

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 coloides 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 µg L⁻¹ em acetonitrila, utilizando fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo para mesotriione e AMBA e no modo negativo para tembotriione. 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 Syncronis C18 (dimensão 50x2,1 mm; partícula 1,7 µ - Thermo Scientific, EUA) na temperatura de 40°C e fluxo de 0,300 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL. 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 min – 5% B; em 4,0 min – 95% B; em 5,5 min – 95% B; em 6,5 min – 5% B; e, finalizando em 8 min a 5% 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 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 µL 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 (1g) e sulfato de magnésio anidro (1g), 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, apresentando 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

ALFERNESS 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://iicweb.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>.