

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ABAMECTINA EM RAIZ DE SOJA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

Palavras-Chave: Abamectina, HPLC-MS/MS, QuEChERS

JEFERSON DOS SANTOS JUNIOR - IQ UNICAMP

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a CARLA BEATRIZ GRESPAN BOTTOLI - IQ UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Abamectina é um composto químico da classe das avermectinas, que são lactonas macrocíclicas que mostram eficácia na utilização para o controle de pragas na agricultura^[1]. Nas culturas de soja a Abamectina é utilizada para o controle de diversas pragas, em especial *Tetranychus urticae* (Ácaro rajado)^[2] e fitonematoides como *Pratylenchus brachyurus* (Nematoide das Lesões) e *Meloidogyne javanica* (Nematoide das Galhas)^[3]. Como mostrado na figura 1, as formas B1a e B1b diferem entre si pelo radical alquila genericamente representado por R.^[4]

O interesse em determinar a abamectina em raízes da soja se deve à perspectiva em conhecer o processo de translocação dos agrotóxicos nas plantas para compreensão dos mecanismos de ação das substâncias.

Nos processos que envolvem os equilíbrios dentro da planta, o metabolismo é transportado pelas membranas e pelo sistema vascular, seguindo os princípios de leis físico-químicas que regem as transformações químicas e energéticas. No entanto, no que diz respeito ao transporte de produtos químicos, como os agrotóxicos, por exemplo, as plantas desenvolveram um sistema peculiar em seu metabolismo. Com isso, desperta na comunidade científica um interesse pelo estudo de métodos sobre absorção de agrotóxicos e seu destino dentro das plantas, pois são assuntos de interesses de natureza econômica e ecológica. A permeabilidade de produtos químicos pelas membranas e o desenvolvimento de métodos que os identifiquem e quantifiquem são necessários para indicar as concentrações e degradação desses compostos. É um desafio obter informação sobre a translocação de agrotóxicos, informação de suma importância para indicar o acesso que é desencadeado dentro da planta; se a concentração aplicada atinge o alvo, seja ele uma praga e/ou doença; ou se a concentração aplicada contamina o fruto.

Na literatura encontrou-se métodos para a determinação de avermectinas em diversas culturas. Porém, não foi encontrado nenhum método para a determinação do teor deste composto na raiz de soja. Portanto, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método para a determinação de abamectina em raízes de soja empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS).

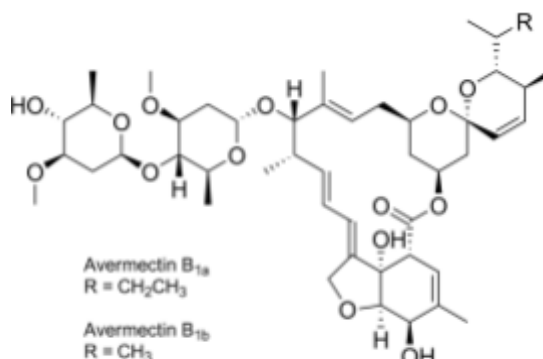


Figura 1- Fórmula estrutural da Abamectina

O método selecionado para o preparo de amostras foi o método *QuEChERS* (lê-se *catchers*), cujo nome é uma sigla em Inglês para (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Inicialmente, o método foi proposto em 2003 por Anastassiades *et al.* para a extração de agrotóxicos em diferentes amostras, de modo a desenvolver uma análise multirresíduo de defensivos agrícolas^[5]. Este método baseia-se em 3 etapas principais: extração com acetonitrila, partição por adição de sais e limpeza do extrato. Na primeira etapa, a acetonitrila é empregada para minimizar a extração de interferentes provenientes da amostra, além de proporcionar extração de analitos de diferentes polaridades e ser compatível com HPLC/MS-MS^[6]. Na etapa de partição, adiciona-se sais com diferentes funções ao sistema. A adição de sais de sódio (como cloreto de sódio) visam promover o efeito de “*salting out*” ao auxiliar na separação de fases sem diluir o extrato, enquanto a adição de sais secantes (como sulfato de magnésio) visa aumentar a recuperação dos compostos polares, além de remover água do sistema diminuindo o volume da fase aquosa. Na etapa de limpeza do extrato (*cleanup*), é utilizado um sorvente, como o PSA, que atua como um filtro químico ao reter coextrativos da matriz amostral. Como o sorvente é adicionado diretamente no sistema, a limpeza do extrato é efetiva e utiliza pouca quantidade de sorvente^[6].

