

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AVEIA

Santa Cruz, L.M.¹; Costa, A.R.¹; Pedron, C.N.¹; Nakano, V.E.¹; Ferigolo, E.F.¹; Silva, M.J.A.¹; Miranda, L.S.J.¹; Pinheiro, S.J.C.¹; Kimura, I.A.¹; Alaburda, J.¹

¹ Instituto Adolfo Lutz

RESUMO

A busca por soluções analíticas para determinação multirresíduo de agrotóxicos tem levado ao desenvolvimento de pesquisas relacionadas a extrações simplificadas e efetivas, com identificação e quantificação por cromatografia e espectrometria de massas. O desenvolvimento de um método rápido por QuEChERS modificado combinado com cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução Exactive Plus Orbitrap™ (UHPLC-HRMS) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras secas (aveia) é apresentado neste trabalho. No total, 65 ingredientes ativos (i.a) atenderam aos critérios de aceitação para linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão (intervalo de confiança de 95%; k=2). A contribuição desse estudo é relevante para pesquisas e programas de monitoramento, cujos dados de resíduos de agrotóxicos em aveia são escassos no país.

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são amplamente utilizados desde meados do século XX¹, com mais de 500 ingredientes ativos de diversas classes químicas registrados no Brasil². Devido aos possíveis efeitos adversos agudos ou crônicos à saúde humana, o monitoramento desses contaminantes é importante e requer o desenvolvimento de estratégias analíticas para resultados rápidos e confiáveis em baixos níveis de concentração nos diversos tipos de amostras.

Uma das técnicas mais utilizadas para análise de resíduos de agrotóxicos é o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Considerado adequado, efetivo e versátil pela introdução de modificações do uso de diferentes solventes, sais, tampões e adsorventes, esse método de extração pode ser aplicado para centenas de compostos em diversas matrizes. Para identificação e quantificação, a introdução da cromatografia acoplada à espectrometria de massas possibilitou ampliar a determinação de contaminantes químicos em muitas matrizes com alta seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão, além de atender aos limites constantes na legislação. Tradicionalmente, as análises são realizadas usando instrumentos triplo quadrupolo, mas o uso de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) é uma excelente alternativa que pode ser utilizada para triagem e/ou quantificação, obtendo-se maior resolução, precisão e faixa dinâmica de análise^{3,4}.

Entre as matrizes que podem ser analisadas por QuEChERS, a aveia (*Avena sativa* L.) é um dos principais cereais de inverno produzidos no Brasil com alto valor nutricional⁵. De acordo com dados do IBGE, o país possui uma área plantada de 499 800 ha, com uma estimativa média de produção de 1,1 milhão de toneladas para o ano de 2022, o que representa um crescimento de 8,2% em relação a 2021^{6,7}. Diversos benefícios são atribuídos à aveia, como por exemplo, redução do colesterol e da absorção de glicose⁸. No Brasil e no mundo, o principal uso da aveia é para alimentação, podendo ser empregada para consumo humano, como por exemplo, na produção de cereais matinais, granola, alimentos infantis e barras de cereais. Além disso, a aveia também pode ser empregada em rações animais e como matéria prima na produção de cosméticos⁵.

OBJETIVO

Desenvolver um método para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras secas (aveia), utilizando QuEChERS modificado e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução Exactive Plus Orbitrap™ (UHPLC-HRMS).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados padrões certificados de agrotóxicos, adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH ou Riedel de Hæn - Sigma Aldrich e padrão de calibração para o espectrômetro de massas composto por n-butilamina, dodecil sulfato de sódio, hidrato taurocolato de sódio, cafeína, solução MRFA (acetato de L-metionila-arginila-fenilalanila-alanina) (Sigma Aldrich e Thermo Fisher Scientific). Os solventes e reagentes empregados foram: sais de extração QuEChERS contendo 1,5 g de acetato de sódio e 6,0 g de sulfato de magnésio (Agilent); sais de limpeza dSPE (400 mg de fase reversa C18, 400 mg de amina primária e secundária - PSA e 1200 mg de Sulfato de magnésio) (Agilent); acetonitrila grau HPLC (JT Baker), metanol grau HPLC (Merck), ácido acético glacial 100% P.A. (Merck); ácido fórmico 98-100% m/m e formiato de amônio 99% (Merck). Membranas PTFE (0,22µm) (Merck, Millipore).

