

Resíduos agrotóxicos em fitoterápicos – CRQ – IV Região

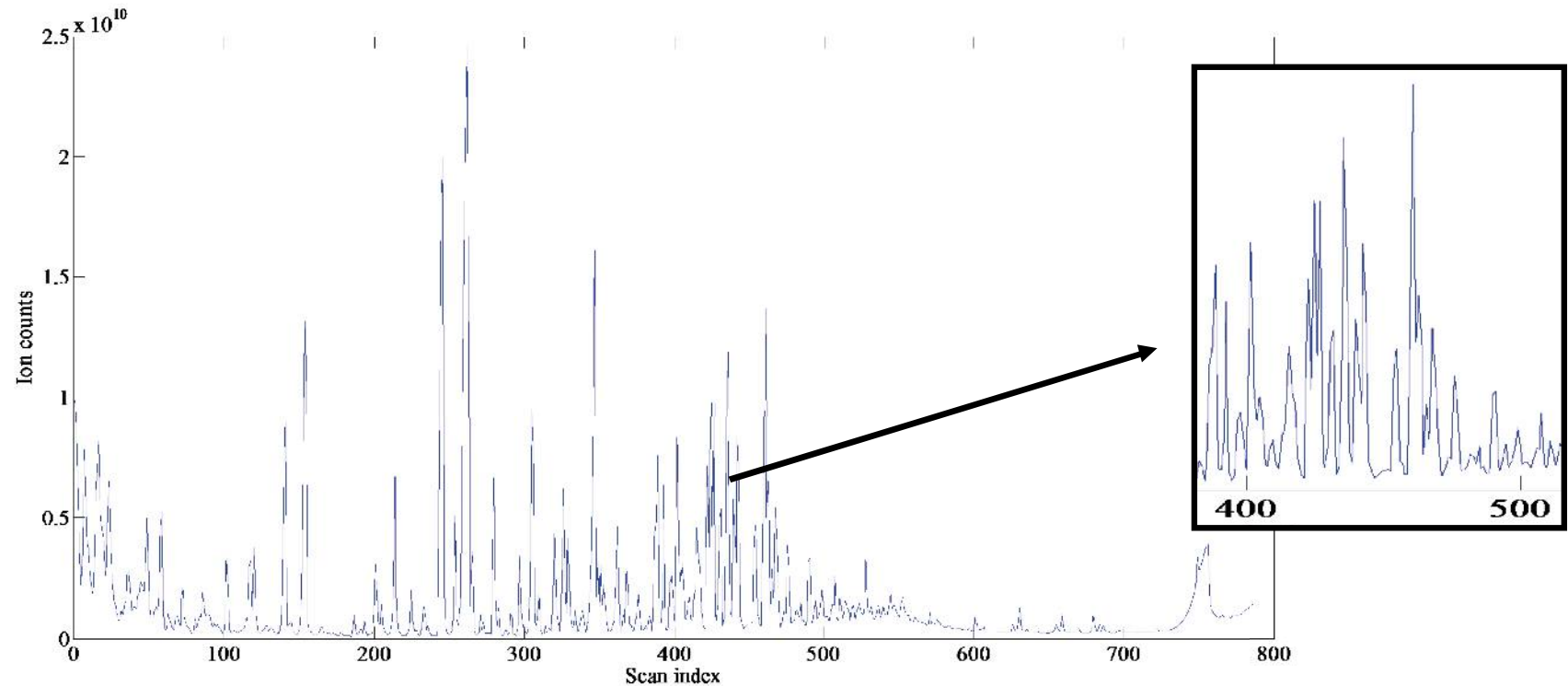
Análise de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos e extratos vegetais: as principais técnicas analíticas aplicadas e estratégias para a validação dos métodos

Prof. Leandro Wang Hantao

wang@unicamp.br

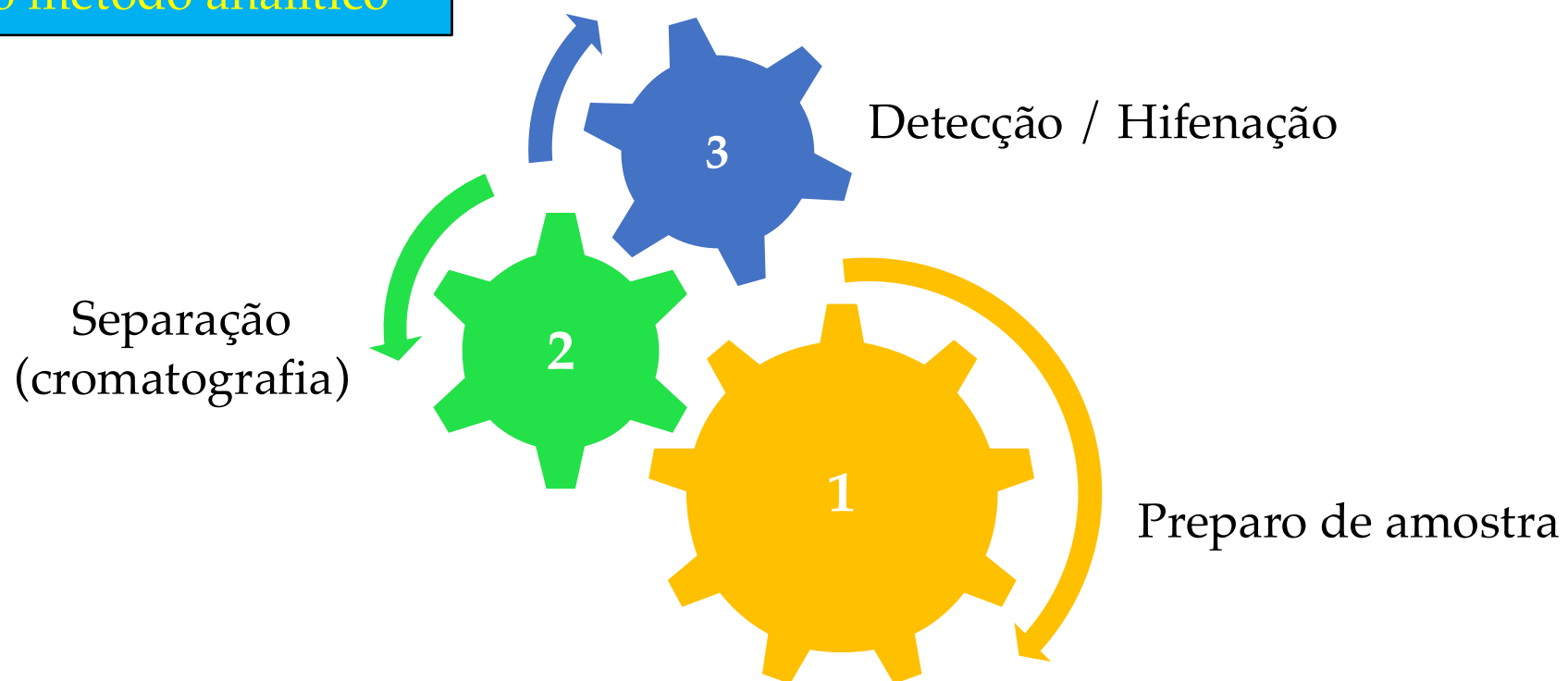
Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas



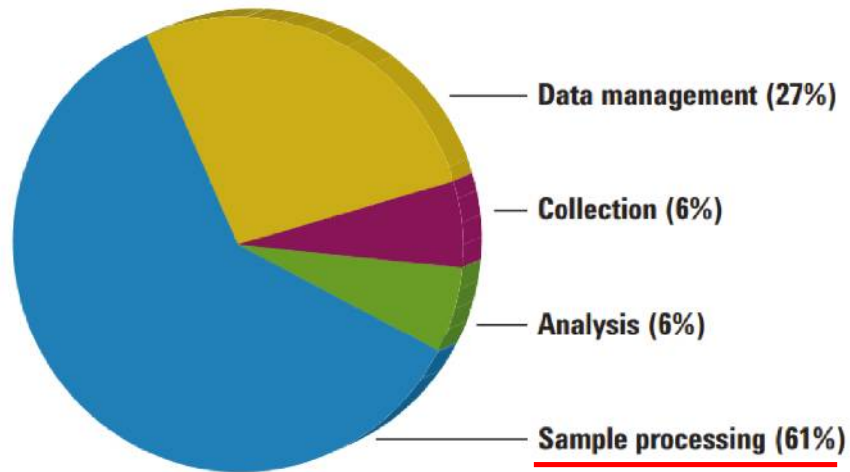


- Fitoterápicos e extratos de plantas medicinais são misturas complexas:
 - Muitos constituintes são incompatíveis com GC.
 - Fração analisável: extensa sobreposição de picos.

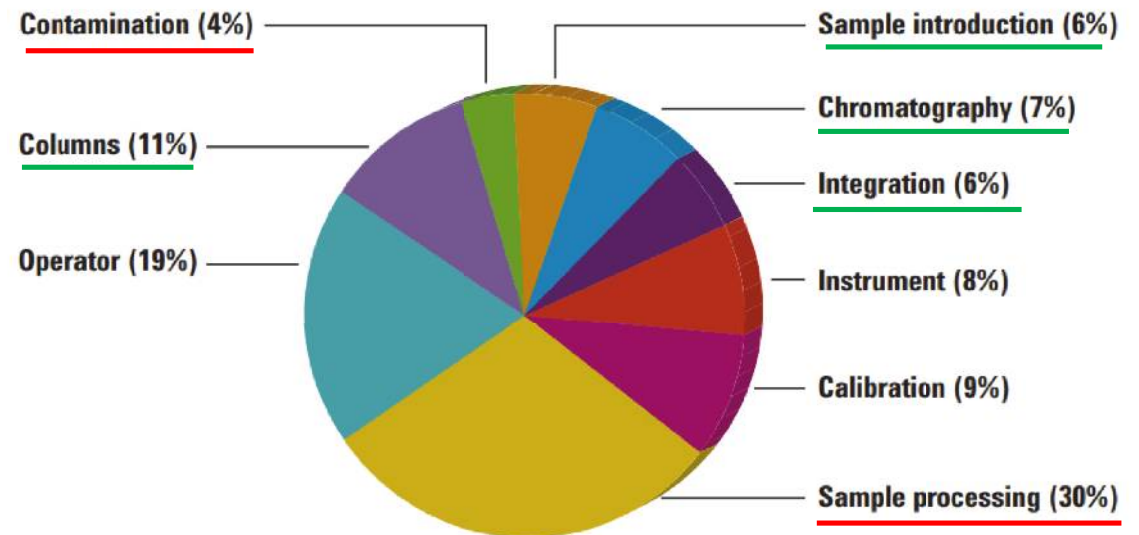
A validação do método é
altamente dependente da
qualidade do método analítico



Time Spent on Typical Chromatographic Analysis



Sources of Error Generated During Chromatographic Analysis



Majors Sample Preparation, Agilent.

- **Preparação da amostra**

Preparo de amostra

6

Desafio: fitoterápicos e derivados de plantas são misturas complexas com uma ampla faixa de propriedades físico-químicas



Amostras sólidas: extração dos analitos (*i.e.*, pesticidas)

Amostras líquidas: pode requerer etapa de cleanup e pré-concentração



Alguma forma de pré-processamento / fracionamento faz-se necessária!



Microextração em fase sólida

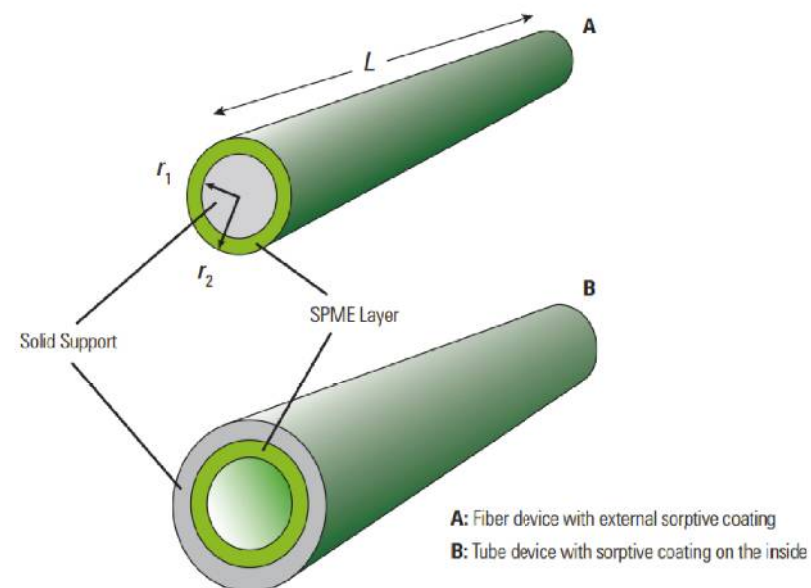
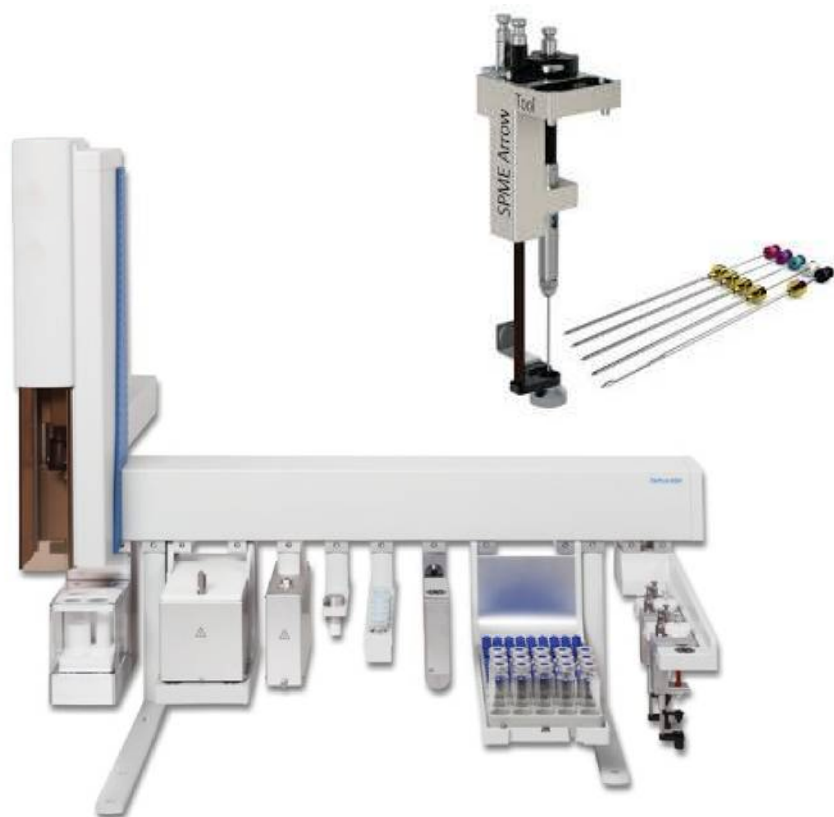
- Extração através do headspace
- Imersão direta na amostra

- ✓ Técnica não-exaustiva ou de equilíbrio.
 - ✓ Mede a concentração média livre do analito.
- ✓ A fase extratora é um sólido ou polímero imobilizado e pode ser reutilizada inúmeras vezes (+100x).
- ✓ A etapa de extração e pré-concentração (50-1000x) são combinadas em uma única e simples etapa.
- ✓ Não requer uso de solventes orgânicos e outros aditivos.

Preparo de amostra – microextração em fase sólida (SPME)

8

Requisito: amostrador automático
+ módulo de SPME

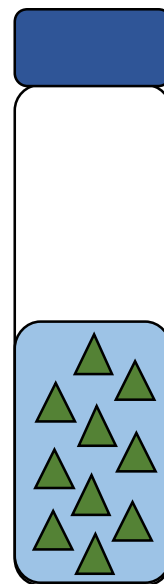
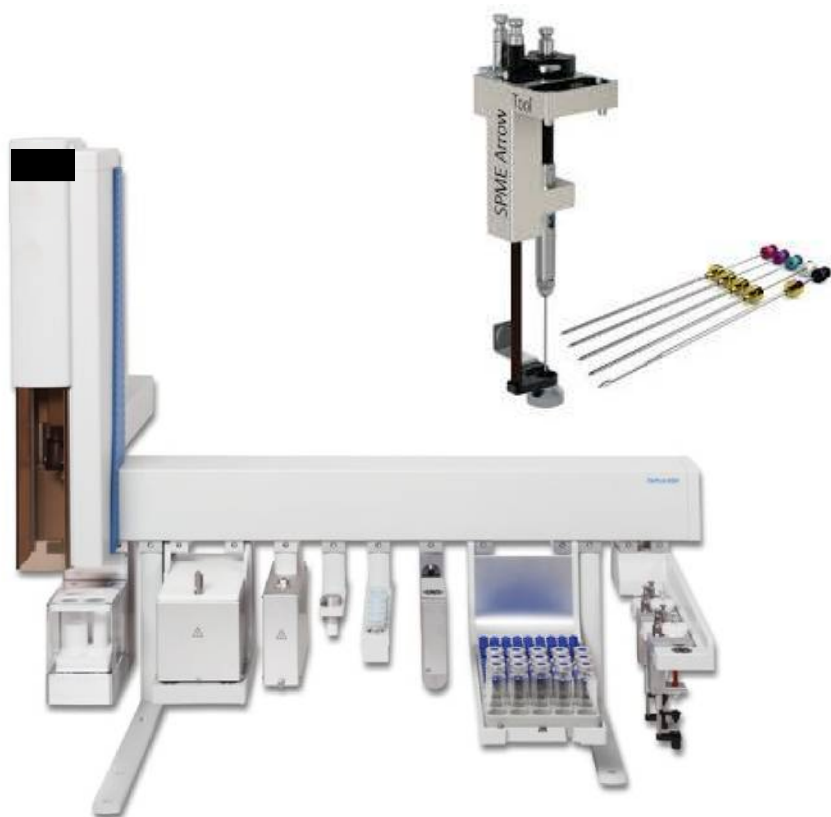


Volume da fase extratora é da ordem de microlitros

Preparo de amostra – microextração em fase sólida (SPME)

9

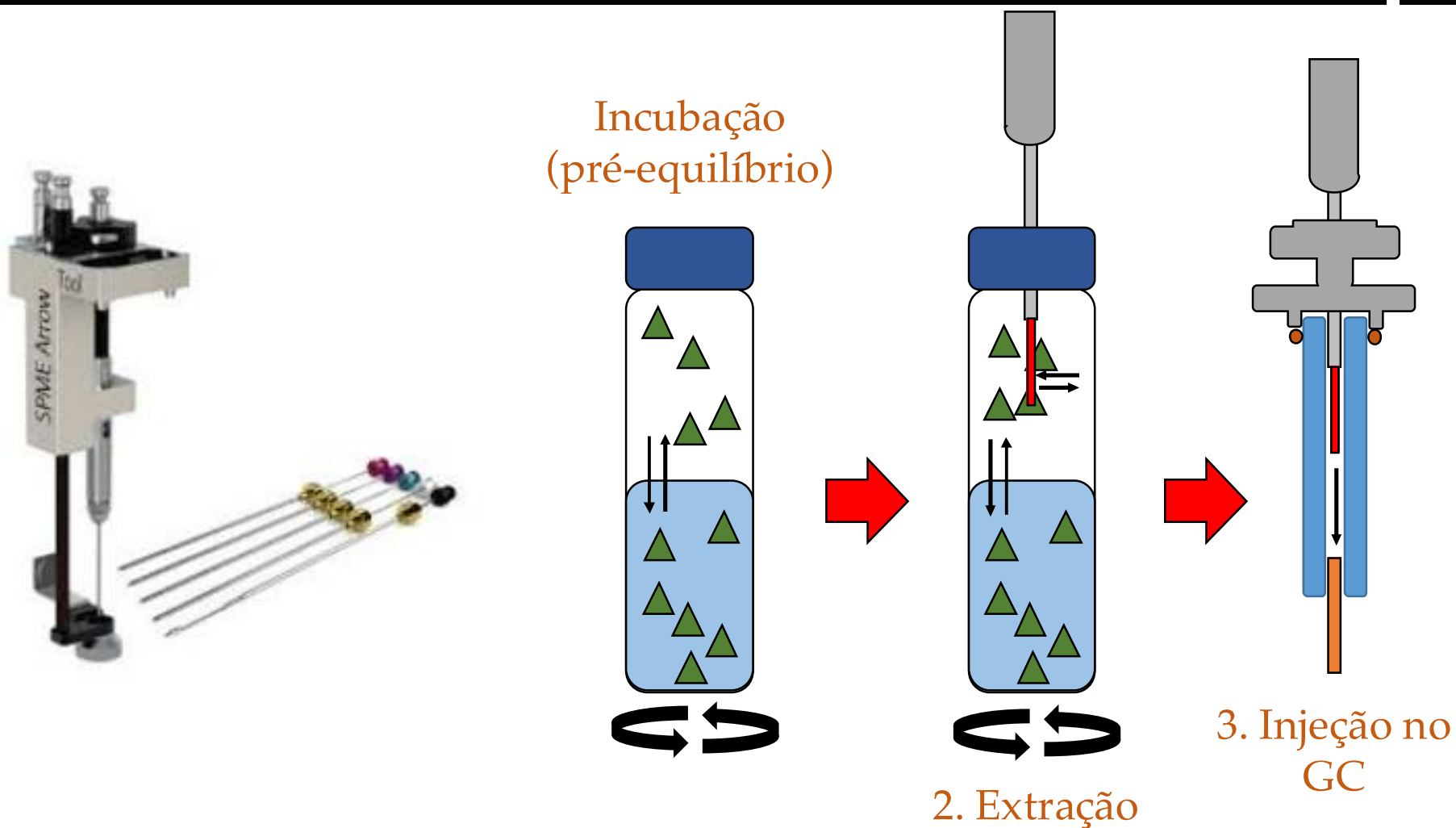
Requisito: amostrador automático
+ módulo de SPME

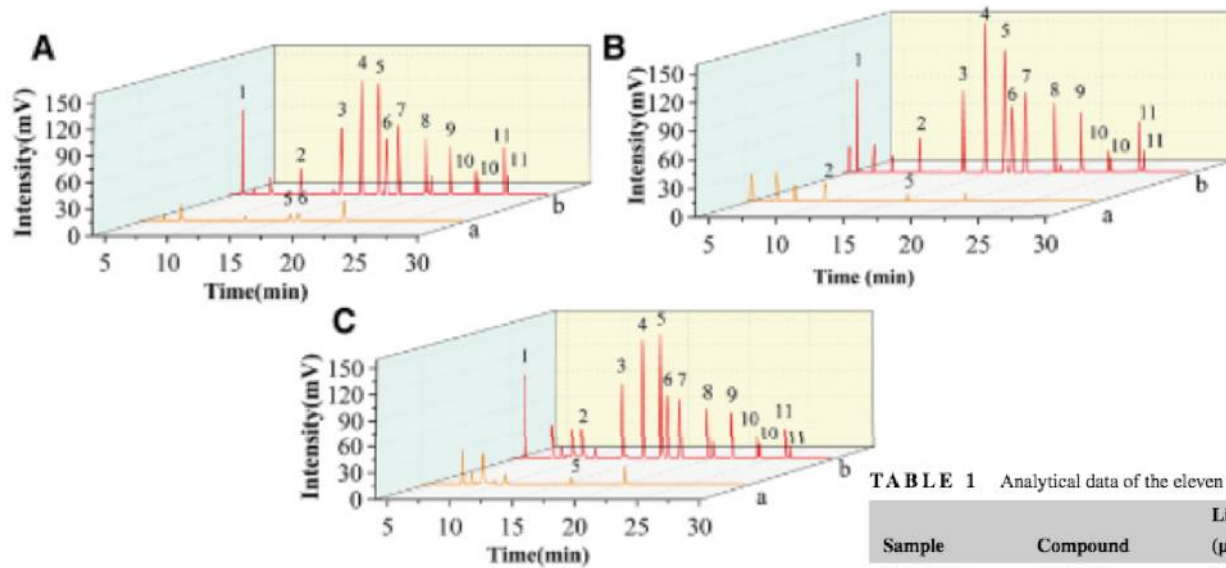


1° Passo:

- Pesar a amostra.
- Adicionar solução de $\text{NaCl}_{(\text{sat})}$.
- Lacrar o sistema.
- Carregar a(s) amostra(s) no cromatógrafo a gás.

Amostra sólida: triturar e homogeneizar.
Amostra líquido: “diluição”.





Estudo de caso: determinação de pesticidas organohalogenados em vegetais

Preparo de amostra: SPME
Plataforma analítica: GC-ECD

TABLE 1 Analytical data of the eleven pesticides for cucumber samples obtained by current method

Sample	Compound	Linear range ($\mu\text{g/kg}$)	LODs ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs ($\mu\text{g/kg}$)	r	Repeatability	
						RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
Cucumber	Trifluralin	0.5–225	0.10	0.33	0.9992	10.8	9.6
	Dicofol	0.5–225	0.04	0.13	0.9991	9.8	8.5
	α -endosulfan	0.5–200	0.10	0.33	0.9973	7.5	6.1
	p,p' -DDE	0.5–225	0.04	0.13	0.9991	7.2	5.9
	Nitrofen	0.5–225	0.05	0.17	0.9982	11.2	9.1
	β -endosulfan	0.5–225	0.05	0.17	0.9990	10.5	9.4
	p,p' -DDD	0.5–200	0.25	0.83	0.9971	8.9	7.2
	p,p' -DDT	0.5–225	0.10	0.33	0.9968	7.8	8.3
	Bifenthrin	0.5–200	0.25	0.83	0.9968	6.8	9.2
	Permethrin	1.5–200	0.05	0.17	0.9964	8.5	6.8
	Fenvalerate	0.5–200	0.05	0.17	0.9980	9.8	8.7

^aThe single-fiber RSD ($n = 5$).

