

Validação de método de determinação de paclobutrazol em solos por HPLC-UV

Validation of HPLC-UV method to determine paclobutrazol in soil

Resumo

Paclobutrazol (PBZ) é um regulador de crescimento vegetal que permanece ativo no solo por muitos anos após a sua aplicação, afetando o crescimento e desenvolvimento das culturas subsequentes. Neste estudo, um método de CLAE-UV foi desenvolvido para a quantificação de paclobutrazol no solo. O processamento da amostra envolveu a extração em fase sólida em cartuchos C-18. A separação foi realizada numa coluna C-18 “core-shell” Kinetex, num modo de eluição isocrática com uma fase móvel constituída por metanol e água e a detecção foi a 221 nm. O método para determinar o paclobutrazol no solo mostrou linearidade, repetibilidade e precisão. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de 0,02 µg/g, e 0,07 µg/g, respectivamente. As recuperações foram de 74 a 88% e os baixos LOD e LOQ confirmaram a aplicabilidade do método proposto para a análise de amostras reais do solo contaminado com PBZ.

Palavras-chave: SPE, limite de detecção, limite de quantificação, PBZ, resíduos

Abstract

Paclobutrazol (PBZ) is a plant regulator that remains active in soil for many years after its application, affecting the growth and development of subsequent crops. In this study, a LC-UV method was developed for the quantification of Paclobutrazol in soil. Sample processing involved a solid-phase extraction on C-18 cartridges. Separation was carried out on a core-shell Kinetex C18 column in an isocratic elution mode with a mobile phase consisting of methanol and water. Spectrophotometric detection with the wavelengths of 221 nm was used. The method to determine paclobutrazol in soil showed adequate linearity, repeatability and accuracy. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) obtained for the PBZ were 0.02 µg/g and 0.07 µg/g, respectively. The recoveries were 74 to 88% and the low LOD and LOQ, confirming the applicability of the proposed method for the analysis of real samples of soil around mango trees.

Keywords: SPE, detection limit, quantification limit, PBZ, residue

Introdução

Paclobutrazol ((2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il) pentan-3-ol)) é um regulador de crescimento que é usado para alterar o ciclo fisiológico da mangueira com a finalidade de produzir frutos em todas as estações. Este composto é geralmente aplicado ao solo na zona das raízes, ou sob as copas das árvores, mas a aplicação no solo tem mostrado maior eficácia (SINGH; BHATTACHERJEE, 2005).

Apesar das vantagens associadas à produtividade, este regulador de crescimento permanece ativo no solo por muitos anos e pode afetar gravemente o crescimento e desenvolvimento das culturas subsequentes, reduzindo o vigor da planta (ATTIYA, 1983; HAMPTON, 1988).

A literatura relata alguns métodos para determinar paclobutrazol. Sannino et al. (2004) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa para determinar pesticidas nas plantas, incluindo PBZ. Sharma; Awasthi (2005) estudaram a persistência do PBZ no solo e quantificaram o mesmo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC MS). Vaz et al. (2007) propuseram um método para a determinação do PBZ em amostras aquosas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia.

O método analítico proposto por Sharma; Awasthi (2005) foi de alto custo, pois foi utilizada uma grande quantidade de

Fernanda Leitão Vaz¹
Maria Aparecida Mouco²
Ester Ribeiro Gouveia³

^{1,3} Departamento de Antibióticos
– Universidade Federal de Pernambuco
² Empresa Brasileira de Produtos Agroindustriais, Embrapa (Semiárido)

Correspondências:
Ester Ribeiro Gouveia
estergouveia@gmail.com

solventes orgânicos. A extração do analito e pré-tratamento são os passos mais difíceis e demorados em um procedimento analítico. Entre os diferentes procedimentos de extração disponíveis, a extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica comum e simples, no entanto, geralmente requer trabalho intensivo e grandes quantidades de solventes orgânicos que são caros, tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparação da amostra cada vez mais útil, evitando muitos dos problemas associados com a extração líquido/líquido, tais como separações de fase, recuperações incompletas, com economia de tempo e o uso de poucas quantidades de solventes orgânicos (SNYDER et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método CLAE para determinar PBZ no solo, utilizando SPE e coluna C18 “core-shell” Kinetex. O método foi aplicado em amostras reais coletadas da região Nordeste do Brasil.

Material e Métodos

Paclobutrazol

Paclobutrazol padrão analítico foi obtida a partir de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Metanol (grau HPLC) foi adquirido a partir de Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

Preparação dos padrões de calibração e fortificação da amostra

A solução estoque padrão foi preparada dissolvendo-se 10 mg de padrão em 100 mL de metanol (100 mg/L) e diluída para atingir concentrações de 0,02 a 10 mg/L. A solução-mãe foi também utilizada para obter as concentrações desejadas por diluição no intervalo de 0,5 a 5 µg/g. Os padrões de calibração e soluções estoque foram mantidos em freeze a -20°C por um período máximo de duas semanas e quatro meses, respectivamente.

