



METODOLOGIA DE ANÁLISE DE PESTICIDAS EM TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM EXTRAÇÃO QuEChERS E GC-MS/MS

Micaéla S. Diogo¹, Débora R. C. De S. Dutra², Carlos Alberto da Silva³, Vera Lúcia Ferracini⁴

Nº 22408

RESUMO - Peixes representam a proteína animal mais consumida no mundo, e neste sentido, o Brasil se destaca pela prática da tilapicultura. A contaminação de águas com pesticidas é conhecida e requer atenção quanto seu acúmulo em peixes, principalmente os componentes persistentes, tais como os organoclorados. Portanto, este trabalho apresenta a validação da metodologia QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro) - citrato para extração de 23 pesticidas em tilápia com análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS/MS) e analisador triplo quadrupolo. Os pesticidas foram selecionados com base na capacidade de bioacumulação em organismos aquáticos. As condições de análise no equipamento foram individualmente otimizadas para cada pesticida, a fim de alcançar a máxima sensibilidade ao monitorar duas transições em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), uma para quantificação e outra para confirmação. O método foi validado em amostras de tilápia fortificadas em 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, sendo cada nível realizado em quintuplicata ($n=5$) e em duas validações para determinar a precisão inter-dias. Os limites de quantificação para os pesticidas foram 5,0 e 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e mostraram precisão de 93,9 a 115,8%, precisão intra-dia de 4,6 a 17,3% e precisão inter-dia de 8,2 a 20%. O efeito matriz foi observado com aumento de sinal sendo necessário o uso de curva na matriz. As curvas de calibração foram lineares usando Trifenil fosfato (TPP) como padrão interno e coeficiente de determinação $r^2=0,99$.

Palavras - chaves: Pesticidas, QuEChERS, Peixe, Cromatografia GC-MS/MS

¹ Autor, Bolsista CNPq: Graduada em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas-SP; micaeladiogo25@gmail.com

² Analista - Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³ Colaborador: Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE

⁴ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; vera.ferracini@embrapa.br



ABSTRACT – *Fish represents the most consumed animal protein in the world, Brazil stands out in the practice of tilapia farming. Contamination of water with pesticides is known and requires knowledge regarding their accumulation in fish, especially persistent components, such as organochlorines. Therefore, this work presents the validation of the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe) -citrate methodology for the extraction of 23 pesticides from tilapia muscle by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS/MS) with a triple quadrupole analyzer. Pesticides were selected based on their bioaccumulation capacity by aquatic organisms. Conditions of analysis on the equipment were individually optimized for each pesticide in order to achieve the maximum sensitivity when monitoring the conditions of two transitions in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode, one for quantification and the other for confirmation. The method was validated in spiked tilapia samples in 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, with each level being performed in quintuplicate ($n=5$) and in two validations to determine the inter-day precision. The limits of quantification for the pesticides were 5.0 and 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, and showed accuracy from 93.9 to 115.8%, intra-day precision from 4.6 to 17.3%, and inter-day precision from 8.2 to 20%. The matrix effect was observed with an increase in the signal, requiring the use of matrix-matched calibration. The calibration curves were linear using Tri-Phenyl Phosphate (TPP) as internal standard and coefficient of determination $r^2=0.99$.*

Keywords: Pesticides, QuEChERS, Fish, Chromatography GC-MS/MS

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o sistema de produção agropecuário que mais cresce no mundo e apresenta grande potencial de expansão devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis (SEBRAE, 2015). O peixe é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, proporcionando uma dieta saudável, com alto valor proteico, rica em vitaminas A, B12, C e D e ácidos graxos poli-insaturados de boa qualidade, como o ômega-3 (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O processo de cultivo intensivo vem sendo realizado para suprir essa grande demanda de produção de peixes. Os peixes estão entre os organismos mais prejudicados pela contaminação aquática por pesticidas sendo ecologicamente relevantes devido a bioacumulação desses compostos apresentando, portanto, riscos para a saúde (SANTANA; CAVALCANTE, 2016).