METODOLOGIA:

Plantio da Soja

Amostras comerciais de sementes de soja foram adquiridas e plantadas em vasos de plástico e colhidas após cerca de 30 dias. O conteúdo dos vasos foi retirado e as raízes da soja foram reservadas para a utilização. O procedimento foi repetido duas vezes ao longo do projeto para suprir as necessidades de volume de amostra.

Preparo de amostra

A fim de testar alternativas para otimizar a resposta analítica da abamectina, além do método original proposto por Anastassiades *et al.*^[5], foram testadas pequenas modificações nos procedimentos de extração:

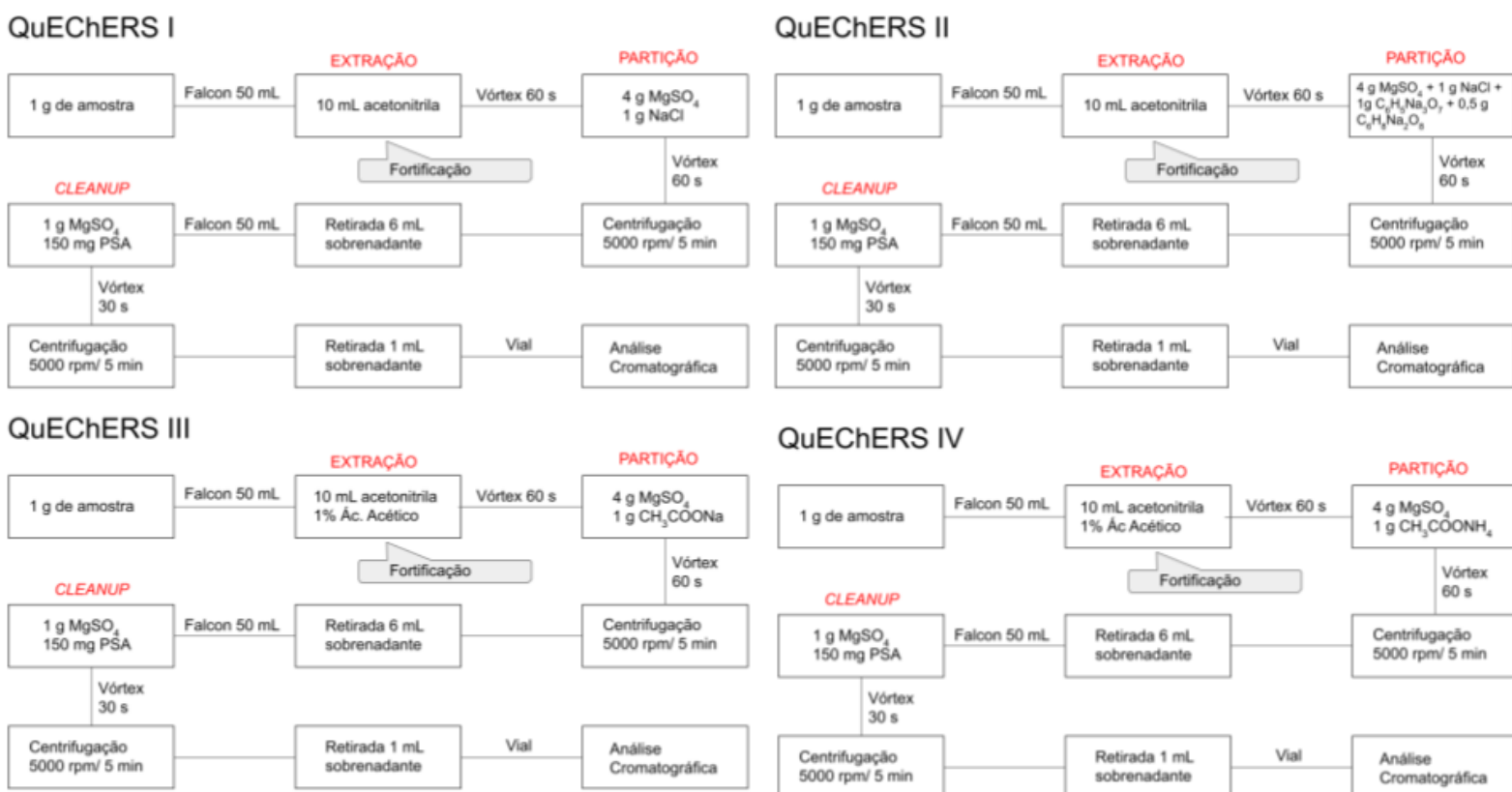


Figura 2: Procedimentos de preparo de amostras propostos com base no método *QuEChERS*

Os quatro métodos propostos foram testados em triplicata e o método com a melhor recuperação da abamectina nas raízes da soja foi selecionado para a etapa posterior de validação do método.

