

1.06.04 - Química / Química Analítica

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE FRAGMENTAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM HORTALIÇAS POR GC/MS-MS

Arthur M. Schreiber¹, Laura de Castro², Alessandro Hermann³, Anagilda B. Gobo⁴

1. Acadêmico de Engenharia Química – UNIJUÍ, bolsista IC

2. Acadêmica de Engenharia Química – UNIJUÍ, bolsista IC

3. Prof. Me Departamento de Ciências da Vida – UNIJUÍ, orientador

4. Prof^a. Me Departamento de Ciências da Vida – UNIJUÍ, coorientadora

Resumo

O trabalho objetivou desenvolver método analítico utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (GC-MS/MS) para identificação de resíduos agrotóxicos em hortaliças. Os agrotóxicos foram selecionados com base na utilização dos cultivos de trigo, milho e soja, uma vez que o estado do RS possui uma abrangente área de cultivo destes grãos, e também para as hortaliças: abóbora, vagem, cenoura, batata-doce, salsa, cebola e cebolinha. A partir da injeção de padrões comerciais no sistema cromatográfico, foi possível a identificação e quantificação de 52 agrotóxicos em um tempo de corrida de 28,95 min.

Palavras-chave: Espectrometria de massas; Cromatografia; Metodologia analítica.

Apoio financeiro: Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ.

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 à saúde humana e ambiental (VEIGA, 2006). Estudos desenvolvidos em amostras de 22 culturas de frutas e hortaliças, coletadas em 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 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 multirresíduos de agrotóxicos em hortaliças utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (GC-MS/MS).

Metodologia

Agrotóxicos selecionados para estudo

Os agrotóxicos avaliados foram selecionados a partir do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com base nos permitidos e não permitidos no cultivo convencional de trigo, milho e soja, amplamente cultivados na região noroeste do estado do RS, bem como para as culturas de abóbora, vagem, cenoura, batata-doce, milho, salsa, cebola e cebolinha.

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 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.

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, 28,95 min.

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 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.

Resultados e Discussão

Para a separação cromatográfica foi avaliado as melhores condições de temperatura do injetor, a partir das temperaturas de ebulição de cada composto 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.

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 450 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 do 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) estão representados na Figura 2.

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.

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

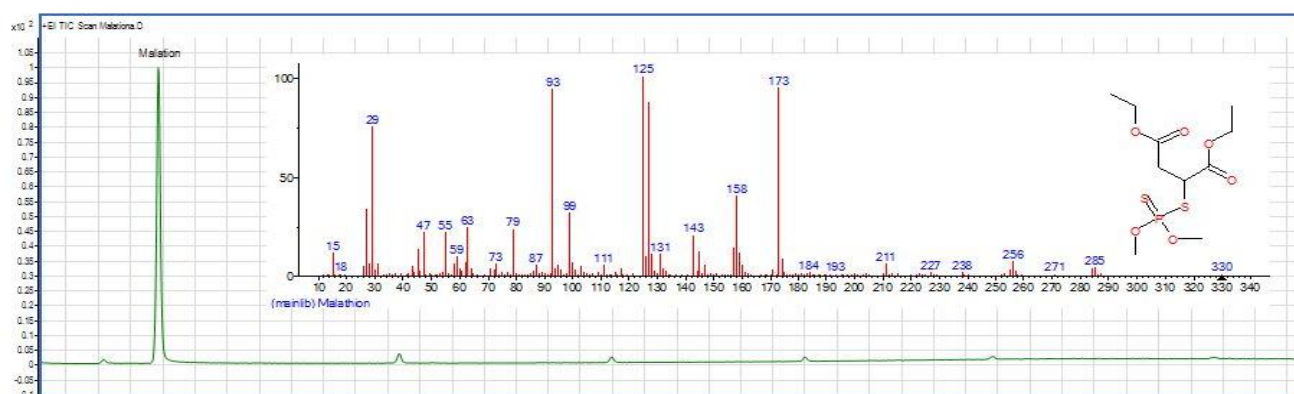


Figura 2 – Espectro de massas obtido para a fragmentação do íon 173 para o agrotóxico Malation, obtido por GC-(TQ)-MS/MS, a partir do padrão analítico na concentração de 10 mg L⁻¹ em acetonitrila.