Para aumentar a produtividade na aquicultura e garantir a qualidade dos organismos cultivados, alguns pesticidas têm sido utilizados visando regular o crescimento e controle de



patologias e parasitas que podem comprometer a produção. Essa prática aumenta a produção, porém torna-se uma fonte de contaminação dos recursos hídricos e da biota, uma vez que esses produtos podem se espalhar pelo curso de água podendo causar contaminação nas espécies (BOTELHO *et al.*, 2012). Diante da problemática causada pelo uso de pesticidas, diferentes órgãos regulamentadores (como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA e o Conselho Nacional de Segurança Alimentar) têm voltado sua atenção para o desenvolvimento de leis no intuito de garantir a segurança alimentar da população. No Brasil há o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos Animais (PNCRC/Animal) adaptado pelo Ministério da Agricultura que tem como objetivo promover segurança química em alimentos de produtos de origem animal e os resultados de análises dessas amostras devem estar em conformidade com os limites de referência apresentados nesse documento (BRASIL, 2019).

Devido à complexidade da amostra, é necessário estabelecer metodologia que seja sensível e eficiente para um monitoramento efetivo dessas substâncias. Na literatura há alguns estudos com uso de metodologia de extração QuEChERS na matriz peixe. Barbieri *et al* (2019) analisaram 52 pesticidas em músculo de peixe utilizando QuEChERS com determinação por LC-MS/MS. Variações da metodologia QuEChERS também são encontradas, Monteiro *et al* (2022) reportaram a metodologia QuEChERSER para implementação de análise de rotina de pesticidas e drogas veterinárias em tilápia.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e implementar um método efetivo, sensível, rápido e robusto para detecção de 23 pesticidas em tilápia utilizando QuEChERS e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC - MS/MS).

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Soluções padrões

Os padrões analíticos foram adquiridos das empresas Dr. Ehrenstorfer, Sigma-Aldrich e ChemService com grau de pureza entre 96,9% e 99,8%. As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em acetona (**grau resíduo**) na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Estas soluções foram armazenadas em frascos escuros e mantidas em freezer a temperatura de -20 °C até o uso. As soluções de trabalho foram preparadas utilizando a mistura de todos os pesticidas na concentração de 10 µg mL⁻¹.



As curvas analíticas de calibração na matriz foram construídas nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de etila e concentração fixa do padrão interno trifenil fosfato no valor de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essas concentrações foram adicionadas em extrato seco de amostras testemunha (livre de pesticidas). O padrão interno Trifenil fosfato (TPP) foi adquirido da Supelco com grau de pureza de 99,3%.

2.2. Procedimento de extração

Cinco gramas de músculo de tilápia processados foram pesados em um tubo de Falcon de 50 mL para extração usando QuEChERS adaptada. Em seguida, foi adicionada a amostra 10 mL acetonitrila grau HPLC e agitada em vortex por 1 minuto. Sais foram incorporados a amostra (4 g MgSO_4 ; 1 g NaCitrate; 0,5 DCS (Disodium Citrate Sesquihydrate); 1 g NaCl) e agitada manualmente por 30 segundos, posteriormente a amostra foi agitada em vortex por 5 minutos e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm. Sete mililitros do sobrenadante foram transferidos para um tubo de Falcon de 50 mL contendo 100 mg PSA, 100 mg C18 e 300 mg MgSO_4 onde foram agitados em vortex por 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm. Seis mililitros do sobrenadante foram transferidos para um tubo concentrador e evaporados até a secura utilizando gás nitrogênio. O extrato seco foi ressuspensionado em acetato de etila contendo TPP 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para amostras, testemunhas, fortificadas e branco de reagentes.