Análise por HPLC/MS-MS

A abamectina extraída das raízes da soja foi analisada por HPLC/MS-MS nas seguintes condições cromatográficas: Fase móvel: A - água + formiato de amônio 0,2% (v/v) : B - metanol; Eluição isocrática (15:85) v/v; Coluna: Waters Nova-Pak C18 (3,9 x 150 mm ; 4µm); Vazão da fase móvel: 1 mL/min; Temperatura da coluna: 40 °C; Volume de injeção: 10 µL; Tempo de análise: 10 min. A detecção foi feita por espectrometria de massas sequencial, onde as razões massa/ carga foram definidas com a utilização do modo *autotune* do detector. Os cromatogramas obtidos indicaram detecção de um intenso pico por volta de 3,5 minutos de corrida cromatográfica, indicando que as condições cromatográficas supracitadas levaram a uma boa detecção da abamectina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Seleção do Método QuEChERS

A fim de selecionar a melhor estratégia dentre as propostas, foram realizadas análises em triplicata utilizando cada um dos métodos propostos. A partir dessas análises, o método selecionado para a etapa posterior de validação foi o método I, que apresentou maiores resultados de área do pico cromatográfico da abamectina e o menor coeficiente de variação dentre os métodos propostos. Os resultados dessa avaliação são mostrados na tabela 1:

QuEChERS	Réplica 1 (Área)	Réplica 2 (Área)	Réplica 3 (Área)	Média das Áreas	Coefficiente de variação (%)
I	1550	1534	1578	1554	1,4
II	1468	1543	1551	1521	3,0
III	1323	1471	1492	1429	6,4
IV	1438	1359	1437	1411	3,2

Tabela 1: Avaliação dos métodos QuEChERS

Validação: Seletividade

A seletividade de um método analítico pode ser definida como a capacidade do método de fornecer uma quantificação do analito de interesse sem que os demais componentes da matriz amostral interfiram significativamente na resposta analítica^[7]. Portanto, para determinar se o método proposto se enquadra como um método seletivo foram feitas corridas cromatográficas dos componentes envolvidos no método, de modo a avaliar a sua resposta analítica. Foram realizadas, separadamente, corridas cromatográficas utilizando uma solução padrão de abamectina em metanol a 1 mg/L, o diluente (metanol), o solvente de extração (acetonitrila), as fases móveis selecionadas, extrato de raiz de soja submetido ao preparo de amostras sem adição de padrão e extrato de raiz de soja submetido ao preparo de amostras com adição de padrão a 1 mg/L (em triplicata). Exemplos dos cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 3. O cromatograma mostrado em (I) foi obtido da análise de uma das replicatas da análise do extrato da raiz de soja submetida ao *QuEChERS* com fortificação com o padrão de Abamectina, onde é observado um pico cromatográfico entre 3 e 3,5 minutos. Este pico se faz presente de forma semelhante nas outras réplicas realizadas. Um pico semelhante é observado no cromatograma (II), obtido pela análise cromatográfica do padrão de Abamectina em metanol. O cromatograma apresentado em (III) se refere à análise cromatográfica do extrato de raiz de soja submetida ao *QuEChERS* sem adição de padrão, onde se observa apenas ruído do equipamento, sem nenhum pico cromatográfico definido. As outras análises do teste de seletividade resultaram em cromatogramas semelhantes ao (III), sem nenhum sinal definido, comprovando a seletividade do método proposto.