Para a avaliação do método, foi utilizada amostra-branco adquirida em feira orgânica no município de São Paulo. Para o preparo das amostras, utilizou-se o método QuEChERS modificado⁹ (Figura 1).

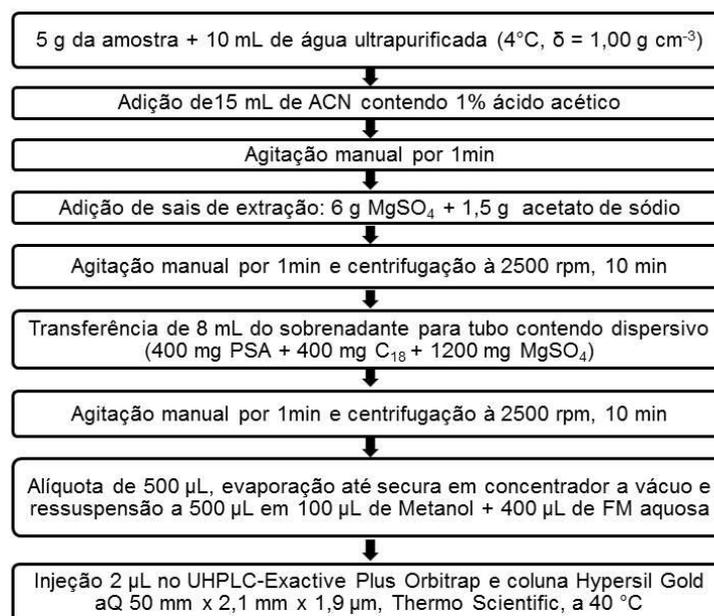


Figura 1: Método de extração para análise de aveia

Para identificação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos foi utilizado cromatógrafo a líquido, UHPLC, modelo Ultimate 3000 Dionex acoplado ao analisador de massas Exactive Plus Orbitrap™ Thermo Scientific. As fases móveis utilizadas foram soluções de formiato de amônio 5mM e 0,1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), programa de gradiente de 12 min com fluxo 0,3 mL min⁻¹. Para o sistema de detecção por espectrometria de massas utilizou-se a fonte de ionização por eletronebulização (*electrospray*) com aquecimento (HESI). Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e negativo de ionização e os experimentos realizados nos modos de detecção, Full MS e All Ion Fragmentation (AIF), numa faixa de massas entre 60 e 900 m/z, e resolução de aquisição de 35 000 e 17 500, respectivamente. O critério para detecção e identificação dos compostos foi a massa exata dos íons de fragmentação e para a quantificação, a massa exata dos íons moleculares, tempo de retenção e padrão isotópico. O erro aceitável de exatidão de massas foi de 5 ppm.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os métodos para análises de resíduos de agrotóxicos são desenvolvidos para uma grande variedade de matrizes¹⁰. Cereais, como a aveia, são considerados amostras complexas pois além de serem secos, possuem alto teor de amido, proteína e gordura, bem como vitaminas, minerais ou subprodutos de moagem que dificultam a análise e afetam a extração. Somado a isso, alimentos processados e produtos à base de cereais e de grãos podem apresentar níveis de concentração menores, já que passam por diversas etapas (i.e. armazenamento, moagem), resultando em possível efeito de matriz mais acentuado¹⁰.

O método QuEChERS, largamente utilizado em análises de resíduos de agrotóxicos, foi originalmente desenvolvido para matrizes de frutas e vegetais frescos, que possuem alto conteúdo de água e baixo teor de gordura, mas para cereais e seus derivados, ainda é considerado limitado^{4,11,12}. Neste trabalho, as amostras foram hidratadas com água ultrapurificada (4°C, $\delta = 1,00 \text{ g cm}^{-3}$), conforme a técnica utilizada por HE et al.¹¹, extraídas com acetonitrila acidificada e sais (*salting out*), em seguida, submetidas à etapa de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, dispersive-Solid Phase Extraction) (vide Figura 1). Dessa forma, o método QuEChERS tem a vantagem de ser dinâmico, simples e rápido, com poucas etapas, o que minimiza os erros analíticos⁴.

A técnica de cromatografia a líquido aliada à espectrometria de massas mostrou ser efetiva, sensível, seletiva e robusta. Além da capacidade de separar, identificar e quantificar, o analisador de massas do tipo Orbitrap permite detectar baixos níveis dos componentes de interesse ao minimizar as interferências químicas.

Para avaliação de linearidade, seletividade, exatidão (recuperação), precisão, limites de detecção e quantificação do método, foi utilizada uma amostra orgânica isenta dos compostos estudados¹³. Os limites de detecção variaram de 0,001-0,003 mg kg⁻¹ e os de quantificação de 0,002-0,009 mg kg⁻¹, cujos valores estão abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA² para os 59 ingredientes ativos regulamentados para aveia². As médias das recuperações para três níveis de concentração (0,01; 0,02 e 0,03 mg kg⁻¹) e 8 réplicas variaram de 71,18 - 118,15% com DPR $\leq 17,20\%$, intervalo de confiança de 95%, k=2 (vide Tabela 1). O método foi considerado satisfatório para a análise de 65 ingredientes ativos, incluindo isômeros e metabólitos, em conformidade com os critérios mínimos estabelecidos pela norma adotada¹³.

Tabela 1 – Íon molecular, Fragmento, Tempo de retenção e Recuperações obtidas para análise de aveia

Composto	Íon Molecular	Fragmento	TR (min)	Recuperações Nível 1		Recuperações Nível 2		Recuperações Nível 3	
				Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
Acefato	183,0119	142,99272	0,57	79,41	8,68	91,44	8,54	89,58	2,81
Acetamiprido	222,0672	197,11684	5,36	94,06	3,57	93,40	2,87	95,31	5,13
Acibenzolar-S-metil	209,9922	167,96999	7,8	94,15	17,20	96,13	5,46	82,89	6,17
Aldicarbe	190,0776	101,02954	5,72	97,19	8,21	95,16	8,06	96,85	4,98
Aldicarb-sulfona	222,0674	148,0419	0,6	92,90	6,20	97,41	5,03	94,53	2,24
Aldicarb-sulfóxido	206,0725	132,04794	0,6	99,97	9,08	101,74	8,99	100,81	2,97
Ametrina	227,1205	186,08084	6,95	99,23	12,90	97,85	5,62	96,57	1,89
Aminocarbe	208,1212	152,10728	0,59	92,66	4,71	86,78	8,96	91,80	5,22
Atrazina	215,0938	174,05419	6,85	109,58	28,04	102,55	5,09	94,40	3,84
Azaconazol	299,0228	230,99752	7,2	96,59	3,91	100,29	4,58	92,40	4,86
Azinfos-etil	345,0371	232,94907	8,35	120,51	35,93	95,55	5,04	87,65	7,77
Azinfos-metil	317,0058	167,01623	7,29	112,30	24,02	102,53	4,50	92,94	4,55
Azoxistrobina	403,1168	372,09795	7,62	99,29	6,72	99,86	7,20	95,37	3,59
Benalaxil	325,1678	294,1493	8,87	116,71	43,10	94,34	5,55	83,01	2,89

Bendiocarbe	223,0845	167,07032	6,22	96,43	5,49	98,27	5,91	98,77	2,24
Boscalida	342,0327	307,0634	7,82	102,47	19,48	93,26	4,14	88,18	3,31
Bromacila	260,016	204,96083	6,15	100,93	5,37	101,80	3,77	100,67	2,31
Bromuconazol-1_2	374,9541	306,92876	8,19/8,79	117,78	56,45	83,74	12,63	71,18	6,70
Bupirimato	316,1569	272,1068	8,28	101,76	27,48	89,55	4,85	85,24	0,75
Buprofezina	305,1562	201,10576	9,35	97,06	10,11	89,93	3,50	89,28	5,50
Carbaril	201,079	155,06057	6,5	95,43	5,31	93,46	6,08	94,96	4,28
Carbendazim	191,0695	160,05059	0,87	91,51	3,18	90,20	1,63	85,72	3,00
Carbofurano	221,1052	165,09118	6,24	98,74	0,67	98,29	4,63	97,39	5,59
Carbofuran, 3OH-	237,1001	181,08613	5,01	90,32	5,70	94,34	4,97	95,27	3,69
Carboxin	235,0667	143,01624	6,4	99,31	2,19	95,47	5,24	100,75	4,53
Cianazina	240,089	214,08547	6,08	96,17	9,54	96,86	5,26	96,89	2,45
Ciazofamida	324,0448	261,09029	8,52	79,71	58,66	93,15	8,10	84,11	4,54
Cimoxanil	198,0753	147,04002	5,31	91,72	3,98	97,04	2,24	96,31	5,25
Ciproconazol-1_2	291,1138	138,99474	7,96/8,22	97,11	27,96	94,77	7,89	85,54	2,95
Ciprodinil	225,1266	210,10254	8,6	121,25	66,49	78,91	9,35	73,52	4,54
Ciromazina	166,0967	125,08238	0,55	48,47	10,58	55,67	4,06	60,95	9,16
Cletodim	359,1322	206,11781	9,25	116,11	47,04	94,70	11,28	85,23	16,87
Cresoxim-metil	313,1314	282,1124	8,71	88,31	59,72	98,15	7,08	87,24	2,97
Diazinon	304,1011	169,07972	8,87	88,50	64,46	104,50	6,39	88,53	11,30
Dimetoate	228,9996	198,96488	4,65	98,26	4,99	97,74	3,25	96,21	2,00
Disulfoton	274,0285	260,98382	6,52	99,17	12,44	99,37	6,00	100,40	3,89
Diuron	232,017	187,96644	7,1	97,03	11,85	97,80	2,69	99,26	3,61
Epoxiconazole	329,0731	141,01033	8,54	158,83	79,85	90,12	8,12	81,93	5,05
Etoprofos	242,0564	215,03237	8,4	90,09	20,59	96,37	9,78	98,59	3,59
Fenamifos	303,1058	276,08186	8,63	107,27	28,79	97,80	5,68	89,11	3,91
Fipronil	435,9387	144,00816	8,67	107,97	21,53	97,23	4,73	80,52	3,42
Flutriafol	301,1027	233,07754	6,84	99,02	8,79	98,97	2,78	98,40	4,52
Fosfamidona	299,0689	226,98709	6,06	99,73	5,20	97,76	2,88	100,38	2,14
Fosmet	316,9945	248,89193	7,33	102,52	15,14	101,63	4,84	92,15	9,90
Imazalil	296,0483	255,00864	6,86	99,06	6,03	95,34	6,18	98,80	6,24
Malaixon	314,0589	142,9929	6,33	99,99	2,27	98,98	2,54	99,71	2,35
Malation	330,0361	285,0015	7,85	99,90	19,25	81,94	8,58	87,59	9,97
Metamidofos	141,0013	142,99272	0,58	81,81	4,49	85,66	7,06	86,45	5,61
Metiocarb	225,0824	169,06825	7,63	99,10	13,74	94,03	6,22	85,63	1,59
Metomil	162,0463	106,03219	0,75	71,29	92,51	99,13	13,02	99,42	4,65
Miclobutanil	288,1142	220,08879	8,15	102,69	22,28	98,66	4,39	88,32	6,47
Molinate	187,1031	126,0914	7,97	92,40	7,31	96,87	7,27	90,42	4,87
Monocrotofos	223,061	193,02626	0,78	88,15	5,33	95,39	2,17	97,72	3,61
Ometoate	213,0225	196,01917	0,59	92,57	5,93	95,33	3,71	95,90	7,84
Paraoxon	275,0559	248,03231	6,83	99,86	6,82	102,26	2,23	100,15	3,36
Paraoxon-metil	247,0246	234,02887	5,98	100,92	10,91	98,85	3,92	99,97	4,66
Pirimifos-etil	333,1276	306,10365	9,38	73,50	65,39	89,88	5,11	86,23	8,93
Pirimifos-metil	305,0963	278,07263	8,92	108,84	18,70	100,88	6,60	100,93	3,46
Procloraz	375,0308	308,00075	9,04	96,25	47,27	90,55	10,87	88,79	8,45
Propoxur	209,1052	168,06564	6,18	99,47	5,96	96,81	2,85	98,34	8,06
Simazina	201,0781	132,03256	6,27	95,88	8,50	95,10	5,56	92,32	4,13
Tebuconazol	307,1451	125,01547	8,84	118,15	66,22	83,52	15,30	77,17	10,34
Tetraconazol	371,0215	184,99215	8,5	131,12	66,58	90,77	11,36	80,42	15,33
Triazofos	313,065	286,04092	8,24	124,48	44,69	95,19	10,07	86,20	8,47
Vamidotiona	287,0415	146,0634	5,13	97,63	3,07	97,72	5,21	94,57	6,73

TR: Tempo de Retenção; DPR: Desvio Padrão Relativo

A adequação do método foi verificada na análise de 12 amostras de aveia (farinha, flocos finos e flocos) disponíveis em supermercados da região metropolitana de São Paulo. Os resultados indicaram a presença de tebuconazol em 3 delas, com valores abaixo do LMR estabelecido para aveia, e pirimifós metílico (i.a. não autorizado) em 11 amostras. Dessa forma, verificou-se que o método multirresíduo de agrotóxicos estudado para 65 i.a. em aveia utilizando a extração QuEChERS juntamente a técnica de quantificação UHPLC-HRMS foi satisfatório. Observa-se na literatura poucos estudos que empregam a análise de resíduos de agrotóxicos em aveia por UHPLC acoplado ao espectrômetro de alta resolução Exactive Plus Orbitrap™.

CONCLUSÃO

O método para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras secas, utilizando uma rápida e eficiente preparação de amostras por QuEChERS modificado e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de alta resolução Exactive Plus Orbitrap™, mostrou-se adequado para a matriz aveia com base nos dados de validação apresentados e propiciará o monitoramento regulatório e de rotina dos resíduos de agrotóxicos estudados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ALDER, L.; STEINBORN, A.; BERGELT, S. Suitability of an orbitrap mass spectrometer for the screening of pesticide residues in extracts of fruits and vegetables. **Journal of Aoac International**, v. 94, n. 6, p. 1661-1673, 2011.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia de Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acesoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em: 14 set. 2022.
3. DOMINICIS, E. de; COMMISSATI, I.; SUMAN, M.. Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1232-1241, 2012.
4. MUSARURWA, H.; CHIMUKA, L.; PAKADE, V. E.; TAVENGWA, N. T.. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103314, 2019.
5. MALANCHEN, B. E.; SILVA, F. A. da; GOTTARDI, T.; TERRA, D. A.; BERNARDI, D. M. Composição e propriedades fisiológicas e funcionais da aveia. **Fag Journal of Health (Fjh)**, v. 1, n. 2, p. 185-200, 2019.
6. IBGE. **Panorama da Produção Agropecuária no Brasil**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/aveia-branca/br>. Acesso em: 11 out. 2022.
7. CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2021/2022: Décimo segundo levantamento: setembro de 2022**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/44551_46a1e5a25194f54bd5d58c35cb8b2646 Acesso em: 11 out. 2022.
8. LIMA, U. M. Uma análise sobre as barreiras fitossanitárias a partir do método de tarifas equivalentes: O caso da aveia no Brasil. **Nexos Econômicos**, v. 13, n. 1, p. 93-121, 2020.
9. PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
10. RAINA-FULTON, R. New trends in pesticide residue analysis in cereals, nutraceuticals, baby foods, and related processed consumer products. **Journal of Aoac International**, v. 98, n. 5, p. 1163-1170, 2015.
11. HE, Z.; WANG, L.; PENG, Y.; LUO, M.; WANG, W.; LIU, X.. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method. **Food Chemistry**, v. 169, p. 372-380, 2015.
12. BORDIN, A. B.; MINETTO, L.; NASCIMENTO FILHO, I. do; BEAL, L. L.; MOURA, S.. Determination of pesticide residues in whole wheat flour using modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2016.
13. EC/EURL. European Commission. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides - EURL. **Document No SANTE/12682/2019 - Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, 1 jan. 2020. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf.