

MULTIRESSÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUA POR INJEÇÃO DIRETA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

M. R. Assalin¹, S. C. N. Queiroz¹, V. L. Ferracini¹, L. C. Paraíba² y A. C. Nardocci³

¹ Doutora em Química, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil. E-mails: marcia.assalin@embrapa.br, sonia.queiroz@embrapa.br y vera.ferracini@embrapa.br

² Doutor em Matemática Aplicada, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil. E-mail: lourival.paraiba@embrapa.br

³ Doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, SP, Brasil. E-mail: nardocci@usp.br

ÁREA TEMÁTICA. REQUISITOS TÉCNICOS

RESUMO. Um método para determinação multiresíduo de 32 pesticidas baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa UPLC – ESI – MS/MS, operado em modo positivo de ionização, sem concentração e/ou clean up para consumo humano. Os limites de quantificação variaram de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, todos abaixo dos valores máximos permitidos pela Portaria do MS 2914/11 de 12/12/2011. Foram monitoradas a resposta de dois íons (duas reações) por analito no modo MRM, com injeção direta de 20 μL e tempo de corrida de 10,3 min. As curvas de calibração foram lineares para todos os analitos com recuperação de 90 % e desvio padrão relativo de $\leq 20\%$.

PALAVRAS CHAVE. Pesticida, água, injeção direta, validação.

1.- Introdução

O grande desafio da produção agropecuária é continuar a se desenvolver, de forma sustentável, para atender às demandas de alimentos, fibras, energia e outras matérias-primas e contribuir com a segurança alimentar. Em áreas de atividade agrícola, a principal preocupação é a contaminação dos recursos hídricos com resíduos de agrotóxicos, sendo que o principal mecanismo para avaliar o impacto do setor e promover políticas voltadas à saúde e o meio ambiente é o monitoramento da qualidade das águas (Gama et al, 2013). No entanto, por se tratar de áreas amplas, da grande quantidade e diversidade de agrotóxicos autorizados para cada cultura e do reduzido número de laboratórios de análise credenciados e de recursos humanos capacitados, o monitoramento da qualidade das águas de um país com dimensões continentais como o Brasil é um enorme desafio (Andrade et al, 2011) Monteiro et al (2014) avaliaram a presença de herbicidas (ametrina, atrazina, simazina e tebutiuram) em amostras de água do Rio Corumbataí e águas provenientes da Estação de Tratamento de Água da cidade de Piracicaba (SP, Brasil). As amostras foram pré-concentradas pelo método de extração em fase sólida e quantificação por Cromatografia Líquida acoplada

a Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS). Este método apresentou limites de quantificação (LQ) bastante baixos, porém por ser demorado, trabalhoso e ter custo elevado, sua aplicação é condicionada a um número limitado de amostras. Botelho et al (2015) desenvolveram um método para análise de atrazina e ametrina em águas superficiais, provenientes do Rio Piracicaba (SP, Brasil) pelo método de injeção direta da amostra (DAÍ) utilizando UPLC-MS/MS, sendo que os limites de quantificação obtidos foram 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para atrazina e ametrina, respectivamente. Métodos para a determinação simultânea de pesticidas em amostras aquosas normalmente, requerem várias etapas de preparação das amostras, como a extração, *clean-up* e concentração. Estudos têm focado no desenvolvimento de métodos analíticos econômicos e com baixos impactos ao meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo validar um método analítico para a determinação simultânea de 32 pesticidas polares por meio de injeção direta (DAÍ), baseado no método descrito por Greulich e Alder (2008), sem concentração da amostra e/ou *clean-up*. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) e poderá ser utilizado no *screening* destes xenobióticos em amostras de água superficial para consumo humano.