2.3. Equipamento GC-MS/MS

O equipamento utilizado foi GC-MS/MS composto por um GC Agilent 7890A equipado com um Gerstel KAS 4 PTV, um amostrador automático CTC Analytics e acoplado a um detector Waters Quattro Micro MS/MS. A aquisição e o processamento dos dados foram realizados no MassLynx, versão 4.1. Foi utilizada uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μm de espessura de filme) da J & W Scientific. O injetor PTV foi mantido inicialmente a 70°C em modo de ventilação do solvente durante a injeção de 3 μL de extrato. A ventilação de hélio foi de 50 mL min^{-1} a 8,2 psi durante 0,25 minutos, após esse tempo, a temperatura aumentou a uma taxa de 12°C s^{-1} até 280°C mantido por 20 minutos. O gás de arraste foi hélio (99,9999% de pureza) com fluxo de 1,0 mL min^{-1} e como gás de colisão foi utilizado argônio. O programa de temperatura do forno do GC foi de 70°C por 1,5 min, seguido de uma rampa de 15°C min^{-1} até 210°C e uma rampa de 2°C min^{-1} até 250°C e uma rampa final de 30°C min^{-1} até 300 °C. A fonte de ionização por elétrons (IE, 70 eV) foi mantida a



temperatura em 180°C e do transferline, 280°C. Duas transições foram monitoradas para cada composto sendo uma delas para quantificação e outra para confirmação. A Tabela 1 mostra o tempo de retenção e as transições. A identificação e confirmação dos pesticidas foram baseadas conforme recomendado pelas Diretrizes Europeias da Sante nº 11312/2021 (SANTE, 2021).

2.3. Validação do método

A validação foi conduzida para determinar a linearidade e sensibilidade, limites de quantificação (LQ), de detecção (LD) e precisão, baseada nos parâmetros e critérios estabelecidos em SANTE (2021) e AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2020). A linearidade foi determinada pela análise em triplicata de injeções das concentrações dos padrões analíticos, compreendidos entre 0,01 - 0,4 µg.mL⁻¹ para estabelecerem os coeficientes de determinação (r²) para cada analito.

O limite de detecção do método (LD), menor concentração que pode ser detectado pela técnica instrumental, foi estabelecido como sendo o primeiro ponto da curva analítica. O limite de quantificação (LQ), a mais baixa concentração que pode ser quantificada, foi determinada para a menor concentração com exatidão e precisão aceitáveis. A eficiência do método foi investigada por meio de estudos de recuperação das amostras fortificadas em 5, 10, 20 e 40 µg.kg⁻¹, com cinco replicatas. A exatidão obtida foi com recuperações de 70% a 120%. A precisão intra-dia (repetitividade, RSD_r%) foi obtida com quintuplicata em quatro níveis diferentes e, analisadas no mesmo dia pelo mesmo analista. A precisão inter-dia (reprodutibilidade, RSD_R %) foi obtida em quintuplicata em quatro níveis diferentes e analisadas em dois dias diferentes, por analistas diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados os íons precursores e seus fragmentos pela intensidade ou pelo valor de massa carga (m/z) na etapa de otimização dos parâmetros de massas, em MRM e ajustadas e otimizadas as condições cromatográficas.

