

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO MULTIRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E GC-MS/MS

D. R. Cassoli<sup>1</sup>, V. L. Ferracini<sup>1</sup>, S. C. N. Queiroz<sup>1</sup>, E. Vilhena<sup>2</sup> e A. C. Nardocci<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Central Analítica de Resíduos e Contaminantes, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. Brasil. E-mails: debora.cassoli@embrapa.br, vera.ferracini@embrapa.br y sonia.queiroz@embrapa.br

<sup>2</sup> Instituto de Química- Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Brasil. E-mail: edermfz@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Departamento de Saúde Ambiental -Faculdade de Saúde Pública, São Paulo- SP, Brasil. E-mail: nardocci@usp.br

### ÁREA TEMÁTICA. REQUISITOS TÉCNICOS

**RESUMO.** Um método para determinação multiresíduo de pesticidas baseado em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS/MS) foi desenvolvido, otimizado e validado para análises em amostras de águas. Foi utilizada extração em fase sólida (SPE- *solid phase extraction*) para concentrar as amostras em 1000 vezes e, alcançar a detectabilidade desejada. Para definir o procedimento de extração, foram avaliados parâmetros como pH e solvente de eluição. A melhor condição obtida foi validada depois de estabelecidos as seguintes condições otimizadas: pH= 7.0 e solvente de eluição diclorometano. O efeito matriz foi avaliado comparando-se a curva no solvente com a curva na matriz. O método proposto resultou no limite de detecção (LD) de 0,02µg/L e de quantificação (LQ) 0,05µg/L com boa linearidade ( $r^2 > 0,99$ ). Exceto para trifluralina, alaclor, permetrina e terbufós, as recuperações obtidas para os demais pesticidas resultaram na faixa de 70% até 107% com coeficiente de variação RSD% de até 19%.

**PALAVRAS- CHAVE.** Pesticidas, água, SPE, validação.

### 1.- Introdução

Contaminantes presentes no ambiente são resultados de diferentes fontes de poluição. O uso de pesticidas na agricultura é uma das fontes de contaminação de água de abastecimento devido a mobilidade e a capacidade de bioacumulação desses compostos no seres vivos. Devido a isso, e ao grande número de princípios ativos utilizados há necessidade de desenvolver metodologia que envolve monitoramento de resíduos de pesticidas em água (Monteiro, et al. 2014). Dos trabalhos encontrados na literatura para análise de resíduos de pesticidas em água, as técnicas de extração mais utilizadas são: extração líquido-líquido (LLE- *liquid liquid extraction*) considerada uma técnica mais tradicional onde há uso de uma grande quantidade de solvente (Wu et al, 2010), extração em fase sólida (SPE) (Terzopoulou et al, 2015), extração em fase sólida (SPE) combinada com microextração em fase sólida (SPME) (Bonanse et al., 2013) e mais recente, o uso da técnica de DLLME-microextração líquido-líquido

(Silva et al, 2017). Caldas et al. (2011) resumem as técnicas mais utilizadas para análise de resíduos de pesticidas em águas. No Brasil, a Portaria nº 2914, de 2011 estabelece padrões de qualidade para água de consumo humano. Conforme a tabela da Portaria 2914, os valores máximos permitidos (VMP) para água de consumo humano para endosulfan alfa, beta e seus sais é 20µg/L, paration metílico 9µg/L, pendimetalina 20µg/L, metolaclo 10µg/L, clorpirifós e clorpirifósoxon 30µg/L dentre outros. Embora muitos pesticidas não estejam citados na Portaria, mas merecem atenção e devem ser incluídos nas metodologias de análise devido às características físico-químicas e toxicidades. Para atender os padrões e limites regulatórios é necessário que a metodologia utilizada seja confiável e que tenha baixos limites de quantificação (menores que os limites estabelecidos pelas agências regulatórias). O trabalho apresentado mostra o resultado de um estudo de uma metodologia otimizada e desenvolvida para determinação de 19 pesticidas, comumente utilizados no Brasil, com uso de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Dos pesticidas estudados e validados para análise, sete deles estão incluídos na Portaria nº 2914, de 2011, com os VRM estabelecidos