2.- Materiais e método

2.1 Equipamento

As amostras foram previamente filtradas em Millex GV de 0,22 μm de poro. Para a análise multiresíduo, cuja ionização ocorre em modo positivo, foi adicionado a uma alíquota de 1 mL de amostra, 20 μL de solução aquosa de ácido fórmico 5% (v/v) diretamente no *vial* de injeção. Os compostos foram analisados no cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas tipo triploquadropolo (QqQ) com fonte de ionização *electrospray* (UPLC–ESI-MS/MS, Quattro Premier XE, Waters), sistema de aquisição de dados via software Masslynx 4.1 (Waters) em modo íon positivo, sem concentração e/ou

clean-up. Os parâmetros utilizados foram capilar 3 KV, extrator 3,0 V, temperatura da fonte 120°C, temperatura e fluxo do gás de dessolvatação (N₂) 400°C e 500 L/H respectivamente. Argônio (99,8%) foi utilizado como gás de colisão com fluxo de 0,2 mL min⁻¹. Foram utilizados como fase móvel (modo gradiente) água contendo ácido fórmico 0,1% (A):etanol (B) na proporção inicial 70% (A), em relação a vazão da fase móvel (0,30 mL min⁻¹), reduzindo para 10% (A) em 10 minutos, restabelecendo o equilíbrio inicial após 10,20 minutos, totalizando 10,3 minutos de corrida. A coluna utilizada foi BEH C18 1,7µm x 2,1x 100 mm (Waters) e volume de injeção de 20 µL. O espectrômetro de massas foi operado em modo MS/MS, usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Foram monitoradas duas transições de cada pesticida analisado, sendo que a mais intensa (mais estável) foi escolhida para quantificação enquanto que a segunda para confirmação.

2.2 Seleção dos pesticidas

Apesar da grande diversidade de pesticidas aplicados para diferentes fins, apenas alguns deles são regulados pela Portaria MS 2914/11. A Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, dispõe sobre os procedimentos de controle da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Estabelece ainda os valores máximos permitidos para alguns agrotóxicos, porém, o número de ingredientes ativos ainda é pequeno em relação à quantidade de agrotóxicos utilizados nas culturas para o controle de doenças e pragas de plantas. A Tabela 1 apresenta os níveis máximos permitidos para algumas substâncias (ou misturas) prioritárias em água destinada ao consumo humano, que fizeram parte do nosso método.

Tabela 1. Valores máximos permitidos segundo a Portaria do MS 2914/11

Pesticida	V.M.P. (µg L ⁻¹)
Aldicarbe + Aldicarbessulfona + Aldicarbissulfóxido	10
Atrazina	2
Carbofurano	7
Clorpirifós + Clorpirifós- oxon	30
Diuron	90
Metamidofós	12
Simazina	2
Tebuconazol	180

Para a seleção dos compostos a serem incluídos neste método analítico de *screening*, foi levado em consideração os contaminantes que possuem maior probabilidade de serem encontrados neste compartimento ambiental. Os pesticidas foram selecionados por volume de uso em cultivos agrícolas de expressivo valor econômico e utilizando o modelo de fugacidade nível I (Mackay, 1991; MacLeod et al 2010). Esse modelo incorpora em seus cálculos o conceito de distribuição de massa entre compartimentos ambientais e define os compartimentos preferenciais de um conjunto de pesticidas. Assim, o

modelo de fugacidade nível I foi aplicado a um sistema hipotético constituído de ar, água, solo, sedimento, biota aquática e plantas. Foi utilizada a massa molecular, a pressão de vapor, a solubilidade em água, a constante de Henry e o coeficiente de partição octanol-água de cada um dos pesticidas. O coeficiente de sorção no solo, os fatores de bioconcentração em organismos aquáticos e plantas foram calculados por meio de expressões que correlacionam cada um desses parâmetros com o coeficiente de partição octanol-água do pesticida. O modelo de fugacidade nível I é recomendado pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1999) como uma das estratégias de análise da exposição ambiental às substâncias químicas.

2.3 Validação do método

O método para a análise multiresíduo foi validado quanto a sua linearidade, sensibilidade, representada pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e precisão. A linearidade foi determinada pela análise em triplicata dos padrões analíticos compreendidos entre 0,1 µg L⁻¹ a 25 µg L⁻¹ para estabelecerem os coeficientes de determinação ($r^2 > 0,99$) para cada analito. O LD, menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental, foi estabelecido como sendo o primeiro ponto da curva analítica, cuja concentração gerou um sinal 3 vezes sinal/ruído. O LQ, a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método, foi determinado por meio de ajuste numérico de curvas a partir das concentrações 0,25; 0,5; 0,8; 1,00; 2,5; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 50,0 µg L⁻¹ versus o coeficiente de variação (CV) das médias das áreas, de seis repetições. Os valores de LQs correspondem à concentração estimada onde o CV foi 20% e também foram obtidos a partir dos ajustes numéricos utilizando-se, ambos calculados pela Proc GLM do SA/STAT versão 9.1 (SAS Institute (2000) SAS/STAT user's guide Release 9.1 SAS Institute, Inc., Cary) (Paraíba, 1999). A eficiência do método foi investigada por meio de estudos de recuperação de amostras previamente analisadas nas quais não foram detectados resíduos dos pesticidas. As amostras foram fortificadas em 1 µg L⁻¹, com cinco replicatas. O critério de aceite adotado foi recuperação de 70 a 120% e coeficiente de variação < 20 %.

