

# Análise multirresíduo de pesticidas em salmão utilizando Agilent Captiva EMR-Lipid com GC/MS/MS

## Autores

Pimperl J. dos Santos,  
Sônia M. V. S. Cardoso,  
Osmar D. Prestes,  
Martha B. Adaime  
e Renato Zanella  
Universidade Federal de  
Santa Maria, Departamento  
de Química, Laboratório de  
Análises de Resíduos de  
Pesticidas (LARP), Santa  
Maria-RS, Brasil, 97105-900

Mariana Baptidão  
Agilent Technologies do Brasil,  
Barueri-SP, Brasil, 06455-000

## Resumo

Esta nota de aplicação descreve um método analítico multirresíduo para determinar pesticidas no salmão. O método de preparo de amostras é baseado na extração líquida seguida pela limpeza com Agilent Captiva EMR-Lipid e a análise com o GC Agilent 9000 Intuvo e o espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (GC/MS/MS) 7010B. A limpeza com Captiva EMR-Lipid fornece a remoção eficiente dos principais interferentes do salmão, como os lipídios. Um total de 38 pesticidas foram determinados em uma corrida de 20 minutos usando uma coluna HP-5ms Ultra Inert, apresentando boa linearidade ( $R^2 \geq 0,990$ ) em uma faixa de concentração de 0,5 a 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para todos os compostos no salmão. De forma geral, as faixas de recuperação variaram de 83% a 125% com RSD <25%.

## Introdução

Um aumento considerável na demanda por produtos de aquicultura criou uma necessidade crescente de monitoramento de resíduos de pesticidas para garantir um suprimento seguro de alimentos. A complexa composição das amostras de peixes (alto teor de proteína e gordura) torna o preparo de amostras um desafio para garantir a qualidade dos resultados analíticos. Um preparo de amostras adequado requer extração satisfatória e consistente para os analitos alvo e remoção eficiente da matriz.

É necessário analisar uma ampla gama de pesticidas para determinar se os níveis residuais desses pesticidas cumprem os limites máximos de resíduos (MRLs) regulamentados. O salmão é uma boa fonte de ômega 3, que contém aproximadamente 20% de proteínas e 10% de lipídios em sua composição centesimal. De acordo com a Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO) das Nações Unidas, o salmão é o nono peixe mais cultivado globalmente e o uso de alguns pesticidas é permitido em seu cultivo devido à possível presença de parasitas.<sup>1</sup> No entanto, a presença desses compostos, mesmo em pequenas quantidades no suprimento de alimentos, pode causar distúrbios no ambiente.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método analítico eficiente e simples baseado em GC/MS/MS para a detecção e quantificação de 38 resíduos de pesticidas em amostras de salmão. O método foi baseado na extração sólido-líquido seguida pela limpeza com Captiva EMR-Lipid e remoção de resíduos de água. O método GC/MS/MS foi baseado no monitoramento dinâmico de reações múltiplas (dMRM) com uma fonte de alta eficiência (HES) e uma coluna de 30 m HP-5ms Ultra Inert.

## Parte experimental

### Produtos químicos e reagentes

- Padrões de pesticida (alta pureza  $\geq 95\%$ ), Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e Sigma-Aldrich (USA)
- Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), e acetato de etila (EtOAc), grau HPLC, J.T. Baker (USA)
- Isooctano grau reagente, Mallinckrodt (Irlanda)
- Tubos de polipropileno (15 mL e 50 mL), Sarstedt (Alemanha)
- Microtubos Eppendorf (2 mL), Axygen Scientific (EUA)

### Soluções e padrões

Soluções estoque individuais de pesticidas (1.000 mg/L) foram preparadas em solvente adequado (ACN, MeOH ou tolueno) e armazenadas a uma temperatura  $\leq -5^\circ\text{C}$ . A solução da mistura (10 mg/L) foi preparada em ACN e armazenada a uma temperatura  $\leq -5^\circ\text{C}$ .

O solvente de extração 80:20 ACN/EtOAc e a solução de eluição 16:64:20 ACN/EtOAc/água foram preparados e armazenados à temperatura ambiente.

### Equipamento e material

- Centrífugas NT 825 (Novatecnica, São Paulo, Brasil) e SL 703 (Solab, São Paulo, Brasil)
- Misturador Vortex QL-901 (Microtechnology, São Paulo, Brasil)
- Balanças analíticas de precisão UX-420H e AUW 220D (Shimadzu, Quioto, Japão)
- Água ultrapura (18 M $\Omega$  cm), sistema Milli-Q (França)
- Cartuchos Captiva EMR-Lipid, 3 mL, 300 mg (p/n 5190-1003)
- Manifold Vac Elut de 12 posições (p/n 5982-9115)

- Homogeneizadores cerâmicos (p/n 5982-9313)
- Filtro de seringa, 13 mm, 0,22  $\mu\text{m}$ , nylon (p/n 5190-5269)
- Septo do injetor, otimizado para temperatura e sangramento (BTO), antiaderente, 11 mm, (p/n 5183-4757)
- Vial 2 mL, transparente, rosqueável, certificado (p/n 5182-0714)
- Tampas rosqueáveis, septo PTFE/silicone vermelho, certificado (p/n 5182-0717)
- Seringa para ALS, agulha fixa, 10  $\mu\text{L}$ , êmbolo com ponteira de PTFE (p/n 5183-4730)
- Liner Ultra Inert, splitless, cone único, lâ de vidro (p/n 5190-3167)
- Coluna capilar planar HP-5ms UI, 30 m  $\times$  0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$  (p/n 19091S-433UI-INT)
- Intuvo SSL Guard Chip (p/n G4587-60565)
- Kit de filtro para limpeza de gases – inclui suporte, unidade de conexão e filtro de gás de arraste para remoção de água, oxigênio e orgânicos (p/n CP17975)
- Pipetas com volumes variáveis da Eppendorf (EUA)

A análise foi realizada usando um GC Agilent 9000 Intuvo com o GC/MS triplo quadrupolo 7010B. O sistema de GC foi equipado com um controle pneumático eletrônico (EPC) e um amostrador automático 7693. O software de estação de trabalho Agilent MassHunter foi usado para aquisição e análise de dados.

## Condições do instrumento

As condições do instrumento GC/MS/MS foram estabelecidas com base nos compostos avaliados. A Tabela 1 lista as condições finais da operação do GC/MS/MS.

**Tabela 1.** Condições do GC/MS/MS Intuvo 9000C e 7010B.

Parâmetro	Valor
Gás de arraste	Hélio 1,2 mL/min
Volume de injeção	2 µL (modo splitless pulsado)
Pressão de pulso da injeção	50 psi
Programa do forno	60°C (1 minuto), 170°C por 40°C/min, 310°C por 10°C/min e manter por 3 minutos
Temperatura do injetor	280°C
Temperatura do Guard Chip	Inicialmente 85°C Modo de rastreamento do forno
Temperatura do barramento	280°C
Linha de transferência	290°C
Fonte de ionização	Impacto de elétrons (HES)
Temperatura da fonte	300°C
Temperatura MS1/MS2	150°C
Modo de aquisição	MRM dinâmico (dMRM)
Gás de colisão	Nitrogênio a 1,5 mL/min

**Tabela 2.** Lista de pesticidas, transições de massa para MRM e energia de colisão.

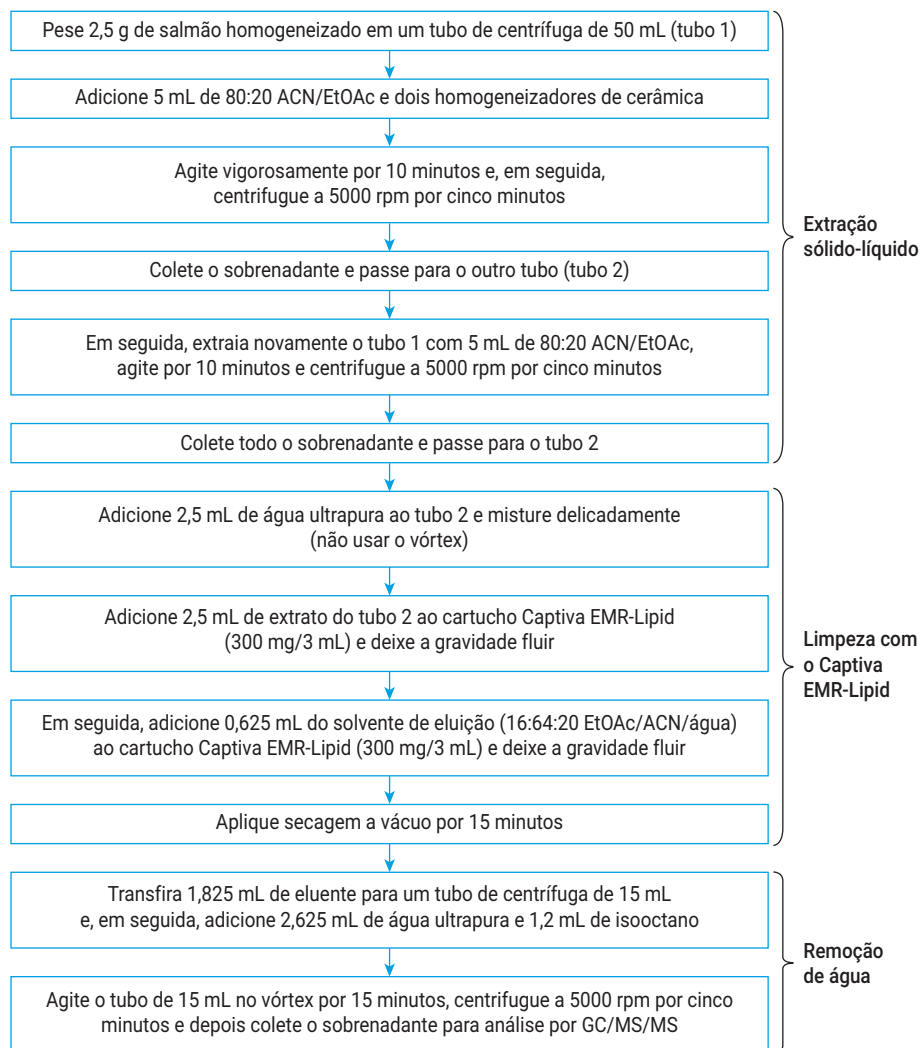
Compostos	Transições MRM				TR (min)
	Quantificador (m/z)	CE (V)	Íons (m/z)	CE (V)	
Acinatrina	228,9 → 92,8	10	207,8 → 181,1	10	14,762
Alaclor	188,1 → 160,1	10	188,1 → 132,1	20	9,224
Atrazina	214,9 → 200,2	5	214,9 → 58,1	10	8,069
Cadusafos	158,8 → 131,0	5	158,8 → 97,0	15	7,183
Clordano-cis	372,8 → 300,9	10	372,8 → 265,9	25	11,099
Clorfenapir	328,0 → 247,0	20	247,1 → 227,1	20	11914
Clorfenvinfós	294,9 → 266,9	5	266,9 → 159,0	20	10,438
Clorpirifós	313,8 → 257,8	15	198,9 → 171,0	15	9,881
Clorpirifós-metil	285,9 → 93,0	25	124,9 → 47,0	15	9,120
Cialotrina (lambda)	208,1 → 181,1	10	181,1 → 152,1	30	14,657
Epoconazole	192,0 → 138,1	10	192,0 → 111,0	25	12,919
Etoprofós	157,9 → 114,0	5	157,9 → 97,0	15	7,183
Etrinfos	292,1 → 181,1	5	181,1 → 153,1	10	8,560
Fenitrotiona	277,0 → 260,1	5	125,1 → 79,0	5	9,118
Fenpropimorfe	128,1 → 110,1	5	128,1 → 86,1	10	9,990
Fentiona	278,0 → 109,0	15	124,9 → 79,0	5	9,974
Fipronil	366,8 → 212,8	25	350,8 → 254,8	15	10,488
Fluazifop-p-butyl	382,9 → 282,0	10	281,9 → 238,0	15	12,049
Floquinconazol	340,0 → 298,0	15	340,0 → 107,8	40	15,798
HCH-alfa	218,9 → 183,0	5	216,9 → 181,0	5	7,766
HCH-beta	218,9 → 183,1	5	216,9 → 181,1	5	7,866
Hexaclorobenzeno	283,9 → 248,8	15	283,8 → 213,9	30	7,834
Indoxacarb	202,9 → 134,0	15	202,9 → 106,0	25	17,900
Malation	172,9 → 99,0	15	157,8 → 125,0	5	9,734
Metidationa	144,9 → 85,0	5	144,9 → 58,1	15	11,033
Metolaclo	240,0 → 162,2	10	238,0 → 162,2	10	9,866
Pendimetalina	251,8 → 162,2	10	251,8 → 161,1	15	10,449
Pirimicarbe	238,0 → 166,2	10	166,0 → 96,0	15	8,699
Pirimifós-metil	290,0 → 125,0	20	232,9 → 151,0	5	9,533
Pirazofós	232,0 → 204,1	10	221,0 → 193,1	10	15,031
Pirimetanil	198,0 → 183,1	15	198,0 → 158,1	20	8,451
Quinalfós	157,0 → 129,1	15	146,0 → 118,0	10	10,757
Spiromesifen	273,0 → 255,1	5	272,0 → 254,2	5	13,611
Terbufós	230,9 → 175,0	10	230,9 → 129,0	20	8,256
Tetraconazol	336,0 → 217,9	20	336,0 → 203,8	30	10,049
Trifloxistrobina	172,0 → 145,1	15	116,0 → 89,0	15	12,830
Trifluralina	306,1 → 264,0	5	264,0 → 206,0	5	7,269
Vinclozolina	212,0 → 172,1	15	197,9 → 145,0	15	9,158

## Preparo de amostras

O método de preparo de amostras foi estabelecido com base em um método relatado anteriormente, utilizado para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) no salmão.<sup>2</sup> As amostras de salmão foram compradas em um supermercado local em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram cortadas, homogeneizadas e armazenadas em um freezer a uma temperatura  $\leq -10^{\circ}\text{C}$ . O método foi realizado em três seções principais:

1. Extração sólido-líquido
2. Limpeza com o Captiva EMR-Lipid
3. Remoção de água

Foram pesados 2,5 g das amostras homogeneizadas em tubos de centrifuga de 50 mL (polipropileno), fortificadas conforme necessário, agitadas em vórtex por um minuto e equilibradas de 15 a 20 minutos. O procedimento de amostra completo é descrito na Figura 1.



**Figura 1.** Procedimento para o preparo de amostras de uma amostra de salmão com base na extração sólido-líquido seguida da limpeza com Captiva EMR-Lipid.

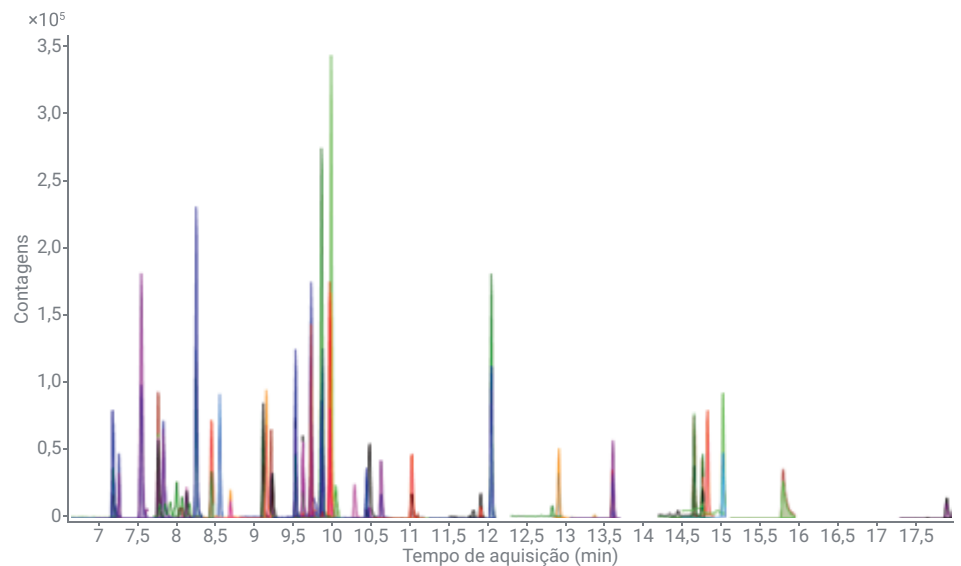
## Validação do método

Parâmetros como limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão e exatidão foram avaliados. Os padrões da curva de calibração incluíram cinco pontos diferentes (2, 4, 25, 50 e 100 µg/kg). Três níveis de fortificação (25, 50 e 100 µg/kg) foram avaliados em termos de recuperação e %RSD (n = 3). A identificação e a quantificação dos analitos foram determinadas a partir dos tempos de retenção e das transições MRM.

## Resultados e discussão

### Método de GC

O MRM dinâmico é uma ferramenta útil para métodos multirresiduais. Ao construir tabelas automáticas de MRM com base nos tempos de retenção (RTs) em uma janela de tempo de retenção detectável (delta RT) para analitos, os compostos são identificados e quantificados com melhor precisão. Além disso, liners e colunas ultra-inertes (UI) foram usados para impedir que pesticidas lábeis, como organofosforados e organoclorados, causassem maus resultados devido à interação com sítios ativos da superfície durante a trajetória de fluxo do GC. A suscetibilidade de compostos altamente sensíveis aos sítios ativos na trajetória de fluxo do instrumento pode resultar em formato do pico e reprodutibilidade ruins e perda significativa de sensibilidade.<sup>3,4</sup> A Figura 2 mostra o cromatograma MRM para todos os 38 compostos do branco de amostra de salmão no nível 25 µg/kg.



**Figura 2.** Um cromatograma MRM em GC/MS/MS mostrando separação dos 38 pesticidas em 20 minutos.

Os resultados da validação estão listados para todos os 38 pesticidas na Tabela 3. O coeficiente de linearidade  $R^2$  da curva de calibração foi superior a 0,9900 para todos os compostos. O limite de quantificação (LOQ) do método foi de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , com duas exceções, cialotrina lambda e fenpropimorfo a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . As recuperações dos analitos variaram de 80 a 125% no nível 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de 93 a 119% no nível 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e de 83 a 107% no nível 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A precisão em termos de desvio padrão relativo (RSD) foi inferior a 25% nos três níveis de fortificação.

**Tabela 3.** Linearidade da curva de calibração do método, recuperações com RSD (n = 3) e limite de quantificação (LOQ) para todos os pesticidas.

Composto	$R^2$	%Rec (%RSD com n = 3)			LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
Acrinatrina	0,9922	92 (7)	101 (9)	101 (2)	25
Alaclor	0,9966	100 (5)	111 (8)	101 (9)	25
Atrazina	0,9959	113 (2)	106 (1)	92 (9)	25
Cadusafos	0,9938	107 (9)	119 (8)	105 (13)	25
Clordano-cis	0,9900	95 (5)	104 (3)	83 (10)	25
Clorfenapir	0,9941	88 (1)	101 (7)	97 (1)	25
Clorfenvinfós	0,9918	109 (14)	114 (2)	95 (14)	25
Clorpirifós	0,9951	83 (9)	105 (14)	96 (3)	25
Clorpirifós-metil	0,9973	93 (2)	107 (9)	96 (14)	25
Cialotrina (lambda)	0,9986	125 (25)	104 (6)	94 (8)	50
Epoxiconazol	0,9919	105 (1)	103 (5)	95 (9)	25
Etoprofós	0,9934	108 (9)	119 (9)	106 (13)	25
Etrinfos	0,9967	99 (3)	110 (9)	100 (8)	25
Fenitrotiona	0,9985	88 (4)	102 (12)	93 (13)	25
Fenpropimorfe	0,9926	80 (25)	100 (8)	103 (15)	50
Fentiona	0,9955	95 (3)	106 (4)	95 (5)	25
Fipronil	0,9907	99 (7)	110 (5)	93 (15)	25
Fluazifope-p-butil	0,9939	92 (5)	103 (7)	98 (1)	25
Floquinconazol	0,9917	108 (12)	113 (3)	97 (14)	25
HCH-alfa	0,9901	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
HCH-beta	0,9930	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
Hexaclorobenzeno	0,9917	84 (13)	93 (5)	98 (7)	25
Indoxacarb	0,9999	93 (5)	114 (4)	99 (12)	25
Malation	0,9981	97 (7)	106 (7)	88 (3)	25
Metidationa	0,9968	97 (13)	107 (5)	92 (21)	25
Metolacloro	0,9909	98 (5)	109 (4)	96 (7)	25
Pendimetalina	0,9946	94 (0)	109 (8)	100 (3)	25
Pirimicarbe	0,9937	114 (6)	112 (9)	103 (20)	25
Pirimifós-metil	0,9985	92 (2)	105 (4)	96 (5)	25
Pirazofós	0,9954	91 (6)	114 (8)	97 (13)	25
Pirimetanil	0,9924	96 (3)	104 (9)	94 (9)	25
Quinalfós	0,9909	92 (1)	106 (7)	95 (6)	25
Spiromesifen	0,9970	92 (2)	108 (6)	97 (8)	25
Terbufós	0,9960	93 (3)	108 (10)	99 (2)	25
Tetraconazol	0,9915	110 (12)	113 (2)	95 (14)	25
Trifloxistrobina	0,9978	108 (9)	109 (8)	100 (11)	25
Trifluralina	0,9920	96 (1)	113 (9)	107 (6)	25
Vinclozolina	0,9988	91 (3)	107 (7)	98 (5)	25

## Método de preparo de amostras

A remoção eficiente da matriz é importante para que as análises multirresíduo de pesticidas tenham êxito em matrizes alimentares complexas, pois as interferências da matriz geralmente são responsáveis pela deterioração dos dados, menor vida útil dos consumíveis e manutenção mais frequente do sistema. A limpeza com Captiva EMR-Lipid é uma solução que pode remover seletivamente interferências de maneira fácil e rápida. Durante o desenvolvimento de métodos, descobriu-se que o método anterior usado para a extração de PAHs do salmão também era adequado para a análise de pesticidas no salmão.

Existem duas partes importantes do método que contribuem para uma boa recuperação do analito:

1. A extração líquida em duplicata melhora a eficiência da extração de analitos desta matriz com alto teor de gordura.
2. A eluição adicional após a passagem da amostra pelo cartucho garante uma eluição mais completa do analito.

A solução de eluição pode variar, mas deve conter 10 a 20% de água para impedir que os lipídios presos no cartucho voltem à matriz. A mistura de 16:64:20 EtOAc/ACN/água foi aplicada para eluição adicional neste método.<sup>2</sup> Uma porção de água foi adicionada ao extrato bruto antes do carregamento da amostra no cartucho Captiva EMR-Lipid. Isso é importante para a retenção lipídica desejada no sorvente do Captiva EMR-Lipid. Geralmente, recomenda-se

20% de água na mistura da amostra. A remoção completa de água na detecção por GC/MS/MS é fundamental para garantir uma boa cromatografia e respostas consistentes dos analitos por GC/MS/MS. Neste estudo, uma extração reversa com solvente isooctano foi usada não apenas para remoção de água, mas também para reconcentração parcial da amostra. No entanto, para a detecção por LC/MS/MS, a remoção de água não é necessária. Após a limpeza com Captiva EMR-Lipid, as amostras podem ser analisadas diretamente ou com diluição por LC/MS/MS. Uma etapa de secagem e de reconstituição para concentrar a amostra antes da análise por LC/MS/MS é necessária somente quando o nível de sensibilidade não pode atender aos requisitos.

A Figura 3 apresenta as recuperações de 38 pesticidas em salmão nos três níveis de fortificação, 25, 50 e 100 µg/kg.

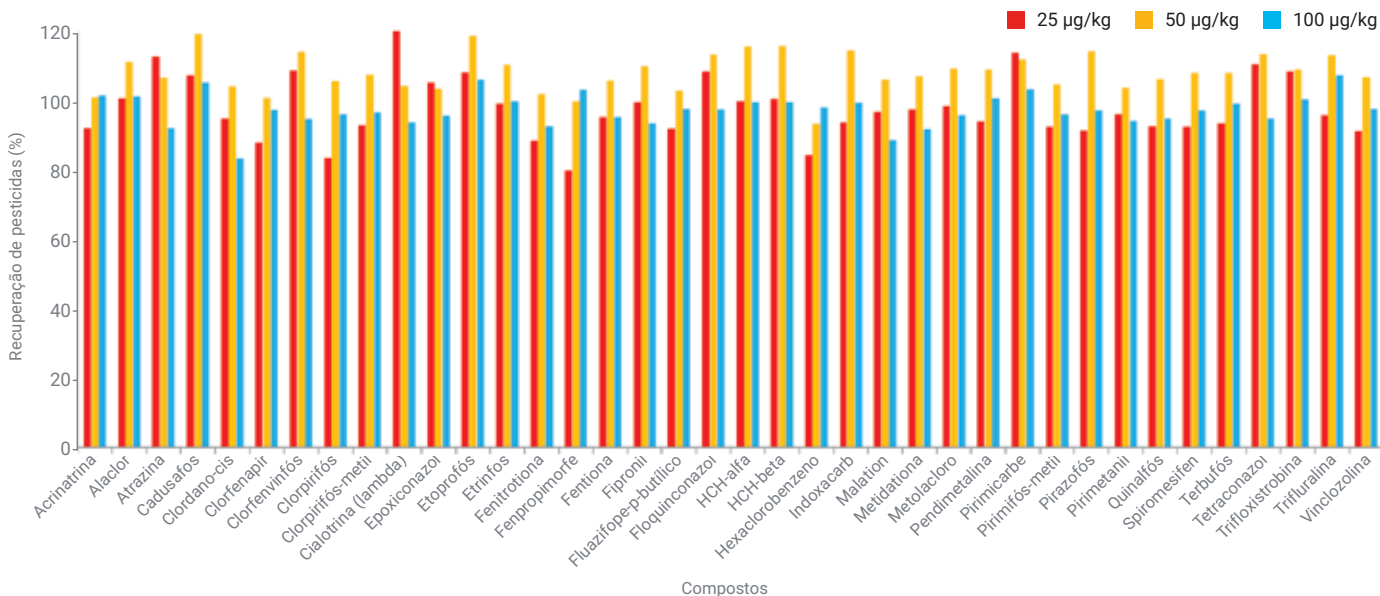
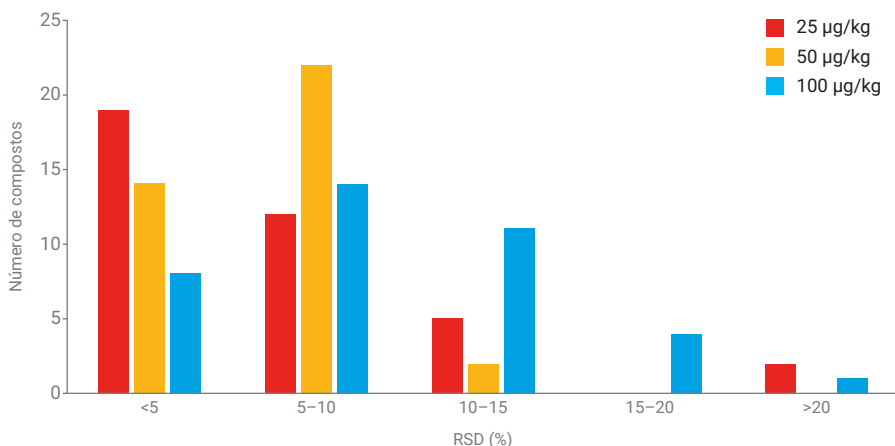


Figura 3. Recuperações de todos os pesticidas avaliados nos níveis de fortificação de 25, 50 e 100 µg/kg.



**Figura 4.** Reprodutibilidade do método em %RSD para análise de pesticidas no salmão em cada nível de fortificação, n = 3.

## Conclusão

Um método usando a limpeza com Agilent Captiva EMR-Lipid e GC/MS/MS Agilent Intuvo foi desenvolvido e validado para a análise de 38 pesticidas no salmão. O método de preparo de amostras demonstrou sucesso e aplicabilidade na análise de pesticidas adequados para GC. É um método único para extração de compostos multiclasse em matrizes de alimentos gordurosos com uma limpeza eficiente da matriz, resultando em um método de rotina simples para laboratórios de teste de alimentos. É importante observar que a limpeza com Agilent Captiva EMR-Lipid é compatível com a técnica de LC/MS/MS.

## Referências

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The state of world fisheries and aquaculture, **2018**. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
2. Determination of 19 Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Salmon and Beef, *Nota de aplicação Agilent*, número de publicação 5994-0553EN, **2019**.
3. Challenging Pesticide Analysis Using an Agilent J&W DB-35ms Ultra Inert GC Column, *Nota de aplicação Agilent*, número de publicação 5990-6595EN, **2010**.
4. Better Pesticide Analysis with Agilent J&W Ultimate Plus Tubing in an Inert Flow, *Nota de aplicação Agilent*, número de publicação 5991-5404EN, **2014**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.