

VALIDAÇÃO DE UM PROCEDIMENTO ANALÍTICO EMPREGANDO UM DISPOSITIVO SEMIAUTOMATIZADO PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO

Madson Moreira Nascimento¹; Jailson Bittencourt de Andrade^{2,3}; Jeancarlo Pereira Dos Anjos^{2,3}

¹Bolsista; Projetos internos – SENAI CIMATEC; madchemis89@gmail.com;

²Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; jeancarlo.anjos@fiieb.org.br

³INCT em Energia e Ambiente; Salvador-BA; jailsondeandrade@gmail.com

RESUMO

O ensaio de validação é uma etapa crítica para assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados. No presente estudo, um procedimento analítico baseado na microextração em fase líquida empregando um novo dispositivo semiautomatizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de vinho foi validado considerando os parâmetros analíticos para validação do tipo “*single laboratory*”. O dispositivo de microextração foi acoplado a um arranjo contendo uma bomba peristáltica e um agitador vórtex com plataforma multi-tubos. Deste modo, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito de matriz, faixa de trabalho e linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, fator de pré-concentração e recuperação absoluta. Com base nos resultados, observou-se que procedimento analítico se mostrou seletivo e sem evidência de falta de ajuste nas curvas analíticas estudadas ($R^2 \geq 0,9950$). Também se mostrou preciso ($RSD \leq 10,2\%$) e exato (recuperações relativas variando de 81,7% a 119%). Por fim, o procedimento validado foi aplicado na determinação de agrotóxicos em amostras de vinho tinto, vinho rosê e vinho branco.

PALAVRAS-CHAVE: LPME, Cromatografia a gás, Espectrometria de massas, Preparo de amostras.

1. INTRODUÇÃO

A confiabilidade de um método de análise química é fundamental para a correta tomada de decisões com base nos resultados obtidos. Um método analítico que fornece resultados não confiáveis, pode levar a prejuízos financeiros e construção de estratégias desastrosas.¹ Deste modo, a validação é considerada uma etapa obrigatória do desenvolvimento de qualquer método analítico. Por meio desta etapa, determina-se se um procedimento de análise química é capaz de fornecer dados confiáveis, com a qualidade exigida por agências reguladoras nacionais e internacionais.² Os métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas precisam passar por um extenso protocolo de validação, uma vez que muitas agências reguladoras determinam os limites aceitáveis destes resíduos. Para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinhos, empregando métodos de microextração/preconcentração, o guia harmonizado da IUPAC é o mais empregado e reconhecido internacionalmente². Logo, é imprescindível assegurar que um determinado método analítico forneça resultados confiáveis. O presente estudo teve como objetivo validar um procedimento analítico com dispositivo semiautomatizado para determinação de resíduos de agrotóxicos com diferentes grupos químicos em amostras de vinho. Os parâmetros de validação foram aqueles estabelecidos pela IUPAC para os critérios de validação “*Single Laboratory*”.

2. METODOLOGIA

A) *Reagentes e soluções:* Foi utilizada uma solução-padrão de agrotóxicos organoclorados (EPA Appendix IX, 46960-U) na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Padrões analíticos de atrazina- d_5 (99,8%), fention-(S-metil- d_3) (98%), difenoconazol (99,7%), sulfotep (96,9%), etion (95%), paration-metil (99,8%), clorpirifós (99,3%), imazalil (99,7%), tebuconazol (99,5%), dissulfoton (98,7%), fention (98,6%), malation (99,8%), molinato (98,2%) e piraclostrobina (99,9%) foram compradas da Sigma-Aldrich. Azoxistrobina (99,5%), fenitrotion (98,5%) foram adquiridos da Chem Service (West Chester, Pensilvânia, EUA). Permetrina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e bifentrina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adquiridos da Accustandard. A partir destes padrões, foram preparadas soluções-estoque (100 mg L^{-1}), em metanol. Para construção das curvas analíticas com equiparação de matriz, foi preparada uma solução de trabalho mista na concentração de 100 ng mL^{-1} contendo todos os agrotóxicos. Um extrato da matriz isenta dos analitos foi preparado passando-se 100 mL de uma amostra de vinho tinto através de um cartucho SPE de C_{18} pré-condicionado com 2 mL de metanol, seguidos de 2 mL de água. A matriz isenta obtida nessa etapa foi utilizada para diluição dos padrões e construção da curva analítica. Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau HPLC/espectroscópico.