^bThe fiber to fiber RSD ($n = 5$).

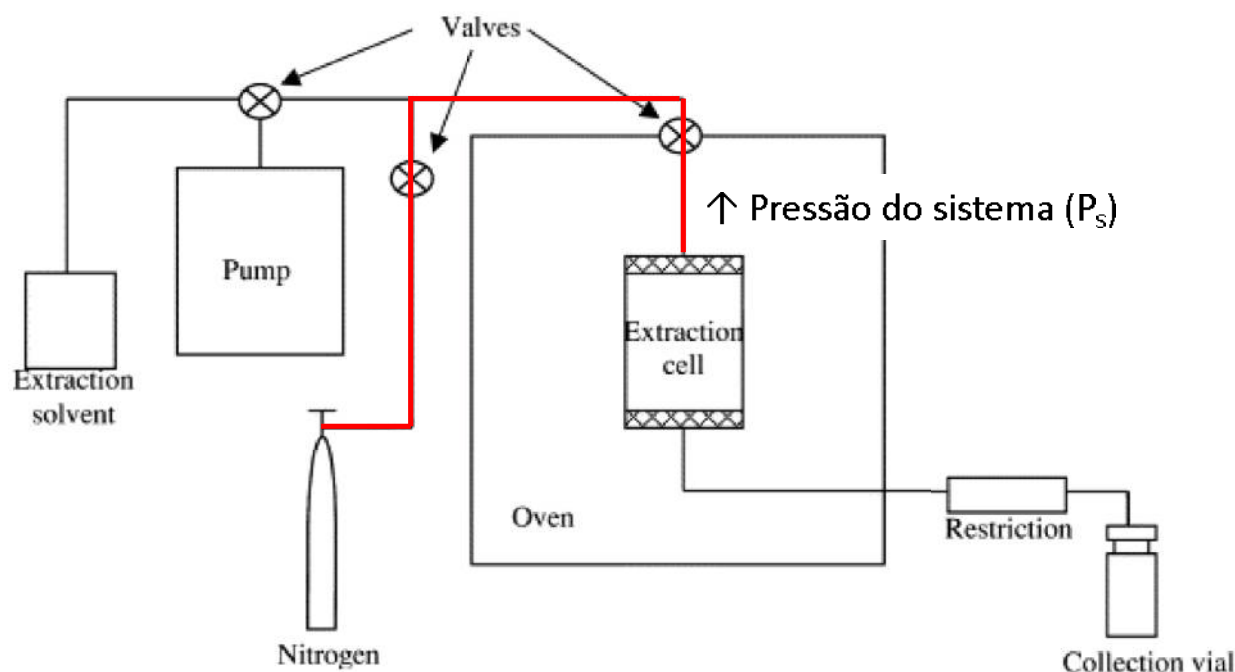


Extração com fluido pressurizado

- ASE - accelerated solvent extraction

- ✓ Aplicação de elevada pressão no sistema (e.g., N_2), $\uparrow$ temperatura de extração (acima da temperatura de ebulição do solvente).
- ✓ Aumento de solubilidade do analito no solvente.
- ✓ Transferência de massas mais rápida (menor viscosidade).
- ✓ Melhor molhabilidade pela redução da tensão superficial do solvente.

Esquema genérico:



Estudo de caso: determinação de pesticidas em *Ulva* sp.

ASE:
20 min, 50 mL de solvente

Soxhlet:
48 h (2880 min), 200 mL de solvente

Pressão de vapor do solvente < Pressão do sistema

Table 3 Recoveries of PPs from *Ulva* sp. samples by SPLE and Soxhlet extraction before GC-ECD

<i>Ulva</i> sp.	SPLE						Soxhlet	
	Low level (5 ng g ⁻¹)		Medium level (25 ng g ⁻¹)		High level (100 ng g ⁻¹)		(100 ng g ⁻¹)	
PP	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Trifluralin	82 ± 5	6	82 ± 6	7	94 ± 6	7	—	—
α-HCH	76 ± 5	7	80 ± 4	5	96 ± 7	7	70 ± 4	4
HCB	79 ± 7	9	71 ± 9	8	79 ± 2	2	—	—
β-HCH	98 ± 8	9	102 ± 3	3	95 ± 5	4	85 ± 5	5
γ-HCH	88 ± 8	9	91 ± 5	5	100 ± 2	2	76 ± 2	1
Quintozene	78 ± 5	6	73 ± 3	4	86 ± 5	6	65 ± 4	5
δ-HCH	89 ± 8	9	93 ± 7	8	98 ± 8	8	86 ± 8	8
Heptachlor	84 ± 7	8	82 ± 4	5	96 ± 2	2	72 ± 6	10
Aldrin	74 ± 3	5	80 ± 6	8	86 ± 5	6	—	—
Chlorpyrifos	95 ± 8	8	100 ± 4	4	95 ± 5	5	—	—
Isodrin	78 ± 6	8	85 ± 4	5	88 ± 2	3	—	—
Heptachlor epoxide	91 ± 5	5	87 ± 5	6	97 ± 6	7	—	—
γ-Chlordane	90 ± 8	9	89 ± 7	8	97 ± 7	7	—	—
α-Endosulfan	79 ± 6	8	78 ± 5	7	99 ± 4	4	—	—
Dieldrin	94 ± 6	6	99 ± 5	5	100 ± 5	5	—	—
<i>p,p'</i> -DDE	86 ± 2	2	91 ± 5	5	96 ± 5	5	98 ± 9	10
Endrin	95 ± 5	5	103 ± 5	5	99 ± 5	5	—	—
<i>p,p'</i> -DDD	89 ± 5	5	101 ± 4	5	92 ± 8	7	95 ± 5	5
<i>p,p'</i> -DDT	96 ± 3	3	85 ± 5	5	95 ± 5	5	78 ± 11	12
Bromopropylate	93 ± 8	8	105 ± 2	2	96 ± 2	2	—	—
<i>p,p'</i> -Methoxychlor	97 ± 7	8	100 ± 3	3	90 ± 5	5	—	—
Mirex	85 ± 4	4	99 ± 8	8	100 ± 4	4	91 ± 8	10

SPLE was performed at low, medium, and high levels of spiking. Values are reported as mean ± SD (*n* = 5)

- Redução no tempo de extração.
- Redução no consumo de solvente orgânico.
- Aprimoramento nos valores de recuperação.



Extração assistida por microondas

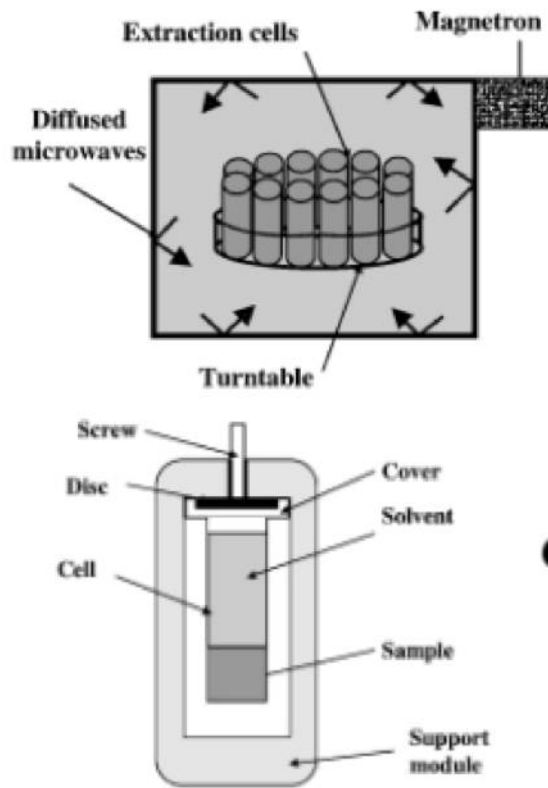
- MAE – microwave assisted extraction

- ✓ Aquecimento da matriz e/ou solvente ocasionado pela migração de íons e rotação de dipolos estimulada pela radiação micro-ondas (300– 300.000 MHz).
- ✓ Em sistemas fechados, o efeito prático é similar ao ASE (e.g., aumento de solubilidade do analito no solvente, transferência de massas mais rápida, melhor molhabilidade pela redução da tensão superficial do solvente).

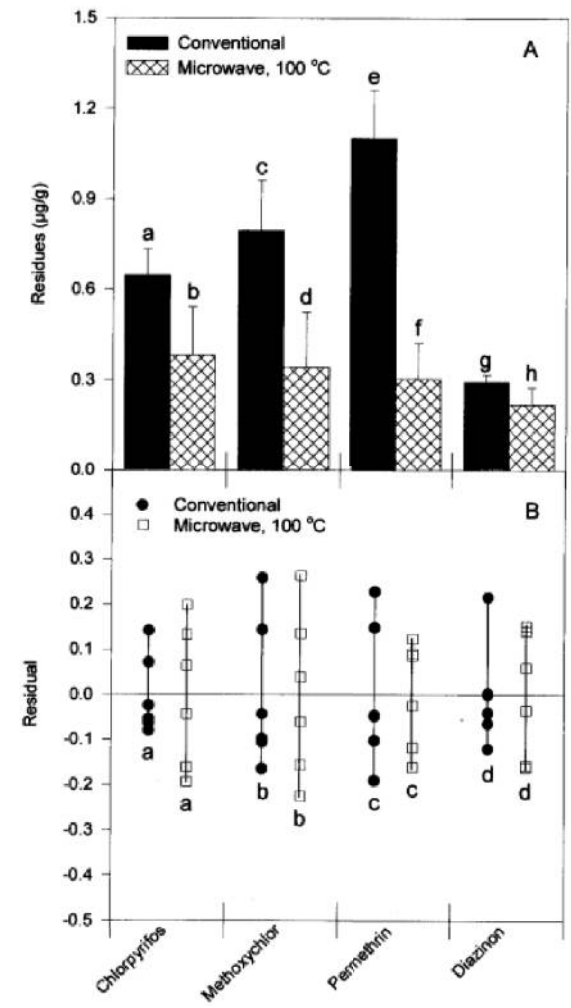
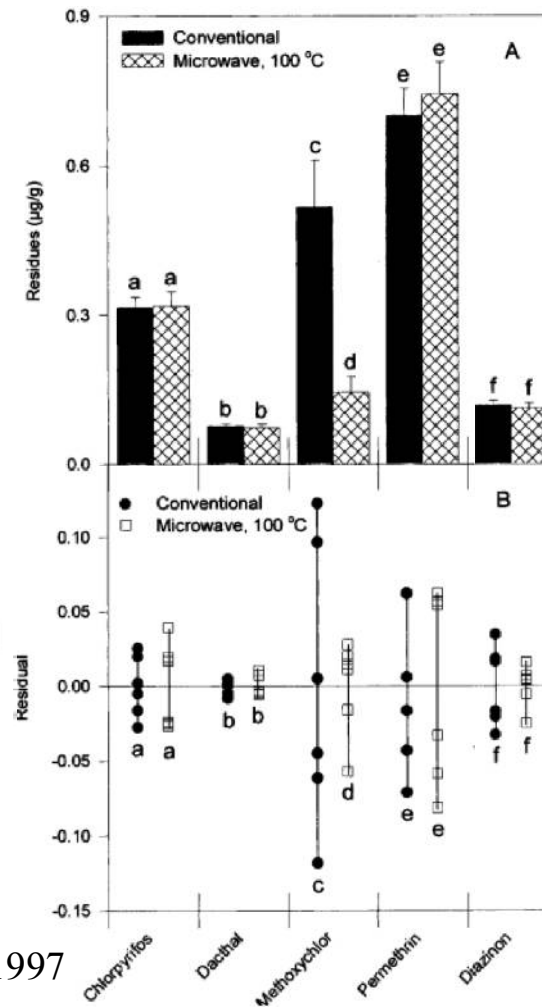
Extração de pesticidas usando MAE

16

Estudo de caso #3:



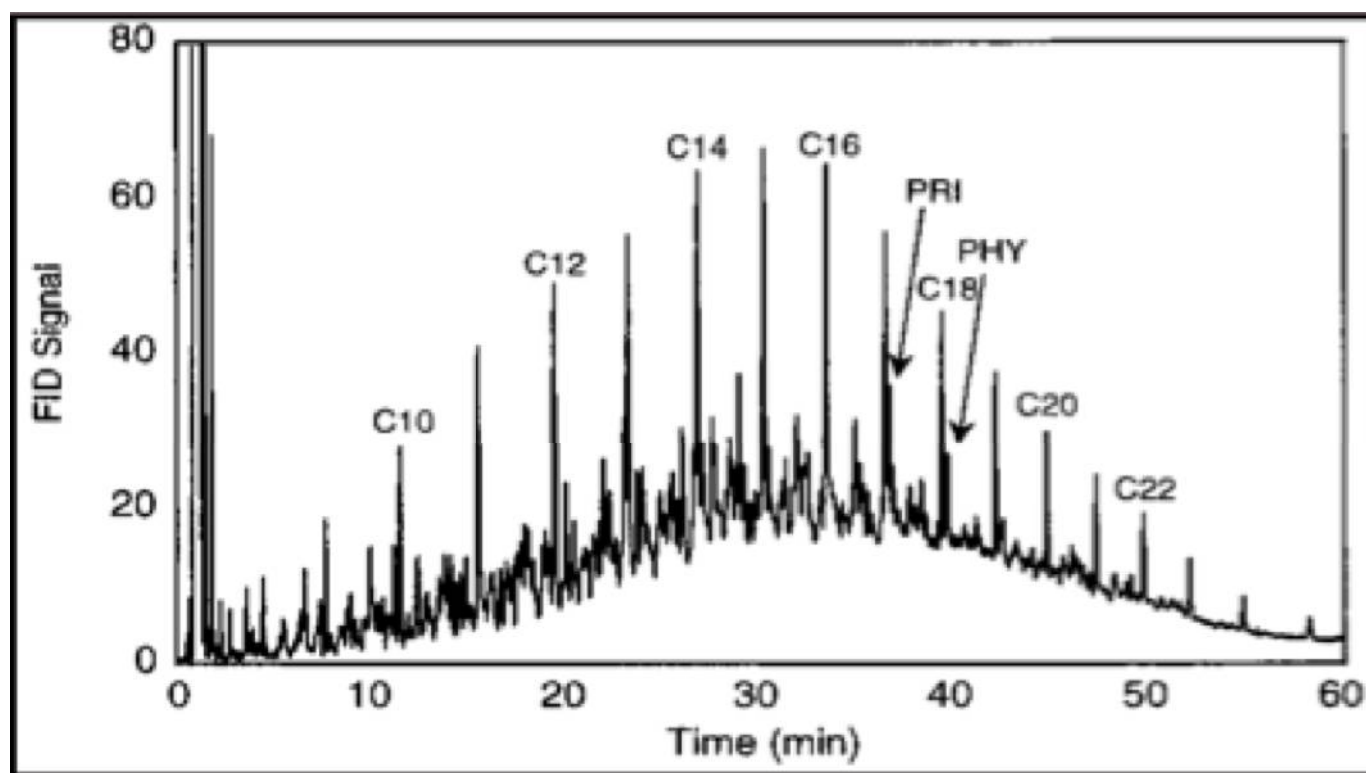
Closed vessel



Camel Analyst 2001 126 1182. / Pylypiw Anal. Chem. 1997 45 3522.

- **Sistemas de cromatográficos modernos**

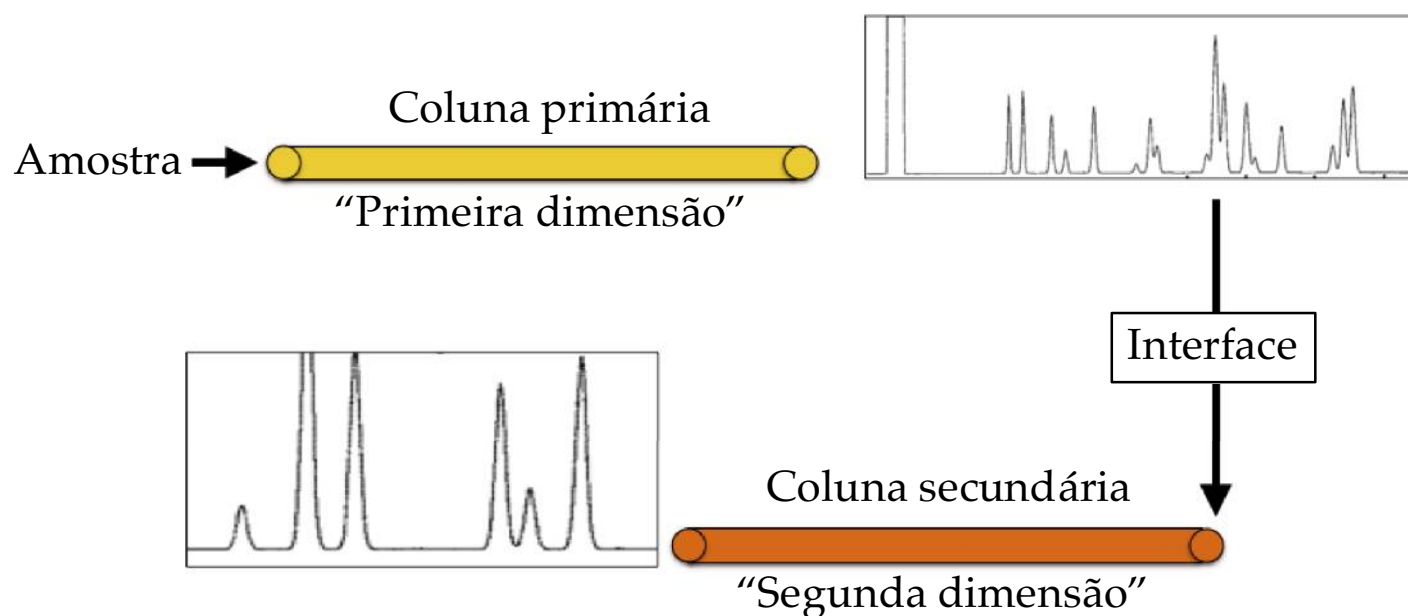
UCM: A mistura complexa não-resolvida



Gaines et al. Environ. Sci. Technol. 32 (1999) 2106.

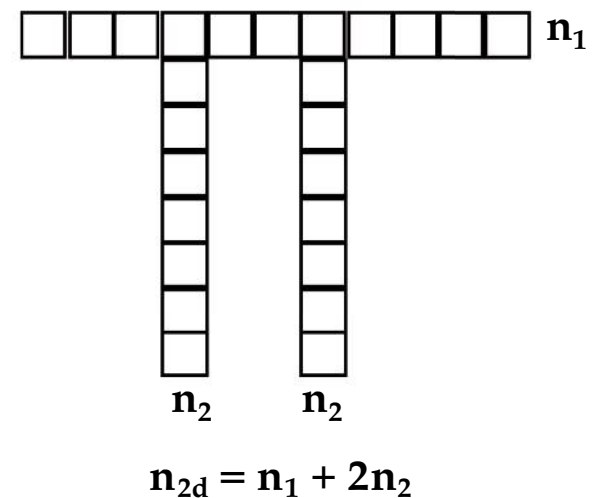
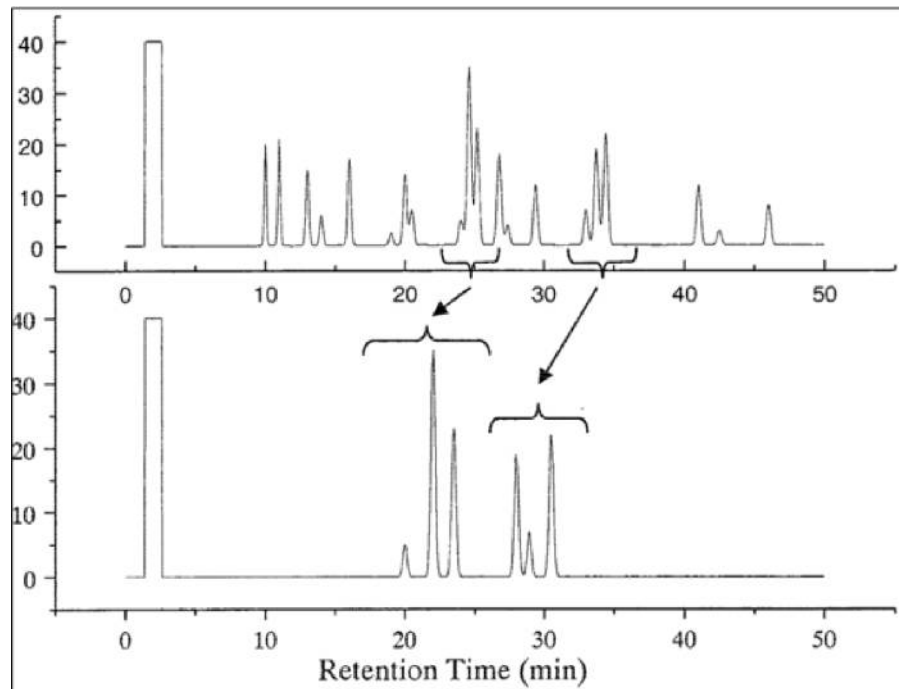
Princípio:

Na MDGC emprega-se duas (ou mais) etapas sequenciais de separação por GC.

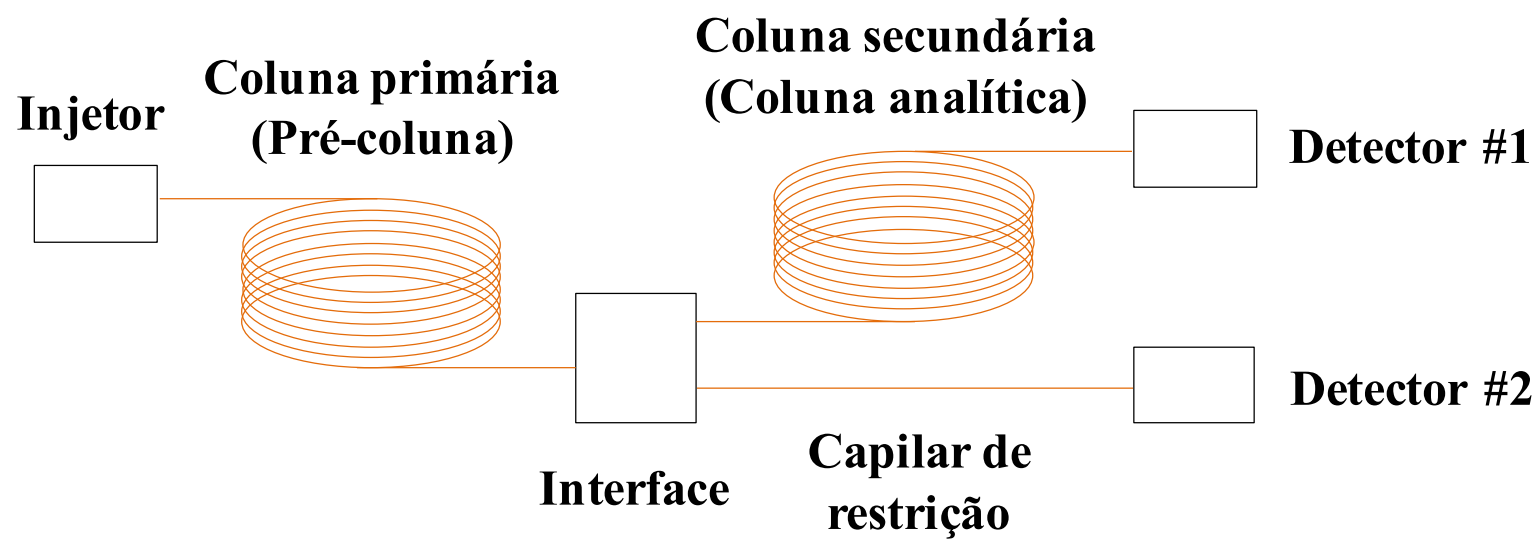


MDGC de frações parciais

Na GC-GC apenas algumas frações são sujeitas a duas etapas de separação.