#### 1.1 Materiais e método

Todos os pesticidas (trifluralina, dicloran, terbufós, clorpirifós metil, metribuzim, paration metílico, alaclor, prometrin, metolaclo, clorpirifós, pendimetalina, fipronil, endosulfan alfa, profenofós, triclorpyr-butotyl-ester, endosulfan beta, endosulfan sulfato, propiconazole, permetrina e boscalide) foram adquiridos da Dr Ehrenstofer. Acetato de etila grau pesticida e metanol grau HPLC Spectro adquiridos da Tedia, diclorometano HPLC com alta pureza da Tedia e sulfato de sódio anidro 12-60mesh adquiridos J.T.Baker. A água utilizada foi de alta pureza obtida de um sistema Milli-Q. Os padrões de pesticidas foram utilizados para preparar soluções estoques de 1000µg/mL em solvente acetona ou tolueno. Soluções de 10µg/mL foram preparadas semanalmente em acetona e armazenadas a 4° C. As soluções de trabalho foram realizadas diariamente.

## 1.2 Equipamento

Para a quantificação dos analitos, foi utilizado o equipamento Agilent 7890A acoplado a um triplo quadrupolo Quattro micro Micromass® e equipado com injetor automático CombPal CTC instalado uma coluna J&W Scientific DB5-MS (30m x 0,25 d.i x 0,25µ de tamanho de partícula). Hélio (pureza 99,9999%) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0mL/min. O injetor foi PTV (*programmed temperature vaporizer*) em modo solvent vent com temperatura inicial 50°C mantida por 0,25min com rampa de 12°C/s até 280°C e tempo de hold 20minutos. O volume de injeção foi de 3µL. A temperatura do forno foi iniciada a 50°C (durante 1,5min) seguido por uma rampa de temperatura de 25°C/min até 150°C e aumento de 5°C/min até 280°C mantendo por 4 minutos e com tempo total de 36min. O espectrômetro de massa foi operado com fonte de impacto de elétrons (IE) a 70eV e a temperatura da fonte foi de 200°C e transferline de 280°C.

## 1.3 Preparação e análise das amostras. Preparo da amostra

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e filtradas em filtro qualitativo nº 1 de diâmetro 7 cm. Foram avolumadas em balão volumétrico de 500mL. Após ajustes de volume, as amostras foram transferidas para um erlenmeyer e ajustado o pH para 7,0±0,2 e 5,0±0,2 utilizando ácido clorídrico ou hidróxido de amônio.

## 1.4 Extração utilizando SPE

Para a extração de fase sólida foram utilizados cartuchos *Hypersep Retain* PEP 200mg/6mL marca Thermo Scientific. Os cartuchos foram primeiramente condicionados pela lavagem com 5mL de metanol, seguido por 5 mL de água ultrapura. As amostras então foram eluídas (0,5L) aplicando-se um fluxo moderado 10mL/min. Os cartuchos foram secos durante 12 minutos sob condições de vácuo. Os analitos retidos foram eluídos com diclorometano ou diclorometano:metanol passando em funil contendo lã de vidro e sulfato de sódio (1,5g). Após recolhido, o extrato foi evaporado sob fluxo moderado de nitrogênio e em banho de gelo. Ao extrato seco, foi adicionado acetato de etila 0,5mL e transferido para um vial para posterior quantificação no equipamento.

## 1.5 Validação

0,5L de água ultra pura foram fortificados com solução padrão da mistura dos pesticidas (1,0µg/mL em acetona) para 0,05µg/mL. O pH das soluções foram ajustados para 7,0±0,2. Cinco repetições foram feitas para a fortificação 0,05µg/L. Uma amostra da testemunha e um branco de reagentes foram extraídos e utilizados na validação. Clorpirifós-metil foi utilizado com padrão de controle em amostras e portanto foi incluído na validação.

## 1.6 Curva na matriz

Para curva analítica foi preparado solução da mistura dos pesticidas na concentração de 10µg/mL e diluído nas concentrações de: 0,02; 0,05; 0,08; 0,15; 0,30 µg/mL utilizando acetato de etila como solvente. Para a curva na matriz, foi realizada a extração de 0,5L de água deionizada com pH=7 com 5 repetições. Para os extratos secos, adicionou-se 0,5mL de cada uma das concentrações preparadas para a curva e transferiu-se cada uma para um vial para posterior injeção. Para avaliar o efeito matriz, ao extrato de água, foi adicionada solução contendo 22 analitos em acetato de etila e o sinal na matriz foi comparado com o sinal dos analitos no solvente. O efeito matriz (%ME *matrix effect*) foi calculado dos slopes das curvas de calibração obtidas em solvente (Ss) e em matriz (Sm) conforme descrito por Giacinti et al (2017). A equação de cálculo é descrita abaixo (1):