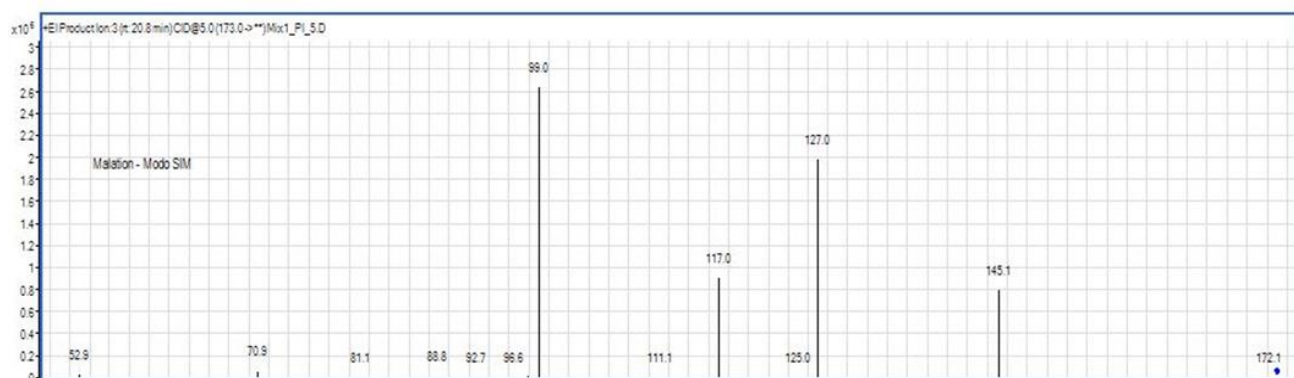


Tabela 1 - Agrotóxicos determinados por GC-(TQ)-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, aquisição de espectro no modo *MRM* com seus respectivos segmentos de análise (Seg), tempos de retenção (t_R), íons precursores (IP) e produtos (ID) para a quantificação e confirmação.

Nome do Composto	Seg	t_R (min)	1ª Transição – Quantificação			2ª Transição – Confirmação		
			IP (m/z)	ID (m/z)	Energia (eV)	IP (m/z)	ID (m/z)	Energia (eV)
Metamidofós	1	4,76	141	64	25	141	79	25
Carbofurano	1	5,21	164	131	20	164	103	20
Carbaril	1	5,75	144	116	15	144	115	15
Dicloreto de paraquate	2	7,00	156	102	30	156	128	30
Pencicuum	2	7,25	180	89	35	180	125	35
Trifluralina	3	8,56	306	206	20	306	264	20
Clomazona	3	8,70	204	78	30	204	204	30
Terbufós	4	9,48	231	129	15	231	175	15
Pirimetanil	4	9,72	198	183	25	198	118	25
Quintozeno	4	9,74	295	237	10	295	265	10
Clortalonil	4	9,75	266	133	30	266	170	30
Fenitrotion	4	9,88	277	260	10	277	109	10
Pirimifós metílico	5	10,23	276	151	20	276	125	20
Malation	5	11,57	173	99	5	173	127	5
Fentiona	5	11,61	278	245	5	278	169	5
Clorpirifós Etilico	5	11,81	314	286	10	314	258	10
Tetraconazol	6	12,02	336	156	30	336	204	30
Tiametoxam	6	12,05	212	125	10	212	139	10
Pendimetalina	6	12,21	252	191	10	252	162	10
Tiabendazol	6	12,47	174	103	20	174	130	20

Zoxamida	7	12,61	187	123	25	187	159	25
Procimidona	7	12,79	283	67	20	283	96	20
2,4 DDE	7	12,89	246	211	25	246	176	25
β - Endosulfan	8	13,13	241	171	30	241	206	30
Profenofós	8	13,19	208	99	30	208	63	30
2,4 DDD	9	13,47	235	199	15	235	165	15
Clorfenapir	9	13,65	247	75	20	247	227	20
α - Endosulfan	10	14,07	241	170	20	241	206	20
Benalaxil	10	14,35	148	105	20	148	79	20
Trifloxistrobina	11	14,75	222	130	10	222	162	10
Tebuconazol	11	14,91	250	70	15	250	125	15
Bifentrin	11	15,01	181	166	20	181	165	20
Fempropatrina	12	15,73	181	152	25	265	89	20
Fenamidona	12	15,92	268	77	25	268	180	25
Metconazol	13	16,22	125	63	35	125	89	35
Fenoxaprop-etílico	13	16,35	288	119	15	288	91	15
β - Ciflutrin	14	17,11	163	127	10	163	91	10
Cipermetrina I	14	17,23	163	127	10	163	91	10
Cipermetrina II	14	17,37	163	127	10	163	91	10
Cipermetrina III e IV	14	17,42	163	127	10	163	91	10
Difenoconazol	15	18,05	323	265	15	265	139	30
Deltametrina	15	18,30	253	172	10	253	93	10
Azoxistrobina	15	18,62	344	183	30	344	329	30
Indoxacarb	15	18,90	203	106	20	203	134	20
Trifenilfosfato	16	20,50	326	169	30	326	215	30
Iprodion	16	20,86	187	124	20	187	159	20
Pirazofós	17	21,01	221	193	15	221	149	15
Prochloraz	17	21,06	308	266	5	308	280	5
Ciprodinil	17	21,23	224	208	25	224	222	25
Fenvalerato	18	24,00	167	125	15	197	141	5
λ - cialotrina I	18	24,30	197	141	5	197	161	5
λ - cialotrina II	18	26,02	197	141	5	197	161	5

Conclusões

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 52 agrotóxicos em um tempo de corrida de 28,95 minutos. A partir dos resultados do presente estudo sobre a otimização das condições cromatográficas e do sistema de espectrometria de massas será realizado a extração dos agrotóxicos das hortaliças abóbora, vagem, cenoura, batata-doce, salsinha, cebola e cebolinha utilizando-se o método Quechers (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Para isso será utilizado um planejamento experimental ²⁴, visando à obtenção das melhores condições de extração e *clean-up*.

Referências bibliográficas

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**.

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**.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (AGROFIT). Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 20 de fevereiro de 2018.