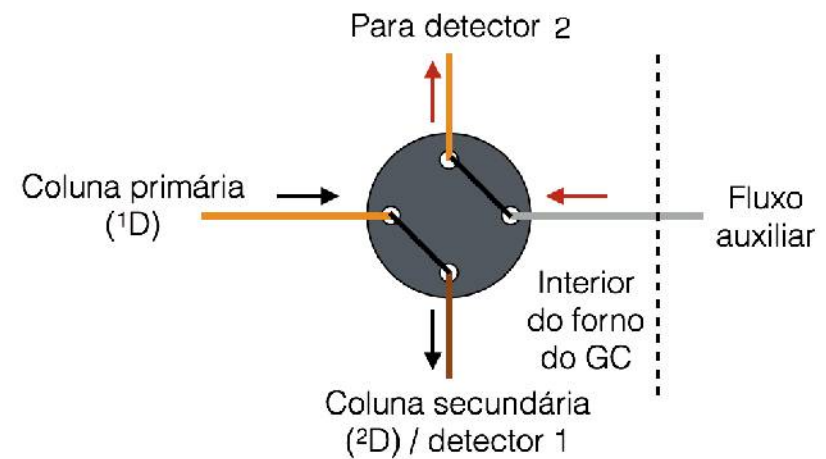
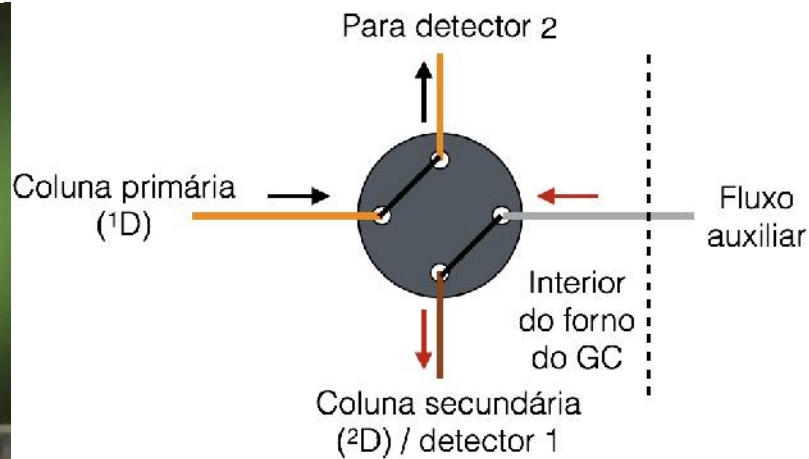


Instrumentação

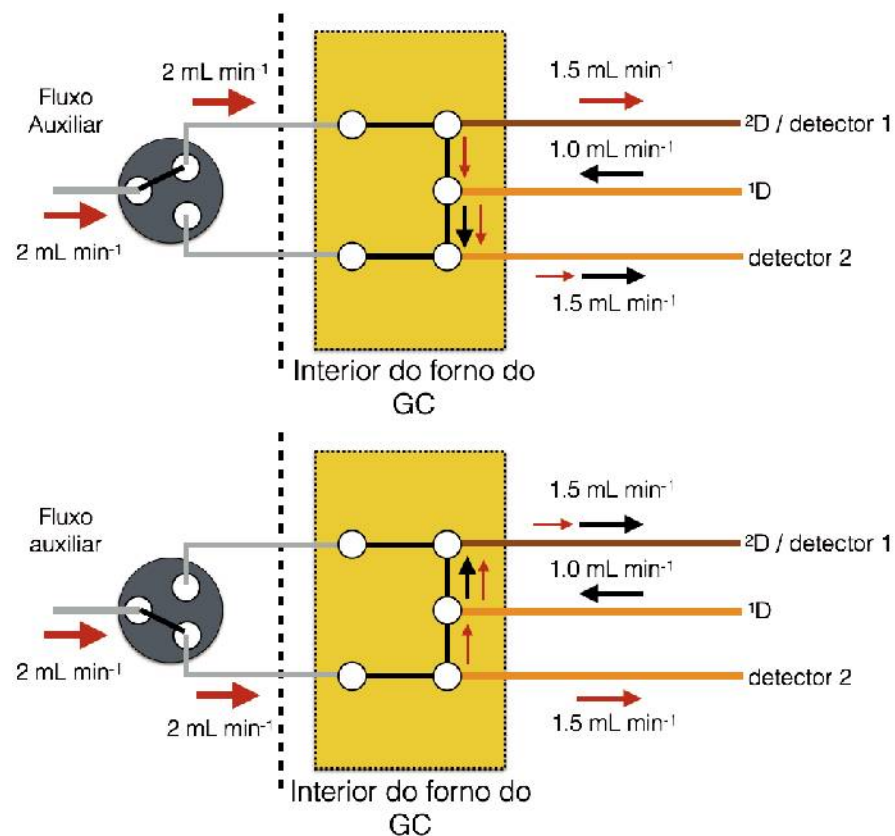
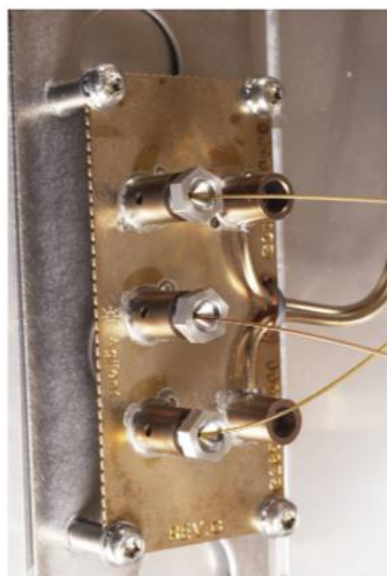


Instrumentação

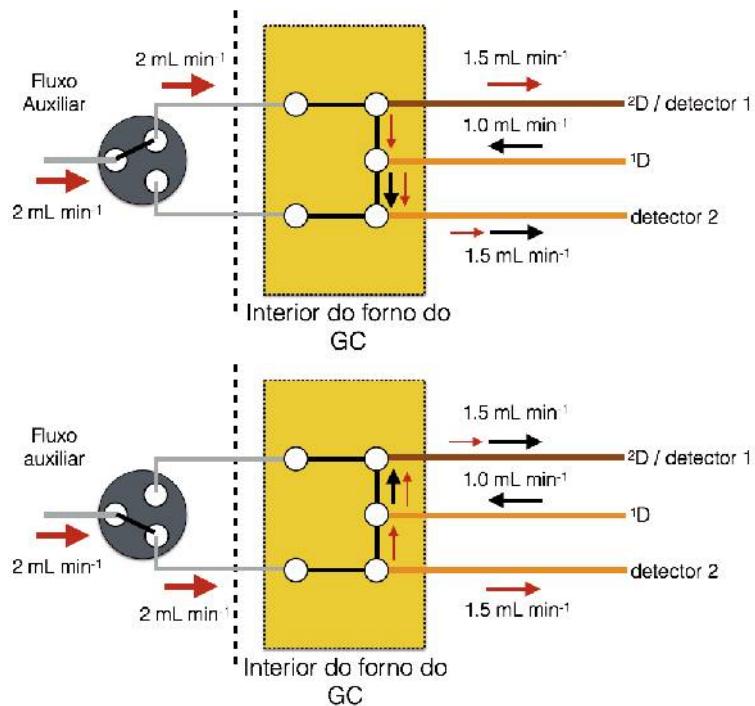
- Simplicidade e robustez.
- Temperatura máxima limitada pelos selos da válvula.



Instrumentação



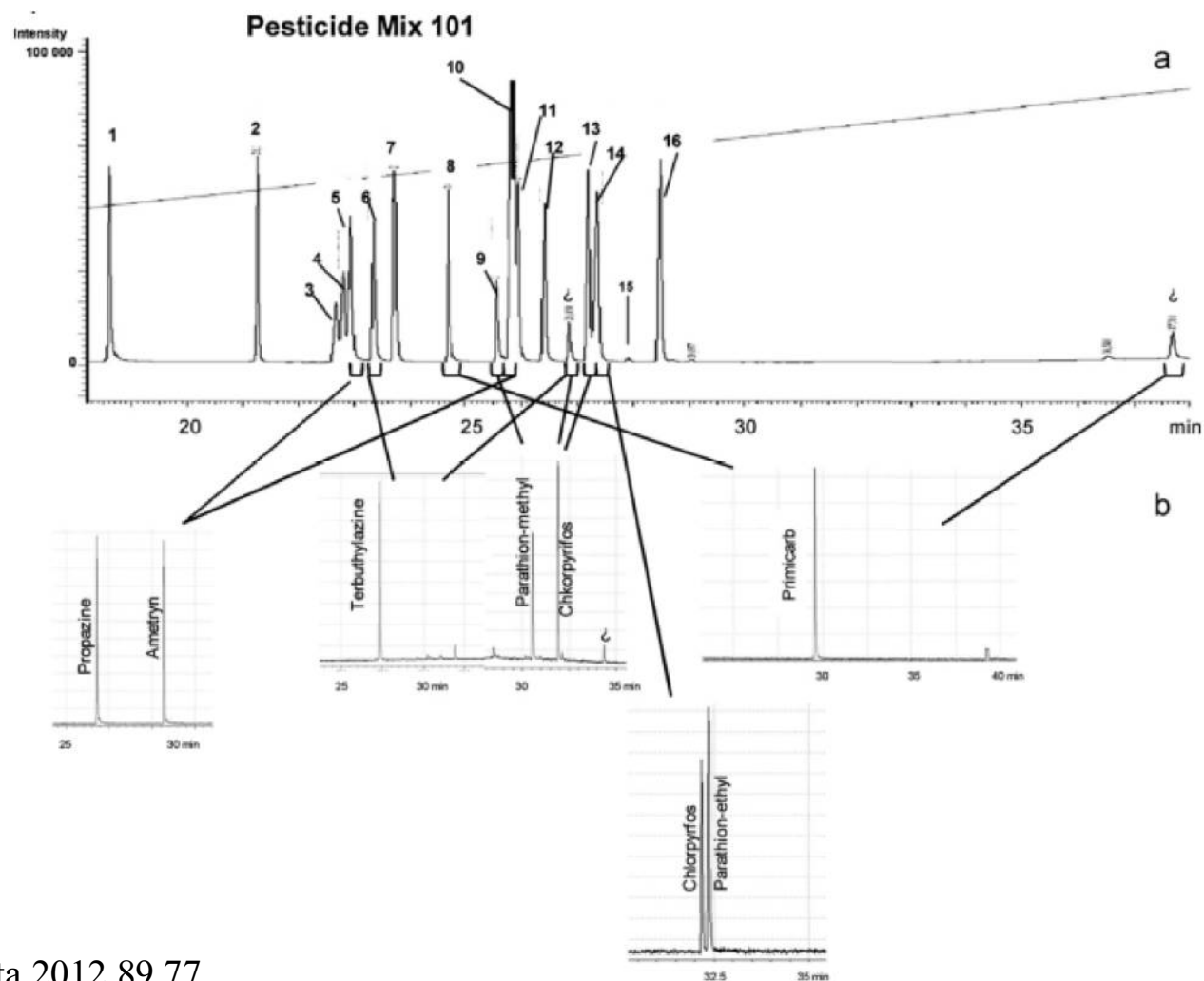
Instrumentação



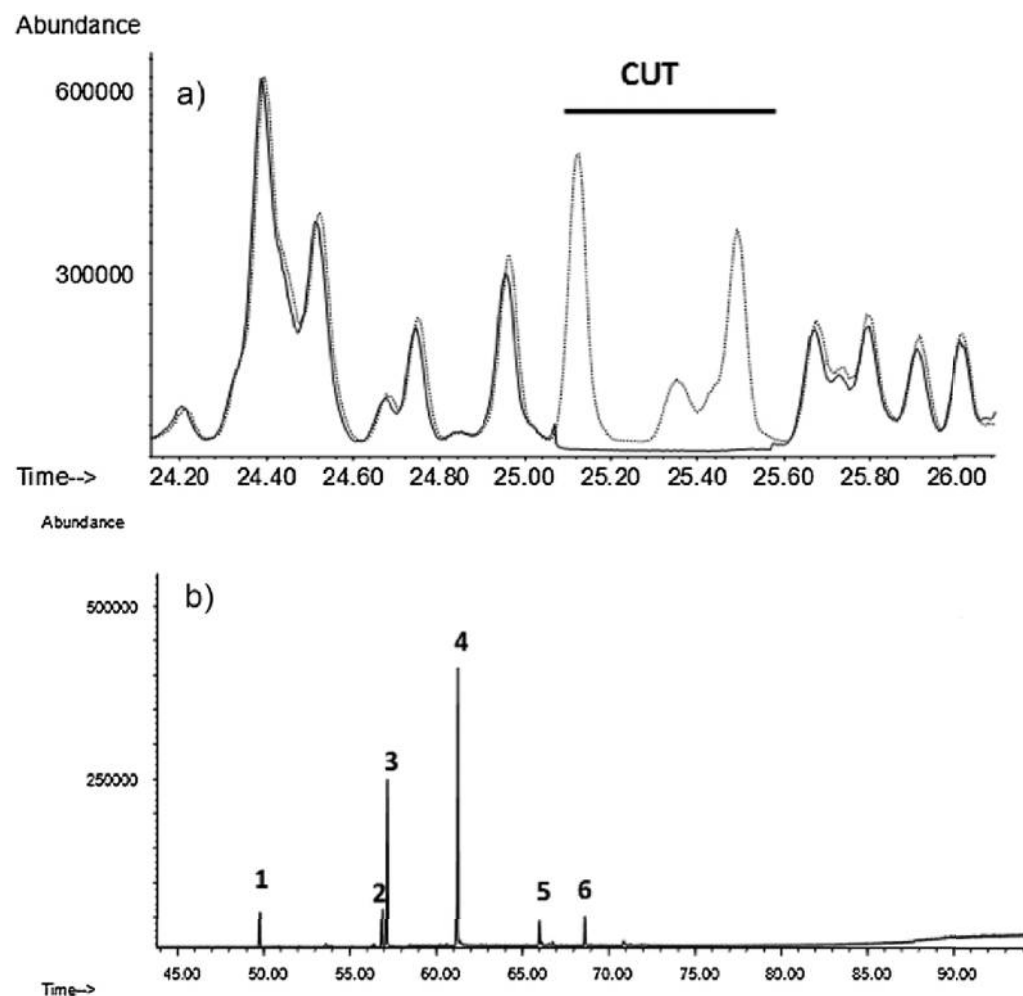
- Conceitualmente simples.
- Requer conhecimentos básicos de pneumática (Hagen-Poiseuille).
- Sistema quimicamente inertes.
- Não há limitação de temperatura máxima.
- Ideal para análise direcionada.

$${}^1F = \frac{60\pi {}^1r^4 (P_{inj}^2 - P_{AUX}^2) T_{ref}}{16\eta {}^1L P_{AUX} T}$$

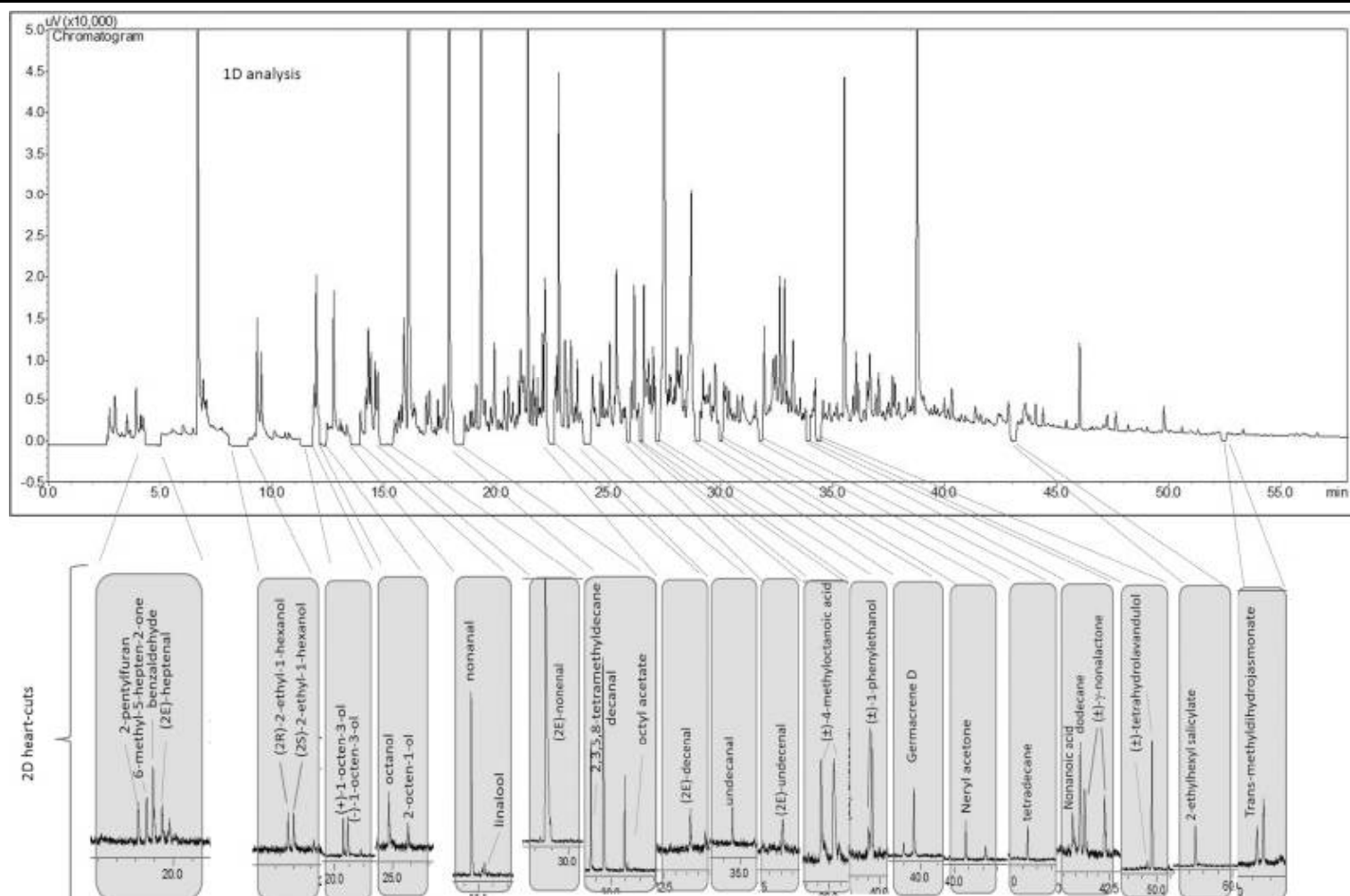
$$R = \frac{128\eta L}{\pi d^4} \quad \frac{F_n}{F_{Total}} = \frac{R_n}{\sum R_n}$$



del Castillo et al. Talanta 2012 89 77.

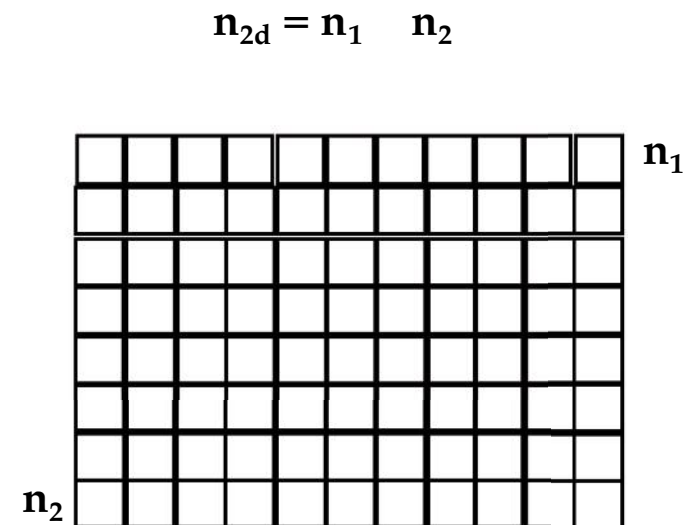
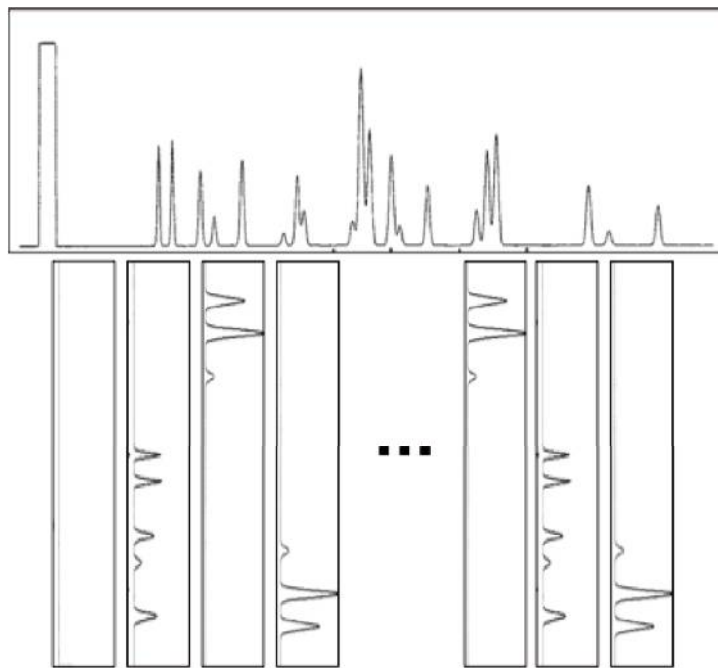


Sharif et al. TRAC Trends Anal. Chem. 2016 82 35.

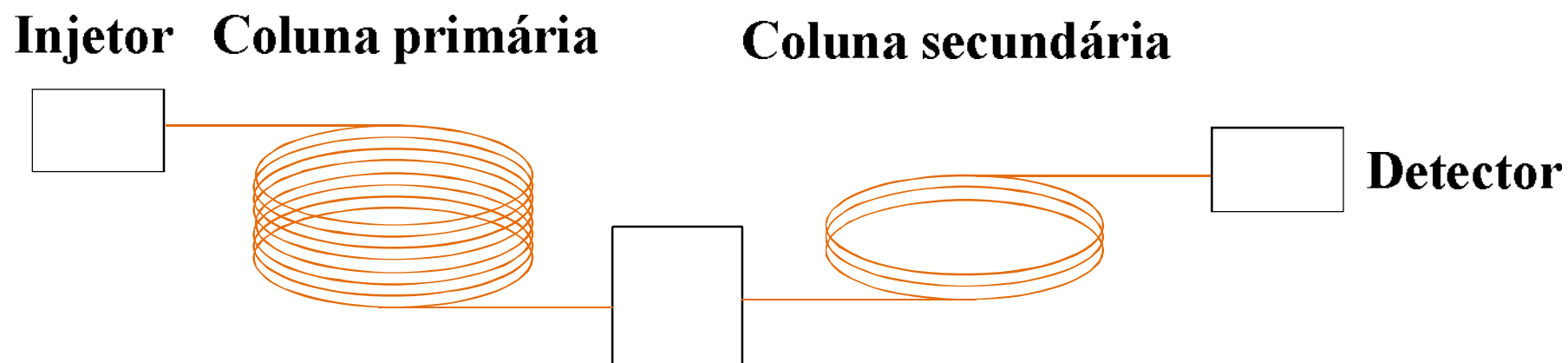


Sharif et al. TRAC Trends Anal. Chem. 2016 82 35.

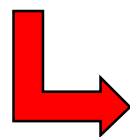
... e se todo efluente da 1D é sujeito a uma etapa adicional de separação ...



Interfaces para GC×GC - moduladores



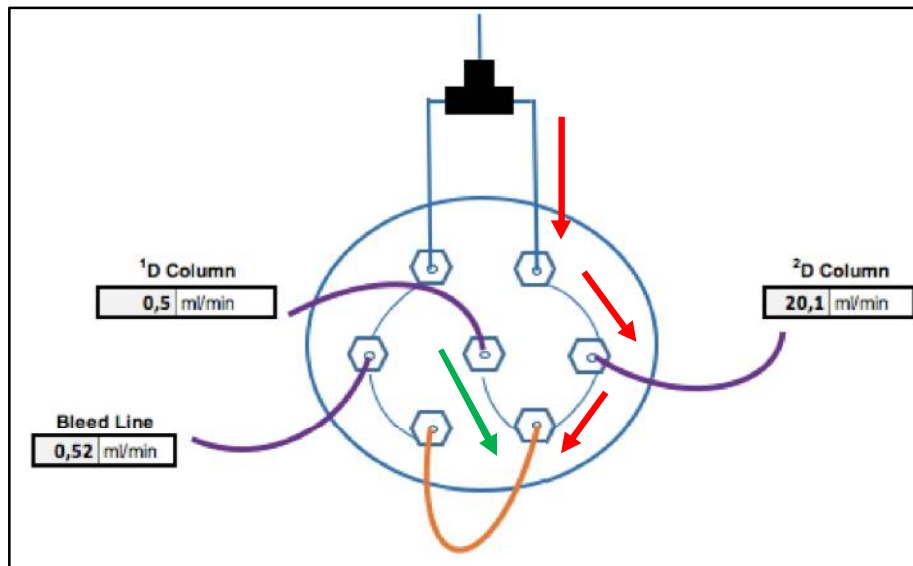
Modulador



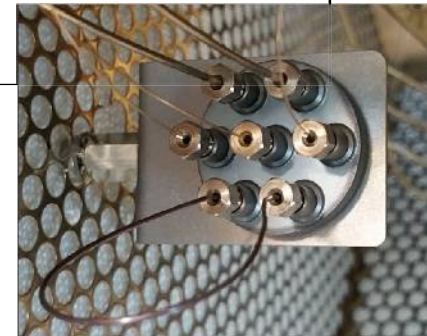
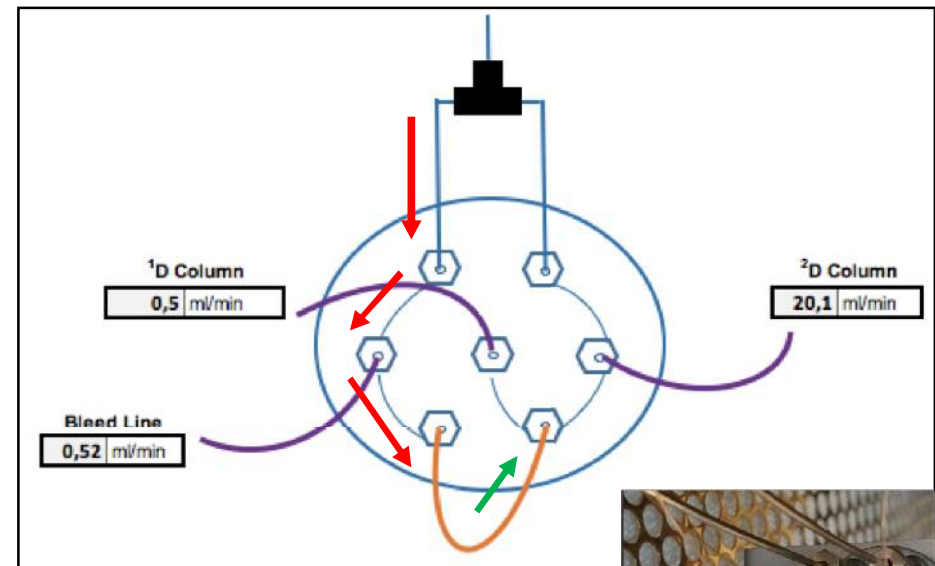
Interface para multiplexação
(transmitir simultaneamente) as duas
separações sequencias na mesma
análise cromatográfica!

Pneumáticos / 'de fluxo'

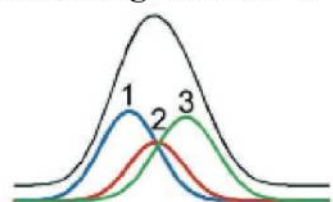
Fill (¹D sampling)



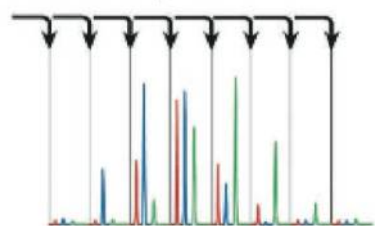
Flush (re-injection)



Cromatograma da 1D



Modulação



Cromatograma bruto (ou desdobrado)

Montagem do cromatograma

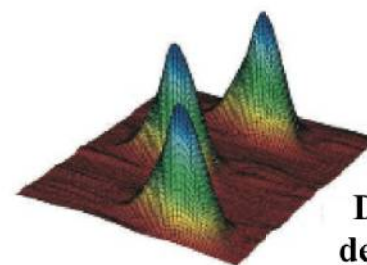
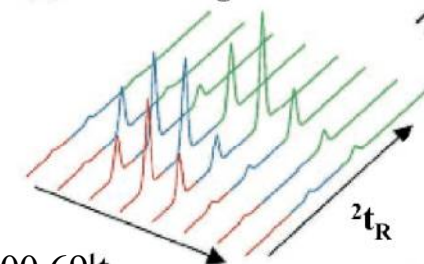


Diagrama de contorno

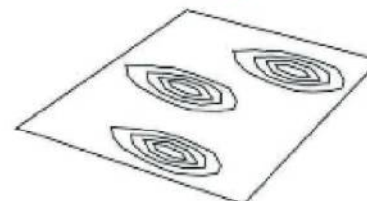


Diagrama de contorno

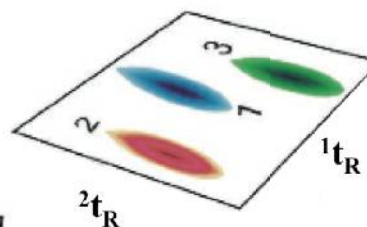
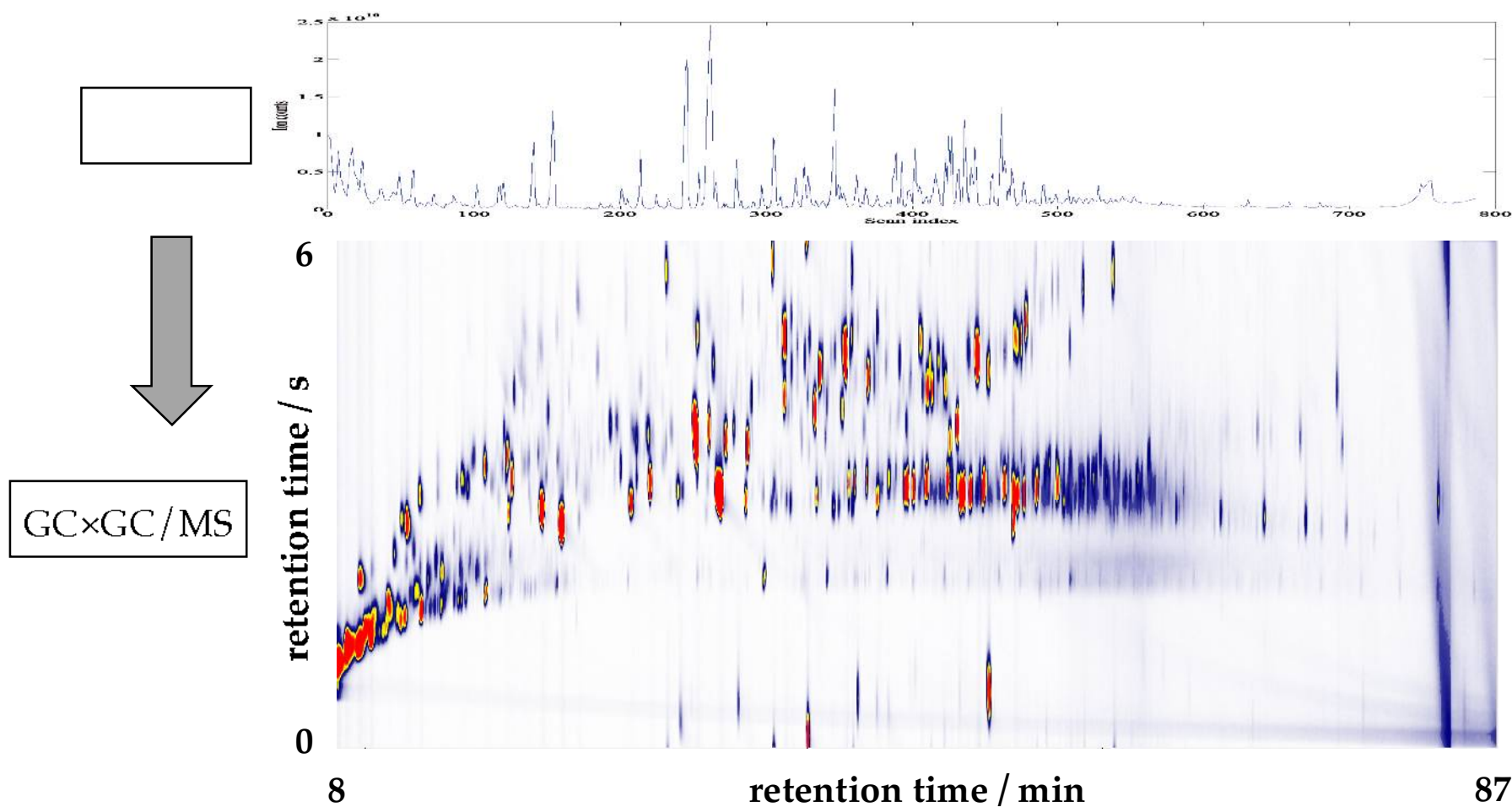


Diagrama de cores

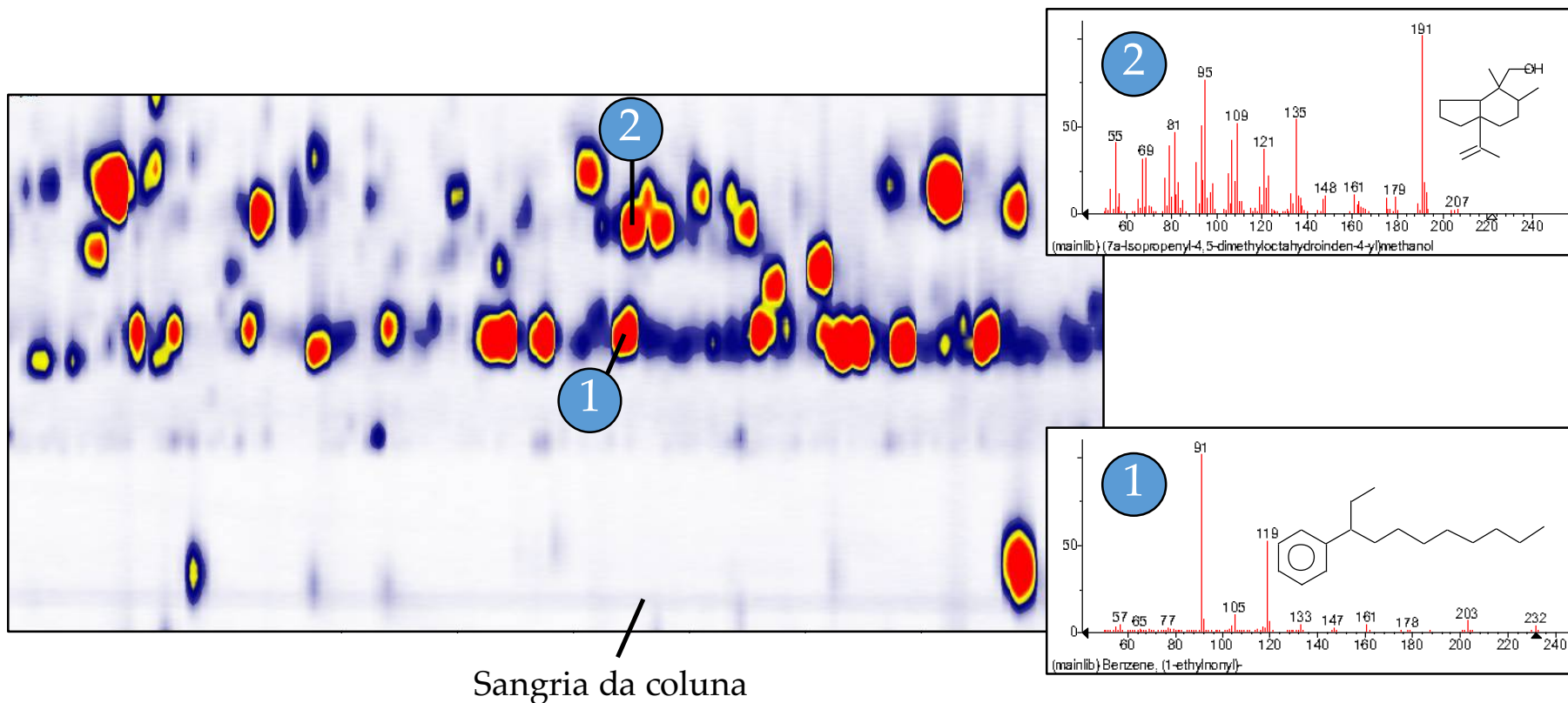
Visualização

Vantagens da GC×GC

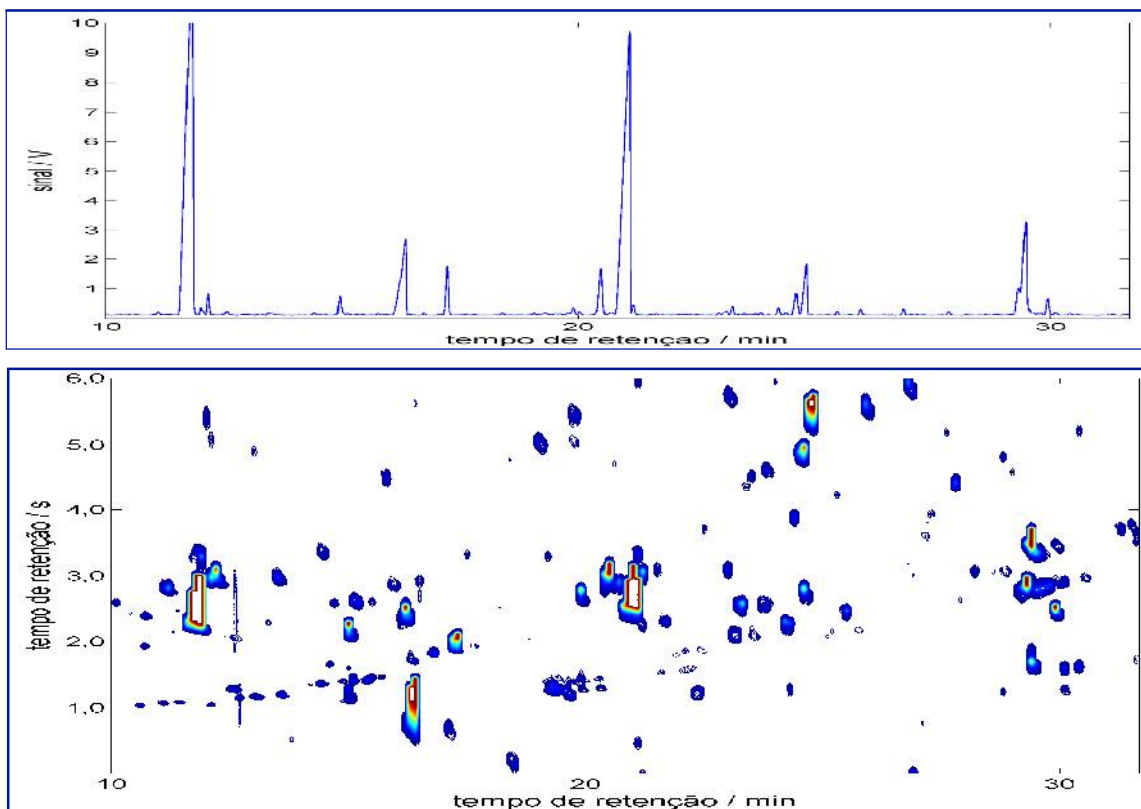
32



Os 3S: separação, 'sensibilidade' e estrutura



Os 3S: separação, 'sensibilidade' e estrutura

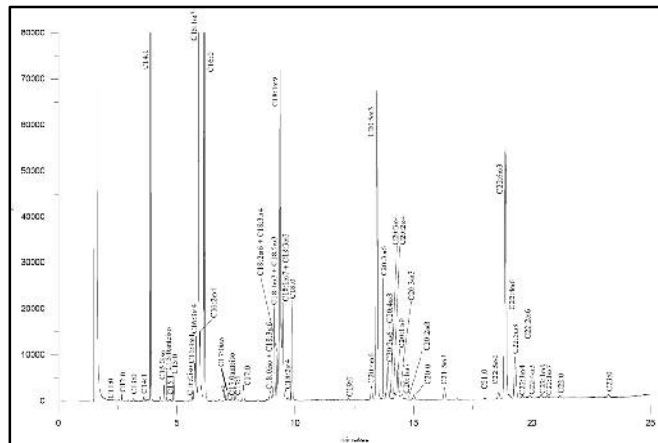


S/N de 3:

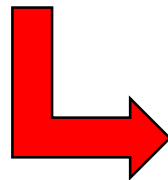
GC-FID
24 picos.

GC×GC-FID
75 picos.

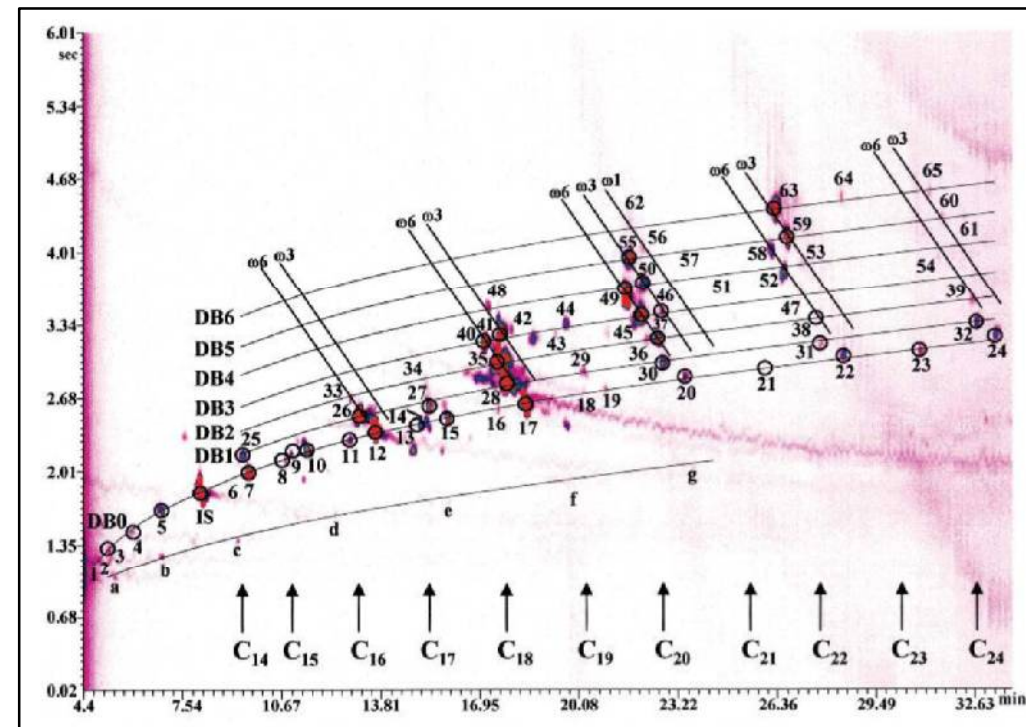
Os 3S: separação, 'sensibilidade' e estrutura



GC-

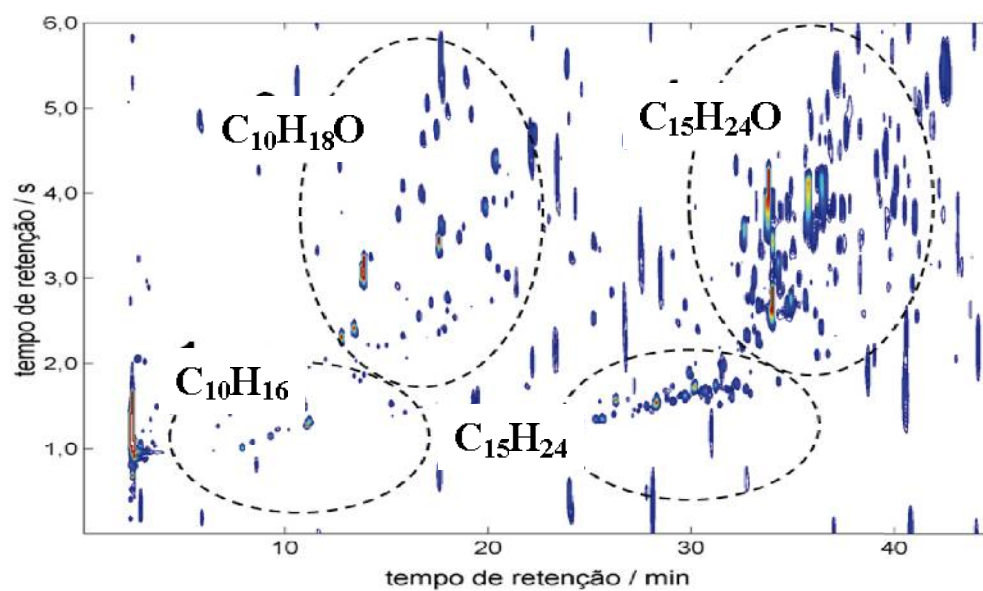
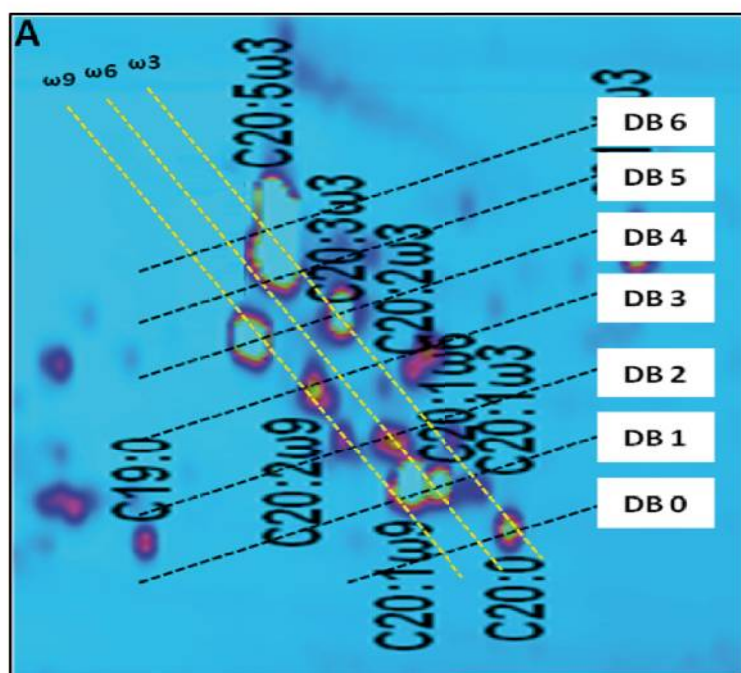


GC×GC-FID



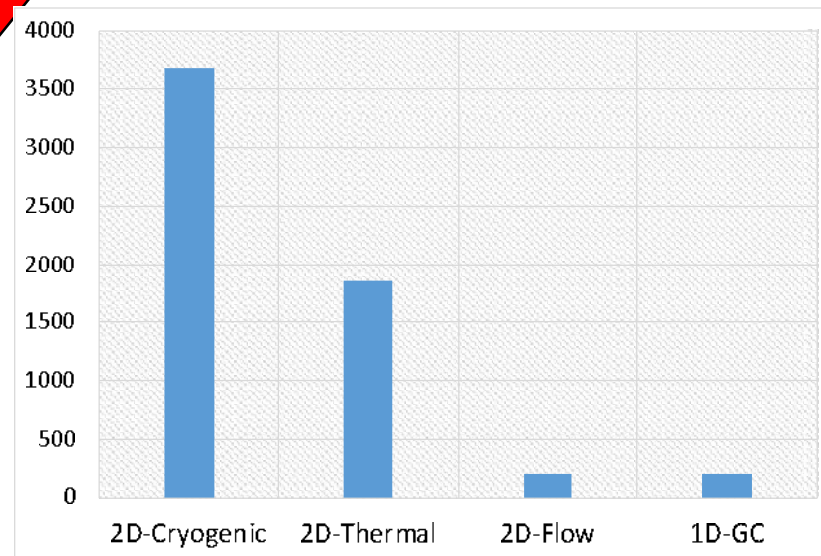
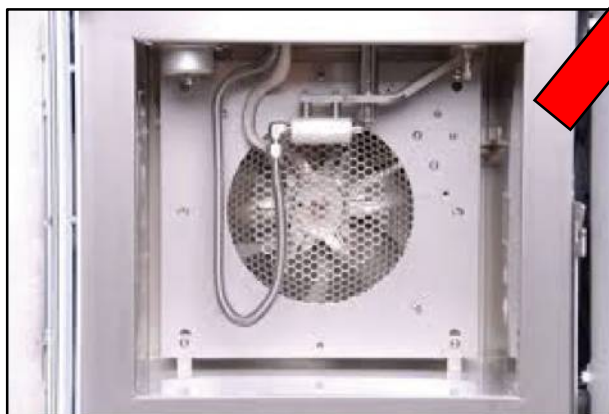
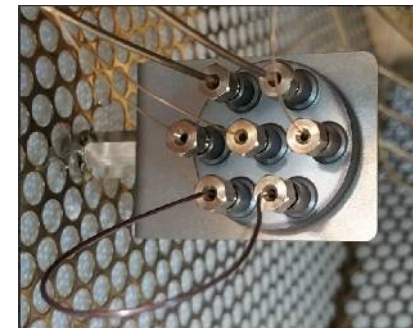
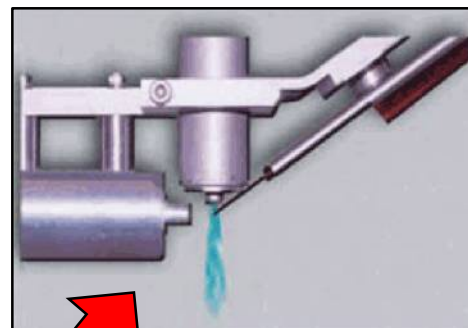
Tranchida et al. J. Sep. Sci. 31 (2008) 3347.