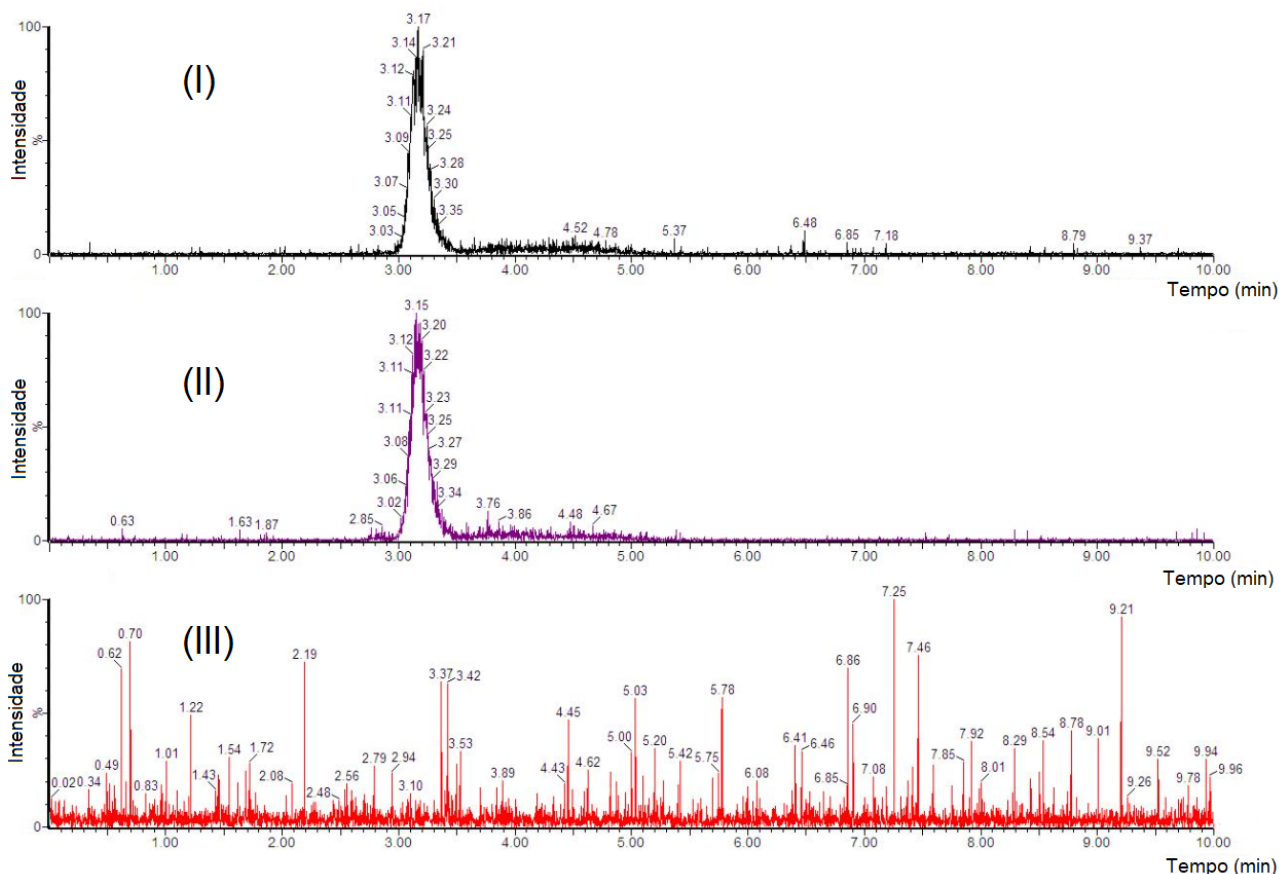


Figura 3 - Cromatogramas dos ensaios de Seletividade do método proposto: (I) Extrato de soja fortificado com abamectina, (II) Padrão de Abamectina em metanol, (III) Extrato branco de soja.

Validação: Efeito Matriz

O estudo do efeito matriz tem como objetivo avaliar a interferência causada no sinal analítico no espectrômetro de massas pelos componentes da matriz amostral^[7]. Tal estudo é de suma importância para amostras com matrizes complexas, como é o caso da raiz de soja. Para avaliar o efeito matriz, foram construídas duas curvas analíticas em 5 níveis de concentração de Abamectina em metanol e no extrato com QuEChERS:

