



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE: AMETRINA, DIURON, HEXAZINONA E TEBUTIURON EM FILÉ DE TILÁPIA

Éder A. Vilhena^{1a}; Vera L. Ferracini^{2b}; Sônia C.N Queiroz^{2c}; Cláudio M. Jonsson^{3c}; Márcia Assalin^{2c}

¹Engenharia Ambiental - FAJ; ² Embrapa Meio Ambiente -LRC; ³ Embrapa Meio Ambiente –LEB

N° 13415

RESUMO - Embora os herbicidas sejam amplamente utilizados nas atividades agrícolas, o impacto desta utilização sobre a qualidade das águas é pouco conhecido e tem sido alvo de estudos em todo o mundo, sendo que efeitos mutagênicos e genotóxicos já foram observados em peixes expostos a herbicidas. Para se avaliar a toxicidade das misturas dos herbicidas tebutiuron, ametrina e do produto comercial Velpar K (diuron e hexazinone), amplamente empregados na cultura canvieira, foi necessário desenvolver e validar um método analítico capaz de detectar e quantificar a presença destes herbicidas em tilápia. A extração dos analitos foi realizada por meio do método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) modificado, seguido de uma etapa de clean-up denominada extração em fase sólida dispersiva (D-SPE). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se um sistema LC-MSMS, dotado de uma fonte de eletronebulização tipo electrospray, modo de ionização positivo, e analisador tipo triploquadrupolo (QqQ). As curvas analíticas obtidas para todos os compostos estudados apresentaram coeficiente de correlação linear (r^2) maiores ou iguais a 0,99, limite de quantificação (LOQ) igual a $0,00125 \mu\text{g g}^{-1}$ e exatidão entre 70 e 120 %.

Palavras-chaves: QuEChERS; tilápia; espectrometria de massas; herbicidas.

^aBolsista Embrapa: Graduação em Eng.Ambiental - FAJ, Jaguariúna - SP edervilhena@bol.com.br, ^bOrientador(a)

^cColaborador(a).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- *Although herbicides are widely used in agricultural activities, the impact of this use on the water quality is not well known and has been the subject of studies around the world, with mutagenic and genotoxic effects observed in fish exposed to herbicides. To evaluate the toxicity of mixtures of the herbicides tebuthiuron, ametryne and the commercial product Velpar K (diuron and hexazinone), widely used in sugar cane, it was necessary to develop and validate an analytical method capable of detecting and quantifying the presence of these herbicides in tilapia. The extraction of analytes was performed using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) modified, followed by a clean-up step called dispersive solid phase extraction (D-SPE). Chromatographic separations were performed using an LC-MSMS system, equipped with an electrospray source, type positive ionization mode and triple quadrupole analyzer (QqQ). The analytical curves for all the compounds studied showed linear correlation coefficient (r^2) greater than or equal to 0.99, limit of quantification (LOQ) equal to 0.00125 $\mu\text{g g}^{-1}$ and accuracy between 70 and 120%.*

Key-words: QuEChERS; tilapia; mass spectrometry; herbicides.

1. INTRODUÇÃO

Devido à facilidade de adaptação, a grande disponibilidade de recursos hídricos, baixo custo na criação e apelo de comida saudável, a tilápia tem se tornado um alimento presente na mesa do brasileiro. Com isso houve um aumento vigoroso em sua produção nos últimos anos no Brasil. Muitos agricultores familiares que antes se dedicavam exclusivamente a agricultura e/ou pecuária passaram a utilizar a criação de tilápias como complemento de renda, sendo que alguns até direcionaram 100% de seus espaços para a aquicultura. O estado de São Paulo possui uma forte atividade agrícola voltada à cultura canavieira, e conseqüentemente uma grande demanda por herbicidas, que são amplamente empregados nessas atividades. Os herbicidas utilizados, muitas vezes são levados a tanques onde ocorre a mistura das substâncias: tebutiuron, ametrina e do produto comercial Velpar K (diuron e hexazinona) ainda que seja proibida por lei. O impacto desta utilização sobre qualidade das águas, entretanto, é pouco conhecido e tem sido alvo de estudos em todo o mundo, sendo que já se observaram efeitos mutagênicos e genotóxicos em peixes expostos a herbicidas. Embora as concentrações dos herbicidas encontrados em água estejam dentro dos limites estabelecidos pela legislação competente, a longo prazo, pode ocorrer a bioacumulação dos herbicidas nos organismos expostos, podendo atingir níveis elevados e causar efeitos deletério (HENRY, 2003; MOZETO, 2004). Para se avaliar a toxicidade das misturas dos herbicidas tebutiuron, ametrina e do produto comercial



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Velpar K (diuron e hexazinone), amplamente empregados na cultura canavieira, foi necessário desenvolver e validar um método analítico capaz de detectar e quantificar a presença destes herbicidas em tilápia.