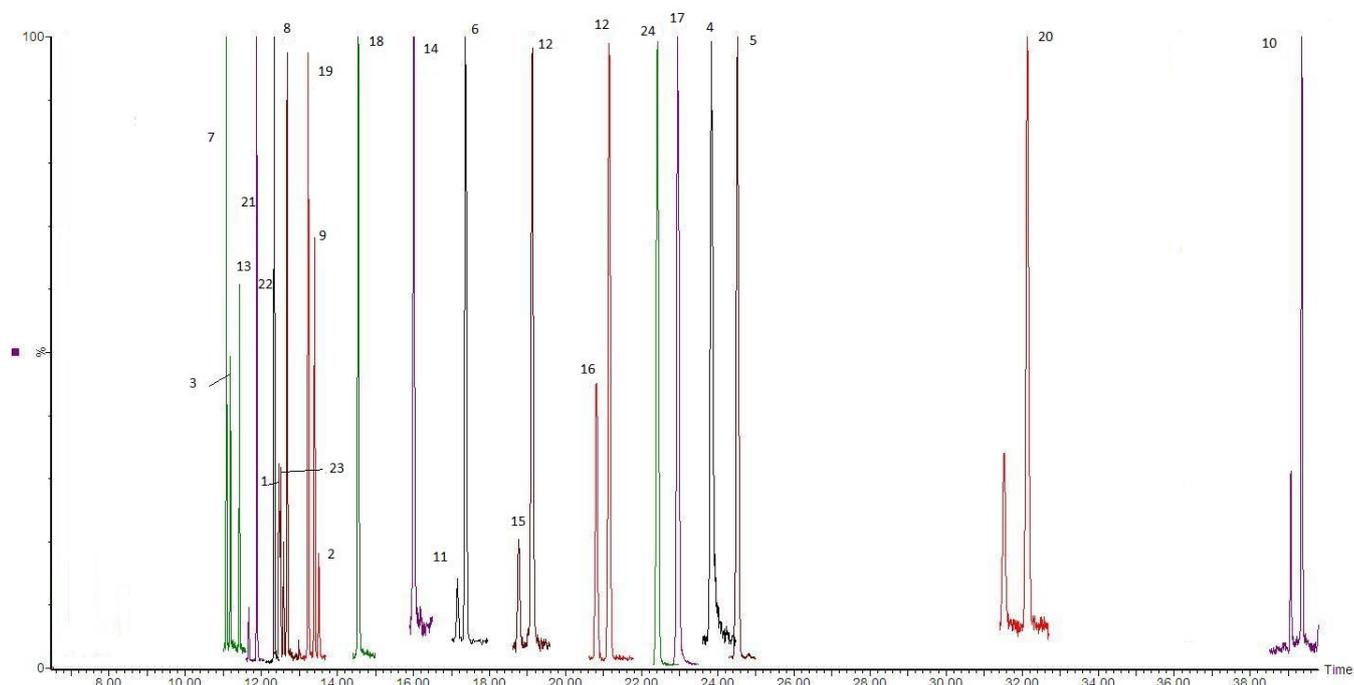


Figura 1. Cromatograma de ion total (TIC) de amostra de músculo de peixe fortificada em 20ug Kg⁻¹. 1-Alaclor, 2-Aldrin, 3-Atrazina, 4-Acetamiprido, 5-Bifentrin, 6-Buprofezina, 7-Carbofuran, 8-Carbaril, 9-Clorpirifos, 10-Cipermetrina Alfa, 11-Dieldrin, 12-DDT, 13-Diazinona, 14-Endosulfan Alfa, 15-Endosulfan Beta, 16- Endosulfan Sulfato, 17- Epoxiconazol, 18-Fipronil, 19- Malation, 20-Permetrina, 21-Pirimicarbe, 22- Propanil ,23-Paration Metílico, 24-Trifenil fosfato.

Na Tabela 1 são apresentados as transições e os tempos de retenção monitorados para os pesticidas.

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

Nº	Pesticida	RT (min)	Transição 1 (target) m/z	CE 1 (V)	Transição 2 (qualifier) m/z	CE 2 (V)
1	Alaclor	12,5	188>160	8	188>131	20



16º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2022

30 e 31 de agosto de 2022

ISBN: 978-65-88414-07-1

2	Aldrin	13,5	263>193	30	255>220	10
3	Atrazina	11,2	200>104	15	200>122	8
4	Acetamiprido	23,8	152>116	15	126>90	5
5	Bifentrin	24,5	181>165	20	181>166	8
6	Buprofezina	17,4	105>104	8	172>57	12
7	Carbofuran	11,2	164>131	15	149>121	5
8	Carbaril	12,7	144>115	20	144>116	10
9	Clorpirifos	13,4	197>169	10	314>258	15
10	Cipermetrina Alfa	36,1	163>127	25	163>91	15
11	Dieldrin	17,3	277>241	8	263>193	30
12	DDT	19,2-21,2	235>165	20	237>165	20
13	Diazinona	11,5	137>84	10	137>54	15
14	Endosulfan Alfa	16,1	241>170	15	241>206	10
15	Endosulfan Beta	18,8	207>172	8	195>159	15
16	Endosulfan Sulfato	20,8	272>237	10	274>239	10
17	Epoconazol	22,9	192>111	20	192>138	10
18	Fipronil	14,6	267>213	25	367>255	25
19	Malation	13,2	127>99	5	173>99	10
20	Permetrina	31,6-32,1	183>168	8	183>165	8
21	Pirimicarbe	11,9	238>166	10	166>96	15
22	Propanil	12,4	217>161	5	161>126	15
23	Paration Metílico	12,5	263>109	8	125>79	5
24	Trifenil fosfato	22,4	326>325	5	325>169	15