B) *Equipamentos:* Para identificação e determinação das concentrações dos resíduos de agrotóxicos foi empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP2020 NX da

Shimadzu, equipado com amostrador automático AOC-5i e coluna capilar Restek rtx 5-MS (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 μ m de espessura de filme). O método cromatográfico foi adaptado de Nascimento, Da Rocha e De Andrade.⁷ O sistema semiautomatizado foi composto por uma bomba peristáltica Miniplus-3 da Gilson e um agitador vórtex multiplataforma BT931 (BT Lab System).

C) *Procedimento de microextração em fase líquida*: Um volume de 12 mL da amostra (pH 4.00; 2,7 % NaCl (m/v)) foi transferido para o dispositivo de microextração (Figura 1). Em seguida, 70 μ L de tolueno foi adicionado à amostra e o dispositivo foi acoplado a um sistema contendo um agitador vórtex multi-tubos e uma bomba peristáltica. O sistema foi agitado por 30 min (750 rpm), em vórtex. Em seguida, a bomba peristáltica foi acionada, direcionando a fase orgânica para a parte superior do dispositivo, onde a mesma foi coletada e levada para injeção no GC-MS.

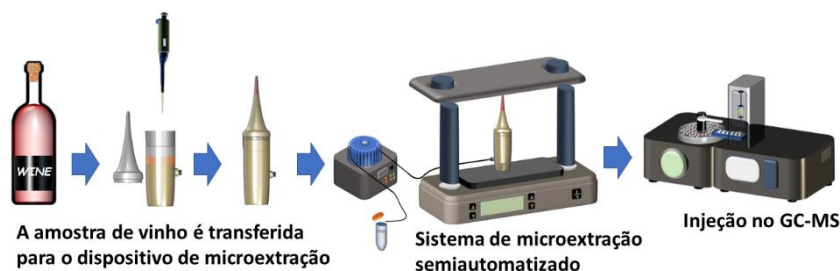


Figura 1. Desenho esquemático da extração de uma amostra de vinho empregando o dispositivo semiautomatizado.

D) *Validação do procedimento analítico*: Os critérios de validação levaram em consideração as figuras de mérito para a validação do tipo “single laboratory”, as quais foram: seletividade, efeito de matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão², fator de pré-concentração e recuperação absoluta. A seletividade foi avaliada comparando-se um cromatograma de uma amostra de vinho tinto fortificada com um cromatograma de uma amostra de vinho tinto livre de agrotóxicos. O efeito de matriz (EM) foi calculado através da razão entre o coeficiente linear de uma curva analítica preparada na matriz (vinho tinto) e coeficiente linear de uma curva analítica preparada em água ultrapura. A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste de falta de ajuste empregando-se a ANOVA ($p < 0,05$). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos através dos parâmetros da curva analítica, conforme descrito por Ribani et al.³ A precisão, expressa como repetitividade e precisão intermediária, foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) obtido da extração de quatro amostras enriquecidas com 100 ng L⁻¹ dos pesticidas em estudo. Em contrapartida, a precisão intermediária foi avaliada calculando-se o RSD da extração de quatro alíquotas da amostra em três dias consecutivos ($n=12$). A exatidão foi calculada por meio de testes de recuperação relativa em três níveis de concentração: 75, 100 e 200 ng L⁻¹. Além disso, foram preparados mais três níveis de concentração (3000, 9000, 13000 ng L⁻¹) para o grupo de pesticidas (piretróides e triazóis), com menor sensibilidade na fonte de ionização do GC-MS. Para isso, adicionou-se alíquotas do padrão misto de pesticidas em um volume de 12 mL da amostra de vinho tinto e efetuou-se o processo de microextração com o dispositivo semiautomatizado em triplicata para cada nível de concentração. O fator de pré-concentração (FC) e a recuperação absoluta (RA) foram calculados utilizando os valores de área de pico para as amostras enriquecidas em 100 ng L⁻¹. Os cálculos utilizados para determinação da FC e RA foram os mesmos reportados no trabalho de Nascimento et al.⁴

F) *Aplicação em amostras reais*. Após validação, o procedimento de microextração empregando-se o dispositivo semiautomatizado foi utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em quatro amostras de vinho: duas amostras de vinho tinto, uma amostra de vinho rosè e vinho branco. Estas amostras foram selecionadas considerando os tipos de vinho mais consumidos no mercado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, o procedimento desenvolvido apresentou boa seletividade, sem nenhum pico interferente eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos. Além disso, o procedimento analítico apresentou linearidade adequada, sem evidência de significância de falta de ajuste ($p > 0,05$ para todas as curvas analíticas avaliadas). Os valores de R^2 variaram de 0,9946 (deltametrina I) a 0,9999 (piraclostrobina), atestando a boa linearidade do método. Em relação ao efeito de matriz, observou-se que o aumento do sinal induzido pela matriz ($ME > 1,10$) foi o efeito de matriz predominante. Deste modo, optou-se por utilizar a curva analítica preparada na matriz do vinho tinto.

