

Avaliação da eficiência de métodos de extração de tembotrione, mesotrione e metabólito em solo de várzea pela técnica de UHPLC-MS/MS

LUCAS FERRAZ BRAATZ¹; BIANCA CAMARGO ARANHA²; MARCUS VINÍCIUS FIPKE²; EDINALVO RABAIOLLI CAMARGO³

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – lucasferrazbraatz2000@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – biancacamargoaranha@gmail.com; marfipke@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas 3 edinalvo_camargo@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Herbicidas inibidores da biossíntese de carotenoides, como tembotrione e mesotrione, inibem a enzima hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), são graminicidas e latifolicidas, usados principalmente no controle em pós-emergência das plantas daninhas na cultura do milho, além de oferecerem atividade residual no solo. A enzima HPPD é chave na síntese de plastoquinona, e sua inibição causa o branqueamento de novos tecidos formados. Esses sintomas resultam da inibição indireta da síntese de carotenoides devido ao fato de a plastoquinona ser um cofator enzimático da fitoeno desaturase (SHANER; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 2014).

A degradação dos herbicidas no ambiente é influenciada por variáveis químicas, físicas e biológicas do solo (LOURENCETTI; DE MARCHI; RIBEIRO, 2008). Solos com altos teores de matéria orgânica e de pH, apresentam uma degradação mais rápida das moléculas herbicidas, devido à maior atividade microbiana. Solos com baixos teores de argila também têm uma degradação mais acelerada, pois a menor sorção dos herbicidas nos colóides do solo torna as moléculas mais suscetíveis à degradação e à lixiviação (SILVA et al., 2019).

Em virtude do ingresso de culturas de sequeiro em terras baixas, como é o caso do milho, tem-se uma preocupação quanto à ação dos herbicidas tembotrione e mesotrione no ambiente, pois são comumente utilizados na cultura. Visto que, os mesmos podem apresentar fitotoxicidade nas culturas subsequentes devido ao efeito *carryover*. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi selecionar um método eficiente de extração para quantificação das moléculas dos herbicidas tembotrione, mesotrione e seu metabólito ácido 2-amino-4-metilsulfonilbenzóico (AMBA) através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) em solos de várzea.

2. METODOLOGIA

Reagentes e materiais

Os solventes e reagentes de fase móvel e extração foram hidróxido de amônio 35%, para LC (Acros Organics®), ácido fórmico 98-100%, para LC (LiChropur, Merck®), ácido acético 100%, para LC (LiChropur, Merck®), acetonitrila, para LC (LiChrosolv, Supelco®) e água ultrapura (Direct-Q 3 UV, Milli-Q®).

Padrões analíticos de alta pureza de tembotrione (99,1%), mesotrione (99,8%) e AMBA (99,8%) foram adquiridos na Sigma-aldrich®. Solução estoque dos padrões analíticos foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ em acetonitrila. A partir da solução estoque elaborou-se uma solução de trabalho em mistura, estando cada composto na concentração de 1000 µg L⁻¹ em acetonitrila.

Instrumentação e condições analíticas

O método cromatográfico foi desenvolvido em sistema UHPLC-MS/MS, modelo Q-Exactive Focus, equipado com espectrômetro de massas Quadrupolo Orbitrap, com amostrador automático Dionex UltiMate 3000 e sistema de aquisição de dados Trace Finder (Thermo Scientific, EUA).

Os parâmetros de espectrometria de massas dos compostos foram otimizados pela infusão direta individual dos padrões analíticos na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, utilizando fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo para mesotrione e AMBA e no modo negativo para tembotrione. Os parâmetros ESI foram temperatura do capilar em 340°C ; vazão do gás da bainha em 40 L h^{-1} ; vazão do gás auxiliar em 12 L h^{-1} ; voltagem do spray de 4.000 V . Quanto aos parâmetros de escaneamento selecionou-se uma resolução 70.000 e energia de fragmentação de 20 ; 40 e 60 eV . A separação cromatográfica foi realizada em coluna Synchronis C18 (dimensão $50 \times 2,1 \text{ mm}$; partícula $1,7 \mu$ - Thermo Scientific, EUA) na temperatura de 40°C e fluxo de $0,300 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $5 \mu\text{L}$. As fases móveis consistiram em A – água ultrapura com $0,1\%$ ácido fórmico e B – acetonitrila com $0,1\%$ ácido fórmico e gradiente de eluição foi com as seguintes proporções: $0-0,5 \text{ min} - 5\% \text{ B}$; em $4,0 \text{ min} - 95\% \text{ B}$; em $5,5 \text{ min} - 95\% \text{ B}$; em $6,5 \text{ min} - 5\% \text{ B}$; e, finalizando em 8 min a $5\% \text{ B}$.

Procedimentos de extração

Inicialmente, 5 gramas de solo branco (sem residual de herbicidas) coletados da área de várzea da Fazenda Experimental da Palma – UFPEL, foram contaminados na concentração de 1 , 5 e 10 ppb em relação ao volume de solução extratora de cada método. Os solos foram submetidos aos diferentes métodos de extração, sendo eles:

Método 1 – Metodologia adaptada de Alferness e Wiebe, 2002. Cada amostra de solo (5 g) contaminada foi adicionada de 10 mL de solução extratora de hidróxido de amônio $0,05 \text{ M}$, posteriormente foram seguidas as recomendações do protocolo.

Método 2 – Essa metodologia de extração consistiu nas mesmas etapas propostas na metodologia anterior (método 1). Entretanto, utilizou-se 25 mL da solução extratora para 5 g de solo, seguindo a proporção $1:5$ amostras/solventes do método original proposto por Alferness e Wiebe, 2002.

Método 3 – Metodologia proposta por Pang, Wang e Hu, 2016. Os 5 g de solo foram adicionados de 2 mL de água, 10 mL de acetonitrila e $100 \mu\text{L}$ de ácido acético. Nesse método adicionou-se 1 g de cloreto de sódio e 2 g de sulfato de magnésio anidro para realização de uma extração líquido-líquido.

Método 4 – Metodologia proposta por Du et al., 2017. As amostras de solo foram adicionadas em 2 mL água e 5 mL de acetonitrila a 2% de ácido fólico. Cloreto de sódio (1 g) e sulfato de magnésio anidro (1 g), também foram utilizados nesse método de extração.

Posteriormente cada extrato foi transferido para frascos de vidro através de filtros nylon e as amostras foram injetadas em UHPLC-MS/MS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos 1 e 2, adaptados de Alferness e Wiebe 2002, consistem em uma extração por solução aquosa altamente alcalina, apresentado $\text{pH } 11,0$ que é

corrigido ao final da extração. No método 1, os valores de recuperação variaram de 43,8 a 151,7%, demonstrando ineficiência do método de extração para o tipo do solo (tabela 2), já que valores aceitáveis variam de 70,0 a 120,0%. O método 2 obteve valores de recuperação variando de 60,0 a 92,6%. Entretanto, para tembotrione e AMBA na concentração de 10ppb, os valores de recuperação não atingiram o mínimo necessário para validação do método de extração (tabela 2).

Tabela 2 – Recuperação (%) de tembotrione, mesotrione e AMBA e solos de várzea extraído pelos métodos 1, 2, 3 e 4.

Método	Concentrações	Recuperação (%)		
		tembotrione	mesotrione	AMBA
1	1ppb	71,1	43,8	151,7
	5ppb	59,5	75,9	62,2
	10ppb	87,6	53,4	129,5
2	1ppb	74,1	83,5	91,2
	5ppb	72,0	88,3	92,6
	10ppb	60,0	80,2	62,4
3	1ppb	105,8	104,7	103,2
	5ppb	78,8	74,5	83,6
	10ppb	74,5	70,7	79,7
4	1ppb	91,4	83,1	68,9
	5ppb	69,0	56,2	56,1
	10ppb	71,9	57,1	57,9

Os métodos 3 e 4 se baseiam pelo método de extração com solvente orgânico, que consiste em uma extração líquido-líquido pelo efeito *salting out*, promovendo a separação entre fases orgânica e aquosa em amostras biológicas, facilitando a extração de compostos hidrofílicos (GRECCO *et al.*, 2018). O método 3 apresentou os melhores resultados em termos de percentual de recuperação que variaram de 70,7% a 105,8%, todos dentro do intervalo considerado ideal. Observou-se que, à medida que as concentrações aumentaram, houve diminuição nos valores de recuperação o que não afetou a aceitabilidade do método. No método 4, os valores de recuperação variaram de 56,1 a 91,4% e mesmo sendo uma técnica semelhante ao método 3, valores de pH da solução de extração pode ter influenciado na eficiência da análise. Após aplicação dos herbicidas, grande parte do produto é direcionada ao solo. O comportamento dos herbicidas é influenciado por suas características físico-químicas, bem como pelas propriedades do solo e pelas condições ambientais (CURRAN, 2016). Solos de várzea, frequentemente sujeitos a alagamentos, apresentam alterações em suas condições físicas, químicas e biológicas, o que afeta a interação dos herbicidas tembotrione e mesotrione.

Embora a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seja uma técnica sensível e robusta para a detecção de moléculas em baixas concentrações, o método de extração é crucial para garantir que o composto de interesse presente no solo seja eficientemente transferido da matriz para a solução a ser analisada. Fatores como as características do solo, do solvente extrator e da molécula de interesse impactam diretamente na eficiência da extração e na confiabilidade dos dados obtidos.

4. CONCLUSÕES

O método 3 apresentou eficiência satisfatória de extração para quantificação das moléculas dos herbicidas tembotrione, mesotrione e o metabólito AMBA em solo de várzea.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFERNES P, WIEBE L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. **J Agric Food Chem**. 2002 Jul 3;50(14):3926-34. doi: 10.1021/jf011696y. PMID: 12083860.

CURRAN, William S. Persistence of herbicides in soil. **Crops & Soils**, v. 49, n. 5, p. 16–21, 2016. <https://doi.org/10.2134/cs2016-49-0504>.

DU P, WU X, XU J, DONG F, LIU X, WEI D, ZHENG Y. Determination and dissipation of mesotrione and its metabolites in rice using UPLC and triple-quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chem**. 2017 Aug 15;229:260-267. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.079. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28372172.

GRECCO, Caroline Fernandes; MIRANDA, Luis Felipe Cabral; CRUZ, Jonas Carneiro; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, n. 2, 2018. DOI 10.5935/sc.2018.006. Disponível em: <http://icweb.org/scientiachromatographica/2018-2/>. Acesso em: 9 out. 2024.

LOURENCETTI, Carolina; DE MARCHI, Mary Rosa Rodrigues; RIBEIRO, Maria Lúcia. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. **Talanta**, 14th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques. v. 77, n. 2, p. 701–709, 15 dez. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.013>.

PANG N, WANG T, HU J. Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chem**. 2016 Jan 1;190:793-800. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.081. Epub 2015 May 18. PMID: 26213040.

SHANER, Dale L.; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA (Orgs.). **Herbicide handbook**. Tenth edition. Lawrence, KS: Weed Science Society of America, 2014.

SILVA, E. M. G.; FARIA, A. T.; MARULANDA, N. M. E.; PEREIRA, G. a. M.; SARAIVA, D. T.; REIS, M. R.; SILVA, A. A. Tembotrione Half-Life in Soils with Different Attributes. **Planta Daninha**, v. 37, p. e019179833, 9 set. 2019. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100074>.