Nos últimos anos, técnicas e métodos de preparo de amostra baseados na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração de agrotóxicos foram desenvolvidos como, por exemplo, o método *QuEChERS* (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (ANASTASSIADES e Colaboradores, 2003). O qual tem sido largamente empregado para determinação de agrotóxicos em matrizes complexas. Foi assim denominado pelas características que possui: rapidez, facilidade, economia, efetividade, robustez e segurança.

Neste estudo, a preparação das amostras foi realizada por meio do método *QuEChERS* modificado. A identificação e quantificação dos resíduos foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O método desenvolvido foi validado considerando-se os seguintes parâmetros: limite de quantificação, linearidade, seletividade, recuperação e precisão intermediária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento foi realizado com a pesagem de 5,0 g de amostra processada em um tubo de polipropileno (capacidade 50,0 mL). Em seguida, 10,0 mL de acetonitrila foram adicionados, seguido por agitação em vortex (60 s). Para etapa de *salting out* utilizou-se 4 g de $MgSO_4$ (Sulfato de Magnésio), 1,0 g de NaCl (Cloreto de Sódio); 1,0 g de $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (citrato de sódio) e 0,5 g de $HOH(COOH)(CH_2COONa)_2$ (hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado) e repetida a etapa de agitação; finalmente, o tubo foi centrifugado a 10.000 rpm durante 7 min. Em seguida, as amostras foram mantidas em geladeira, a 4°C durante 2 horas. Para a etapa de purificação, adicionou-se 125 mg do adsorvente *PSA (primary secondary amine)* e 750 mg de $MgSO_4$ a uma alíquota do extrato orgânico previamente refrigerada à 5°C ,seguido pelas etapas de agitação e centrifugação. Uma alíquota de 2 ml do extrato orgânico foi levada a evaporação sob fluxo de N_2 e temperatura ambiente até a secura. O extrato foi ressuspendido em 0,5 mL de fase móvel (60:40 v/v Metanol/ Acido fórmico 0,1%) filtrado em 0,45 μm e analisado por LC – MSMS. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se um sistema Varian 1200L dotado de uma fonte de eletronebulização tipo *electrospray*, modo de ionização positivo, e analisador tipo triploquadropolo (QqQ). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se coluna Polaris 3 C18 A (150 mm x 2,0 mm i.d., 5 μm), fluxo de 0,25 ml min^{-1} e gradiente linear de 60 a 95% de fase orgânica durante 10 minutos. As condições otimizadas de ionização do analito foram:



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

temperatura da fonte, 50° C, pressão e temperatura do gás de dessolvatação (N₂) 28 psi e 280° C, respectivamente. Argônio foi utilizado como gás de colisão. A aquisição foi realizada em modo MRM (*multiple-reaction monitoring*). O íon molecular protonado [M +1] de cada composto foi selecionado como íon precursor. Os parâmetros de ionização (modo de ionização, íon precursor, íons produtos, voltagem do cone e energia de colisão) foram otimizados por meio de infusão individual das soluções padrões de cada analito (1µg ml⁻¹) a 20 µl min⁻¹ e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 01. LC – MS/MS condições de ionização dos pesticidas analisados.

Analito	TR (min)	Íon Precursor	Íon Produto	Voltagem do cone (KV)	Energia de Colisão (V)	Modo de ionização
Ametrina	3,53	228,3	96,0	65,0	23,0	Positivo
			186,0		15,0	
Diuron	3,41	232,8	46,0	55,0	8,0	Positivo
			72,0		11,0	
Hexazinona	5,57	253,0	171,1	65,0	27,5	Positivo
			84,9		14,5	
Tebutiuron	3,46	228,0	172,0	65,0	15,0	Positivo
			115,9		24,5	

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração

O método *QuEChERS* foi modificado em relação ao método original de forma a promover uma minimização do efeito matriz em função da presença de interferentes das amostras que por ventura não sejam eliminados na etapa de purificação. Assim sendo, uma etapa adicional foi inserida, após a etapa *salting out*, na qual os extratos foram mantidos sob refrigeração a 4°C, por 2 horas. Este procedimento resultou numa minimização do efeito matriz por possibilitar uma maior limpeza do extrato.