Os 3S: separação, 'sensibilidade' e estrutura

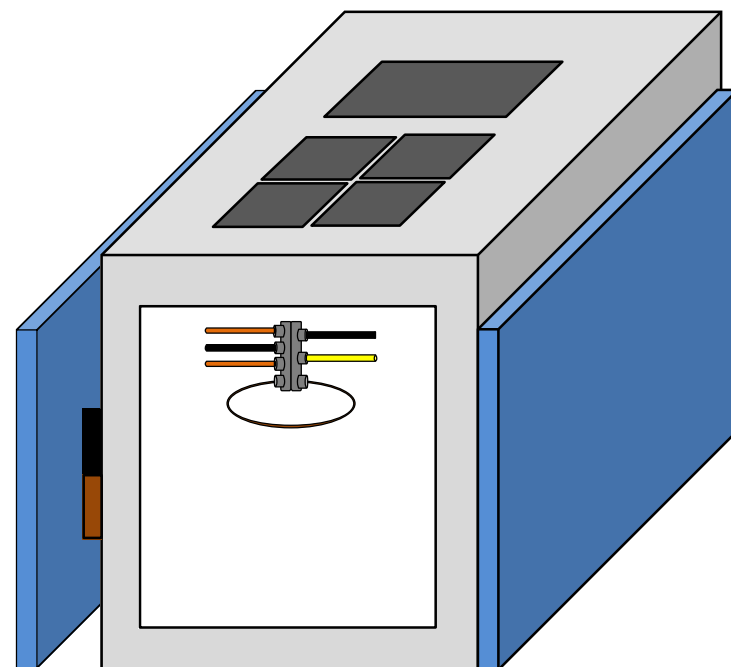
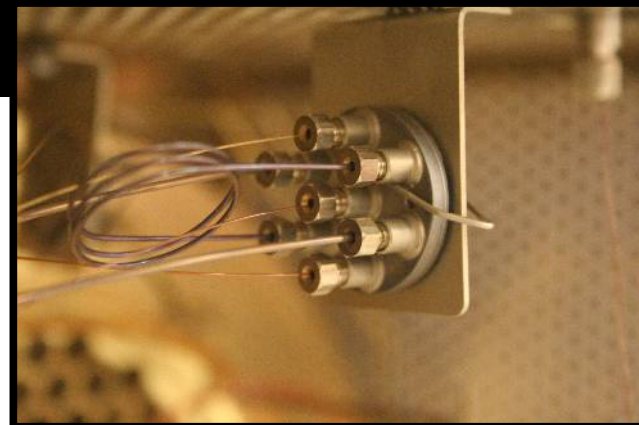
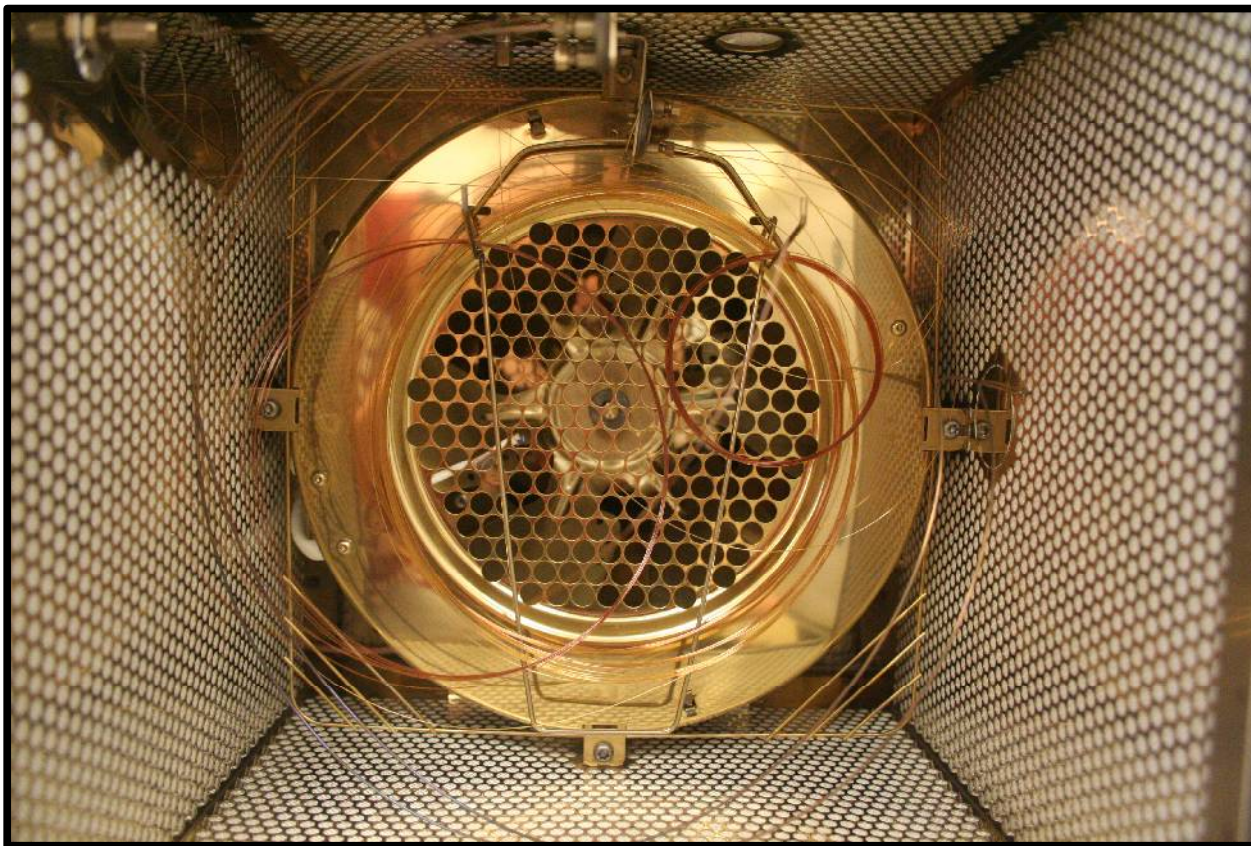


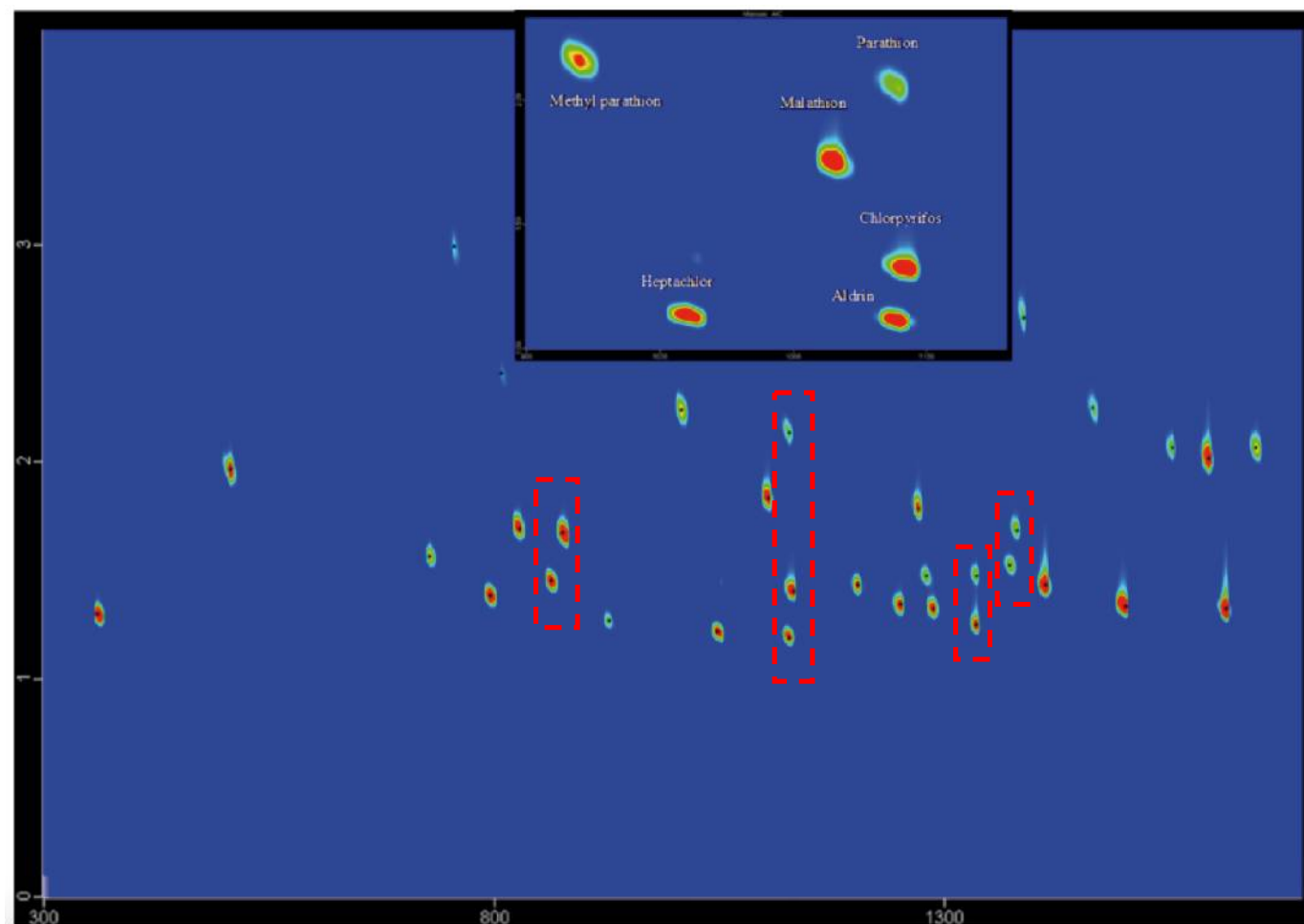
Custos de operação da GC×GC

37



O instrumento para FM-GC×GC

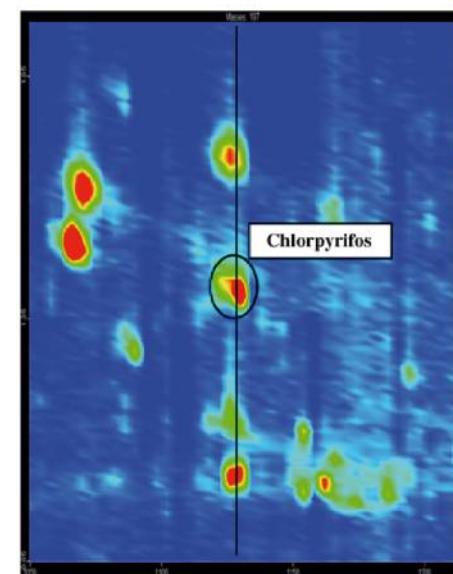
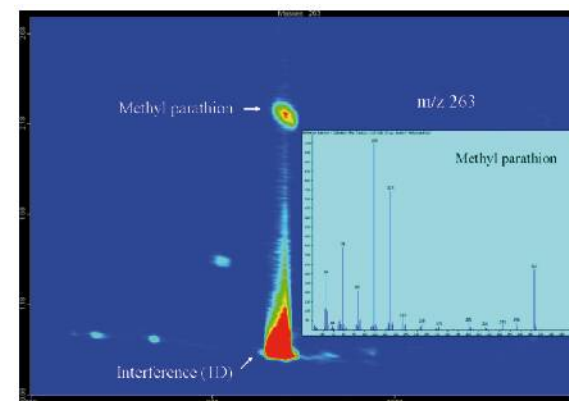
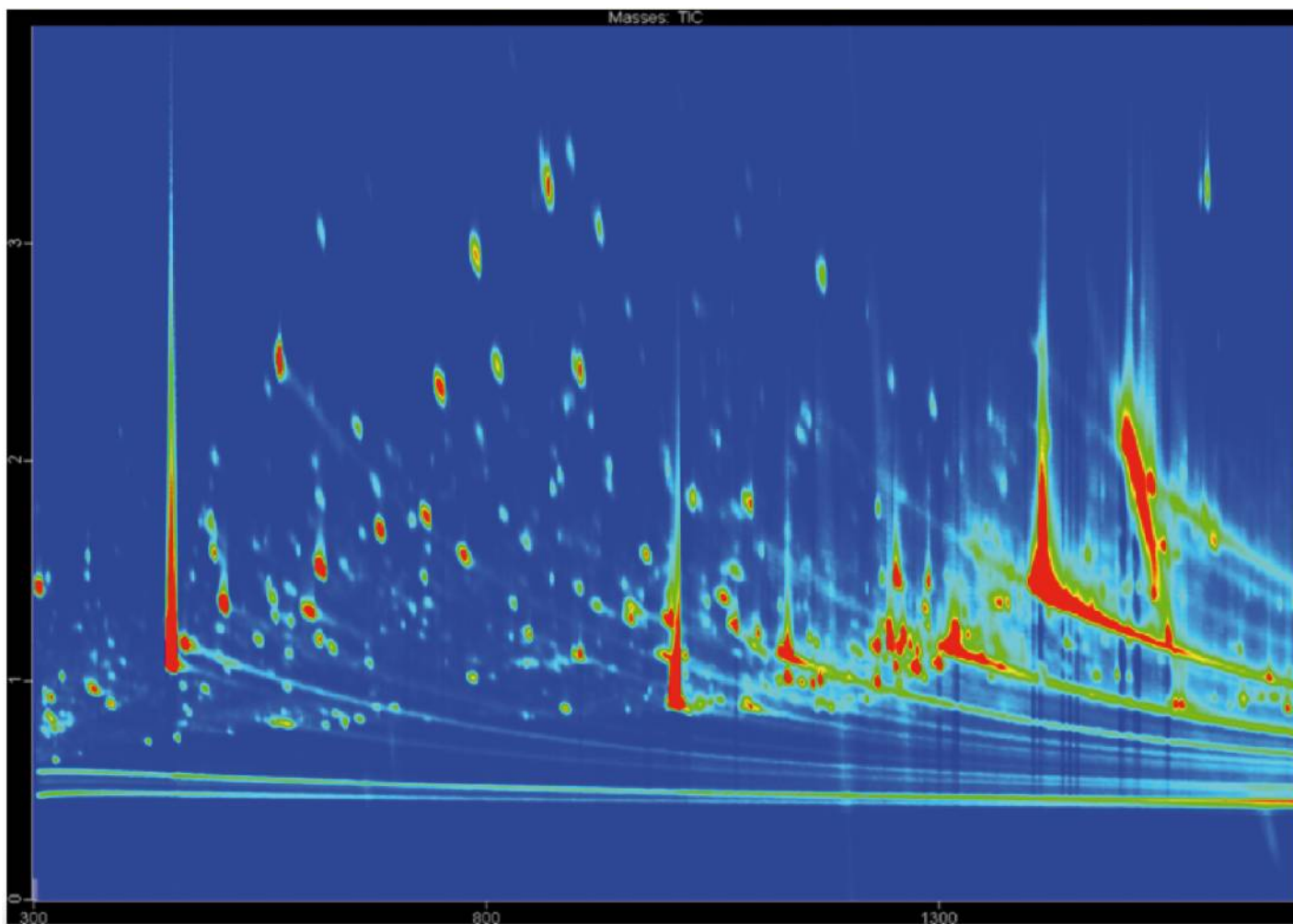




Análise de uma mistura
de pesticidas por
GC×GC/MS

Determinação de pesticidas usando GC×GC/MS

40



Cochran J. Chromatogr. A 2008 1186 202.

- (Ideias de) Estratégias para monitoramento de pesticidas

Análise exploratória / untargeted

- MS de alta resolução e exatidão.

Análise exploratória por classes

- Detecção seletiva por classes de heteroátomos.
- Detecção simultânea (MS/Seletivo).

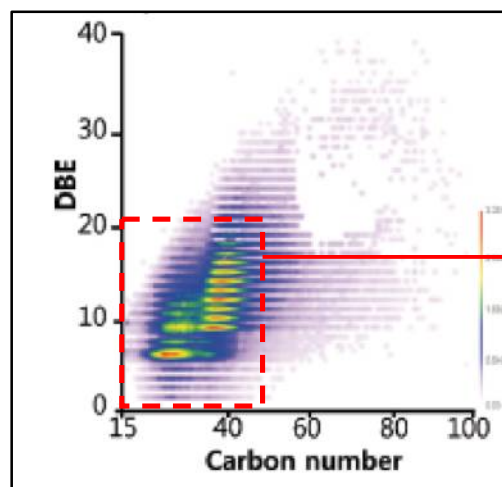
Análise direcionada / targeted

- MS/MS (QqQ)

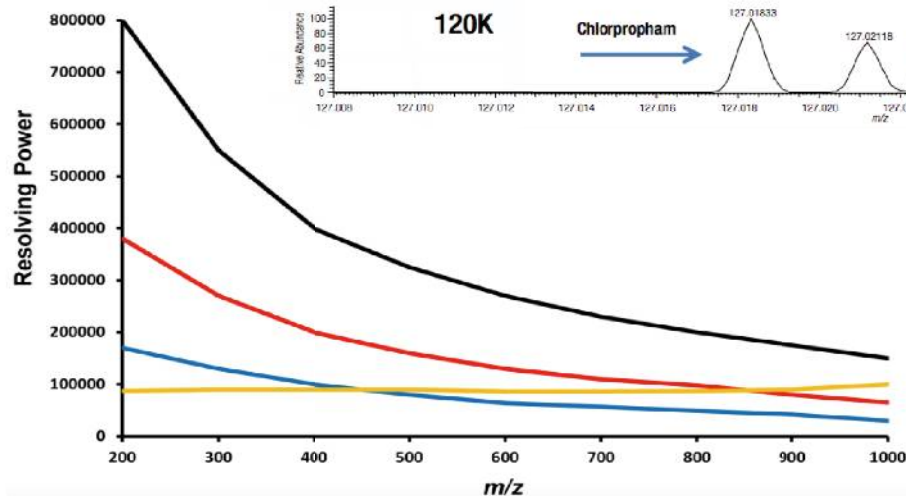
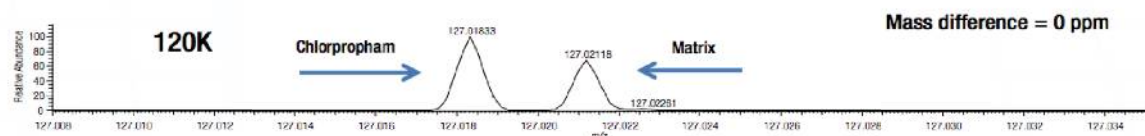
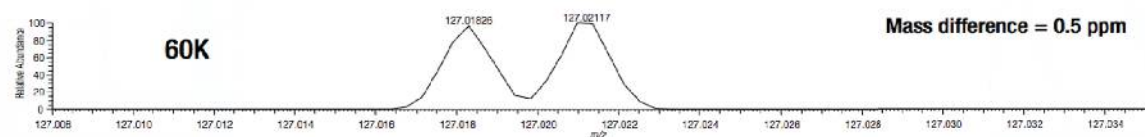
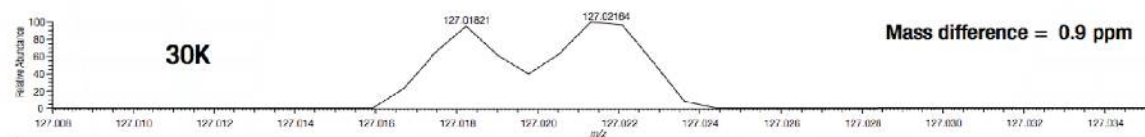
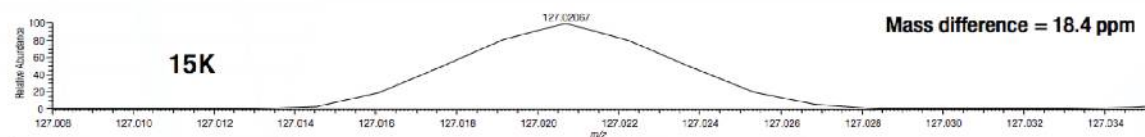
- **1. Análise exploratória / untargeted**

Requisitos do analisador de massas para análise untargeted

44



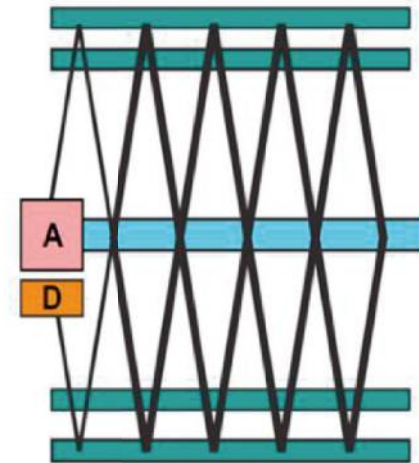
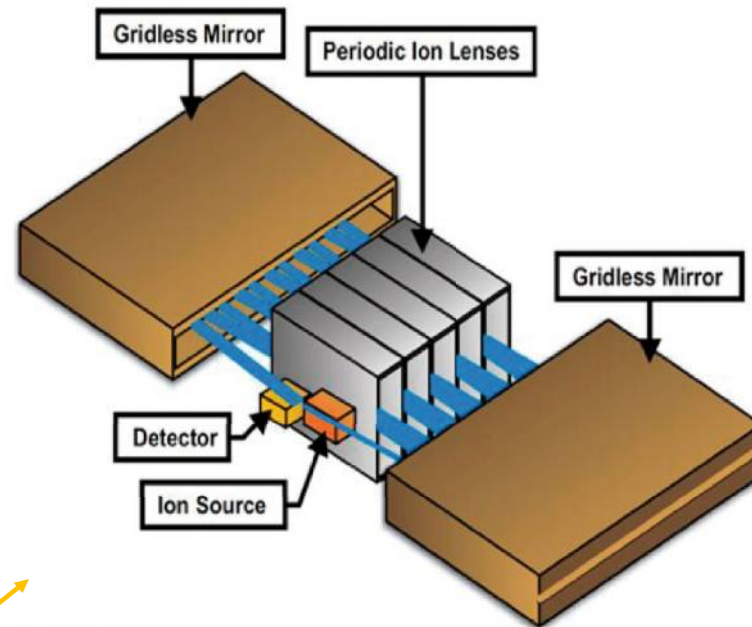
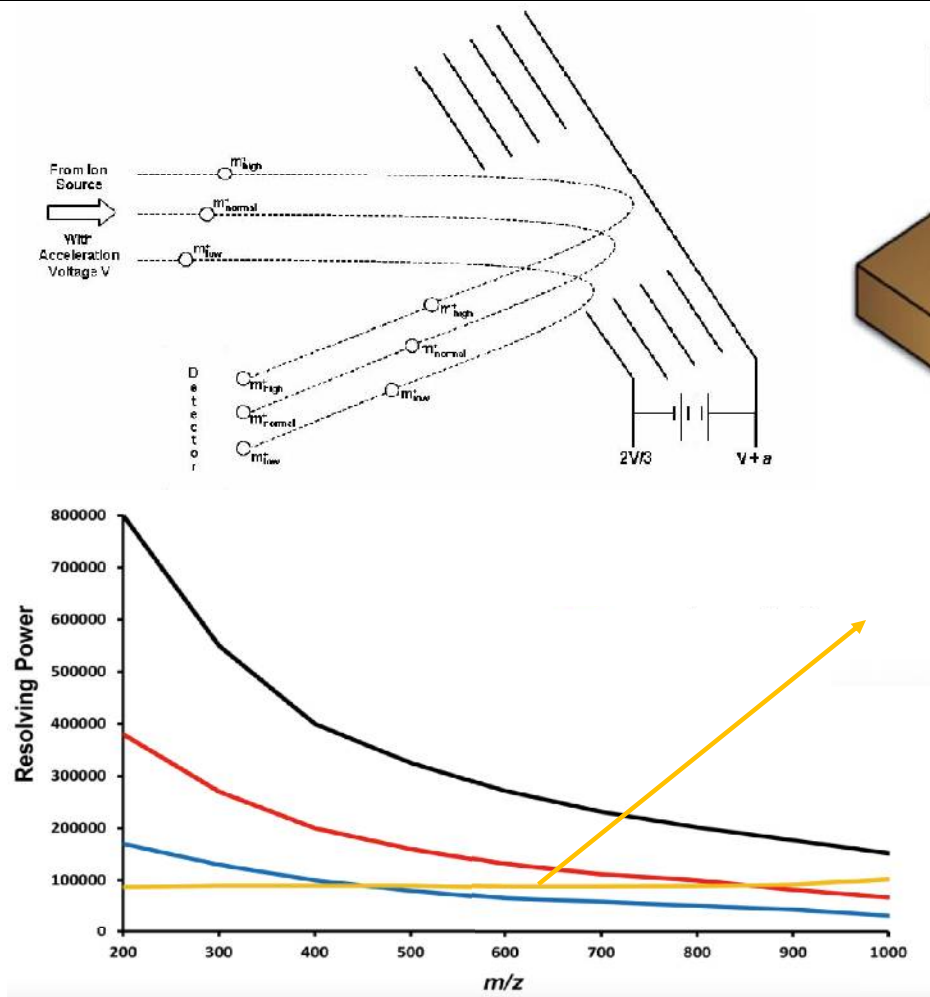
GC(×GC)



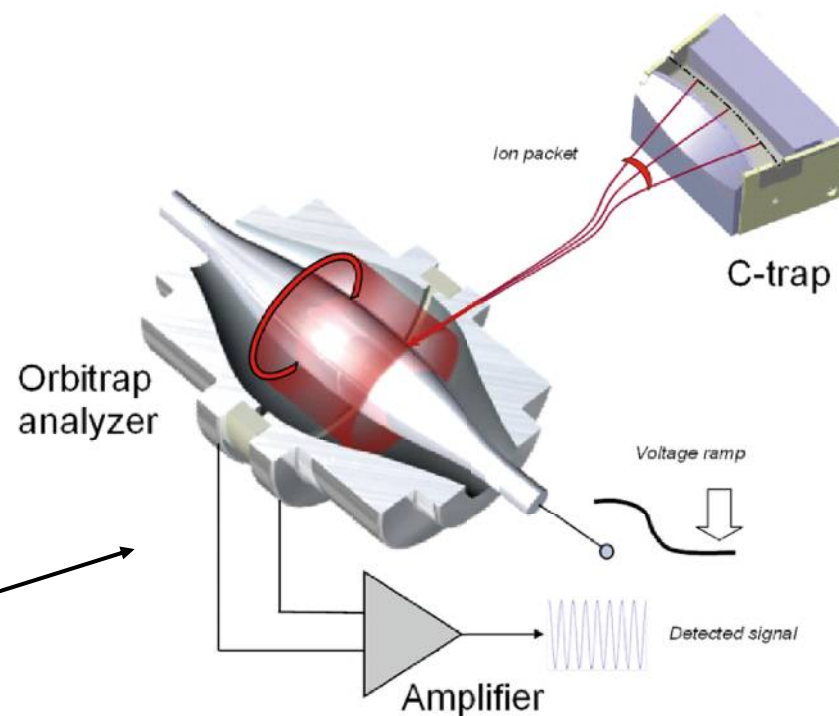
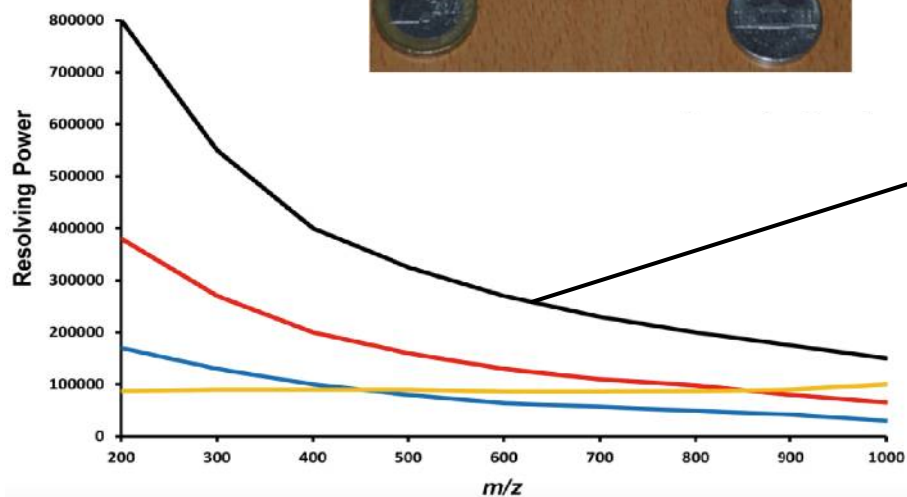
Klitzke Energy Fuels 2012 26 5787.

