

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO MICRO-QUECHERS E LC-MS PARA DETECÇÃO DE AGROTÓXICOS EM MÚSCULO DE PEIXES*

MIQUEIAS C. SILVA^{1,2}, ENDI ADRIANO FURES³, JONAS SIMON DUGATTO⁴,
JANAÍNA SILVA SARZI⁵, DAVID A. R. TATAJE⁶, LIZIARA C. CABRERA^{7,2}

1 Introdução

Os agrotóxicos têm o potencial de causar danos significativos ao meio ambiente, afetando principalmente a qualidade da água (tanto superficial quanto subterrânea) e do solo. Conseqüentemente essas substâncias impactam a saúde de seres humanos, animais e plantas. Os peixes desempenham o papel de bioindicadores, refletindo a qualidade dos habitats aquáticos e a dinâmica do destino dos agrotóxicos no ambiente (Rani *et al.*, 2021).

Devido à bioacumulação de agrotóxicos em animais, como em tecido de peixes, e ao uso intensivo desses compostos no Brasil, especialmente no sul, é necessário desenvolver métodos de preparo e extração de amostras de peixes que sejam versáteis, rápidos, e sustentáveis, permitindo uma análise eficiente dos compostos de interesse.

Em vista disso, o método QuEChERS (do inglês, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) foi desenvolvido para análise de agrotóxico em vegetais e frutas (Anastassiades *et al.*, 2003). Sendo adaptado com o tempo para outras matrizes, como peixes. Além disso, a miniaturização de métodos proporciona a menor utilização de reagentes, principalmente solventes orgânicos e possibilita o trabalho com amostras diminutas como tecidos de organismos. Este trabalho busca otimizar e validar um método micro-QuEChERS para determinação de agrotóxicos em tecidos de peixes utilizando LC-MS.

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um método

¹Estudante de Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS, contato: miqueias.castro18@outlook.com

²Núcleo de síntese, aplicação e análise de compostos orgânicos e inorgânicos (NUSAACOI) – UFFS

³Mestrando em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS

⁴Químico Industrial, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS

⁵Pós-Doutoranda, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS

⁶Doutor em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS

⁷Doutora em Química Analítica, UFFS, *campus* Cerro Largo/RS, **Orientadora**. Contato: liziara.cabrera@uffs.edu.br

*Desenvolvimento e validação de métodos para determinação de agrotóxicos em músculo e fígado de peixes.

utilizando a técnica miniaturizada QuEChERS, também conhecida como micro-QuEChERS, para a determinação de resíduos de agrotóxicos em músculo de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas.

3 Metodologia

O procedimento experimental envolveu a otimização do método QuEChERS miniaturizado modificado e a aplicação do método multirresíduo por HPLC-MS para analisar agrotóxicos em tecidos de peixe. Essa pesquisa foi conduzida no Laboratório de Química Instrumental do *Campus* Cerro Largo da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

Utilizou-se o Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-MS 2020, que possui uma fonte de Ionização por Electrosprav (ESI), um analisador de massa do tipo quádruplo e um sistema de aquisição de dados LabSolutions®. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica InfiniyLab Poroshell 120 EC-C₁₈ 3 x 50 mm, 2.7 µm (Agilent®).

No estudo, utilizou-se peixes da espécie *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como “traíra”, para as amostras “branco” e fortificadas. E foram adquiridos de um produtor rural em Giruá – RS e cria os animais em açudes distantes de lavouras. O músculo do peixe foi triturado até obter completa homogeneização, utilizando um multiprocessador. Desse modo, obteve-se uma alíquota representativa de tecido muscular de peixes para realizar testes de otimização e validação da metodologia estudada.

Inicialmente foi avaliado em teste os melhores sorventes ou combinação destes para etapa de limpeza (*clean-up*) do método proposto. Tendo como tratamentos: T1 (0,04 g C₁₈ + 0,03 g MgSO₄), T2 (0,014 g PSA + 0,014 g C₁₈ + 0,3 g MgSO₄), T3 (0,02 g C₁₈ + 0,2 g Florisil + 0,3 g MgSO₄), T4 (0,04 g Florisil + 0,15 g MgSO₄), T5 (0,0296 g MgSO₄ + 0,0394 g C₁₈ + 9,86·10⁻⁴ g Carvão Ativado) e T6 (0,0296 g MgSO₄ + 0,0394 g Florisil + 9,86·10⁻⁴ g Carvão Ativado), sendo: C₁₈: octadecilsilano e PSA: amina primária e secundária. Os tratamentos foram avaliados com as condições do QuEChERS Acetato, pois este garante uma melhor extração do co-extrato quando comparado com o QuEChERS-Original.

O segundo experimento compreendeu a comparação do QuEChERS-Original e QuEChERS-Acetato, onde no Original usa-se acetonitrila pura na etapa de extração e no Acetato nesta etapa acidifica-se o acetonitrila em 1% com ácido acético. Para o teste e suas quantidades de sais respectivamente conforme determinam os métodos: QuEChERS-Original (0,6 g MgSO₄ + 0,1 g NaCl) e no QuEChERS-Acetato (0,4 g MgSO₄ + 0,35 g Acetato de Sódio).

Para avaliar o efeito da temperatura na extração dos agrotóxicos estudados, no terceiro experimento, utilizou-se uma centrífuga com refrigeração, realizando-se o teste de 4 temperaturas nas etapas de extração/partição e limpeza de cada amostra, sendo as temperaturas avaliadas: -10, -5, 0 e 5 °C.