Coleta de amostras

O método de preparação da amostra foi baseado naquele proposto por Sharma e Awasthi (2005) com modificações na etapa de limpeza, isto é, utilizando-se extração em fase sólida (SPE), em vez de extração líquido-líquido (LLE). Para o desenvolvimento do método, o solo foi coletado a partir do campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para aplicar o método, amostras reais de solo foram coletadas em duas regiões (A e B), localizadas em uma estação experimental no Vale do São Francisco no nordeste do Brasil. As amostras de solo, classificado como Argissolo Amarelo, foram coletadas em áreas com plantio irrigado de manga (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins).

O solo de um grupo de manqueiras (Tommy Atkins), tratadas com aplicações consecutivas de paclobutrazol a uma concentração de 3,75 gramas de ingrediente ativo por planta,

foi coletado após 30 dias da última aplicação. Foram coletados, em média, 1,5 kg de solo na profundidade de 15 e 30 cm, em quatro pontos, ao redor 6-8 plantas. Estas amostras foram armazenadas a 4°C em geladeira até a extração. O tempo máximo de armazenamento foi de 30 dias.

Extração de paclobutrazol do solo

Exatamente 2,5 g de solo seco foram pesados e misturados com 30 mL de MeOH. As condições de funcionamento foram as seguintes: temperatura de extração de 30°C, 200 rpm (em um incubador rotativo fornecido pela New Brunswick Scientific Company, SC 25) e dois ciclos de 30 minutos cada. Após a extração e filtração através de papel qualitativo, 10 mL de água ultrapura foram adicionados a cada amostra de extrato. O metanol foi evaporado a 40°C utilizando um evaporador rotativo (Buchi, Suíça).

Limpeza das amostras

A amostra foi aplicada num cartucho C-18 (500 mg/3mL -Agilent) previamente condicionado com 6 mL de metanol. Após lavagem com 3 mL de água ultrapura, o analito foi eluído com 10 mL de metanol e injetado no cromatógrafo.

Instrumentação e condições cromatográficas

Os experimentos foram realizados num sistema cromatográfico HP 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) equipado com um detector UV/VIS, amostrador automático, desgaseificador, bomba quaternária e compartimento de colunas termostaticado. As condições cromatográficas foram baseadas naquelas utilizadas por Vaz et al. (2007). Uma eluição isocrática foi obtida pela mistura de água (20%) e MeOH (80%). O fluxo foi ajustado para 0,4 mL/min numa coluna C18 (150 mm x 4.6 mm - Phenomenex, Torrance, CA, EUA). O comprimento de onda de detecção foi de 221 nm e a temperatura da coluna foi de 30°C.

Validação do método

O método CLAE-UV foi validado com base em parâmetros, tais como a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação (SNYDER et al., 1997).

Resultados e discussão

A linearidade de um método é uma medida de quão bem um conjunto de respostas versus concentração se aproxima de uma linha reta de calibração. Dados de linearidade podem ser obtidos de várias maneiras. Uma técnica conveniente é preparar uma solução estoque da substância a ser analisada e realizar diluições em série para se obter as concentrações necessárias para análise.

Os dados são então processados usando uma regressão de mínimos quadrados linear. Uma linearidade com coeficien-

te de correlação acima de 0,999 é aceitável para a maioria dos métodos, especialmente para os componentes principais de um método de ensaio (Snyder et al., 1997). No presente trabalho, o método foi estudado na faixa de 0,02 - 10 mg/L. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,999.

A precisão pode ser definida como “o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o processo é aplicado repetidamente a replicatas de uma amostra homogênea”. A repetibilidade é a precisão de um método de acordo com as mesmas condições de funcionamento ao longo de um curto período de tempo. Esta é medida por um processo sequencial, injeção repetida de uma mesma amostra homogênea, seguido pelo cálculo da média da área ou altura dos picos e da determinação do desvio padrão relativo, também denominado de coeficiente de variação (CV). A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão ou o desvio padrão relativo de um conjunto de injeções (Snyder et al., 1997).

A repetibilidade foi avaliada em três repetições e em três concentrações (0,5; 1 e 10 mg/L). Os desvios-padrão médio e relativo das áreas de pico são apresentados na Tabela 1, a qual mostra uma excelente repetibilidade de resultados. Dependendo do tipo de amostra, um CV de 5 a 10% é normalmente aceitável (SNYDER et al., 1997).

A exatidão é definida como a proximidade do valor medido com o valor verdadeiro. Tipicamente, a exatidão é determinada e representada por meio de estudos de recuperação, mas existem três maneiras para determiná-la: (1) a comparação com um método padrão de referência, (2) a recuperação do analito numa matriz em branco, ou (3) adição de um padrão do analito a uma amostra já contaminada (SNYDER et al., 1997).