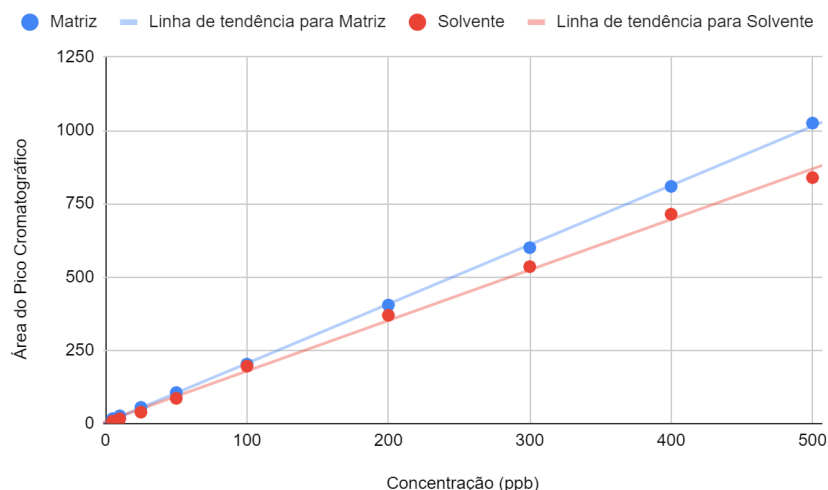


Figura 4 - Curvas analíticas obtidas com o Extrato fortificado e com o Padrão adicionado ao Solvente.

O Efeito matriz foi calculado pela equação 1, e os resultados são mostrados na tabela 2.

$$Efeito\ Matriz = \left[\left(\frac{\text{Área}_{\text{Extrato fortificado}}}{\text{Área}_{\text{Padrão no Solvente}}} \right) \times 100 \right] - 100$$

Equação 1. Cálculo do Efeito matriz^[8]

Concentração (µg/L)	Área média - Extrato	Área Média - Solvente	Efeito matriz (%)
25	55	39	41,9
50	106	86	22,9
100	203	196	3,6
300	600	535	12,1
500	1025	839	22,2
MÉDIA			20,5

Tabela 2: Avaliação do Efeito Matriz

Portanto, o método apresenta um efeito matriz por volta de 20,5%. Por estar dentro do intervalo de 20 a 50%, pode-se afirmar que se trata de um efeito matriz médio.^[8]

Validação: Limites de Quantificação e Detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, enquanto o limite de quantificação é definido como a menor concentração ou teor que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Para determinar os limites de quantificação e detecção, foram realizadas análises (em triplicata) em 3 níveis a baixas concentrações e foi avaliada a razão entre sinal analítico e ruído. Os resultados estão expressos na Tabela abaixo:

Concentração (µg/L)	Média das Áreas	Coefficiente de variação das Áreas (%)	Média das Razões Sinal/ Ruído
10	16	11	3
20	31	8	5
30	53	4	10

Tabela 3: Análises para a determinação dos Limites de Quantificação e Detecção

Segundo o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do MAPA^[7], o limite de detecção é definido como a mínima concentração em que a Razão sinal/ ruído obtida na análise é maior ou igual a 3, enquanto o limite de quantificação se trata da mínima concentração em que a Razão sinal/ ruído maior ou igual a 6. Portanto, afirma-se que o limite de detecção do método é de 10 ppb, enquanto o limite de quantificação é de 30 ppb.

CONCLUSÕES:

Dentre as opções avaliadas no preparo da amostra por *QuEChERS*, a estratégia selecionada foi a que se assemelha ao método proposto originalmente, mas utilizando menor quantidade de amostra e de reagente. As análises apresentaram bons resultados do método frente aos parâmetros de validação avaliados, indicando que o método pode ser utilizado para a determinação do agrotóxico Abamectina em amostras de raízes. Etapas subsequentes de validação serão realizadas de modo a confirmar a aplicabilidade do método para a avaliação do processo de translocação da abamectina em soja.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CAMPBELL, William *et al.* **Ivermectin and Abamectin**. 1. ed. New York: Springer-Verlag New York, 1989. 363 p. v. 1. ISBN 978-1-4612-3626-9.
- [2] AGROLINK. **Bula Abamectin Nortox**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/abamectin-nortox_3435.html.
- [3] CORTE, Gerson Dalla *et al.* Tecnologia de aplicação de agrotóxicos no controle de fitonematoides em soja. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1534-1540, 2014.
- [4] Chemspider - Abamectin (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8095964.html>)
- [5] ANASTASSIADES, Michelangelo *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- [6] PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS. Organização de Keyller Bastos Borges, Eduardo Costa de Figueiredo, Maria Eugênia Costa Queiroz. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos, c2015. 263 p., il. ISBN 9788521626947 (broch.)
- [7] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários**, CGAL/DAS, 2011
- [8] SHIROMA, Leticia Sayuri. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de florfenicol e seu metabólito em tilápia por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**: Aplicação em ensaios de bioconcentração. 2019. 1 recurso online (108 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP