) através de monitoramento de íon seletivo no primeiro quadrupolo (Q1) foi novamente fragmentado através de diferentes energias de colisão no segundo quadrupolo, na faixa de 5 a 45 Volts, obtendo desta forma espectros de íons totais na ordem de 50 a 500 m/z de razão massa carga no terceiro quadrupolo (Q3). Os dados obtidos permitiram avaliar a melhor energia para a escolha da transição de quantificação entre íon precursor e produto, com maior sensibilidade e detectabilidade (a partir da intensidade do sinal - Transição de quantificação), bem como outra transição entre íon precursor e íon produto utilizada para qualificação, confirmação do analito a ser determinado (a partir da intensidade do sinal - Transição de qualificação).

Na Figura 1 está representado o cromatograma e os espectros de massas de íons totais o agrotóxico Malation. O espectro de massas obtido pelo monitoramento do íon precursor (173) e seu padrão de fragmentação, podendo-se visualizar o íon de maior intensidade utilizado para quantificação (íon 99) e o segundo de maior intensidade utilizado para qualificação (íon 127) representados na Figura 2.

Evento: VII SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

Figura 1 - Cromatograma e espectro de massas de íons totais para o agrotóxico Malation, obtido por GC-(TQ)-MS/MS, a partir de fortificação em acetonitrila na concentração de 10 mg L⁻¹.

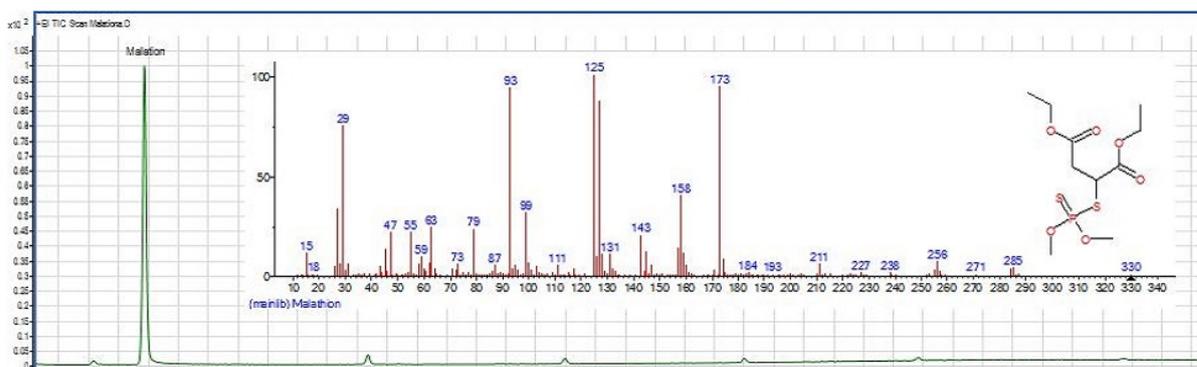
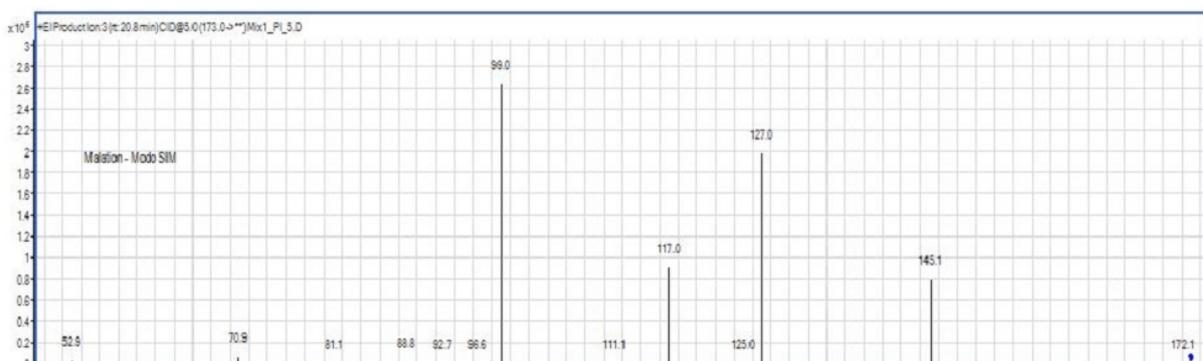


Figura 2 - Espectro de massas obtido pelo modo SIM (5eV) para o agrotóxico Malation, obtido por GC-(TQ)-MS/MS, a partir de fortificação em acetonitrila na concentração de 10 mg L⁻¹.



Para um total de 29 compostos estudados os agrotóxicos: Fenvalerato, Pirazofós, Iprodion, Piraclostrobina, Procloraz, Metomil, Pencicuirom e Imidacloprido, estão apresentando vários picos cromatográficos na injeção do padrão individual, o que pode estar indicando decomposição térmica no injetor que está operando a 280 °C ou no desenvolvimento do processo de separação que inicia em 70 °C e segue com aquecimento até 270 °C, estes compostos serão objetos de estudo mais aprofundado. A partir das injeções realizadas pôde-se obter o espectro de massa para cada composto, as condições de energia para a fragmentação dos íons precursores de cada molécula, o tempo de retenção, e as transições que visam permitir a quantificação e qualificação inequívoca dos diferentes compostos avaliados por GC-(TQ)-MS/MS, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Agrotóxicos determinados por GC-(TQ)-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, aquisição de espectro no modo MRM com seus respectivos segmentos de análise, tempos de retenção (tR), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação.

Evento: VII SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

Nome do Composto	Segmento	$t_{R, \text{min}}$	Primeira Transição - Quantificação			Segunda Transição - Confirmação		
			Ion Precursor (m/z)	Ion Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Ion Precursor (m/z)	Ion Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)
Metamidofós	1	9,305	141	64	25	141	79	25
Carbaril	2	14,495	144	116	15	144	115	15
Penciclorom	3	17,245	180	89	35	180	125	35
Clomazona	4	18,25	204	78	30	204	204	30
Pirimetanil	4	18,75	198	183	25	198	118	25
Fenitrotrion	5	20,54	277	260	10	277	109	10
Malation	6	20,77	173	127	5	173	99	5
Clorpirifós Etilico	7	21	314	286	10	314	258	10
Tiametoxam	8	21,36	212	125	10	212	139	10
Tiabendazol	9	21,76	174	103	20	174	130	20
Proclimidona	10	22,025	283	67	20	283	96	20
β - Endosulfan	11	22,43	241	171	30	241	206	30
2,4 DDD	12	23,06	235	199	15	235	165	15
α - Endosulfan	13	23,55	241	170	20	241	206	20
Trifloxistrobina	14	24,36	222	130	10	222	162	10
Bifentrin	15	25,355	181	166	20	181	165	20
Fenamidona	16	25,59	268	77	25	268	180	25
λ - cialotrina	17	26,46	181	127	30	181	152	30
β - Cliflutrin	18	28,75	163	127	10	163	91	10
Difenoconazol	19	32,06	323	265	15	265	202	30
Azoxistrobina	20	34,15	344	183	30	344	329	30

4 - Considerações Finais

O estudo das condições cromatográficas e dos parâmetros de fragmentação para cada analito por GC-(TQ)-MS/MS permitiram o desenvolvimento das condições para identificação e quantificação simultânea de 21 agrotóxicos. A partir dos resultados do presente estudo sobre a otimização das condições cromatográficas e do sistema de espectrometria de massas será realizado um planejamento experimental para determinar as melhores condições experimentais para a execução do método de extração de agrotóxicos presentes em diferentes hortaliças cultivadas no interior do estado do Rio Grande do Sul, em especial abóbora, vagem, cenoura, batata-doce, milho, salsinha, cebola e cebolinha, como também um estudo sobre o efeito matriz na determinação de agrotóxicos e remoção de interferentes nas diferentes matrizes citadas.

Keywords: Pesticide; GC-MS; Analytical methodology

Referências

- 1.ABRASCO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê Abrasco**. Disponível em <www.abrasco.org>. Acesso em junho de 2017.
- 2.ANvisa (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em junho de 2017.
3. JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. Food Control, v. 25, p. 607-616, **2012**.
- 4.VEIGA, M. M. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Caderno de Saúde Pública, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, **2006**.