A recuperação do paclobutrazol foi realizada utilizando-se três níveis diferentes (0,5; 1 e 5 µg/g), em triplicata, para cada nível. A Tabela 2 mostra as recuperações e o desvio padrão relativos. Recuperações superiores a 70% foram obtidas para todos os níveis.

Duas importantes características de um método são o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ). O limite de detecção pode ser definido como o menor nível de analito que dá uma resposta mensurável. LOD e LOQ foram determinados como a menor concentração injectado PBZ que produziu uma relação sinal-ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente.

Os valores de LOD e LOQ obtidos foram de 0,02 µg/g e 0,07 µg/g, respectivamente. Os baixos limites de detecção e de quantificação, obtidos no presente trabalho, foram possíveis devido ao uso de uma coluna “core-shell”. Estas colunas proporcionam separações mais eficientes e mais rápidas quando comparadas com as colunas convencionais com partículas de 3-5 µm e são compatíveis com os sistemas de CLAE convencionais e suportam pressões máximas de 400 bar.

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de PBZ em amostras reais de solo de duas regiões (A e B) do Vale do São Francisco no semiárido nordestino do Brasil. A Tabela 3 apresenta os valores dos resíduos, que foram maiores do que o limite máximo de resíduos (LMR) em solo (0,02 µg/g), aceitável pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

Tabela 1. Repetibilidade do método HPLC-UV de determinação de paclobutrazol em solo

Concentração (mg/L)	Áreas Médias (mAU)	Desvio Padrão (mAU)	CV (%)
0,5	14,1	1,20	8,55
1	40,8	3,81	9,36
10	259,7	17,11	6,59

Tabela 2. Recuperação do método HPLC-UV de determinação de paclobutrazol em solo

Concentração (mg/L)	Áreas Médias (mAU)	Desvio Padrão (mAU)	CV (%)
0,5	74,3	0,91	1,23
1	77,2	2,28	2,96
5	88,7	3,20	3,61

Tabela 3. Resíduo de paclobutrazol (PBZ) nos solos

Solo	PBZ (µg/g)	Desvio Padrão (µg/g)	CV (%)
A	1,11	0,13	11,60
B	0,73	0,10	13,63

Conclusões

A metodologia desenvolvida permitiu a determinação de PBZ em amostras de solo de áreas agrícolas. A precisão, a exatidão e os limites de detecção e de quantificação foram satisfatórios, o que permitiu a utilização do método para monitorar o PBZ em amostras reais de solo da região do cultivo de manga do semiárido nordestino brasileiro, com histórico de aplicação de PBZ.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Pós-doutorado e pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Available in: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/31107.htm>. Oct 2012.
- ATTIYA, H. J.; FIELD, R. J.; HILL, G. D. Effects of PP333 and TIBA growth regulators on development and yield components of spring sown field beans (*Vicia faba*L.). Proc. Agron. Soc. New Zeal. 13: 81-87, 1983.
- HAMPTON, J. G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. New Zeal. J. Exp. Agr. 16: 167-172, 1988.
- SANNINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. J. Chromatogr. A 1036: 161-169, 2004.
- SHARMA, D.; AWASTHI, M. D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit and soil. Chemosphere. 60, 164-169, 2005.
- SINGH, V. Z.; BHATTACHERJEE, A. K. Genotypic response of mango yield to persistence of paclobutrazol in soil Acta Hort. 106: 53-59, 2005.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; Practical HPLC method development, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc: New York, 1997.
- VAZ, F. L.; MILFONT, M. L. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Determinação da concentração de paclobutrazol por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia. Quim. Nova. 30: 281-283, 2007.

PENSE EM PROTEÍNAS! PENSE EM G-BIOSCIENCES!

O progresso atual na área da proteômica tem aberto novas oportunidades para obtenção de informações de interesse sobre processos normais e anormais que ocorrem nos diferentes tecidos e fluidos corporais do organismo humano, em condições e/ou momentos distintos.

Para acompanhar este progresso a Biosystems oferece uma linha especializada em análise protéica, a G-Biosciences



A G-Biosciences desenvolve produtos de alta tecnologia voltados para a proteômica



- Reagentes para lise celular e extração protéica de bactérias, leveduras, tecidos, células de mamíferos e insetos;
- Coquetéis inibidores de proteases e fosfatases;
- Reagentes para quantificação de proteínas;
- Reagentes para preparo de proteínas para eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE 1D, 2D e IEF);
- Marcadores de peso molecular de proteínas;
- Consumíveis e reagente para limpeza e concentração de amostras;
- Tripsina grau Espectrometria de Massa;
- Além de excelentes produtos para Western Blotting - corante reversível para membranas, acelerador, reagente para reaproveitamento de membrana "stripping e reprobing", substratos quimioluminescentes e membranas de nitrocelulose ou PVDF e muito mais.



homem proteína

Saiba mais sobre técnicas e curiosidades de Proteômica!
<http://info.gbiosciences.com/blog/>

CATÁLOGO



BIOSYSTEMS

DDG: 0800 703 1012
www.biosystems.com.br
comercial@biosystems.com.br