$$ME\% = (S_m - S_s) / S_s \times 100 \quad (1)$$

## 2.- Resultados e discussão

O modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) foi programado e selecionando para cada pesticida, duas transições (tabela 1) uma para quantificação e outra para confirmação. Para otimização da análise no equipamento, foram realizadas corridas em full scan para cada um dos pesticidas selecionado o íon majoritário e verificando o tempo de retenção de cada um. Em seguida, foram realizadas as fragmentações com gás de colisão argônio ( $2,5 \times 10^{-3}$ ) e selecionados os íons secundários para quantificação e confirmação. Selecionadas as duas transições, foram realizadas análises no equipamento com diferentes energias de colisão (5, 10, 15, 20, 25 e 30). A energia de colisão que gerou maior sensibilidade tanto para quantificação como confirmações foram às estabelecidas e usadas na validação e análise (tabela 1).

**Tabela 1.** Dados de aquisição usados para a análise por GC-MS/MS.

Pesticida	Transição 1	EC (V) 1	Transição 2	EC (V) 2
Trifluralina	306>264	5	306>206	12
Dicloran	206>176	10	176>148	10
Terbufós	288>231	4	231>129	10
Clorpirifós metil	286>93	20	286>271	10
Metribuzim	198>82	10	198>110	8
Paration metílico	263>109	10	263>127	8
Alaclor	188>160	8	188>131	18
Prometrin	241>184	10	241>169	15
Metolacoloro	238>162	8	238>133	25
Clorpirifós	197>169	10	314>258	12
Pendimetalina	252>162	8	252>191	8
Fipronil	367>213	25	367>255	20
Endosulfan alfa	241>206	8	241>170	15
Profenofós	339>268,9	8	339>297	5
Triclorpyr-b.ester	182>146	8	182>164	8
Endosulfan beta	195>125	18	237>143	25
Endosulfansulf.	272>237	12	387>241	15
Propiconazole	173>145	12	259>173	12
Permetrina	183>168	8	183>153	10
Boscalide	140>112	15	140>76	30

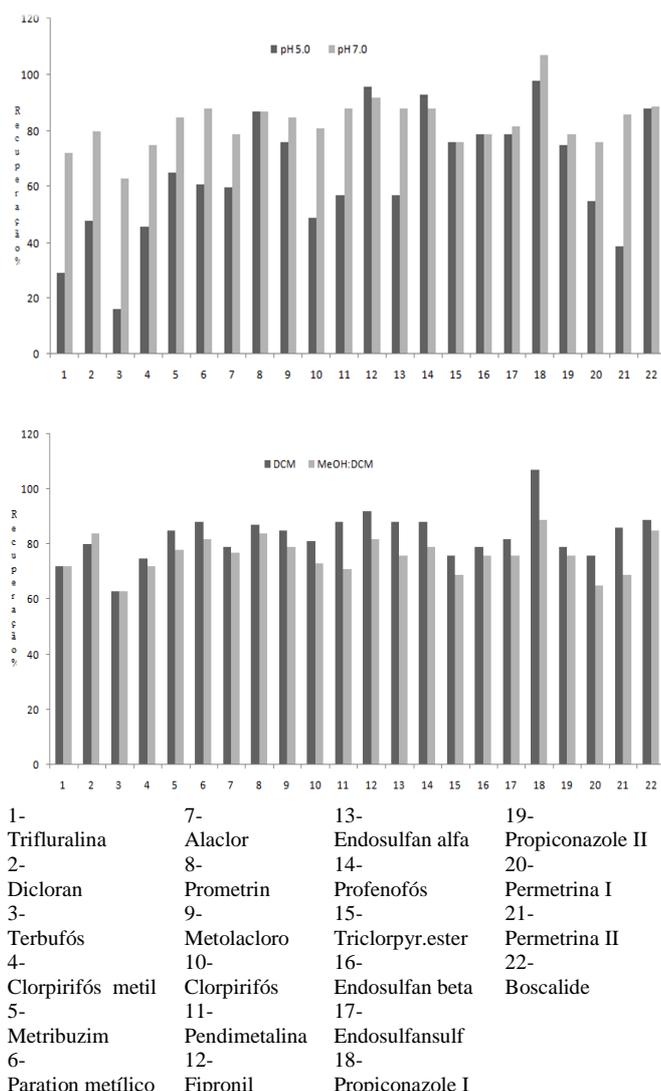


Fig. 1. Efeito do pH (a) e tipo de solvente (b) na eficiência de extração de resíduos de pesticidas em água utilizando SPE