3.2 Validação

O método foi validado considerando-se os seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas e análise das equações das retas obtidas, é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. As curvas analíticas obtidas apresentaram coeficiente de correlação (r) maiores ou iguais a 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO, que recomendam



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

respectivamente, $r > 0,99$ e $r > 0,90$. Os valores da faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação para os herbicidas estudados estão apresentados na Tabela 02. O valor do limite de quantificação (LOQ) estabelecido foi de $0,00125 \mu\text{g g}^{-1}$ para diuron, hexazinona, ametrina e tebutiuron. No método proposto foi constatado efeito matriz para o pesticida tebutiuron, cujos valores médios de recuperação (fortificação no LOQ, $n = 5$), utilizando-se como forma de quantificação, a curva no solvente, foram de 32%, indicando que os interferentes presentes na amostra resultam em supressão do sinal analítico. Dessa forma a quantificação dos agrotóxicos foi realizada por calibração externa, através de superposição da matriz, que embora seja mais trabalhoso, evita resultados inexatos. A precisão do método foi avaliada através de estudo de repetibilidade e precisão intermediária. As recuperações dos pesticidas foram realizadas em dois níveis de concentração do analito (LOQ e 2 LOQ), visto que a eficiência do método pode variar em função da quantidade da substância adicionada. Foram realizadas ainda 05 replicatas e analisadas em dois dias diferentes. Os valores de recuperação e CV (%) são apresentados na Tabela 03. Os valores de recuperação obtidos para todos os analitos estudados estão compreendidos entre 70 e 120 % e CV (%) inferiores a 20% o que está de acordo com a literatura sobre validação de métodos cromatográficos para análise de resíduos.

Tabela 02. Resultados da validação da tilápia

N°	Composto	Recuperação (%)		Coeficiente de Variação (%)	
		LOQ (mg. kg ⁻¹)	2.LOQ (mg. kg ⁻¹)	LOQ (mg. kg ⁻¹)	2.LOQ (mg. kg ⁻¹)
1	Ametrina	90,0	117,0	7,9	3,8
2	Diuron	99,0	106,5	7,5	1,3
3	Hexazinona	130,0	102,5	6,8	3,4
4	Tebutiuron	74,0	94,0	12,1	6,9

Tabela 03. Dados de validação

Pesticida	Faixa de trabalho	Equação da reta	Coef. de Correlação Linear(R ²)
Ametrina	0,005 á 1,0	Y=4E+09X+6E+07	0,993
Diuron	0,005 á 1,0	Y=2E+09X+3E+07	0,9937
Hexazinona	0,005 á 1,0	Y=5E+08X+1E07	0,9961
Tebutiuron	0,005 á 1,0	Y=2E+08X+3E+06	0,9925



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

3.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método empregando *QuEChERS* modificado e LC-ESI-MS/MS, após ser validado foi aplicado para a análise de resíduos dos herbicidas Tebutiuron, Ametrina, Diuron e Hexazinona em tilápia. As amostras fazem parte de um estudo para avaliação da toxicidade destes herbicidas, bem como de suas misturas à organismos expostos. O método está sendo aplicado em amostras dos estudos de toxicidade ainda em andamento.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o método empregando *QuEChERS* modificado e LC-ESI-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos Tebutiuron, Ametrina, Hexazinona e Diuron em tilápia é eficiente, rápido e preciso. As curvas analíticas obtidas para todos os compostos estudados apresentaram coeficiente de correlação linear (r^2) maiores ou iguais a 0,99, limite de quantificação (LOQ) igual a $0,00125 \mu\text{g g}^{-1}$ e exatidão entre 70 e 120 % com coeficiente de variação (CV %) menor que 20%.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade de estágio bem como o apoio financeiro. A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anastassiades, M.;Lehotay S.J; Stajnbaher D. e Schenck F.J. **Fast and easy multiresidue method employing acetronile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce.** Journal of AOAC international vol.86, Issue: 2, 412-431 Mar-Apr 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos e toxicologia** <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+toxicologia>, acessado em 10/06/13.

HENRY, R. 2003. **Os Ecótonos nas Interfaces dos Ecossistemas Aquáticos: Conceitos, Tipos, Processos e Importância. Estudo de Aplicação em Lagoas Marginais ao rio Paranapanema, na Zona de sua Desembocadura na Represa Jurumirim.** p. 1 – 28. In: HENRY, R. (Org.) 2003. Ecótonos nas Interfaces dos Ecossistemas Aquáticos. Rima: São Carlos. 349p.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf

MOZETO, A.A. 2004. **Sedimentos e Particulados Lacustres: Amostragens e Análises Biogeoquímicas.** 2004. p. 295-320. *In:* BICUDO, C.E.M. & BICUDO, D.C. (Org.) 2004. Amostragem em Limnologia. São Carlos: Rima. 371p.