

METABOLÔMICA DO SOLO RIZOSFÉRICO DE CULTURAS AGRÍCOLAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Amanda Castro Comar¹, Ana Paula Garcia Vitoriano², Luiz Regis Prado Junior³, Jose Eduardo Gonçalves⁴, Carla Porto⁵

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Maringá/PR. Bolsista PIBIC/ICETI- Unicesumar. amandacomar9@gmail.com

² Acadêmica do Curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. apgvitoriano@gmail.com

³ Acadêmico do Curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. lrpradoj@gmail.com

⁴ Mestrado em Tecnologias Limpas, Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação –ICETI. Universidade Unicesumar, Maringá, PR, Brasil. jose.goncalves@unicesumar.edu.br

⁵ MsBioscience, Incubadora Tecnológica de Maringá – Complexo UEM, Maringá, PR, Brasil. cporto.silva@gmail.com

RESUMO

O aumento constante e exponencial da população mundial, tem evidenciado a necessidade de aumento na produção de alimentos, com o intuito de satisfazer a demanda mundial e, conseqüentemente, evitar a insuficiência de comida e nutrientes. Segundo a FAO, 815 milhões de pessoas carecem de alimentos no mundo. O Brasil apresenta uma grande produtividade agrícola, sendo de grande relevância mundial, apresenta grandes áreas de produção e clima favorável para isso. Porém, com o intuito de aumentar a produção, os solos agrícolas sofrem grandes danos afetando a produtividade e retardando o processo de produção de demanda alimentar. O uso de agroquímicos e metais pesados na agricultura, têm aumentado significativamente, impactando a segurança alimentar dos próximos anos, uma vez que causam prejuízos a saúde do solo. Sendo assim, buscou-se analisar metabólitos através da extração e estudo de amostras de rizosfera em solos agrícolas próximos a Maringá-PR, por meio de abordagem metabolômica utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS do inglês, *ultra high performance liquid chromatography tandem Mass Spectrometry*), buscando resíduos de 30 agrotóxicos (8 fungicidas, 16 herbicidas e 6 inseticidas), encontrando resíduos de 23 (77% do total). A partir do processamento de dados obteve-se a fragmentação da atrazina (herbicida, triazina), do epoxiconazol (fungicida, triazol) e, do imadocloroprido (inseticida, neonicotinóide). Por meio da pesquisa, foi possível mostrar que a metodologia de extração proposta e a análise por UHPLC-MS/MS e a foram satisfatórias, levando em consideração que o presente estudo teve caráter exploratório.

PALAVRAS- CHAVE: Agroquímicos; HPLC-MS; Segurança Alimentar.

1 INTRODUÇÃO

O expressivo aumento da população, torna prioridade expandir a produção de alimentos evitando uma insuficiência para atender a demanda mundial. Para isso, é preciso manter a qualidade e sustentabilidade dos sistemas produtivos, o que vem sendo um grande desafio para o setor agrônômico (GARNETT, 2013). Como o solo é fundamental na produção de alimentos, ele desempenha um importante papel na garantia da segurança alimentar populacional (KALIA; GOSAL, 2011).

Solos que apresentam metais pesados em sua composição (HUBERT et al. 2010) e depósitos de agroquímicos, se tornam contaminados (BREVIK, 2014), gerando grande impacto na segurança alimentar, uma vez que, pode transformar terras produtivas em improdutivas. Além disso, esta contaminação do solo resulta em alimentos inseguros e de baixa qualidade nutricional (HUBERT et al. 2010).

O uso indiscriminado de agroquímicos apresenta um impacto negativo nas comunidades microbianas do solo, envolvidas com a retenção e reciclagem de nutrientes, prejudicando a saúde do solo e, conseqüentemente, os bons resultados das culturas agrícolas. Ademais, fatores como mudanças climáticas, também influenciam no ecossistema do solo.

Associar inovações tecnológicas e mudanças gerenciais na conservação do solo é visto como o melhor caminho para a redução de custos ambientais e consequente aumento sustentável da oferta de alimentos (GARNETT, 2013). Uma das técnicas que vem se destacando na identificação de metabólitos da fração orgânica do solo é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-MS, do inglês *high performance liquid chromatography-mass spectrometry*).