## 2.1 Extração

Para otimização da metodologia de extração dos pesticidas em água, foram testados dois valores de pH, 5 e 7 das amostras. Conforme mostrado na figura 1, para o pH 7,0, foi obtido uma melhor eficiência de extração, ou seja, um maior número de pesticidas foram encontrados na faixa de 70-120%. A natureza do solvente de eluição também foi avaliada testando eluição com diclorometano (DCM) e uma mistura 50:50 de metanol (MeOH):diclorometano (DCM). Como mostrado na Figura 1, para o diclorometano, a eficiência de recuperação dos pesticidas foi maior.

## 2.2 Validação. Linearidade

As curvas de calibração foram construídas plotando as concentrações de cada analito versus a área de cada pico utilizando análise por regressão linear. As curvas da mistura de analitos no solvente versus mistura de analitos no extrato da matriz foram comparadas quanto ao efeito matriz. Três injeções para cada nível de concentração de

cada padrão foram feitas. O padrão de clorpirifós metil foi utilizado como *surrogate* para maior controle da etapa de extração. Para avaliação das recuperações, cinco replicatas foram feitas e portanto sua determinação foi validada juntamente com os outros pesticidas.

## 2.3 Efeito matriz

Para verificar o efeito matriz, os extratos das amostras testemunha foram fortificados com solução da mistura dos padrões de pesticidas. A comparação entre as áreas medidas na matriz e no solvente fornece informações da amplitude do efeito matriz. Segundo Krueve et al (2008), não há efeito matriz observado para %ME igual a 100% e valores acima de 100% indica aumento de sinal e valor abaixo de 100%, supressão de sinal. A tabela 2 mostra os valores obtidos de %ME para os analitos em estudo e embora a amostra seja de água, houve forte efeito matriz (%ME) com aumento de sinal e valores de ME% que chegaram até 857,9%. Desta forma, para eliminar problemas de quantificação, as curvas analíticas foram feitas na matriz.

Tabela 2. Efeito matriz (EM%)

Pesticida	EM%
Trifluralina	284,4
Dicloran	249,0
Terbufós	489,3
Clorpirifós metil	335,9
Metribuzim	273,5
Parationmetílico	331,1
Alaclor	261,7
Prometrin	328,3
Metolacloro	599,5
Clorpirifós	366,3
Pendimentalina	176,4
Fipronil	327,2
Endosulfan alfa	199,5
Profenofós	793,1
Triclopyr-butylester	270,3
Endosulfan beta	242,7
Endosulfan sulfato	229,2
Propiconazol I	254,4
Propiconazol II	428,0
Boscalide	857,9
Permetrina I	432,3
Permetrina II	353,1

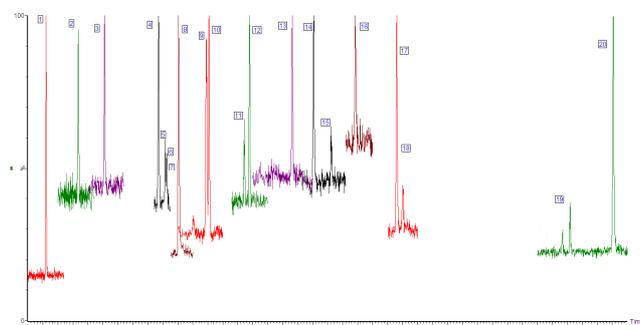
## 2.4 Limite de detecção

Para determinação do limite de detecção (LD) foram injetados concentrações de 0,008 µg/L a 0,02 µg/L em triplicatas estabelecendo o LD para a concentração de 0,02µg/mL com coeficiente de variação (RSD%) das injeções de até 9,2%.

## 2.5 Exatidão

Conforme mostra a tabela 3, os valores de recuperação obtidos para fortificação 0,05µg/L estão na faixa de 70-120% (exceto para permetrina, alaclor, terbufós e trifluralina). Os valores aceitos na validação foram estabelecidos pelo laboratório e foram baseados no documento SANTE (2015) e MAPA (2011). Para futuras

análises, somente serão considerados os pesticidas que foram aprovados durante a validação observando os valores de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção e quantificação. A fig. 2 mostra o cromatograma de íon total (TIC- *total ion chromatogram*) de uma amostra de água testemunha fortificada em 0,05µg/L.