Requisitos do analisador de massas para análise untargeted

45

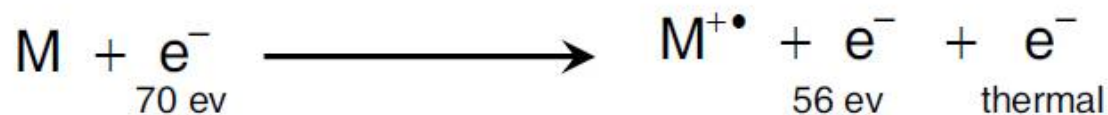
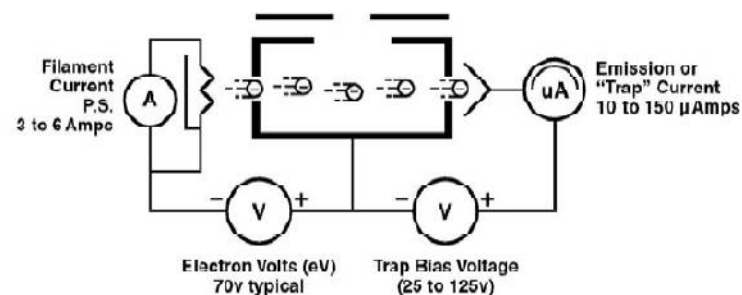
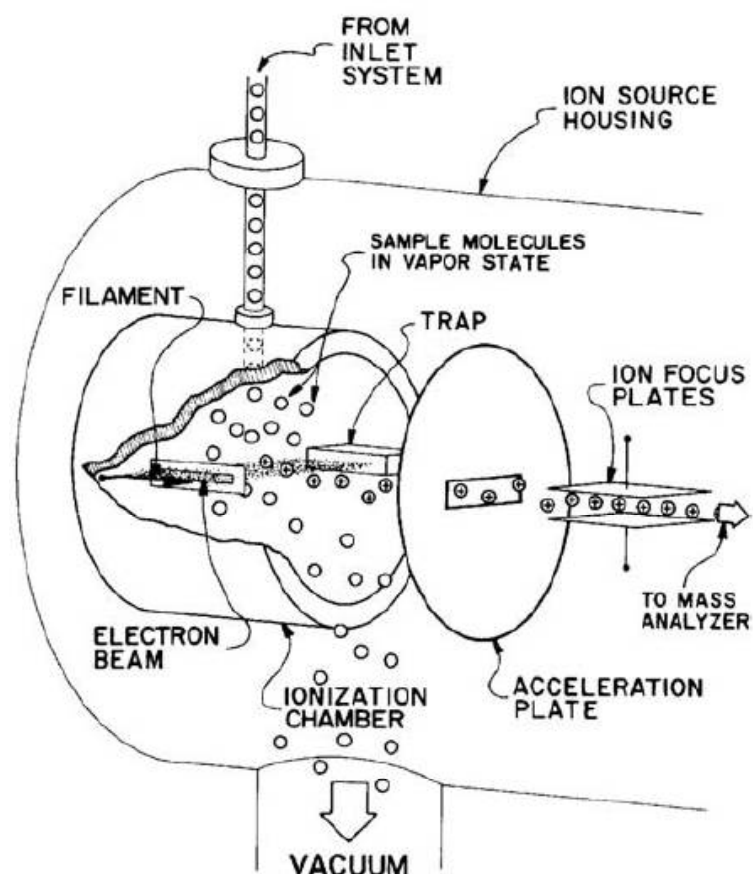


- Analisador de massas (m/z): medidas de tempo de voo.



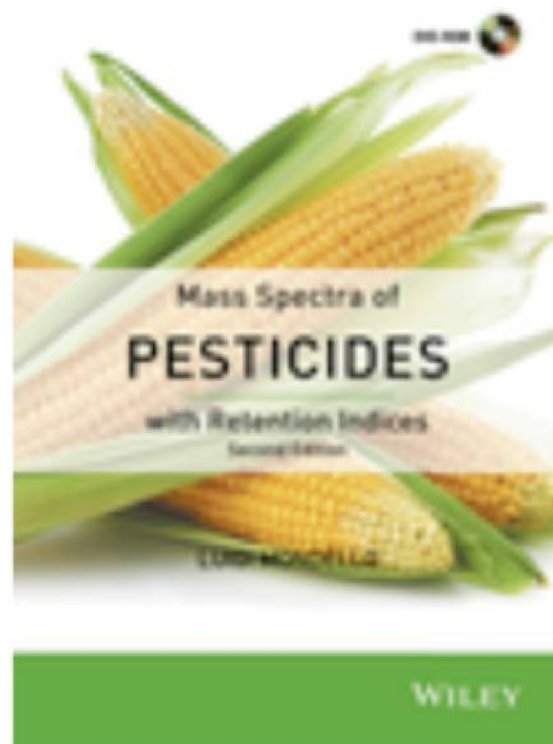
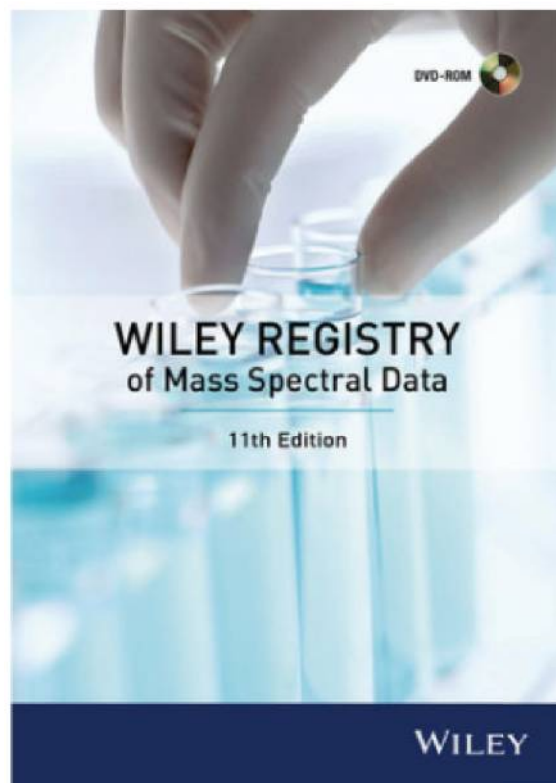
- Analísador de massas (m/z): armadilha eletrostática com transformada de Fourier (e.g., Orbitrap)

Ionização por elétrons (EI)



Espectros de massa altamente reprodutíveis (@ 70eV).

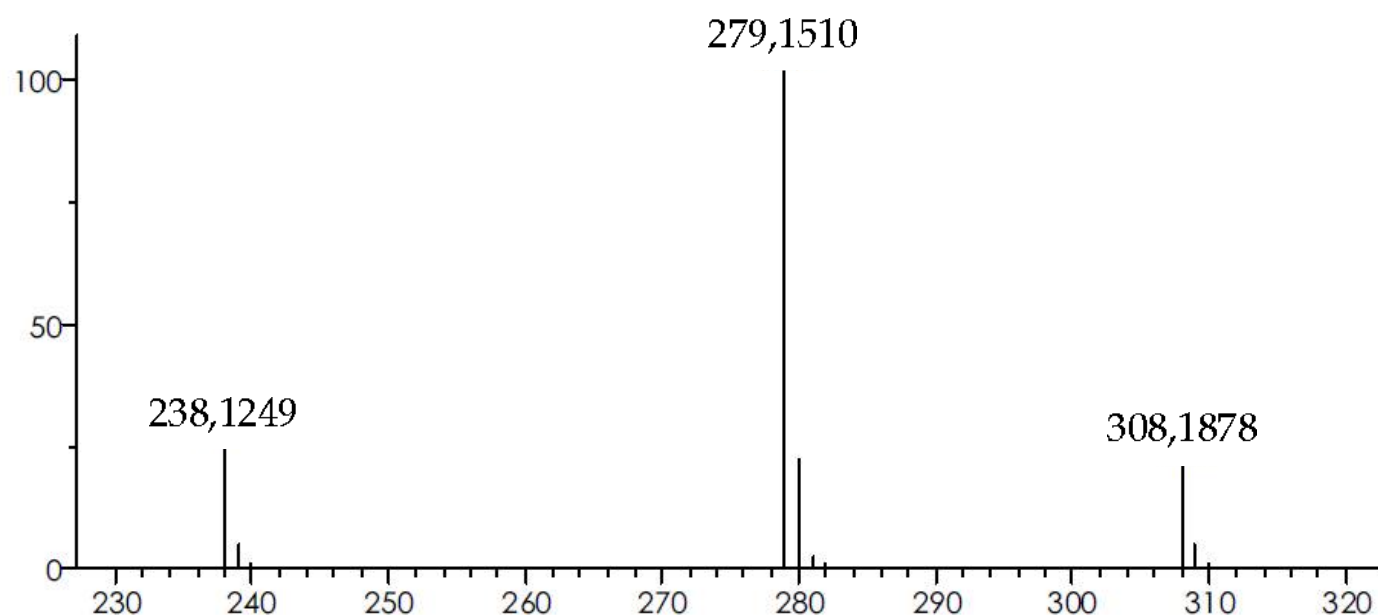
Ionização por elétrons (EI)



Watson e Sparkman, Introduction to Mass Spectrometry Fourth ed.

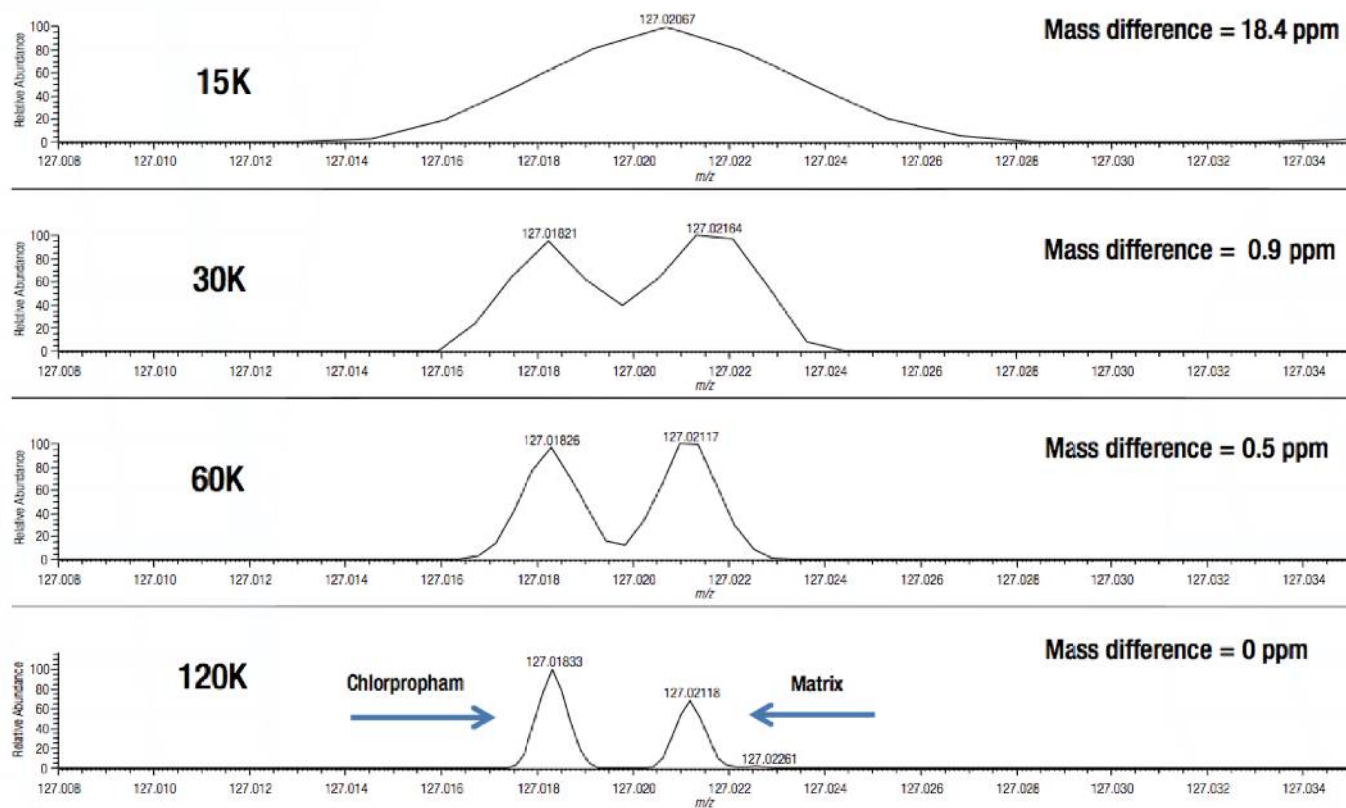
+267.376 espectros catalogados

Espectro de massa: exatidão (acurácia) na medida de massa

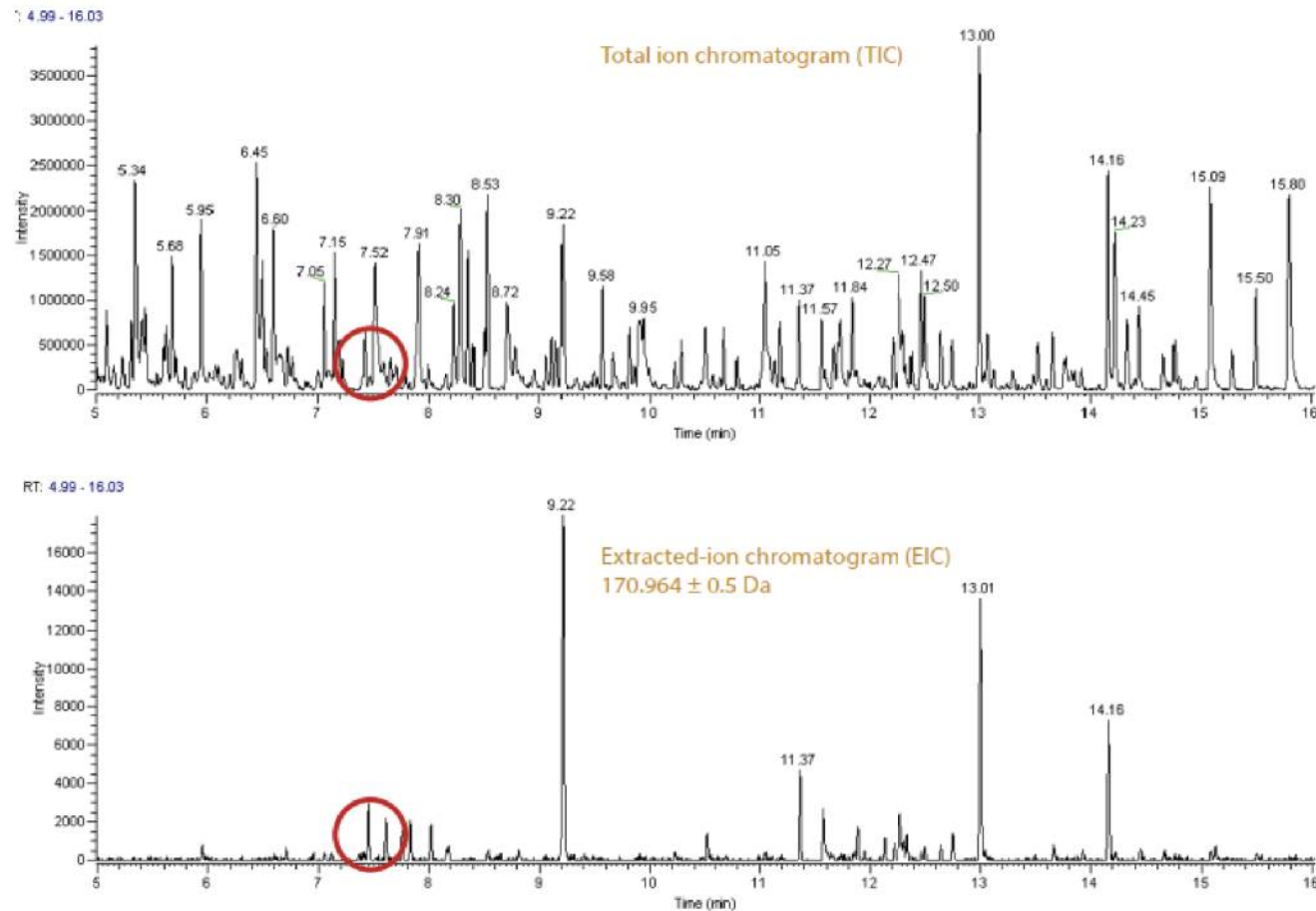


Elemental Composition				
C	H	N	O	Exact Mass
18	20	4	1	308.1637
18	12	—	5	308.0685
18	4	4	2	308.0334
19	2	1	4	307.9984
19	20	2	2	308.1525
19	36	2	1	308.2827
20	12	4	—	308.1062
20	24	2	1	308.1888

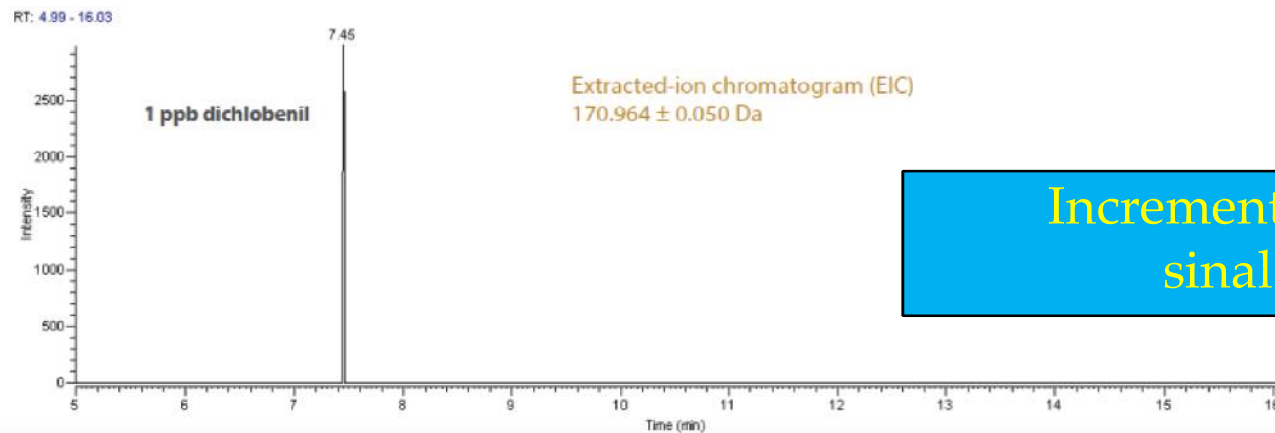
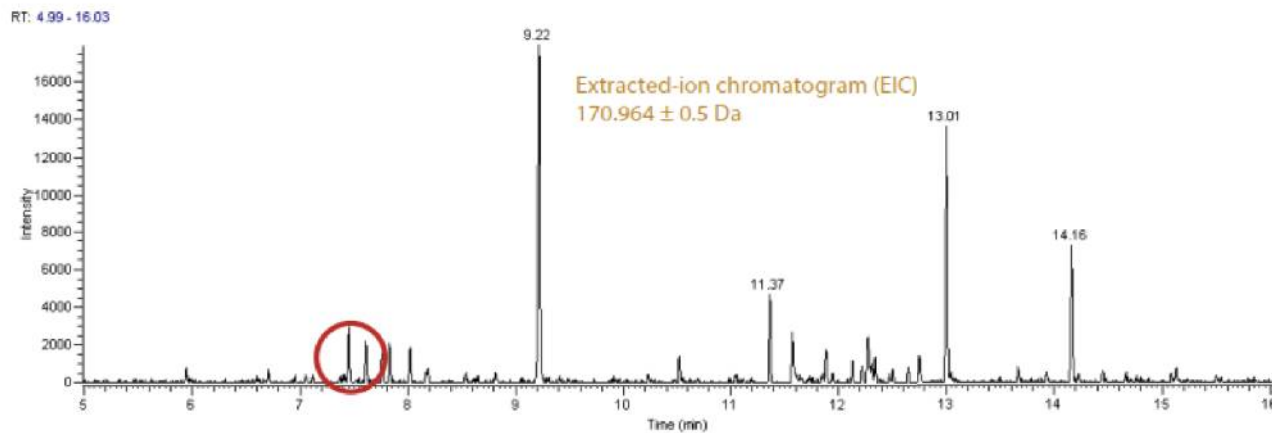
Explorando a seletividade de massa: resolução de massa



Explorando a seletividade de massa: exatidão de massa



Explorando a seletividade de massa: exatidão de massa

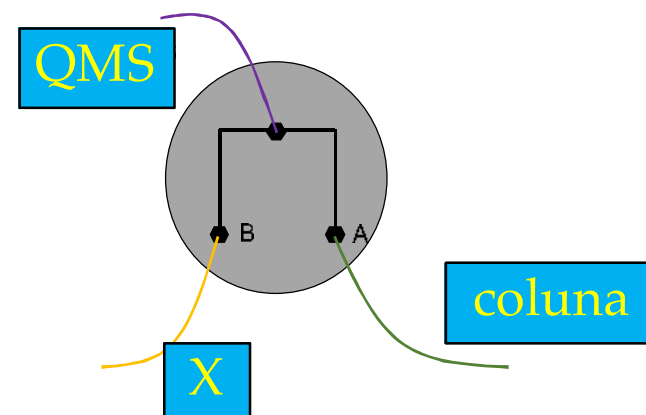


Incremento na relação
sinal/ruído!

- **2. Análise exploratória por classes**



- Detector seletivo: detecção por classe.
- Single QMS: confirmação (m/z e coordenadas de retenção).

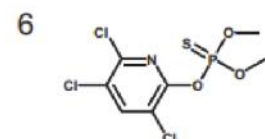


Desenvolvimento do método

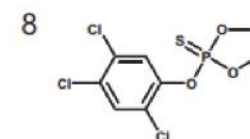
55

#	Compound	FPD/P	FPD/S	ECD	NPD	FID/TOF-MS
1	Dichlorvos	X		X	X	X
2	Mevinphos	X			X	X
3	Dimethoate	X	X		X	X
4	Diazinon	X	X		X	X
5	Chlorothalonil			X	X	X
6	Chlorpyrifos methyl	X	X	X	X	X
7	Parathion methyl	X	X		X	X
8	Fenchlorphos	X	X	X	X	X
9	Pyrimiphos methyl	X	X		X	X
10	Fenitrothion	X	X		X	X
11	Malathion	X	X		X	X
12	Chlorpyrifos	X	X	X	X	X
13	Fenthion	X	X		X	X
14	Parathion ethyl	X	X		X	X
15	4,4'-dichloro-benzophenone			X		X
16	Chlorfenvinphos	X		X	X	X
17	Fenthion ethyl	X	X		X	X
18	Procymidone			X	X	X
19	Captan		X	X	X	X
20	Bromophos ethyl	X	X	X	X	X
21	Methidathion	X	X		X	X
22	alpha-Endosulfan		X	X		X
23	Fenamiphos	X	X		X	X
24	Prothiophos	X	X	X	X	X
25	Buprofezin		X		X	X
26	Bupirimate		X		X	X
27	Ethion	X			X	X
28	Beta-Endosulfan		X	X		X
29	Carbophenothion	X	X	X	X	X
30	Endosulfan-sulfate		X	X		X
31	Propargite		X			X
32	Bifenthrin			X		X
33	Iprodione			X	X	X
34	Dicofol			X		X
35	Azinphos methyl	X	X		X	X
36	Lambda cyhalothrin			X	X	X
37	Fenarimol			X	X	X
38	Azinphos ethyl	X	X		X	X
39	Permethrin isomer 1			X		X
40	Permethrin isomer 2			X		X
41	Coumaphos	X	X	X	X	X

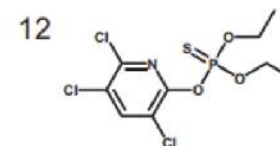
Estrutura química do grupo de pesticidas define o tipo de detector (X).



