

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA FLORPYRAUXIFEN-BENZYL POR UHPLC-MS/MS

**DANTE BERGMANN ELIAS¹; BRUNA CHRISTOFARI CEOLIN²; BIANCA
CAMARGO ARANHA³; EDINALVO RABAOLI CAMARGO⁴**

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – dantebelias@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– brunacceolin@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – biancacamargoaranha@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas– edinalvo_camargo@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O arroz é cultivado e consumido em todos os continentes. O cereal destaca-se pela produção e área cultivada, além de desempenhar papel estratégico tanto no aspecto de valor econômico, social e fazer parte da dieta alimentar de grande parte da população mundial (SILVA, O. F. da; FERREIRA, C. M.; WANDER, A. E., 2021). No Brasil, o Rio Grande do Sul se destaca por ser o maior produtor desse grão, com grande parte da produção concentrada na metade Sul do estado (CONAB, 2015). No entanto, segundo dados do Boletim da safra 2021/2022 da CONAB, o Rio Grande do Sul apresentou uma redução de área, em virtude da menor rentabilidade em relação às culturas concorrentes e do incremento significativo nos preços dos insumos.

As plantas daninhas são as principais responsáveis pela redução na produtividade de grãos na cultura do arroz, podendo alcançar 80 a 90% de redução na ausência de um manejo eficiente no controle dessas espécies. O controle químico é o método mais amplamente utilizado, em decorrência da alta eficiência e praticidade (Andres & Machado, 2004). No ano de 2019, foi registrado no MAPA o herbicida Loyant® (florpyrauxifen) de ação sistêmica e pertencente à classe dos mimetizadores de auxina, seletivo para acultura do arroz, possuindo um amplo espectro no controle de plantas daninhas, inclusive a biótipos resistentes a outros mecanismos de ação (MILLER, NORSWORTHY & SCOTT, 2017).

Em virtude da proximidade com culturas adjacentes sensíveis aos herbicidas hormonais, tem-se uma preocupação quanto à ação do herbicida no ambiente. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), embora tenha autorizado a comercialização desse insumo, não estabeleceu instruções no que diz respeito à metodologia de extração e quantificação de resíduos desse composto como forma de monitoramento ambiental (VIEIRA, L. H. S. et. al. 2022). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver um método para quantificação da moléculado herbicida florpyrauxifen-benzyl através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS).

2. METODOLOGIA

Reagentes e preparo da solução analítica

Ossolventes utilizados foram metanol grau HPLC (Honeywel, EUA), acetonitrilagrua HPLC (Dinâmica, Brasil), ácido fórmico 98%, P.A. (Neon, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Direct Master System MS2000 ALL (Gehaka, Brasil). Padrão analítico do herbicida florpyrauxifen-

benzyl (FPB) foi obtido da Dr. Ehrenstorfer™ (LGC, Alemanha) com grau de pureza de 98,37%.

Solução estoque do FPB foi preparada na concentração de 100 mg L^{-1} e armazenadas em frascos âmbar a -20°C . A partir da solução estoque elaborou-se solução de trabalho na concentração de 1000 µg L^{-1} .

Condições analíticas de cromatografia e espectrometria de massas

Para o desenvolvimento do método, utilizou-se sistema UHPLC-MS/MS, modelo Q-Exactive Focus, equipado com espectrômetro de massas Quadrupolo-Orbitrap, com amostrador automático Dionexultimate 3000 e sistema de aquisição de dados Trace Finder (ThermoScientific, EUA).

Os parâmetros de espectrometria de massas foram otimizados pela infusão direta do padrão analítico de FPB na concentração de 200 µg L^{-1} em acetonitrila, preparada a partir da solução de trabalho. A otimização dos parâmetros foi realizada pela seleção do íon precursor $[M+H]^+$ 439.04223 no modo SIM gerado por eletronebulização no modo positivo em fonte ESI. Os fragmentos gerados foram monitorados pela varredura do íon produto no qual a energia de colisão foi variada objetivando determinar as melhores condições de detecção.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Accucore C18 (dimensão $100 \times 2,1 \text{ mm}$; partícula $2,6 \text{ µm}$ - ThermoScientific) na temperatura de 40°C e fluxo de $0,400 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de 10 µL . Gradiente de eluição e fases móveis foram otimizados buscando melhores características de resolução de pico e sinal analítico.

Validação do método

Na validação foram avaliados parâmetros de seletividade, linearidade e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A seletividade foi avaliada a partir da comparação dos cromatogramas do solvente (branco) com uma amostra fortificada na concentração de 20 µg L^{-1} . A linearidade (faixa linear da curva analítica) foi averiguada em função do coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,99$) através da injeção em duplicata de curva padrão nas concentrações de 1; 5; 10; 15; 20 e 25 µg L^{-1} preparada a partir da solução de trabalho. LOD foi determinado pelo menor ponto da curva considerando razão sinal/ruído ($S/N \geq 10$) e LOQ foi determinado a partir da equação a seguir: $\text{LOD} = \text{LOQ}/3,33$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização dos parâmetros de espectrometria de massas