Para os parâmetros descritos anteriormente foi realizado o planejamento composto central, a fim de encontrar um procedimento que permitisse a extração adequada dos agrotóxicos em estudo em músculo de peixe. O planejamento consistiu na variação de três fatores, sendo eles as massas dos sais de partição e do sorvente de limpeza, bem como também a temperatura com níveis de 0,6197 a 1,0653 g de NaCl + MgSO₄; 0,0330 a 0,1170 g de C₁₈ + MgSO₄ e temperaturas de -8,4 a 8,4 °C. Todas as otimizações foram avaliadas quanto às recuperações dos analitos, escolhendo as melhores condições para a maioria deles.

Além disso, a metodologia foi validada quanto a alguns parâmetros analíticos como seletividade, curva, linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) sensibilidade, exatidão e precisão conforme determina Inmetro (2020) e Anvisa (2017).

Posteriormente o método foi testado em matriz de fígado de peixes para avaliação da resposta em termos de recuperação para cada analito.

4 Resultados e Discussão

Otimização da etapa de limpeza

A melhor condição de limpeza para o método foi o teste 1 (0,04 g C₁₈ + 0,03 g MgSO₄), com 23 compostos na faixa de recuperação cada, sendo este selecionado para prosseguimento da otimização do método.

Teste de comparação entre QuEChERS Original e Acetato

Os resultados para o teste comparativo entre a utilização do QuEChERS Original e Acetato demonstram que, o teste com melhor resultado em termos de mais analitos com recuperação adequada (70-120%) foi o teste 1 (QuEChERS Original), o qual utiliza os sais NaCl e MgSO₄ e acetonitrila pura para a extração e partição.

Teste de temperaturas da centrífuga

Os resultados obtidos foram inconclusivos acerca da temperatura de centrifugação utilizada no método. Os resultados para a temperatura mais alta (5 °C) foram de 24 compostos na faixa de recuperação aceitável, ao passo que os resultados para a temperatura mais baixa (-10 °C) foram similares, com 23 compostos. Os resultados das temperaturas intermediárias, 0 e

-5 °C, foram piores, com 13 e 17 compostos na faixa, respectivamente. A fim de otimizar o parâmetro temperatura, tendo em vista os resultados inconclusivos obtidos no teste aplicado, o mesmo foi avaliado através do planejamento experimental.

Planejamento experimental composto com ponto central

Os resultados gerais para o planejamento experimental composto com pontos centrais, proporcionaram a otimização das massas dos reagentes utilizados, bem como a temperatura de centrifugação. Portanto, determinou-se que seria utilizado para a etapa de validação do método os seguintes valores: 0,2 g de NaCl + 0,6 g MgSO₄; 0,045 g C₁₈ + 0,03 g MgSO₄; e temperatura em 0 °C.

Validação do método Micro-QuEChERS

A seletividade foi assegurada neste método, pois não havia interferentes no tempo de retenção de cada composto, sendo confirmado pela análise dos brancos em triplicata. A linearidade do método foi confirmada pela plotagem da curva analítica em metanol e curva de trabalho, realizada em seis níveis de concentração pelo método otimizado.

Para a exatidão e precisão estes parâmetros foram calculados e o aceite do critério de recuperação entre 70 e 120% e desvio padrão relativo, também chamado de coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Os níveis de concentração avaliados foram 2, 4, 8, 20 e 40 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. A maioria dos compostos obtiveram valores dentro do aceitável. Os compostos 2,4-D, tebuconazol, profenofós e clorpirifós não são abrangidos pelo método por não apresentarem recuperações adequadas durante os testes.

Para o LOQ foi usado o menor concentração que após processo de preparo de amostra tenha obtido recuperações de 70-120% e CV menor que 20%. Sendo o LQ usado como menor ponta da curva de calibração, a qual variou de 2,0 a 8 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, sendo que somente para trifloxistrobina o LQ foi de 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Resultados que se assemelham com determinação de agrotóxicos em tecidos de peixes Chatterjee *et al.* (2016) e não sendo método miniaturizado.

O teste do método otimizado para a matriz músculo obteve resultados diferentes na matriz fígado de peixe, não apresentando resultados adequados de recuperação dos analitos estudados, sendo portanto necessários mais estudos para o desenvolvimento de um método para determinar os agrotóxicos em estudo nessa matriz.

5 Conclusão

Conclui-se que a metodologia miniaturizada micro-QuEChERS proposta para a determinação de agrotóxicos em músculo de peixe utilizando LC-MS mostrou ser eficaz, seguro e sensível, podendo ser aplicado em trabalhos de monitoramento e análises de rotina. Além disso, o método miniaturizado proporciona um menor uso de solvente orgânico e demais reagentes, diminuindo custos e resíduos, e o trabalho com pequenos organismos.

Referências Bibliográficas

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (Publicada no DOU no.141, de 25 de julho de 2017) Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

CHATTERJEE, N. S. *et al.* Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food chemistry**, v. 196, p. 1–8, 2016.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf. Acesso em: 05 abr. 2023.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of AOAC International**. v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

PERESTRELO, R. *et al.* QuEChERS - Fundamentos, melhorias relevantes, aplicações e tendências futuras. **Analytica chimica acta**, v. 1–28, 2019.

RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of cleaner production**, v. 283, n. 124657, p. 124657, 2021.

Palavras-chave: Agricultura; Contaminantes emergentes; Cromatografia; Micro-extração.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2023 - 0323 - EDITAL Nº 73/GR/UFRS/2023

Financiamento: CNPq