



## DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE ABAMECTINA EM RAÍZES DE SOJA

**Palavras-Chave:** Abamectina, Soja, Micro-ondas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**Autores:**

Ana Beatriz Januário Bitencourt, IQ – UNICAMP

Eliezer de Oliveira, IQ – UNICAMP

Prof.<sup>(a)</sup>. Dr.<sup>(a)</sup>. Carla Beatriz Grespan Bottoli (orientadora), IQ - UNICAMP

---

### INTRODUÇÃO:

Dada a importância da soja para o agronegócio brasileiro desde a década de 1970, por sua alta demanda e exportação, tal grão possui grande relevância para a economia nacional, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja [1]. Entretanto, nematoides como o *Heterodera Glycines* colocam em risco a produtividade do grão por serem responsáveis por cistos na soja, prejudicando 9 milhões de toneladas anualmente deste produto de interesse [2].

Diante de tal contexto, torna-se interessante empregar o uso de avermectinas como a abamectina para se eliminar a ameaça de tais nematoides. A abamectina é um inseticida e acaricida pertencente ao grupo das avermectinas, as quais fazem parte da família das lactonas macrocíclicas, originadas da fermentação do fungo actomiceto (*Streptomyces avermitilis*) que age diretamente nos nematoides [3].

Neste projeto deseja-se determinar a presença de abamectina na raiz da soja, e para isso, faz-se uso de algumas técnicas e métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para separar adequadamente os analitos, acoplada a espectrometria de massas (MS), capaz de identificar os fragmentos que constituem a abamectina e a extração assistida por micro-ondas (MAE), empregada para auxiliar na extração do analito e um preparo de amostra adequado. Em relação ao preparo de amostras, etapas como a extração e a limpeza dos analitos e do extrato são aplicadas, bem como uma etapa de pré concentração empregando a secagem e ressuspensão do analito.

### METODOLOGIA:

#### 1. Amostras de raiz de soja

Para avaliar a extração de abamectina presente na raiz da soja, amostras branco foram fortificadas com o analito. Tal processo teve como início o plantio das sementes de soja em meio de cultivo composto por uma mistura de fertilizantes orgânicos classe B e fibra de coco. As sementes então foram dispostas em vasos de 10L, os quais continham 5 sementes cada, cujo crescimento foi garantido pela exposição diária ao sol e irrigadas com água, para

obter plantas do estágio V3/V4 que foram posteriormente retiradas dos vasos para terem suas raízes separadas e lavadas.

A lavagem das raízes era realizada com água potável até toda terra ser removida, logo após tal etapa utilizava-se água destilada para complementar a lavagem. Partindo das raízes já limpas, as mesmas eram secas com um fluxo de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) durante 12 horas e longe da exposição a luz com o auxílio de um papel alumínio, a fim de evitar a degradação do analito. Com as raízes lavadas e secas, estas eram então trituradas para se obter um pó com o auxílio de nitrogênio líquido e um almofariz com pistilo, sendo armazenadas no congelador logo em sequência.



**Figura 01:** a (Raízes retiradas do solo), b (Raízes lavadas e secas), c (Raízes trituradas)

## 2. Preparo de amostras

A partir das raízes lavadas, trituradas e secas, iniciou-se a otimização para encontrar as melhores condições de extração e preparo de amostras partindo do seguinte procedimento experimental.

Inicialmente pesou-se 1 g de raiz para que a mesma fosse fortificada durante 30 minutos com 100 µL de uma solução padrão de abamectina de concentração igual a 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Após a fortificação, adicionou-se 4 mL de água miliQ para umedecer a raiz e posteriormente adicionou-se 10 mL de acetonitrila. Na sequência, levou-se a amostra para o MAE durante 20 minutos a uma potência de 450W e 70°C. O extrato foi centrifugado durante 5 minutos à 5000 rpm para assim coletar o sobrenadante e limpá-lo.

A limpeza por sua vez foi realizada utilizando 150 mg de PSA e 900 mg de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), levando tal mistura para o vórtex por 30 segundos e retornando com ela para a centrífuga por 5 minutos à 5000 rpm. Com o extrato limpo, coletou-se 5 mL do mesmo e levou-o para uma secagem com N<sub>2</sub>. Em seguida, foi realizada a ressuspensão com 1 mL de metanol com agitação durante 1 minuto no vórtex e banho de ultrassom por 10 segundos, para assim ser filtrada e injetada no HPLC.

