

METABOLIZAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONA – OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE 3-HIDROXIMETILSULFENTRAZONA EM URINA DE MAMÍFEROS

E. F. Fay¹, V. L. S. S. Castro¹, C. M. M. S. Silva¹, R. Abakerli², M. Assalim¹ y M. N. Eberlin³

¹ Embrapa Meio Ambiente, CP 69, Jaguariúna, SP, CEP: 13820-000, Brasil; e-mail: bethfay@cnpma.embrapa.br

² Consultora

³ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, Campinas, SP, Brasil, CEP, 13084-971

1.- Introdução

Os agrotóxicos são frequentemente aplicados no decorrer dos ciclos das culturas para controlar organismos deletérios ou para impedir o crescimento de plantas daninhas. Muitos deles representam uma ameaça toxicológica progressiva para a vida animal e humana (ANG *et al.*, 2005). Entre os herbicidas utilizados nas principais culturas do estado de São Paulo está o sulfentrazone que pode ser aplicado pós-plantio ou como pré-emergente em relação às plantas daninhas (FAIRBANKS, 2005). É classificado na categoria toxicológica III, portanto perigoso ao meio ambiente, mas não é carcinogênico. Segundo divulgação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2004 o uso de agrotóxicos no Brasil aumentou 22%, passando de 2.3 kg ha⁻¹ para 2.8 kg ha⁻¹ (FELICONIO, 2006). Os herbicidas representam 49% dentro desse total e seu uso está concentrado nas culturas de soja, cana-de-açúcar, milho, arroz e algodão (PACHIONE, 2004).

O herbicida sulfentrazone N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]-fenil]ctanossulfonamida, inibe a enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox) (DAYAN, *et al.*, 1998). As características deste produto que influem no seu comportamento ambiental são: moderadamente solúvel, não susceptível a hidrólise, extremamente susceptível a fotólise direta em água, muito estável para a fotólise em solo, meia-vida de 1,5 anos sob condições aeróbias, meia-vida de nove anos em condições anaeróbias, alta mobilidade em solo, média do coeficiente de partição, $K_{oc}=43$, e do coeficiente de sorção, $K_d<1$, e baixa volatilidade em solo e água. Pode-se dizer que este composto é altamente móvel e persistente, e tem um alto potencial de lixiviação tanto vertical quanto horizontal (EPA, 2003).

O destino e o comportamento da sulfentrazone em regiões de clima tropical não são conhecidos. Dessa forma é de fundamental importância estabelecer o comportamento ambiental deste herbicida, entretanto, não encontramos disponível no mercado o metabólito principal da sulfentrazone, HMS, para estudo. Muito pouco é conhecido em relação à toxicidade para mamíferos ocasionada por este composto.

Além do problema da persistência da molécula por um período suficiente para limitar ou injuriar o desenvolvimento de espécies cultivadas em rotação, seus resíduos podem persistir em partes das plantas que

poderiam ser utilizadas para consumo humano ou animal. Tal fato é preocupante, pois a sulfentrazone pode causar alterações no desenvolvimento e na reprodução de animais. Assim, foi observado em estudos relacionados ao desenvolvimento embrio-fetal, com exposição a doses do herbicida que não ocasionavam toxicidade materna, alguns efeitos prejudiciais ao desenvolvimento até a segunda geração de animais (EPA, 2003).

É bem estabelecido na literatura que mamíferos, como ratos, são capazes de metabolizar o herbicida. A sulfentrazone é rapidamente absorvida em mamíferos sendo que acima de 84% da dose administrada é excretada na urina e nas fezes no intervalo de 72h. O metabolismo de sulfentrazone em animais e plantas é similar. O maior metabólito em plantas é o 3-hidroximetilsulfentrazone (HMS). Ainda são formados o 3-desmetilsulfentrazone (DMS) e o ácido sulfentrazonacarboxílico (SCA). Considerando que a rota metabólica proposta para mamíferos apresenta como principal metabólito o 3-HMS (88-95%), na urina, e sua baixa toxicidade oral ($LD50>2855$ mg.kg⁻¹), este composto foi isolado de urina de rato após a administração do composto parental.

Devido à dificuldade de obtenção do metabólito, para uso como padrão em análise de resíduos, e altíssimo custo de síntese, foi objetivo deste trabalho isolá-lo em urina de ratos Wistar, tratados com o agrotóxico, para fins de estudos de degradação do composto parental, pois já está bem estabelecido na literatura que mamíferos, como ratos, são capazes de metabolizar o herbicida.

2.- Material e Métodos

Animais – Foram utilizados ratos Wistar machos com peso corporal ao redor de 230 ± 15 g. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas e acondicionados em gaiolas com livre acesso a ração (Purina) e água.

Exposição e Dose – O número de animais em cada grupo foi dividido igualmente. Foram expostos a 100mg de sulfentrazone kg⁻¹ sendo o herbicida diluído em azeite de oliva. O grupo controle somente recebeu azeite de oliva.

Amostragem – Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada durante 48h em gelo seco.

Análise cromatográfica - O HMS foi purificado por HPLC preparativa e identificado por espectrometria de massas.

Para obtenção do 3-hidroxi metil sulfentrazone, as porções de urina dos ratos tratados foram combinadas e submetidas à extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila. A fração orgânica foi separada, tratada com Na_2SO_4 , concentrada a vácuo próximo a secura, evaporadas em corrente de N_2 e ressuspendidas em 3 ml acetonitrila (urina metabolizada). O mesmo procedimento foi utilizado na urina proveniente dos animais utilizados como controle (urina controle). A uma fração da urina controle, foi adicionado sulfentrazone ($0,7\mu\text{g/mL}$) (urina fortificada). A separação do metabólito de interesse foi feita por CLAE, utilizando um cromatógrafo Shimadzu, detector (SPD 10AV) UV (254 nm), coluna Supelcosil PCL-18 ($12\mu\text{m} \times 25\text{cm} \times 10\text{mm}$), fluxo de 3mL min^{-1} , segundo o gradiente 25:75 a 60:40 em 45 minutos, sendo a fase móvel composta por acetonitrila ácido acético 0,5 %. Foram comparados os cromatogramas resultantes das injeções das amostras (metabolizada, fortificada e controle) para identificação dos picos. Para a identificação dos picos por espectrometria de massas, coletaram-se os eluatos individualmente, nos tempos de retenção selecionados (13,76 min; 16,26 min e 24,92 min), e foram submetidos à extração líquido-líquido, com acetato de etila. Nesta etapa, o detector foi desligado. Os eluentes correspondentes aos referidos tempos de retenção foram coletados separadamente e submetidos novamente a extração líquido-líquido, com acetato de etila. A fase orgânica foi separada e concentrada em rotaevaporador, a 30°C e ressuspendidas em 5 mL de acetonitrila. A fim de elucidar as estruturas, as amostras foram submetidas à espectrometria de massas utilizando o sistema APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) no Q-trap da Applied Biosystems. A massa do 3-hidroxi metil sulfentrazone é de 402 e o monitoramento do ion molecular ($M+1$) de relação m/z 403 identifica o composto de interesse, isto é; indica a formação do metabólito de interesse.

3.- Resultado

O metabólito de interesse, 3-hidroxi metil sulfentrazone, foi obtido mediante a metabolização da sulfentrazone por ratos. A massa do 3-hidroxi metil sulfentrazone é de 402 e o monitoramento do ion molecular ($M+1$) de relação m/z 403, o que confirmou a identificação do composto de interesse.

O tempo de retenção do HMS nas condições descritas foi de 12,52 min. e o da sulfentrazone de 23,8min.

4.- Discussão e Conclusão

O procedimento foi validado e adaptado pelo Laboratório de Resíduos de Pesticidas e de Ecotoxicologia da Empresa Meio Ambiente, utilizando a metodologia de Leung et al. (1991).

A metabolização do pesticida por ratos permite a obtenção do composto de interesse, por meio de um experimento bastante simples. Na dependência da quantidade obtida na

urina dos animais expostos a doses que não causem sinais evidentes de toxicidade; este procedimento viabilizará, científica e economicamente, estudos de degradação da sulfentrazone em solo que se constituem em um dos principais processos no controle da mobilidade do herbicida. Desta forma, nos estudos de degradação deste herbicida, este composto poderá ser utilizado para identificação do metabólito produzido em nossas condições tropicais.

Referências

- ANG, E. L., ZHAO, H. y OBBARD, J. P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 487-496, 2005.
- DAYAN, F. E., ARMSTRONG, B. M. y WEETE, J. D. Inhibitory activity of sulfentrazone and its metabolic derivatives on soybean (*Glycine max*) protoporphyrinogen oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2024-2029, 1998.
- EPA. Federal Register: Sulfentrazone; Pesticide Tolerances, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm>> Consultado em: 25 set. 2004.
- FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam mercado. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos_agricolas.htm> Consultado em: 03 mar. 2005.
- FREICONIO, A. E. Agrotóxicos: riscos para a saúde e o meio ambiente. Disponível em: <<http://www.sitiodomoinho.com/jornal/Powervoice/DefaultNewsShow.asp?Editoria=6&Noticia=35>> Acesso em: 31 maio 2006.
- LEUNG, L. Y., LYGA, J. W. y ROBINSON, R. A. Metabolism and distribution of the experimental triazolin herbicide F6285 [1-[2,4 - Dichloro-5-[N-(methylsulfonyl) amino] phenyl]-1,4-dihydro-3-methyl-4-(difluoromethyl)-5 H - triazol -5-one] in the rat, goat, and hen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p.1509-1514, 1991.