A partir da infusão do padrão de FPB na concentração de 200 µg L^{-1} em acetonitrila, foi possível otimizar as melhores condições de ionização e fragmentação do herbicida. As características físico-químicas do FPB indicam insolubilidade em água e alta afinidade por solventes orgânicos (SILVA, K. S.), optando-se assim analisá-lo em solução de acetonitrila. O íon precursor foi monitorado no modo de ionização positivo. As características químicas da molécula que por ser composta por nitrogênio em sua estrutura é passível de ser protonada, sendo assim indicada eletronebulização no modo positivo de ionização. Os parâmetros na fonte de ionização HESI foram: temperatura do

capilar em 350°C; vazão do gás da bainha em 30 L h⁻¹; vazão do gás auxiliar em 10 L h⁻¹; voltagem do spray de 3.500 V. Quanto aos parâmetros de escaneamento selecionou-se uma resolução 35.000 e energia de fragmentação de 20; 30 e 50 eV. Ao utilizar um sistema MS/MS, as condições da fonte de ionização e analisador de massas devem ser otimizadas, a fim de obter um melhor resultado na análise das massas dos íons precursores e produtos. O íon precursor e produtos monitorados para o herbicida FPB podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Características químicas, íon percurso e produtos para Florpyrauxifen-benzyl.

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Massa exata	Íon precursor	Íons produtos
FPB*	C ₂₀ H ₁₄ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₃	439.2400	438.0344	439.04223	225.0428; 263.0831; 291.2316; 376.2595; 377.2627

*Florpyrauxifen-benzyl; nome IUPAC: 4-amino-3-cloro-6-(4-cloro-2-fluoro-3-metoxifenil)-5-fluoropiridina-2-carboxylic acid.

Durante o desenvolvimento do método para determinação do herbicida FPB buscou-se otimizar as melhores características de separação combinadas com a detecção dos íons no espectrômetro de massas. As fases móveis utilizadas no modelo experimental consistiram da combinação de água com solventes orgânicos (metanol ou acetonitrila), contendo ou não os aditivos ácido fórmico e formiato de amônio (dados não mostrados). A mistura de aditivos na fase móvel quando se utiliza o detector espectrômetro de massas e fonte de ionização tem o intuito de favorecer o processo de ionização dos analitos.

Os resultados indicaram que a melhor combinação de fase móvel foi composta por A) solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição ficou programado com início em 10% B até 0,5 min, aumentando para 100% B aos 4 min, mantendo-se em modo isocrático em 100% B dos 4 aos 6 min, seguido para 10% B em 6,5 min e finalizando em 10% B aos 7 min. O tempo de retenção do composto foi de 4,68 min. Dos parâmetros de validação, o método foi seletivo, a faixa linear trabalhada foi entre 1 e 25 µg L⁻¹, com R² de 0,9939 e LOD e LOQ foram respectivamente 0,33 e 1 µg L⁻¹.

Os resultados demonstraram que o uso do metanol como fase móvel B, independente do uso de aditivo, resultou em uma boa ionização do herbicida, porém apresentou menor eficiência cromatográfica com pico mais disperso (Figura 1). Nos cromatogramas, é possível observar que a adição de ácido fórmico em ambas as fases móveis, água e acetonitrila, aumentou o sinal do íon [M+H]⁺ pela redução do pH, o que facilita a ionização no modo positivo na fonte de ionização. No entanto, o uso do formiato de amônio não demonstrou influência na ionização do composto (Figura 1). No desenvolvimento de um método cromatográfico, a composição da fase móvel influencia significativamente o sinal analítico e a adequada separação desses (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2014). Os testes desenvolvidos geram informações importantes para estudos posteriores na determinação do herbicida, considerando que existe pouca literatura que aborde métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para o herbicida florpyrauxifen-benzyl.

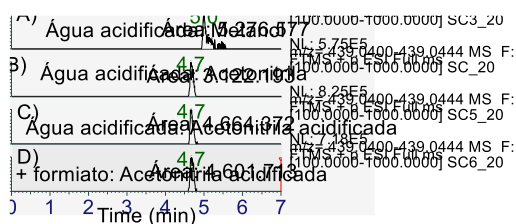


Figura 1. Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS para o herbicida florpiauxifen-benzyl em diferentes fases móveis.

4. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver um método para determinação e quantificação do herbicida florpiauxifen-benzyl por UHPLC-MS/MS. Adicionalmente, mais estudos devem ser realizados com a finalidade de desenvolver um protocolo de extração adequado e testar o efeito da matriz nos parâmetros do método desenvolvido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. **Plantas daninhas em arroz irrigado. Boletim da Safra de Grãos CONAB** (<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>).
- Boletim Grãos Agosto 2015 – Conab** / <https://www.conab.gov.br>
- JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. **Cromatografia líquida de alta eficiência.**
- GUIMARÃES, C. M.; PRABHU, A. S.; CASTRO, E. da M. de; FERREIRA, E.; COBUCCI, T.; YOKOYAMA, L. P.- **Cultivo do arroz em rotação com soja.**
- Luis Henrique Silveira (2022) **_ OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DO HERBICIDA FLORPIRAUXIFEN-BENZIL EM AMOSTRAS DE ÁGUA**
- Miller MR, Norsworthy JK (2018) **Influence of soil moisture on absorption, translocation, and metabolism of florpiauxifen-benzyl**
- Osmira Fatima da Silva, Alcides Wander e Carlos Magri Ferreira - **CULTIVO DE ARROZ: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL**
- SILVA, K. S. - <https://weedout.com.br/florpirauxifen-benzil/>