Portanto, é necessário e de grande importância a realização de pesquisas voltadas a compreensão dos problemas dos solos, resultando em melhores previsões de respostas ambiental e biológicas, ao uso racional e sustentável desse recurso e consequentemente, diminuindo o impacto ambiental das atividades agrícolas, proporcionando solos mais férteis e, maior segurança alimentar.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A amostragem e o condicionamento das amostras foram realizados em trabalho anterior por Vitoriano (2020), a qual coletou três amostras de solo em uma propriedade rural localizada no noroeste do Paraná, com cultura de soja na profundidade de 10 a 20 cm. As mesmas foram acondicionadas em tubos falcon (50 ml). As amostras ficaram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento da extração.

As amostras de solo 0,25 g foram transferidas para tubos, tipo *eppendorf*, e acrescentado em cada uma 1 mL o solvente extrator: e metanol/água (8:2, v/v) (HAYDEN et al., 2019). A suspensão foi agitada em vórtex por 30 min, centrifugada a 6400 rpm por 5 min e o sobrenadante coletado, sendo o processo de extração realizado por três vezes na mesma alíquota da amostra. No trabalho, foi avaliada a lista de agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná (ADAPAR), sendo selecionados 30 princípios ativos, incluindo diferentes classes (8 fungicidas, 16 herbicidas e 6 inseticidas) e, entre eles, três (Flufenacete, Acetocloro e Mesosulfuron) atualmente tem uso proibido no estado.

Em seguida, foram feitas as análises por UHPLC-MS no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) na UEM utilizando um sistema hifenado constituído por UHPLC modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) e um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II® (*Bruker Daltonics Corporation*, Alemanha), equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* em modos de ionização positivo e negativo.

Os dados obtidos foram processados no software *ProfileAnalysis*®, versão 2.1 (*Bruker Daltonics*, Alemanha). As substâncias alvo (princípios ativos) foram pesquisadas através das respectivas fórmulas moleculares e massas monoisotópica teóricas. Os dados dos espectros de fragmentação dos íons das substâncias alvo encontrados foram confrontados manualmente com os espectros de fragmentação, além do cálculo da exatidão de massas, sendo aceito erros de até 5 ppm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após busca manual das substâncias em cada amostra em modos de ionização positivo e negativo. Utilizando os dados de fórmula molecular e estrutura química dos princípios ativos selecionados fez-se a pesquisa da massa molecular alvo protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$ dos defensivos agrícolas.

Foram detectados 23 dos 30 agroquímicos pesquisados, o equivalente a 77% do total, nas amostras, com a detecção de maior número de compostos em modo de ionização positivo, representando 73% dos compostos. Os princípios ativos foram encontrados pela extração do cromatograma de íons usando a fórmula molecular e massa monoisotópica e verificando pelo cálculo do erro em ppm e espectro de fragmentação da molécula, quando disponível.

Entre as substâncias detectadas foi possível observar o espectro de fragmentação de apenas 3 íons, possibilitando a comparação de seus espectros de massas experimentais com os espectros de fragmentação encontrados em bancos de dados públicos. Cabe-se ressaltar que, nenhum dos compostos foi identificado por meio de *softwares* comumente utilizados neste tipo de análise, provavelmente, devido à baixa quantidade de informação sobre os espectros de fragmentação nos bancos de dados referentes a estes compostos.

Tabela 1- Princípios ativos fragmentados nas amostras de solo

Princípio ativo	Fórmula Molecular	TR (min)	ESI	Massa Teórica	Erro (ppm)
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	7,57	+	215,09323	3,5
Epoconazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	9,98	+	329,072569	0,6
Imidacloprido	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	5,47	+/-	255,051754	0,3

TR= Tempo de Retenção na corrida cromatográfica; ESI= modo de ionização por eletrospray positivo (+); negativo (-); positivo e negativo (+/-); Massa Teórica: massa monoisotópica calculada; Erro de massas: exatidão da medida, calculada através da diferença entre a massa monoisotópica medida (experimental) e a massa monoisotópica teórica.

Os três princípios ativos fragmentados foram: atrazina, epoxiconazol e imidocloprido, sendo que os três são liberados para uso nas culturas do Paraná pela Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (SEAB) que possui como órgão responsável a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Estes agroquímicos apresentam diferentes formulações, assim também variadas classificações toxicológicas e ambientais, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT).