Para seleção dos fatores que mais afetam o processo de extração, foi executado um planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>. Os fatores avaliados foram: potência e temperatura do micro-ondas, tempo de extração e teor de solvente orgânico. A resposta utilizada foi a recuperação de abamectina, sendo calculada como

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área do analito}_{\text{fortificação antes da extração}}}{\text{área do analito}_{\text{fortificação após a extração}}}$$

## 3. Análises cromatográficas

As condições para a operação do HPLC-MS/MS foram otimizadas anteriormente por um trabalho realizado pelo grupo de pesquisa da NovaCrom por Periotto (2022), sendo estas empregadas na realização do presente trabalho.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo à líquido de alta eficiência (HPLC) Alliance 2695, Waters. Foi empregada uma coluna Waters Nova-Pak C18 (3,9 mm x 150 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula). A separação cromatográfica foi realizada no modo de eluição isocrática e as fases móveis compostas por água: metanol, 15:85 v/v, ambas com 10 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e ajuste de pH 4 com ácido fórmico na fase A. Os demais parâmetros do HPLC utilizados foram: temperatura da coluna em 40 °C, volume de injeção de 10 µL, vazão de fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> e tempo de análise de 10 minutos. Acoplado ao HPLC foi utilizado um espectrômetro de massas, Micromass Quattro Micro API, Waters com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por electrospray. O software MassLynx 4.1 foi empregado para aquisição de dados. As condições de operação do espectrômetro de massas foram: modo de ionização positivo, voltagem do capilar 3,5 kV, vazão de N<sub>2</sub> 1000 L h<sup>-1</sup>, temperatura de dessolvatação 450 °C, vazão de gás no cone 50 L h<sup>-1</sup>, temperatura da fonte 150 °C. O espectrômetro de massas sequencial foi operado no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), tendo como íon precursor m/z 890,57 e íons produto m/z 305,3 e 567,4.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O primeiro teste para avaliação da extração de abamectina em amostra de raiz por MAE consistiu na comparação entre a fortificação de abamectina diretamente na raiz branca antes da extração (teste 1) e a fortificação de abamectina após a raiz branca passar pela extração no MAE (teste 2). Comparando o teste 1 e 2, observou-se que a fortificação antes da extração resultou em área aproximadamente a metade da área obtida com fortificação após extração no MAE. Este resultado demonstrou que a abamectina pode ter sido retida pela raiz de soja e não foi completamente extraída ou que perdas ocorreram durante as etapas de limpeza ou secagem/ressuspensão. Diante disso, foi realizado o teste 3, com a secagem e ressuspensão de uma solução padrão de abamectina 25 µg L<sup>-1</sup> em N<sub>2</sub>, com o qual foi possível concluir que a etapa de secagem e ressuspensão não resultou em perdas consideráveis, e gerou suspeitas quanto as possíveis perdas relacionadas a etapa de limpeza.

**Tabela 1:** Condições iniciais de análise e seus respectivos valores de área.

Teste	Condição	Área (média de 2 injeções)
1	Fortificação da raiz branca antes da extração	208
2	Fortificação da raiz branca após o MAE	431
3	Padrão seco no N <sub>2</sub>	504

Diante destes resultados fez-se necessário realizar testes par avaliar o uso do PSA, uma vez que o mesmo pode adsorver o analito de interesse, como aponta a tabela 2.

**Tabela 2:** Análise dos efeitos da presença do PSA na etapa de limpeza do extrato

Condição	Área (média de 3 injeções)
Fortificação da raiz branca e uso do PSA na limpeza	201
Fortificação da raiz branca e limpeza sem PSA	225

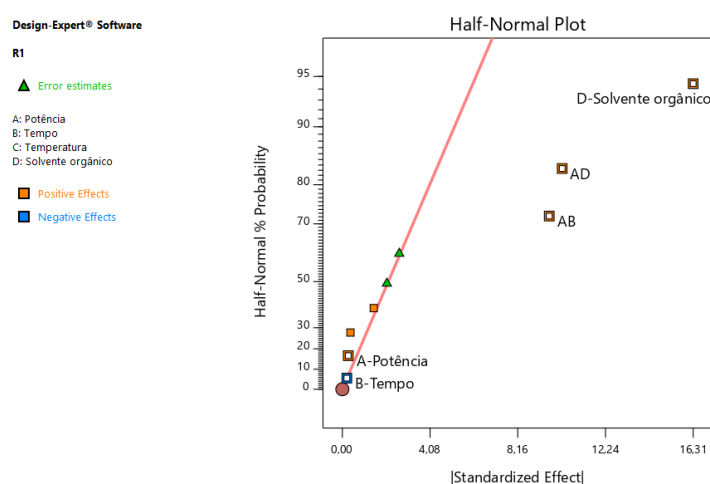
Conforme as áreas obtidas para o analito na tabela 2, foi possível perceber que as perdas relacionadas a presença do PSA eram baixas, apontando que a abamectina está interagindo com a raiz e ficando retida pelo processo de fortificação.