3.- Resultados e discussão

Os dois mais abundantes íons precursores e seus fragmentos foram selecionados em função da otimização das condições cromatográficas bem como a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, em MRM. Na Tabela 2 são apresentados os tempos de retenção e as transições monitoradas para os 32 pesticidas estudados. Na Tabela 3 são apresentados os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), % de recuperação e coeficiente de variação (CV %) no nível de fortificação estudado. Para todos os pesticidas estudados as curvas

analíticas apresentaram ajuste linear na faixa estudada, e coeficiente de determinação compreendido entre 0,994 e 0,999. As recuperações obtidas ficaram compreendidas entre 81 % (carbofurano) e 106 % (linuron). Este estudo de recuperação foi realizado de forma a avaliar a eficiência do método, em termos de recuperação, embora em métodos analíticos nos quais estudos de recuperação não são possíveis, como no caso da injeção direta de amostras, somente a precisão é requerida, que por sua vez é determinada por análises repetidas de padrões analíticos (Sante, 2015). Para os 32 pesticidas a sensibilidade para injeção direta foi satisfatória para quantificação dos resíduos, descartando a necessidade *cleanup* e/ou concentração das amostras de água.

Tabela 2. Dada de aquisição usados para a análise por UPLC-MS/MS

Pesticida	Transição 1	Transição 2	Tr (min)
Aldicarbe	212.8>88.6	212.8>115.8	3.39
Ametrina	228>68	228>186	4.72
Aminopirralide	207>134	207>161	1.23
Atrazina	216>96	216>174	5.49
Azoxistrobina	404.1>329	404.1>372	6.61
Boscalide	342.9>123	342.9>307	6.92
Carbofurano	222>139.9	222>165	4.40
Clomazona	240>89	240>125	6.27
Clotianidin	250>132	250>169	2.11
Diuron	250>132	250>169	5.84
Fenarimol	330.8>80.6	330.8>267.7	7.68
Flutriafol	302>70	302>123	5.63
Halosulfuron metil	435>82.8	435>182	7.66
Imazapic	276.2>163	276.2>231	2.88
Imazetapir	289.9>176.6	289.9>244.7	3.82
Imidacloprido	256.1>175	256.1>209	2.00
Linuron	249>182	-	6.59
Mandipropamide	412.1>328.2	412.1>356.1	7.03
Metamidofós	141.6>93.6	141.6>124.6	1.06
Metomil	162.7>87.8	162.7>105.9	1.49
Metisulfuron metil	382>167	382>198.9	4.42
Nicosulfuron	411>106	411>182	4.24
Sethoxidim	328>178	328>282	9.63
Simazina	202>96	202>124	4.28
Sulfometuron metil	365>107	365>150	4.40
Tebuconazol	308.1>70.1	308.1>124.8	8.42
Tebutiuron	228.9>116	228.9>172	4.56
Tebuzenozide	353.1>133	353.1>297.1	8.08
Penosulan	484>164	484>195	5.01
Propiconazol	342>69	342>159	8.53
Tiametoxam	292>132	292>211.2	1.57
Triticonazol	318>70	318>124.9	7.68

4.- Conclusão

O método de análise por injeção direta, sem concentração e/ou *clean-up* permitiu determinar 32 pesticidas nos valores de LQ que variaram de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, dependendo do pesticida.

O valor máximo de LQ 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ corresponde ao fenarimol e o valor mínimo de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ corresponde ao triticonazol. Os valores de LQ para aldicarbe, atrazina, carbofurano, diuron, metamidofós, simazina e tebuconazol, estão abaixo dos valores máximos permitidos pela Portaria do MS 2914/11 de 12/12/2011 e, na mesma ordem de grandeza para os que não constam na mesma. Além disto, para a atrazina e simazina, a Legislação Ambiental Brasileira, *Resolução CONAMA 357* estabelece os valores máximos permitidos para estes compostos em 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, para corpos aquáticos brasileiros. Nesse método foram monitoradas 64 transições no intervalo de aproximadamente 10 minutos. O método para *screening* de pesticidas em amostras de água mostrou ser sensível, rápido, de baixo custo e confiável.