RT, tempo retenção; CE, energia colisão

Para avaliar a extensão do efeito matriz foi realizado o cálculo proposto pelo Guia SANTE (2021), em que $EM\% = ((\text{Resp}_{\text{Matriz}}/\text{Resp}_{\text{Solv}}) - 1) \times 100$. Dessa maneira, apenas 5 dos 30 compostos analisados apresentaram efeitos na matriz abaixo de 20 % nas 7 concentrações (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) utilizadas nas curvas analíticas de calibração.

Na Figura 2 são apresentados os dados de recuperação das amostras fortificadas em 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com cinco replicatas na validação do peixe com uso de padrão interno e curva matriz.

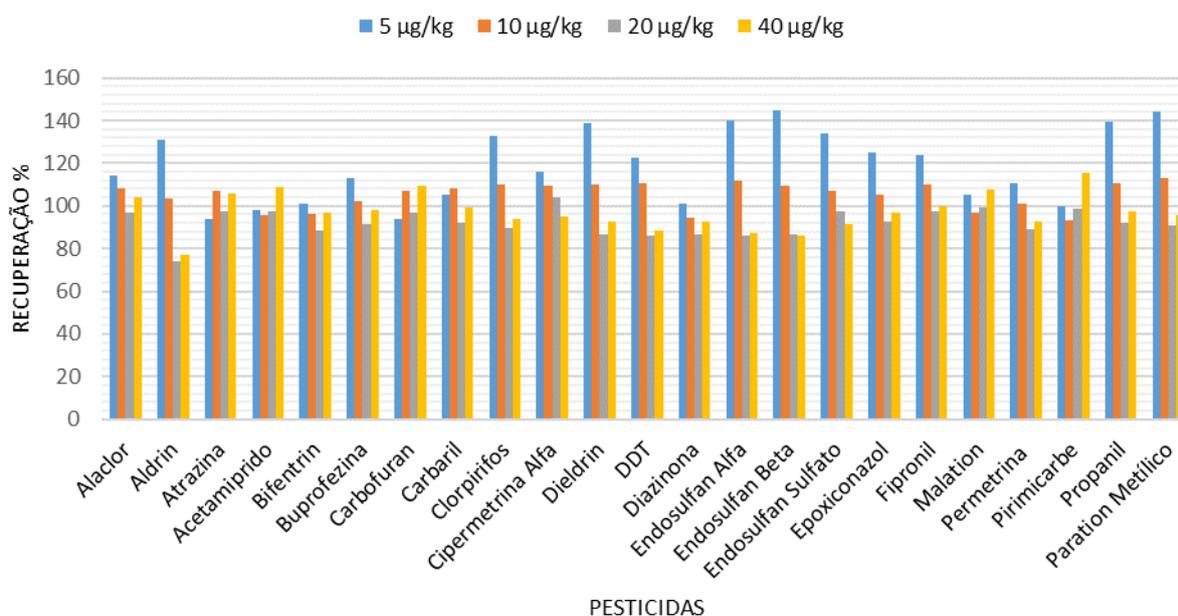


Figura 2. Média das recuperações das amostras fortificadas em 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=5).

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros de validação para as precisões intra-dia e inter-dia, em quintuplicata, no LQ. Sob as condições otimizadas, para o LQ da tabela 2, as recuperações dos analitos variaram na faixa de 93,9% a 115,8%, as quais estão dentro da faixa recomendada pela AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2020) e SANTE (2021). Também são apresentados os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e o coeficiente de variação (CV %) dos pesticidas.



Tabela 2. Parâmetros de validação.

Pesticidas	Limite de Detecção (LD) (µg/Kg)	Limite de Quantificação (LQ) (µg/Kg)	Recuperação % média no LQ (n=5)	Precisão intra-dia (RSD%) n=5	Precisão inter-dia (RSD%) n=10
Alaclor	4,17	5,0	114,1	9,8	9,6
Aldrin	1,66	10,0	103,6	4,6	8,2
Atrazina	4,17	5,0	93,9	16,8	13,6
Acetamiprido	4,17	5,0	98,3	13,0	13,0
Bifentrin	1,66	5,0	101,2	17,3	17,1
Buprofezina	4,17	5,0	112,8	10,3	10,3
Carbofuran	1,66	5,0	93,9	16,8	12,9
Carbaril	1,66	10,0	108,0	15,4	20,0
Clorpirifos	1,66	10,0	96,6	12,3	8,6
Cipermetrina Alfa	4,17	5,0	115,8	16,9	16,9
Dieldrin	1,66	10,0	110,1	9,6	10,0
DDT (mistura de isômeros)	1,66	10,0	110,4	10,4	17,0
Diazinona	1,66	5,0	100,9	15,1	15,1
Endosulfan Alfa	1,66	10,0	111,7	7,6	8,6
Endosulfan Beta	4,17	10,0	109,7	11,6	13,3
Endosulfan Sulfato	1,66	10,0	107,0	15,8	11,4
Epoxiconazol	1,66	10,0	105,0	10,2	13,2
Fipronil	1,66	10,0	110,0	9,1	13,9
Malation	1,66	5,0	105,0	13,9	13,9
Permetrina (mistura isômeros)	1,66	5,0	110,9	14,8	14,8
Pirimicarbe	4,17	5,0	99,8	14,6	14,6



Propanil	1,66	10,0	110,9	9,4	13,6
Paration Metílico	1,66	10,0	113,3	12,9	20,0

4. CONCLUSÃO

O método validado para determinação de 23 pesticidas mostrou ser efetivo, sensível e confiável. Através da validação do método foi possível a avaliação da performance para 4 níveis de fortificação (n = 5 cada) em duas validações em dias e analistas diferentes, onde as recuperações ficaram entre 70 -120% RSDs \leq 20% (inter e intra dias). O método validado mostrou aplicabilidade em amostras de peixe.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa de Iniciação Tecnológica e Industrial (DTI-C) concedida viabilizando a oportunidade de desenvolver esse projeto, a analista Débora R. C. De S. Dutra pela instrução e conhecimento e a Embrapa Meio Ambiente por ceder espaço no Laboratório de Resíduos e Contaminantes (LRC) para a realização dos procedimentos.

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PARA: programa de análises de resíduos de agrotóxicos em Alimentos. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 18 maio 2022.

BARBIERI, M. V. *et al.* Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 958-967, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.289>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718341858?via%3Dihub>. Acesso em: 16 maio 2022.

BOTELHO, R. G. *et al.* Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. **Revista Visão Agrícola**, v. 11, p. 45-48, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 5, de 23 de abril de 2019**. Fica aprovado o Plano de amostragem e os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos.



Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animais/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/InstruoNormativaN05.2019PNCRC2019.pdf>. Acesso em: 17 maio 2022.

MONTEIRO, S. H. *et al.* Validation of the QuEChERSER mega-method for the analysis of pesticides, veterinary drugs, and environmental contaminants in tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 4, p. 699-709, 2022. Informa UK Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2021.2020911>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2021.2020911>. Acesso em: 18 maio 2022.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Proteínas do peixe**. v. 8, p. 23-32, 2009.

SANTANA, L. M. B. M.; CAVALCANTE, R. M. Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: uma revisão. **Orbital - The Electronic Journal Of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 257-268, 31 jul. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v8i4.856>. Disponível em: <http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/856>. Acesso em: 20 maio 2022.

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. 2021. Document N°. SANTE 11312/2021.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil**: série de estudos mercadológicos. Brasília, DF, p. 6-17. 2015.