A atrazina é um herbicida do grupo triazina; o epoxiconazol é um fungicida do grupo triazol; e, o imidocloprido é um inseticida do grupo neonicotinóide. Esses compostos são apresentados toxicidade entre as categorias 2 e 5, sendo que quando menor a categoria, mais tóxico é o composto, e dentre as classes de risco ao ambiente, apresentam taxas de I sendo altamente perigoso para o ambiente a III com a taxa de perigo um pouco menor. A capacidade de menor ou maior adsorção destes compostos no ambiente resultam em seus efeitos ecotoxicológicos, toxicológicos e a capacidade de biodegradação (CORREIA et al. 2007).

Pelo fato da análise por HPLC-MS ter sido realizada utilizando uma metodologia de busca não direcionada e de multicomponentes, resultou em uma análise compreensiva dos componentes químicos das amostras. Assim, apesar de muitos íons precursores (*m/z*) terem sido detectados, a quantidade desses íons selecionados para fragmentação foi relativamente baixa. Por isso, a abordagem analítica teve caráter exploratório, mas que possibilitou demonstrar a aplicabilidade da análise por HPLC-MS para investigar resíduos de diferentes agrotóxicos em amostras solo em apenas um método de extração e análise.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O declínio da qualidade do solo, em geral, tem sido causado devido a mudança de propriedades físicas, químicas e biológicas e contaminações por produtos orgânicos e inorgânicos. Por meio deste trabalho, foi possível detectar em amostras de solos agrícolas do noroeste do Paraná a presença de resíduos 23 agroquímicos por meio da técnica de HPLC-MS, podendo atestar que essa ferramenta é primordial no auxílio de aferição da qualidade do solo, mostrando resultados satisfatórios para a pesquisa.

Por meio dos resultados obtidos torna-se evidente os riscos e o aumento gradativo da contaminação do meio ambiente. Resíduos químicos, como o caso de agrotóxicos, são bioacumulados no solo, podendo tornar um solo produtivo em solo improdutivo, afetando diretamente a segurança alimentar da população, uma vez que reduz a oferta de alimentos, podendo afetar sua composição nutricional, influenciando na qualidade do alimento devido

a sua contaminação. O potencial de contaminação do solo por diversos defensivos agrícolas, deve ser evitado, exigindo-se cautela, preparo e expertise para que a aplicação destes não atinjam às camadas do solo e regiões próximas. Técnicas analíticas, como a utilizada no trabalho, torna-se um grande auxílio para o setor agrônomicos, para uma melhor produção agrícola, sem resíduos tóxicos e prejudiciais, contribuindo para a saúde das populações afetadas diretamente, como é o caso das populações presente no solo e as plantas, e para a saúde humana, garantindo a ampliação da segurança alimentar e nutricional da população. É importante ressaltar que, ainda há uma lacuna em relação as informações espectrais disponíveis nos bancos de dados para identificação dos compostos da área.

REFERÊNCIAS

ADAPAR, AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. Lista de Agrotóxicos Aptos para Comércio e Uso no Paraná. **Agência de Defesa Agropecuária do Paraná**, Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Curitiba-PR. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-07/lista_1.pdf. Acesso em: 20 abril 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (2016). AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit> . Acesso em: 22 jul. 2021.

BREVIK, E. C.; BURGESS, L. C. **The influence of soils on human health**. Nat Educ Knowl, v. 5, n. 12, p. 1, 2014.

CORREIA, F.V.; MERCANTE, F.M.; FABRÍCIO, A.C.; CAMPOS, T.M.P.; VARGAS, E.J.; LANGENBACH, T. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 37-46, jan./dez. 2007.

GARNETT, T. **Food sustainability: Problems, perspectives and solutions**. Proceedings of the Nutrition Society. Anais.Cambridge University Press, fev. 2013

HAYDEN, H.L. et al. Metabolomics approaches for the discrimination of disease suppressive soils for *Rhizoctonia solani* AG8 in cereal crops using ¹H NMR and LC-MS. **Science of The Total Environment**, v. 651, p.1627-1638, fev. 2019. Elsevier BV.

HUBERT, B. *et al.* The Future of Food: Scenarios for 2050. **Crop Science**, v. 50, p. S-33-S-50, 2010. doi: 10.2135 / cropci2009.09.0530

KALIA, A.; GOSAL, S. K. Effect of pesticide application on soil microorganisms. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 57, n. 6, p. 569-596, 2011.

VITORIANO, A. P; G. **Estudo metabolômico em solo com baixa produtividade agrícola**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência, Tecnologia e Segurança Alimentar) – Unicesumar. Maringá, 2020.