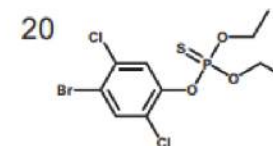
Chlorpyrifos methyl (MW = 322.54)



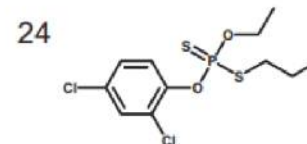
Fenchlorphos (MW = 321.55)



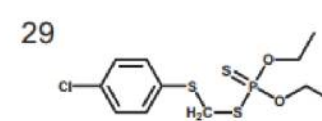
Chlorpyrifos (MW = 350.59)



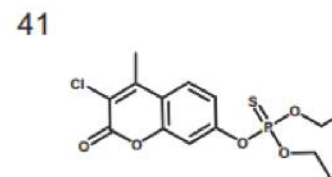
Bromophos ethyl (MW = 366.0)



Prothiophos (MW = 345.25)



Carbophenothion (MW = 326.74)

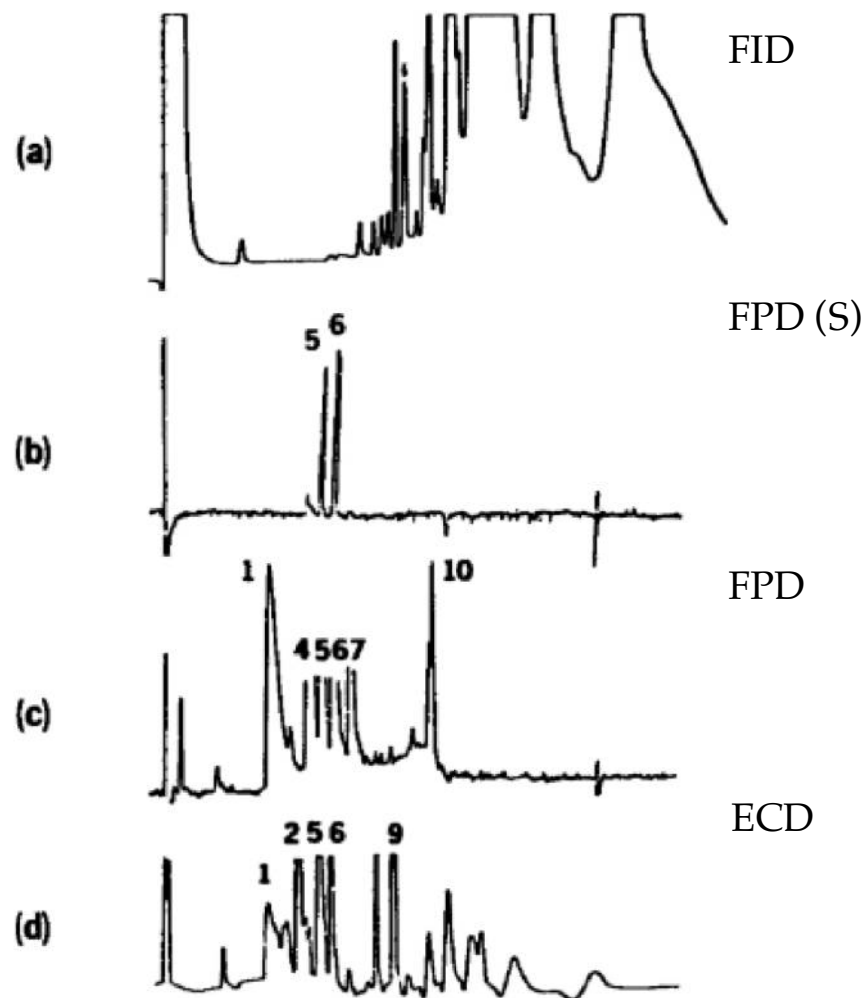


Coumaphos (MW = 362.77)

QMS: confirmação da ocorrência usando íons característicos.

Características

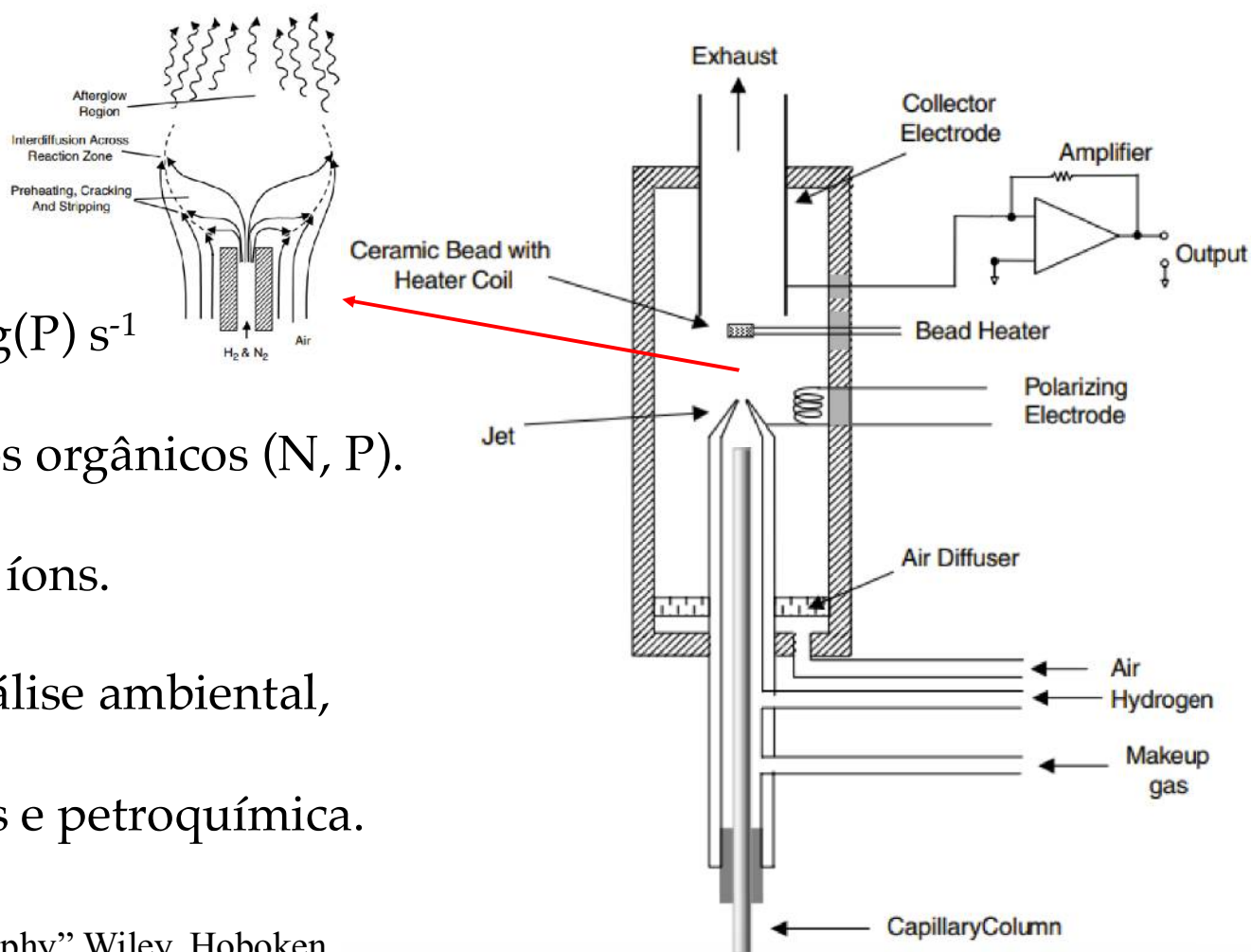
- Faixa linear.
- Sensibilidade (razão sinal/ ruído).
- Seletividade (universal vs. seletivo).
 - Análise de uma mistura complexa contaminada com 10 pesticidas



- Detectores
 - Detecção Termoiônica, Detector Nitrogênio-Fósforo (NPD)

Características

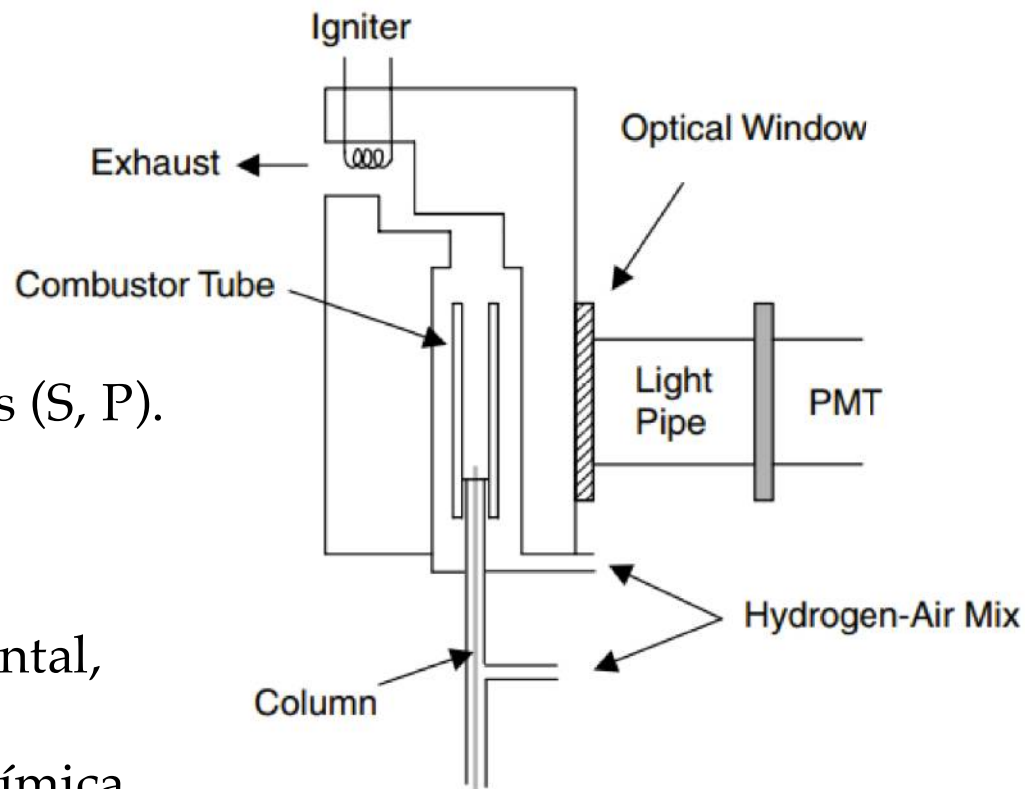
- Faixa linear: 10^4
- LOQ: 1 pg(N) s^{-1} ; $0,5 \text{ pg(P) s}^{-1}$
- Seletividade: compostos orgânicos (N, P).
- Princípio: produção de íons.
- Principal aplicação: análise ambiental, segurança de alimentos e petroquímica.



- **Deteccção por Fotometria de Chama (FPD)**

Características

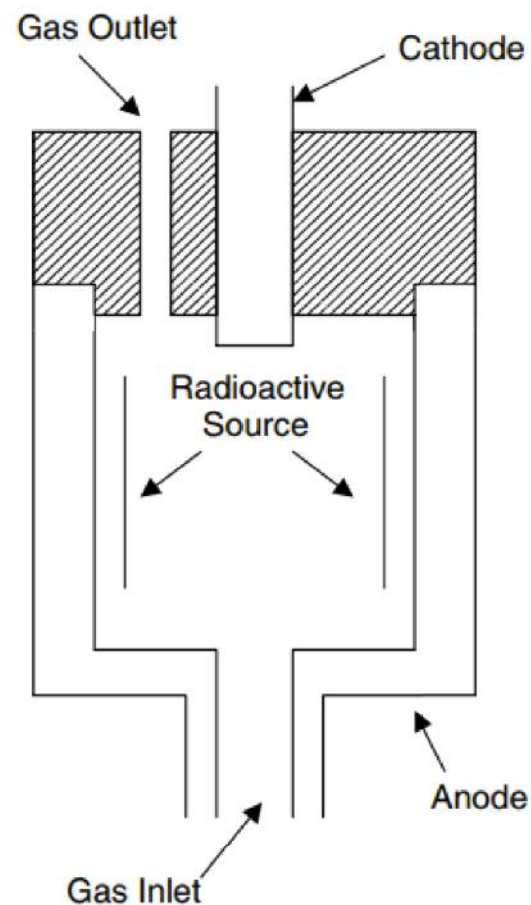
- Faixa linear: 10^3
- LOQ: 50 pg(S) s^{-1} ; 2 pg(P) s^{-1}
- Seletividade: compostos orgânicos (S, P).
- Princípio: emissão de fótons.
- Principal aplicação: análise ambiental, segurança de alimentos e petroquímica.



- **Deteccção por Captura de Elétrons (ECD)**

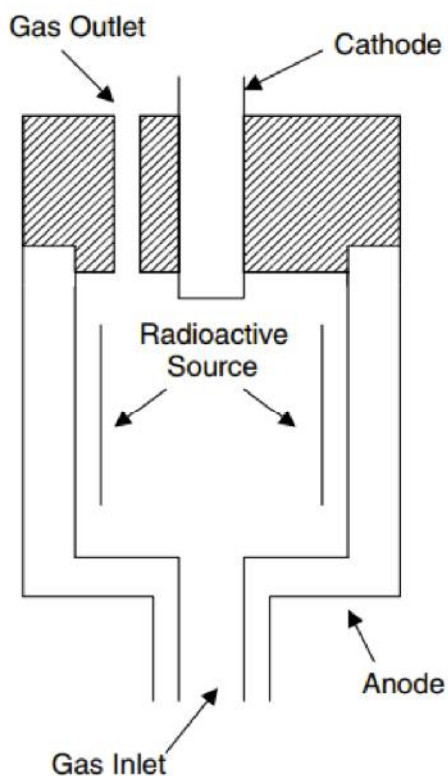
Características

- Faixa linear: 10^4
- LOQ: 10 fg s^{-1} .
- Seletividade: compostos eletrofílicos.
- Princípio: captura de elétrons.
- Principal aplicação: análise ambiental, segurança de alimentos.

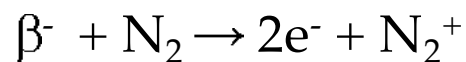
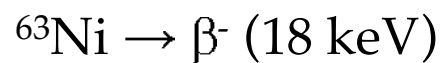


Grob "Modern Practice of Gas Chromatography" Wiley, Hoboken.

Características



- Gás de arraste e gás de make-up: N_2



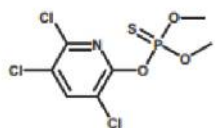
- Cátodo: coleta majoritariamente elétrons.
- Similar à Lei de Beer.

Grob "Modern Practice of Gas Chromatography" Wiley, Hoboken.

Cuidado com a análise por classes

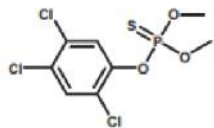
64

6



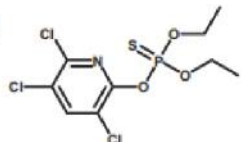
Chlorpyrifos methyl (MW = 322.54)

8



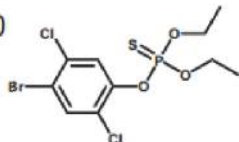
Fenchlorphos (MW = 321.55)

12



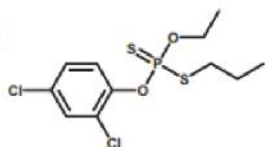
Chlorpyrifos (MW = 350.59)

20



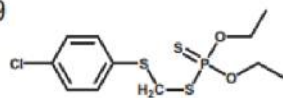
Bromophos ethyl (MW = 366.0)

24



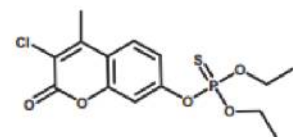
Prothiophos (MW = 345.25)

29

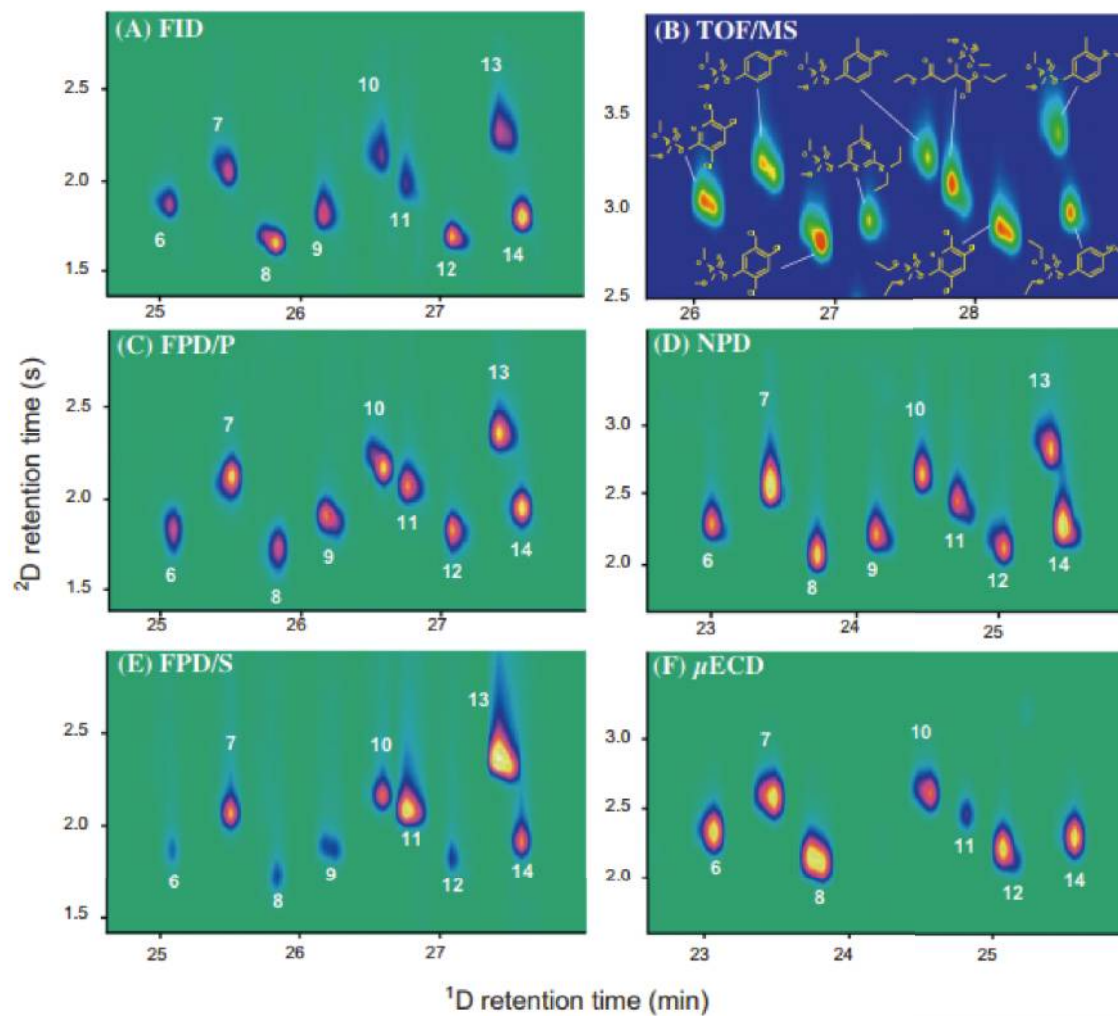


Carbophenothion (MW = 326.74)

41



Coumaphos (MW = 362.77)

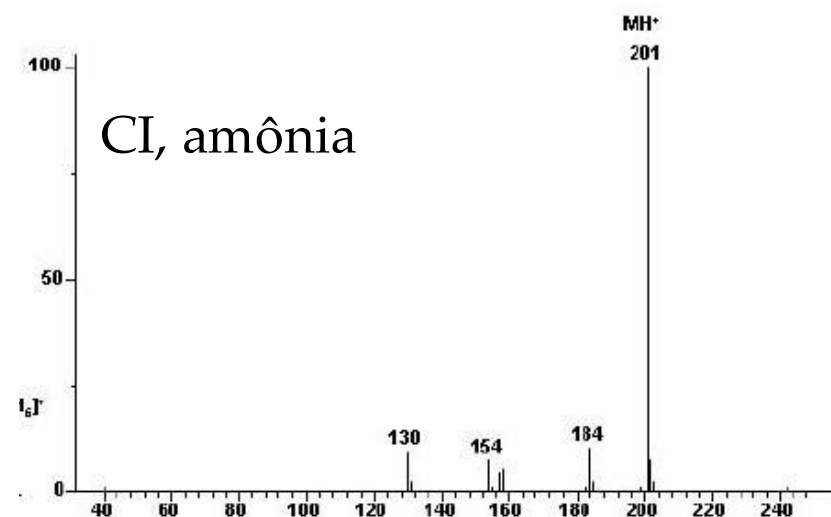
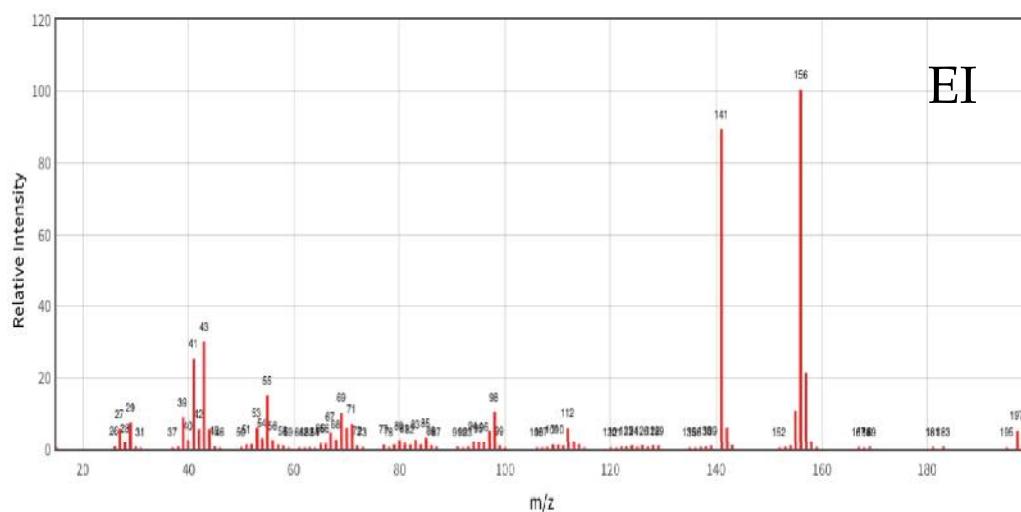
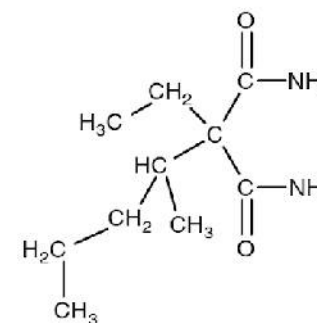


Engel et al. J. Chromatogr. A 2013 1311 140.