Tabela 3. Limites LQ, LD, Recuperação (%), CV %

Pesticidas	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV (%)
Aldicarbe	0,30	0,10	82	13
Ametrina	0,18	0,10	90	9
Aminopirralide	0,79	0,25	92	26
Atrazine	0,32	0,10	90	8
Azoxistrobina	0,54	0,25	105	13
Boscalide	1,30	0,25	85	20
Carbofurano	0,60	0,10	81	13
Clomazona	0,26	0,10	100	10
Clotianidin	1,00	0,25	80	21
Diuron	0,57	0,10	97	10
Fenarimol	2,40	0,25	86	24
Flutriafol	0,15	0,10	99	4
Halosulfuron metil	1,00	0,25	93	7
Imazapic	0,29	0,10	96	9
Imazetapir	2,00	0,25	92	18
Imidacloprido	1,50	0,25	91	15
Linuron	0,10	0,39	106	14
Mandipropamid	0,78	0,25	86	19
Metamidofós	0,26	0,25	98	15
Metomil	0,19	0,10	93	12
Mets. Metil	0,68	0,25	91	21
Nicosulfuron	0,49	0,25	93	11
Sethoxydim	0,34	0,10	85	11
Simazina	0,56	0,10	102	11
Sulfom. Metil	0,45	0,10	90	4
Tebuconazol	0,38	0,10	99	10
Tebutiuron	0,18	0,10	95	8
Tebuzenozide	0,22	0,10	85	8
Penosulan	0,30	0,25	98	19
Propiconazol	0,40	0,10	91	7
Tiametoxam	1,10	0,25	83	8
Triticonazol	0,07	*	89	4

Agradecimentos. À FAPESP pelo financiamento do projeto - Processo PPSUS: 50016-3 e a Embrapa pelo apoio e suporte técnico.

Bibliografia

- Andrade, A. S., Queiroz, V. T., Lima, D. T., Drumond, L. C. D., Queiroz, M. E. L. R. e Neves, A. A. *Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Paranaíba – MG*. *Quim. Nova*, 34, No. 7, 1129-1135, 2011.
- Botelho, R.G., Monteiro, S.H., Christofolletti, C.A. e Moura-Andrade, G. C.R. *Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine and Ametrine Induce Micronuclei Formation and Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Fish*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 577-585, 2015.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. *Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências*. Brasília: DOU nº 239, seção 1, de 14 de dezembro de 2011.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357, de 17 de março. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências*.
- European Commission Decision SANTE/11945/2015 implementing Council Directive Supersedes SANCO/12571/2013 concerning guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, April 2016. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticide_s_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf. Acesso em: 16/12/2016.
- Gama, A.F., Oliveira, A.H.B. e Cavalcante, R.M. *Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense*. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 462-467, 2013.
- Greulich, K. e Alder, L. *Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391:183, 2008.
- Mackay, D. *Multimedia environmental models: the fugacity approach*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1991. 257 p
- MacLeod, C. M., Gopie, N., Hourihan, K. L., Neary, K. R., e Ozubko, J. D. *The production effect: Delineation of a phenomenon*. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 36, 671-685, 2010.
- Monteiro, R.T.R., da Silva, I. G. H., Messias, T. G., de Queiroz, S. C. N., Assalin, M. R., de Souza, D. R. C., Alves, C. H. R., Ferreira, A. C. e Blaise, C. *Chemical and ecotoxicological assessments of water samples before and after being processed by a Water Treatment Plant*. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, Taubaté, 9, 6-18, 2014
- OECD. *Organization for Economic Cooperation and Development Environmental exposure assessment strategies for existing industrial chemicals in OECD member countries* Paris: OECD, 1999. 31p.(OECD Series on Testing and Assessment, 17).
- Paraíba, L. C. *Modelización de la fugacidad mediante sistemas dinámicos discretos*. 1999. 199 f. Tesis (Doctoral) - Universidad Politécnica de Valência, Valência, 1999.