

() Graduação (x) Pós-Graduação

VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS ACETADO SEM A ETAPA DE LIMPEZA PARA EXTRAÇÃO DO FIPRONIL EM SOLO

Rafaela Roberta Morelato,
Universidade Federal da Fronteira Sul,
rafaelarobertamorellato@hotmail.com

Jonas Simon Dugatto,
Universidade Federal da Fronteira Sul,
jonas.dugatto@uffs.edu.br

Thuanne Braúlio Hennig,
Universidade Federal da Fronteira Sul,
thuanne_hennig@hotmail.com

Paulo Roger Lopes Alves,
Universidade Federal da Fronteira Sul,
paulo.roger.lopes@gmail.com

Liziara da Costa Cabrera,
Universidade Federal da Fronteira Sul,
liziara.cabrera@uffs.edu.br

RESUMO

O composto fipronil é um inseticida comumente utilizado não só, na agricultura, para controle de pragas e insetos, como nas culturas de arroz, trigo, algodão, manga, cana-de-açúcar, milho, cereais e girassol, mas também, para o controle de parasitas como pulgas e piolhos em animais domésticos. O agrotóxico é altamente tóxico a saúde humana e assim, são necessários métodos analíticos validados para o monitoramento desses compostos que é altamente persistente em solo. O método utilizado para determinação de matriz solo foi o método QuEChERS acetado sem a etapa de limpeza e a análise foi por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS). Como resultado da validação obteve-se uma resposta linear com coeficiente de correlação de 0,994. A recuperação foi entre 115 - 120% com RSD inferior a 20% para quatro níveis (0,01, 0,05, 0,5, 2,5 mg kg⁻¹). O LOQ do método foi de 0,01 mg kg⁻¹. A validação do método é de extrema importância para utilização nas determinações de fipronil no solo, pois, é um composto que pode causar diversos efeitos a biota.

Palavras-chave: Fipronil; Validação de método; HPLC-MS; Solo.

1 INTRODUÇÃO

O fipronil, 5-amino-1- (2,6-dicloro-R, R, -trifluoropropil) -4- (trifluorometil) sulfinil] pirazole-3-carbonitrilo (Figura 2), é um poderoso inseticida fenilpirazol usado na agricultura para controle de uma gama de pragas de insetos, principalmente em culturas de arroz, trigo, algodão, manga, cana-de-açúcar, milho, cereais, girassol, entre outras (BOBE et al., 1997).

Fipronil (Regent ® 800 WG) é um composto considerado altamente tóxico pela ANVISA (2020), e persistente no solo por ser de baixa solubilidade em água, tem sido objetivo de vários estudos no mundo em decorrência de sua toxicidade a insetos não alvos. Em alguns países da Europa sua utilização foi proibida em decorrência da alta toxicidade, causando a morte de abelhas, responsáveis pela polinização (GRANZOTO, 2017).

Sua comercialização foi suspensa na França, desde 2004, por causa da mortalidade das abelhas e em outros países da Europa ele também foi proibido pela descoberta do seu alto grau de toxicidade (OLIVEIRA, 2010). O composto fipronil é um dos inseticidas mais utilizados no Brasil para combater pragas, principalmente em culturas alimentícias. Estudos crônicos com ratos utilizando o fipronil mostraram alterações como: alterações dos hormônios da tireóide, diminuição do ganho de peso, ansiedade e alterações no colesterol, proteínas e cálcio (USEPA, 1996). Neste contexto, o presente trabalho tem o objetivo de validar o método analítico utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para extração pelo método QuEChERS acetato sem etapa de limpeza com sorventes para determinação de fipronil em diferentes concentrações nos solos, principalmente em solos provenientes de ensaios toxicológicos.

O método QuEChERS foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades e colaboradores para determinação de agrotóxicos em frutas e verduras. Mais tarde, em 2005 Lehotay e colaboradores desenvolveram os métodos tamponados QuEChERS acetado e QuEChERS citrato, sendo esses considerados métodos oficiais para análise de agrotóxicos pela União Européia (PRESTES et al. 2009; PRESTES et al. 2011). Uma das etapas importantes do método QuEChERS é etapa de limpeza (*clean up*), o qual a tem objetivo de eliminar os interferentes da matriz a ser analisada, melhorando os resultados da determinação e eliminando possíveis efeitos da matriz. Nessa etapa, é utilizado uma técnica chamada Extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), onde os sorventes são utilizados para eliminar interferentes. Os principais sorventes utilizados são C18, PSA e Cgrafitizado (GCB). O GCB tem baixo custo, mas em geral acaba retendo também agrotóxicos, principalmente os planares. Já o C18 e PSA são excelentes na

remoção de interferentes, e otimizando suas quantidades é possível não reter os analitos de interesse. No entanto, o uso desses sorventes tem um custo um pouco elevado para aquisição e implica de uma etapa adicional que é a técnica de D- SPE. Uma alternativa que tem sido utilizada é o uso de apenas uma etapa de extração com solventes (acetonitrila/água ou metanol/água, por exemplo) e posterior diluição, dispensando a etapa de limpeza do extrato. Trabalhos que utilizam essa etapa têm sido relatados de forma promissora (SILVA et al., 2019; GEBREHIWOT et al., 2019).

2 MATERIAIS E METODOS

Para extração do fipronil em solo e posterior análise por LC-MS o método de preparo de amostra utilizado foi o método QuEChERS acetado modificado sem a etapa de limpeza, onde foi pesado 10 g de solo, adicionado 10 mL de água ultrapura, agitação por 30 seg. Logo após foi adicionado 10 mL de acetonitrila (grau HPLC, JtBaker) acidificada a 1% de ácido acético, sendo agitado e adicionado 6 g de sulfato de sódio anidro (JtBaker) e 1,5 g acetato de sódio. O frasco com a mistura foi agitado manualmente por 30 segundos e por mais 30 segundos em vortex. Logo após foi levado a centrifugação em 9000 rpm por 5 min. 1 mL do sobrenadante foi retirado e diluído a 10 mL com metanol e água (70:30). A mistura foi filtrada em filtros de seringa de PTFE de 0,2 μm (CHROMAFIL XTRA) e condicionados em vials para injeção no LC. Foi utilizado Cromatógrafo Líquido (LC-MS 2020, Shimadzu) com fonte de ionização por ESI, analisador de massa tipo quadruplo e sistema de aquisição de dados LabSolution, utilizando a coluna Varian C18 (50 mm x 2,0 mm x 2,8 μm). Os componentes da fase móvel foram água ultrapura (A) e metanol grau HPLC (B). O modo de eluição foi através de gradiente, iniciando com 10% de B, até 0,25 s e aumentando linearmente a 48% até 1 minuto, segue aumentando até 5 min chegando a 100% de B em 0,5 s retorna a 10%, mantendo-se até 1.0 minutos para reestabelecer as condições iniciais. O volume de injeção foi de 10 μL , com uma vazão de fase móvel de 0.3 mL min⁻¹. As razões massa/carga (m/z) 435 em modo negativo. O método foi validado seguindo as principais figuras de mérito indicados pelo INMETRO, 2020 para validação de métodos analíticos. A exatidão foi determinada em termos de recuperação em três níveis de concentração Nível 1 (0,01 mg kg⁻¹); Nível 2 (0,5 mg kg⁻¹) e Nível 3 (2,5 mg kg⁻¹) (esses níveis foram escolhidos pois englobam os menores resultados esperados nas amostras). Nesses testes foram utilizados a amostra de solo do experimento controle. O solo foi fortificado (*spiking*) com padrão analítico de Fipronil (Sigma Aldrich Pestanal, de 98% de pureza).

Para o nível foi adicionada 50 μL de um padrão de 10 mg L^{-1} , para nível 2 e 3 foi utilizado 50 e 250 μL de um padrão de 100 mg L^{-1} . O procedimento realizado foi o mesmo descrito para as amostras. Foram realizadas 3 réplicas de cada nível para determinar a precisão intermediária em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A validação de um método analítico é responsável por garantir o desempenho do método, avaliando parâmetros como a exatidão, precisão, seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação intra ou interlaboratórios.

O método utilizando QuEChERS acetate sem a etapa de limpeza foi validado de acordo com as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020) para validação *in house*. Os parâmetros foram: linearidade, precisão (em termos de recuperação), repetibilidade e precisão intermédia (em termos de desvio padrão relativo, RSD), limites de quantificação (LOQ). A curva de calibração foi construída com cinco níveis de calibração (5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Uma resposta linear com coeficientes de correlação de 0,994. A recuperação foi entre 115 - 120% com RSD inferior a 20% para quatro níveis (0,01, 0,05, 0,5, 2,5 mg kg^{-1}). O LOQ do método foi de 0,01 mg kg^{-1} . Os resultados mostraram-se satisfatórios e assim o método apresenta confiabilidade para determinação do fipronil em amostras contaminadas para ensaios toxicológicos.

A etapa de limpeza utilizando apenas diluição permitiu ainda maior rapidez e menor custo no preparo de amostra.

4 CONCLUSÃO

O método QuEChERS acetado sem a etapa de limpeza e a análise por cromatografia, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) mostraram alta eficácia quanto a extração do fipronil em solos. A existência de estudos sobre o composto é de grande necessidade, pois, o agrotóxico não só, contamina a saúde humana diretamente, como também, é um composto bioacumulável que consiste, na absorção de contaminantes pelos organismos a uma taxa mais elevada em relação à dessorção.

REFERÊNCIAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia de agrotóxicos: F43. 2005.** Fipronil. Disponível em:< <https://www.gov.br/anvisa/pt->

br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4351json-file-1/view>. Acesso em: 19, agos. 2021.

BOBE, A.; COOPER, J.; COSTE, C.M.; MULLER, M.A. Behaviour of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pestic. Sci.** 52, 275–281, 1998.

GRANZOTO, Mariana Rolim. Toxicidade do fipronil sobre "Enchytraeus crypticus" em solo tropical natural: teste multigeracional. 1 recurso online (69 p.) Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia**, Limeira, SP, 2017.

GEBREHIWOT, W. H.; ERKMEN, C.; USLU, B. A novel HPLC-DAD method with dilute-and-shoot sample preparation technique for the determination of buprofezin, dinobuton and chlorothalonil in food, environmental and biological samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 99, p. 1-15, 2019.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. jun.2020.Disponível

em:<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio>. Acesso em: 15 agos, 2021.

OLIVEIRA, P.R. Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores. Rio Claro, 2010. 173f. Tese (Doutorado) – **Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 2010.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. A.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

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.

SILVA, L. P.; MADUREIRA, F.; VARGAS, E. A.; FARIA, A. F.; AUGUSTI, R. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 270, p. 420-427, 2019.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. EPA/630/R-95/002F, Washington, DC, 1996.