Diante disso foi aplicado um planejamento fatorial fracionário, o qual busca encontrar os parâmetros que possuem efeito significativo e mais interferem na extração do analito. Para isso, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  conforme a tabela 3 aponta as distintas condições dos experimentos e a resposta obtida (recuperação).

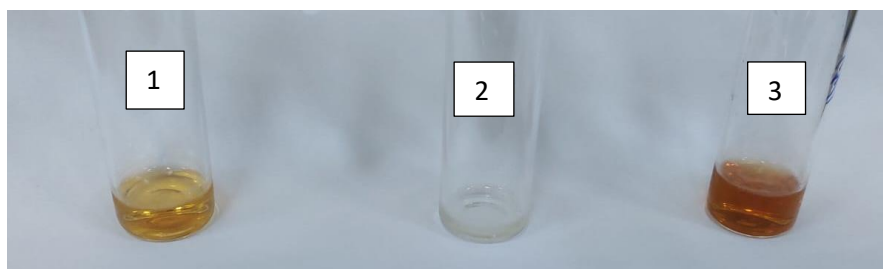
**Tabela 3:** Planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Experimento	A - Potência (W)	B - Tempo (min)	C - Temperatura (°C)	D - Teor solvente orgânico (%)	Recuperação (%)
1	200	5	40	60	78
2	700	5	40	100	83
3	200	15	40	100	74
4	700	15	40	60	66
5	200	5	100	100	83
6	700	5	100	60	59
7	200	15	100	60	67
8	700	15	100	100	95
9	450	10	70	80	76
10	450	10	70	80	85
11	450	10	70	80	80

A partir do gráfico 1 pode-se concluir que o teor de solvente orgânico é o fator que mais afeta a extração. Este fator possui efeito positivo, ou seja, quando o teor está no nível máximo (100% de solvente orgânico) tem-se um aumento na recuperação do analito. Isso se dá pela maior capacidade da acetonitrila, quando comparada a água, de extrair a abamectina que possui polaridade mais semelhante com esse solvente orgânico. Além disso, uma vez que as interações AB e AD possuem efeito significativo os fatores potência e tempo devem ser considerados no modelo final. Portanto, os fatores teor de solvente orgânico, potência e tempo serão avaliados em um planejamento composto central a fim de se encontrar um ponto ótimo de extração para estes três parâmetros.



**Gráfico 1:** Gráfico de efeitos dos parâmetros avaliados no planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .



**Figura 02:** Diferenças visuais a partir das diferenças nas condições de análise (1- 200W, 5min e 40°C; 2 - 700W, 5min e 40°C e 3 - 700W, 5min e 100°C)

## CONCLUSÕES:

A porcentagem de solvente orgânico é o fator que mais afeta na extração de abamectina na raiz da soja. Além disso, a limpeza com PSA não oferece perdas significativas nos valores das áreas do analito, fazendo com que esta etapa ainda faça parte do procedimento empregado para tal determinação. Nas próximas etapas será finalizada a otimização do método e o mesmo será validado.

---

## BIBLIOGRAFIA

1. A SOJA: A ORIGEM DO GRÃO. Aprosoja Brasil. Disponível em: < <https://aprosojabrasil.com.br/a-soja/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2023.
2. VITTI, Agnelo José. Tratamento de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) com abamectina, tiabendazol e acibenzolar-S-metil no manejo de nematóides. Tese de Pós-Graduação. Goiânia, p. 120. 2009. Disponível em: Acesso em 10 de janeiro de 2023.
3. TEIXEIRA, Leila Suleima. Métodos para determinação de avermectinas em diferentes matrizes. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso. São João del-Rei, p. 30. 2015. Disponível em: Acesso em 15 de janeiro de 2023
4. PERIOTTO, Diogo. Desenvolvimento e validação de método para determinação de abamectina em dendê por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. Dissertação de mestrado. Campinas- SP, p. 122. 2022.