O LD variou de 2,29 ng L⁻¹ (piraclostrobina) a 533 ng L⁻¹ (deltametrina I), enquanto os valores de LQ variaram de 7,63 ng L⁻¹ (piraclostrobina) a 1,78 µg L⁻¹ (deltametrina II). Para a maioria dos analitos estudados, os valores de LQ determinados neste estudo foram menores do que os relatados em trabalho anterior, empregando uma microextração de fase líquida com solvente binário miniaturizado (BS-LPME)⁵ e microextração com gota única (SDME)⁶, representando um avanço importante na extração de pesticidas usando técnicas de LPME.

Com relação à precisão, os valores do desvio padrão relativo (RSD) para repetitividade (n = 4) foram ≤10,2% para todos os pesticidas alvo, enquanto para precisão intermediária, o RSD variou de 2,67% (atrazina) a 19,1% (permetrina II).

No que diz respeito a exatidão, foram obtidos valores de recuperação relativa aceitáveis para a maioria dos analitos, os quais variaram de 81,7% (heptacloro-epóxido) a 119% (paration), exceto para piraclostrobina e atrazina-d₅, que ficaram abaixo de 80% no menor nível de concentração (75 ng L⁻¹). No entanto, todos os analitos foram recuperados satisfatoriamente (na faixa de 80-120 %) nos níveis de concentração média (100 ng L⁻¹) e alta (200 ng L⁻¹). Quanto à avaliação da eficiência de extração, foram obtidos fatores de enriquecimento variando de 13,2 (dimetoato) a 192 (molinato), assim como recuperações de extração variando de 81,7% (heptacloro-epóxido) a 119% (paration), o que mostrou que a maioria dos analitos foram satisfatoriamente extraídos da amostra de vinho e transferidos para a fase orgânica (solvente extrator). Algumas exceções foram observadas para compostos altamente hidrofóbicos (log K_{ow} > 5), como heptacloro, 4,4-DDE, 4,4-DDT, 4,4-DDD, etion, bifentrina, metoxicloro, carbosulfan e permetrina, que apresentaram recuperações de extração inferiores a 60%.

O procedimento analítico foi aplicado na determinação de pesticidas em quatro amostras de vinho. Alguns fungicidas, como epoxiconazol, tebuconazol e difenoconazol, foram detectados com elevadas frequências de detecção nas amostras de vinho tinto (73,9 – 95,7%). As concentrações destes agrotóxicos nas amostras estudadas variaram de <LQ a 35,9 µg L⁻¹.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento de microextração empregando-se um dispositivo miniaturizado foi validado com sucesso de acordo com os critérios de validação “*single laboratory*” estabelecidos pela IUPAC. Os baixos valores de LD e LQ permitiram a determinação de resíduos de agrotóxicos nas amostras de vinho tinto, vinho rosè e vinho branco à níveis de traço (ng L⁻¹). O procedimento analítico se mostrou preciso e exato, alcançando recuperações satisfatórias para a maioria dos analitos investigados. O procedimento desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes tipos de de vinho.

Agradecimentos

SENAI CIMATEC, INCT em Energia e Ambiente, CNPq, Projeto Kirimurê.

5. REFERÊNCIAS

1. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
2. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines For Single- Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
3. RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, v. 1156, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 201–205, 2007.
4. NASCIMENTO, M. M.; DA ROCHA, G. O.; DE ANDRADE, J. B. Customized dispersive micro-solid-phase extraction device combined with micro-desorption for the simultaneous determination of 39 multiclass pesticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1639, p. 461781, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461781>>.
5. SANTIAGO, M. A. P. A. et al. A miniaturized simple binary solvent liquid phase microextraction (BS-LPME) procedure for pesticides multiresidues determination in red and rosè wines. *Microchemical Journal*, v. 167, n. April, p. 106306, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106306>>.
6. DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS. *Microchemical Journal*, v. 112, p. 119–126, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.10.001>>.