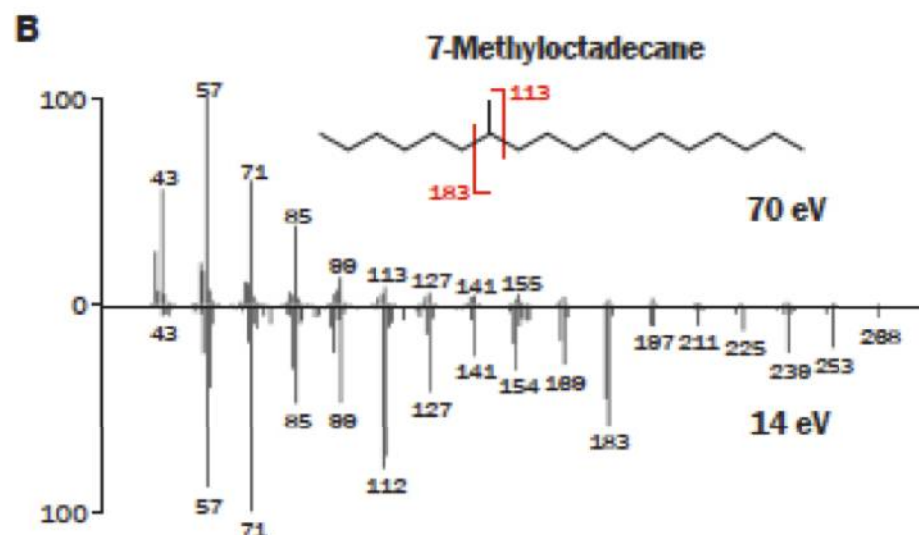
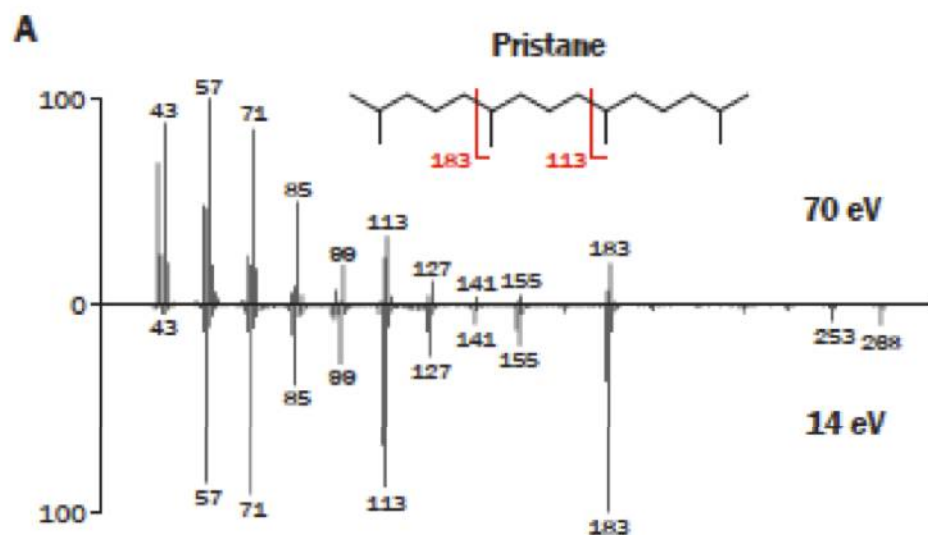
- **Análise direcionada / targeted**

Técnicas de ionização mais comuns

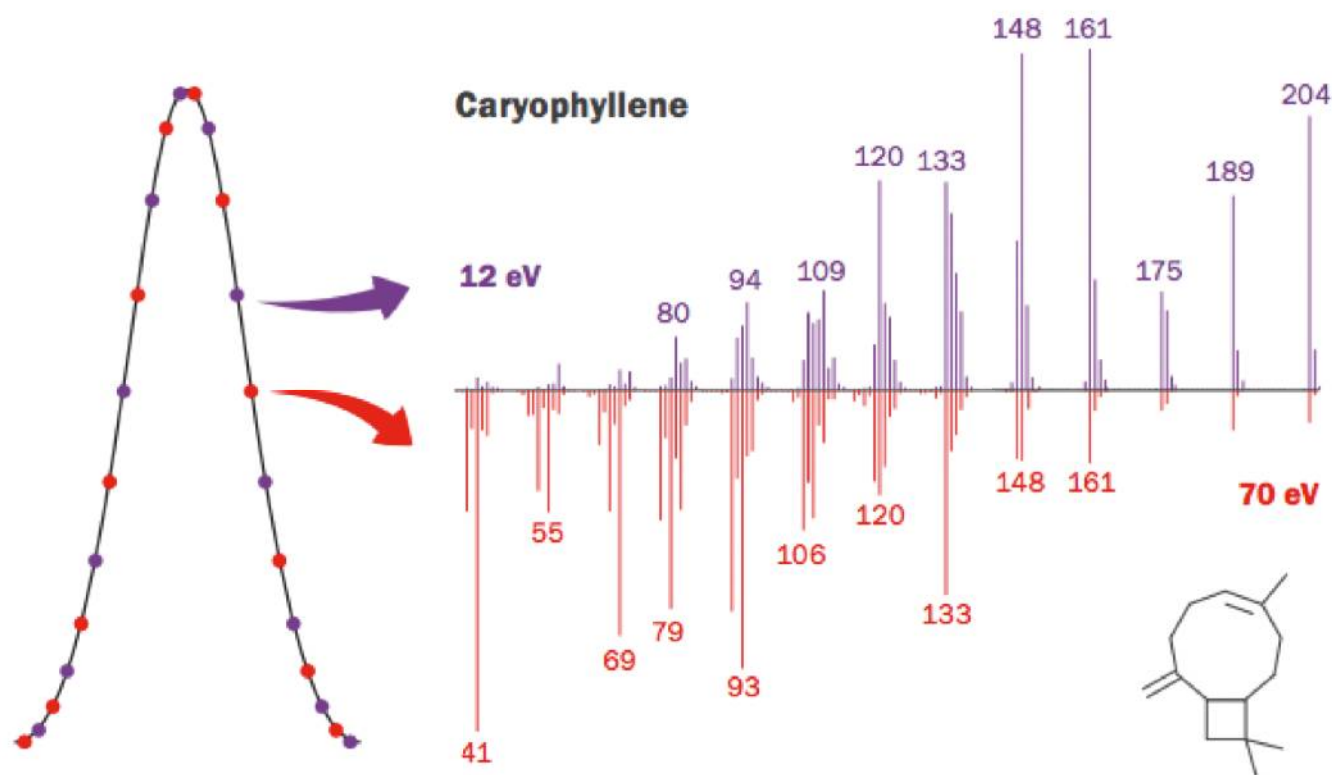
- Ionização por elétrons (EI).
- Ionização química (CI)



Ionização por elétrons (EI)

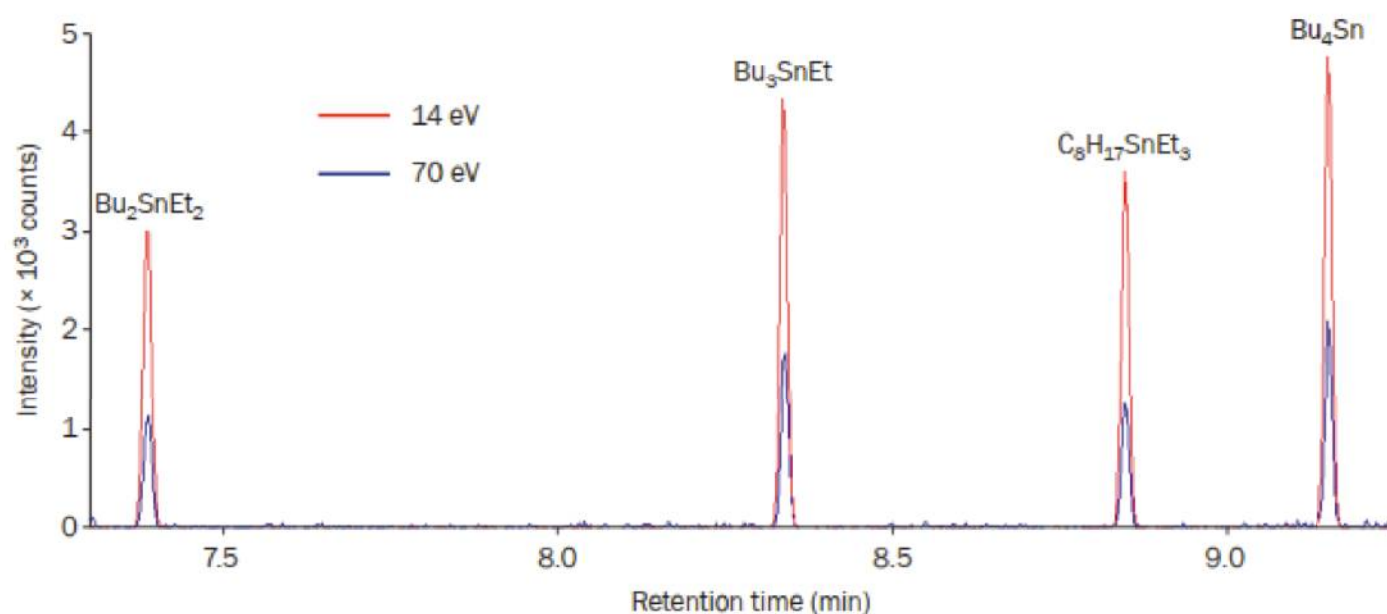


Ionização por elétrons (EI)

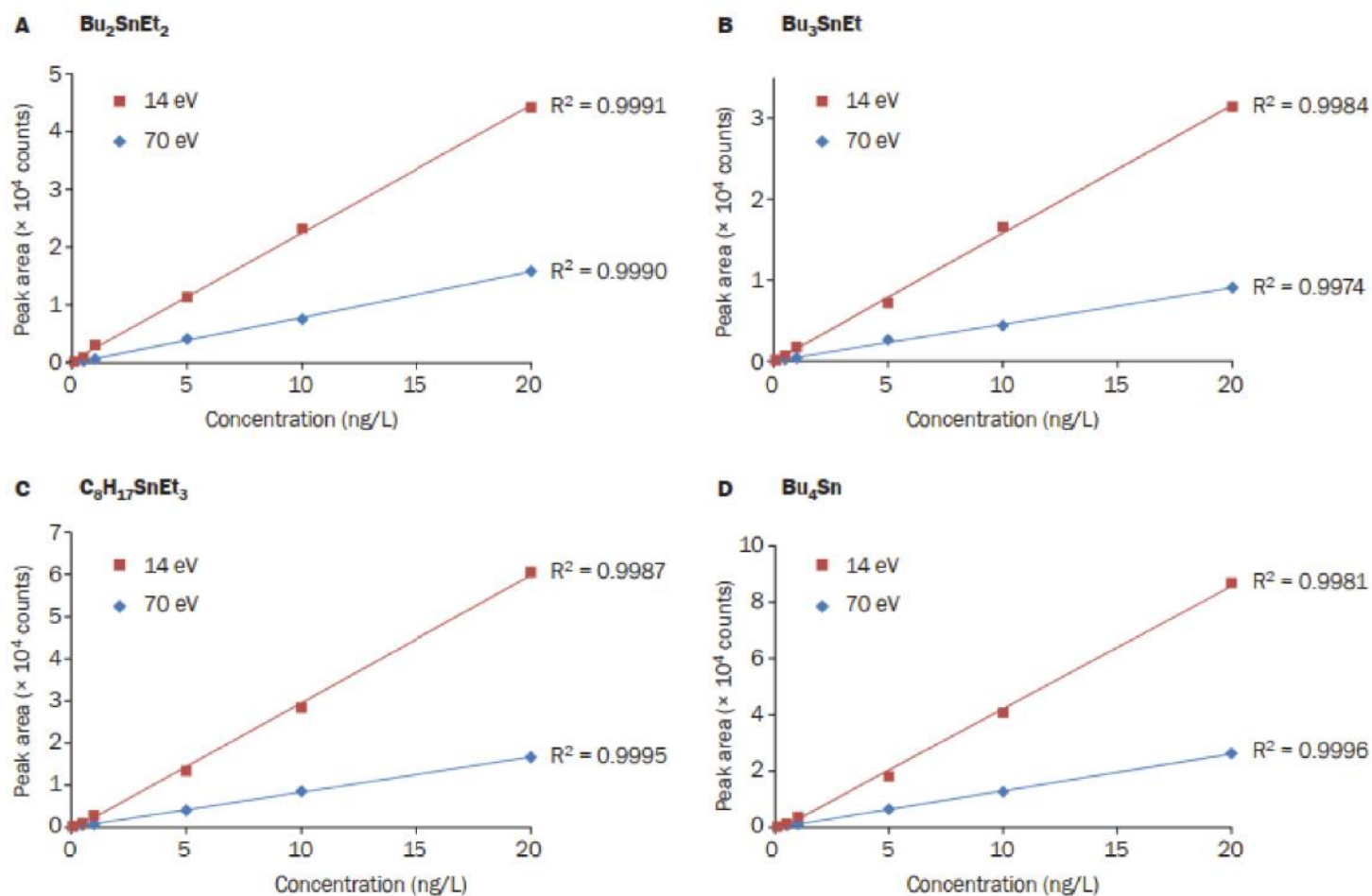


- Tandem ionization

Ionização por elétrons (EI)

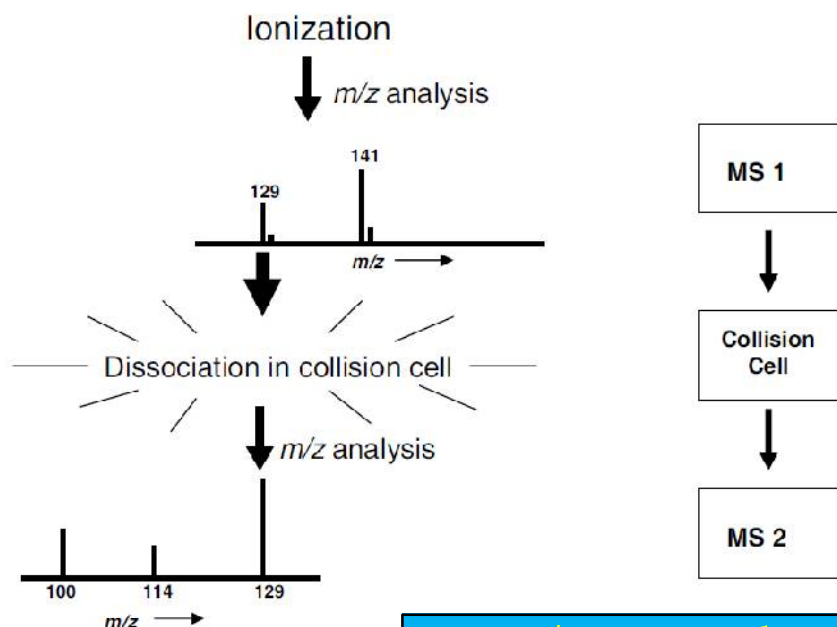


- EI @ 70 eV: análise qualitativa usando bibliotecas de espectro de massa
- Soft EI: análise quantitativa, confirmação de íon molecular (quando presente)

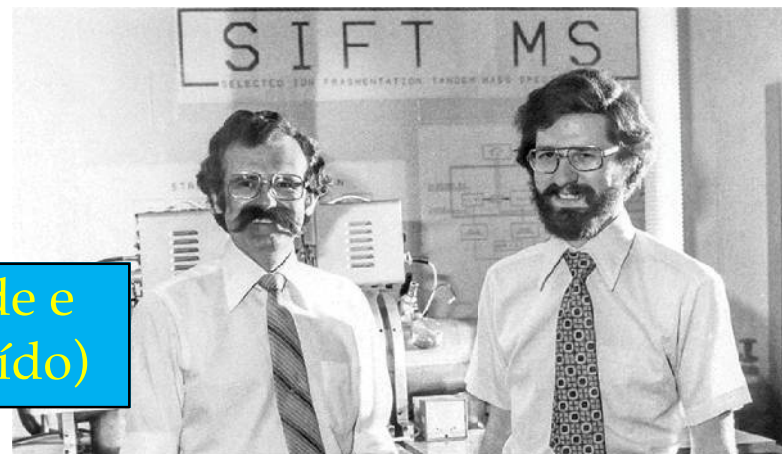


Experimentos com MS/MS (QqQ)

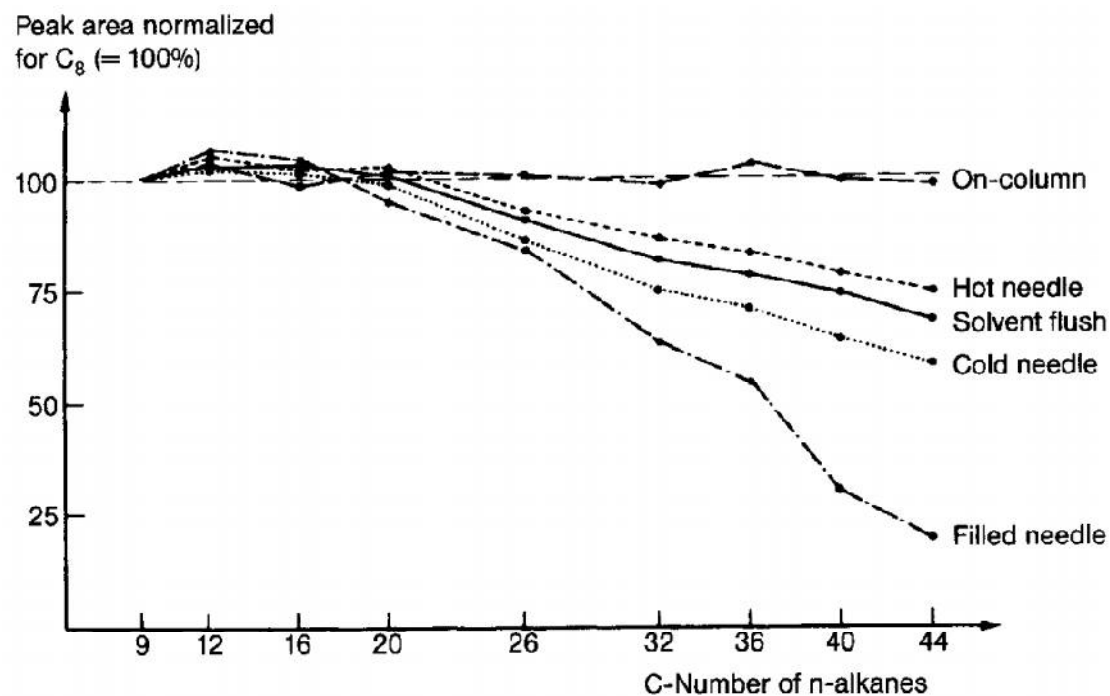
- Espectro de íons produto;
- Espectro de íons precursor;
- Espectro de perda neutra constante;
- Espectro de reações múltiplas.



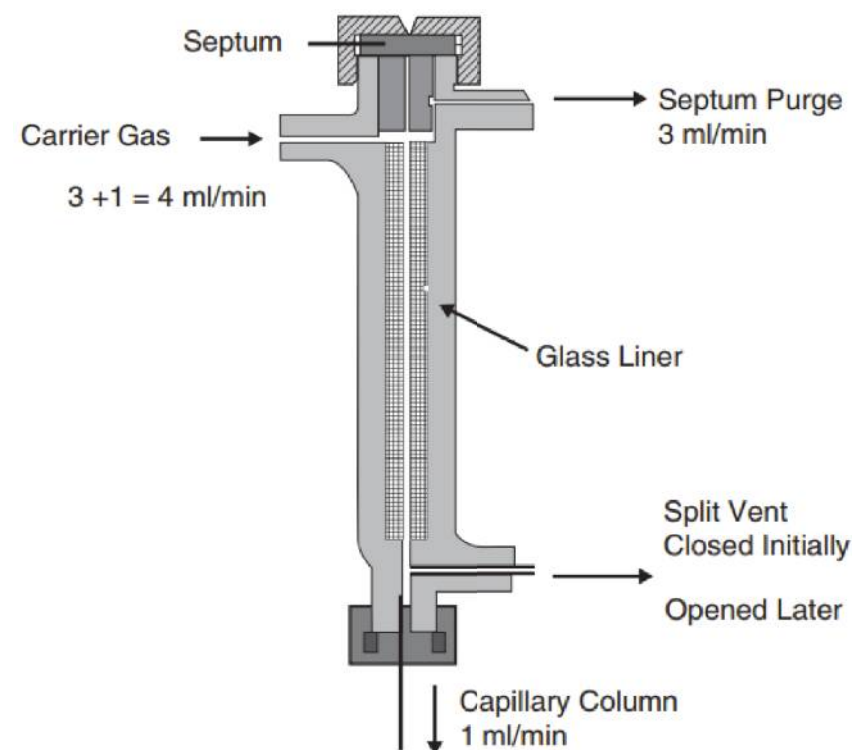
MS/MS: ganho em sensibilidade e 'sensibilidade' (relação sinal/ruído)



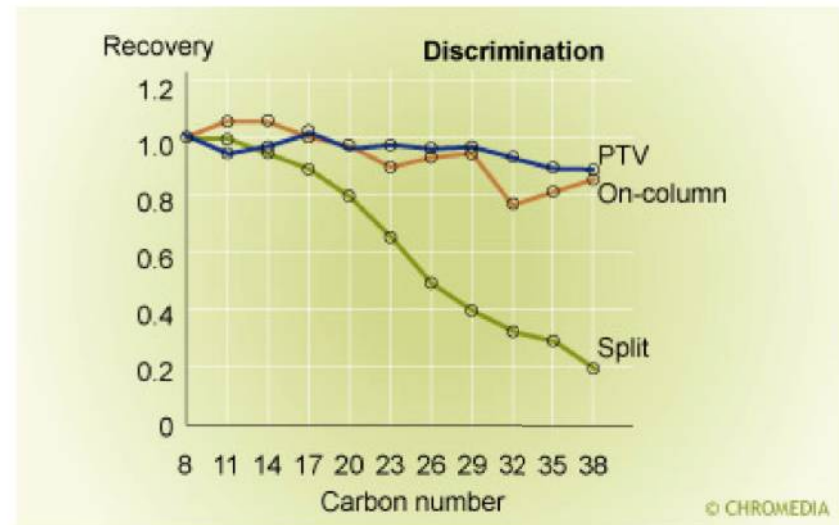
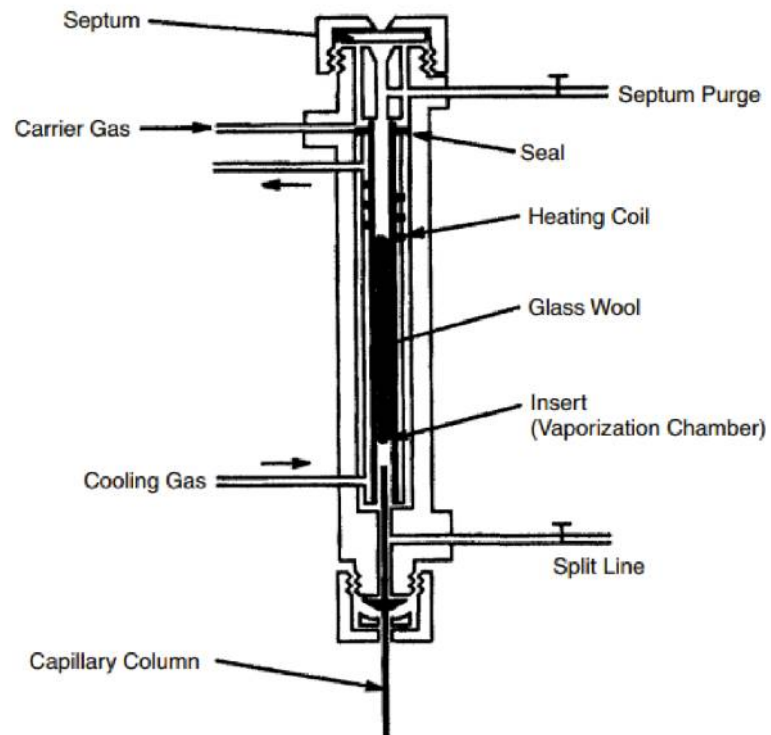
- **Dica: sistema de injeção**



Injetor split/splitless: discriminação em função de forma de injeção.



Injetor com programação de temperatura (PTV):



Injetor com programação de temperatura:



- Sistemas multi-modo são compatíveis com os principais fabricantes (Thermo, Agilent, Shimadzu).
- Flexibilidade operacional:
 - Vaporização “seletiva do solvente”: large volume injection (LVI).
 - Derivação de analitos no injetor.
 - Introdução de amostras líquidas, viscosas e sólidas.



A - Split



B - Splitless (Efeito solvente)



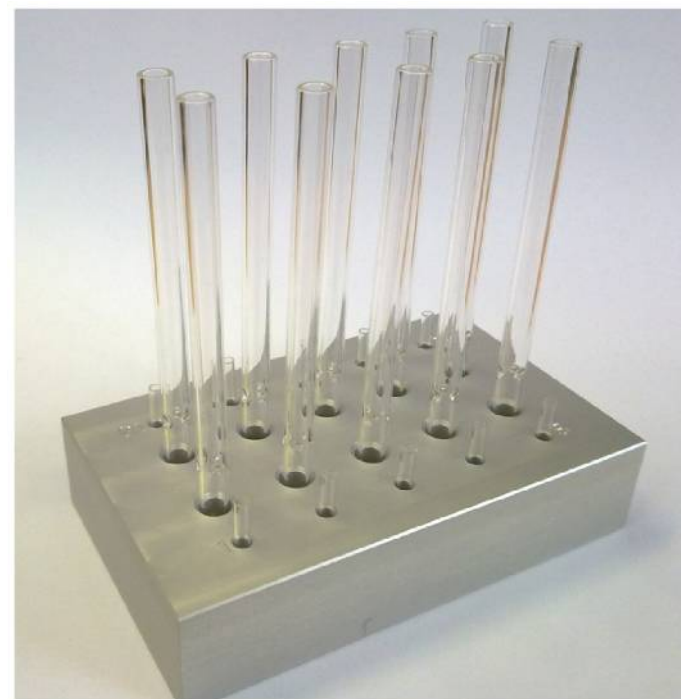
C - LVI



D – Sólidos, líquidos, TD



etc

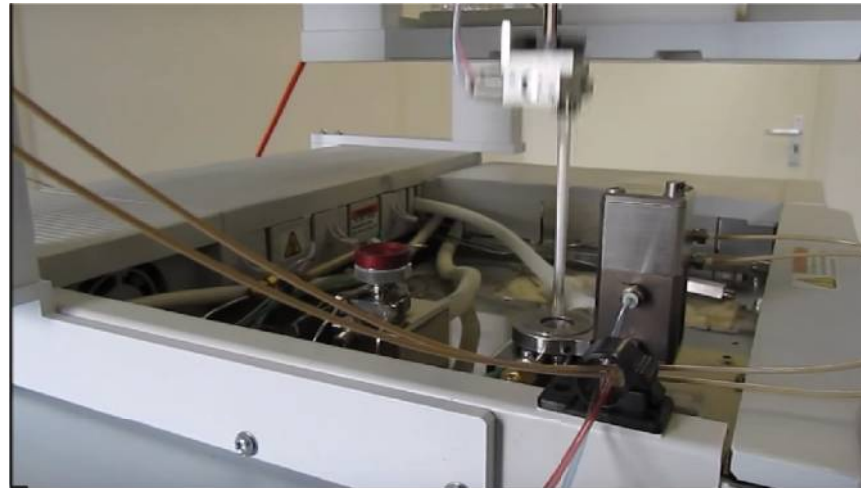
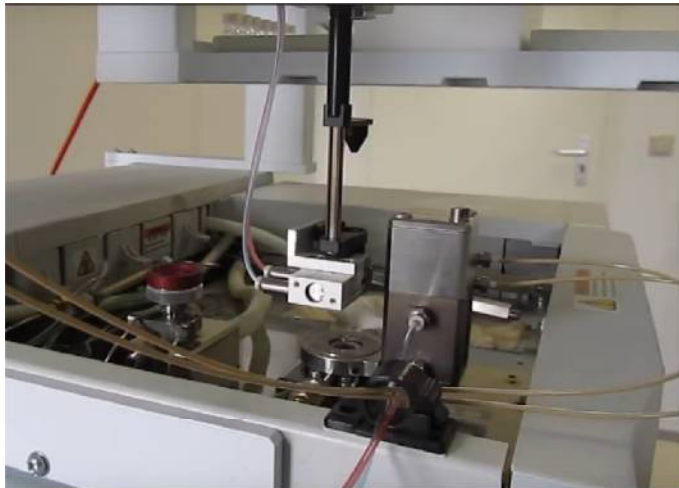


Injetor multimodo

77



- Aumento de sensibilidade (LVI).
- Discriminação de injeção negligenciável.
- Eliminação do efeito de memória.
- Redução da degradação de pesticidas termolábeis.



Muito obrigado!