1- Trifluralina	7- Alaclor	13- Endosulfan alfa	19- Permetrina
2- Dicloran	8- Prometrin	14- Profenofós	20- Boscalide
3- Terbufós	9- Metolacloro	15- Triclorpyr.ester	
4- Clorpirifós metil	10- Clorpirifós	16- Endosulfan beta	
5- Metribuzim	11- Pendimetalina	17- Endosulfansulf	
6- Paration metílico	12- Fipronil	18- Propiconazole	

**Fig. 2.** Cromatograma de íon total (TIC) de amostra de água testemunha fortificada 0,05µg/L

**Tabela 3.** Resultados das recuperações durante a validação da metodologia para fortificação 0,05µg L<sup>-1</sup>. (n=??)

Pesticida	Recuperação (n=5) (%)	CV (%)
Trifluralina	64	10
Dicloran	80	17
Terbufós	61	8
Clorpirifós metil	73	9
Metribuzim	70	9
Paration metílico	97	17
Alaclor	55	7
Prometrin	73	8
Metolacloro	70	9
Clorpirifós	74	12
Pendimetalina	77	12
Fipronil	107	10
Endosulfan alfa	70	10
Profenofós	85	19
Triclorpyr-b.-ester	93	17
Endosulfan beta	74	10
Endosulfan sulfato	77	11
Propiconazole I	80	14
Propiconazole II	73	10
Permetrina I	28	19
Permetrina II	37	9
Boscalide	73	11

CV= coeficiente de variação

A metodologia otimizada e validada foi testada em amostra de água de torneira para verificar a aplicabilidade em amostras reais. Não foram detectados resíduos dos pesticidas estudados para valores acima do limite de detecção (LD) 0,02µg/L.

### 3.- Conclusões

A metodologia apresentada mostrou, por meio da validação, ser adequada para atendimento de portarias e padrões estabelecidos por agências reguladoras com limite de quantificação de 0,05µg/L. A mesma mostrou ser útil para programas de monitoramento por incluir pesticidas que não possuem padrões estabelecidos por agências reguladoras brasileiras, contribuindo para subsidiar políticas públicas.

**Agradecimentos.** A Embrapa Meio Ambiente e a FAPESP processo PPSUS- 50016-3.

### Bibliografia

- Brasil, Ministério Da Saúde, *Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011.*
- Bonanse, R. I., Amé, M. V. y Wunderlin, D. A. *Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: SuquiaRiverbasin (Argentina)Chemosphere* 90 p. 1860–1869, 2013.
- Caldas, S. S., Gonçalves, F. F., Primel, E. G., Prestes, O. D., Martins, M. L., y Zanella R. *Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas Quím. Nova, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011*
- Giacinti, G., Raynaud, C., Capblancq, S. y Simon, V. *Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry* *Journal of Chromatography A*, 1483 p.8–19, 2017.
- KRUVE, A., Kunnapas, A., Herodes, K. y Leito, I. *Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry* *Journal of Chromatography A*, 1187 (2008) 58–66.
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial. *Guia de validação e controle de qualidade analítica - Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal. Brasília, 2011*
- Monteiro, R. T. M., Silva, G.H., Messias, T.G, Queiroz, S.C.N., Assalin, M. R., Cassoli, D. R., Alves, C.H.R., Ferreira, A. C. y Blaise C. *Chemical and ecotoxicological assessments of water samples before and after being processed by a Water Treatment Plant. Ambiente e Água- vol.9, n. 1, 2014.*
- SANTE - Safety of the Food Chain Pesticides and biocides. *European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document nº 12571/2013.*
- Silva, A.S.; Dores, E.F.G.C. y Villa, R.D.A. *Multiclass Analytical Method for Pesticides Determination in Water using DLLME and GC-MS* *Revista Virtual de Química* vol. 2, nº 1, 2017.
- Terzopoulou, E., Voutsas, D. y Kaklamanos, G. *A multi- residue method for determination of 70 organic micropollutants in surface waters by solid-phase extraction followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry* *Environ Sci Pollut Res* n. 22, p. 1095–1112, 2015.
- Wua, J., Lub, J., Wilson, A C., Youjian, L. y Lua, H., *Effective liquid–liquid extraction method for analysis of pyrethroid and phenylpyrazole pesticides in emulsion-prone surface water samples* *Journal of Chromatography A*, 1217 p. 6327–6333, 2010.