

MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE IMAZAQUIM, TEBUCONAZOLE, FLUAZIFOP-P-BUTIL E FLUAZIFOP-P EM VAGEM DE SOJA

S. C. N. Queiroz, R. T. Nogueira, M. L. Saito*
Embrapa Meio Ambiente Rod. SP 340 km 127,5 Tanquinho Velho,
CP 69 CEP 13820-000 Jaguariúna – SP. e-mail: sonia@cnpma.embrapa.br*

RESUMO

É apresentado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para determinação dos pesticidas imazaquim, tebuconazole, fluzifop-p-butil e seu metabólito fluzifop-p em vagem de soja. Para a extração foi utilizado acetonitrila como solvente e uma etapa adicional de limpeza foi realizada utilizando partição com hexano. O extrato foi injetado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência nas seguintes condições: a fase móvel foi acetonitrila/água pH 3 (ajustado com ácido fosfórico), eluição por gradiente e vazão 1 mL min⁻¹; coluna Shim-pack C-18, 4,6x150mm e comprimento de onda 225 nm (detector UV/Vis). Os seguintes parâmetros de validação foram obtidos: limite de detecção (LOD), 0,2 µg g⁻¹; limite de quantificação (LOQ), 1,0 µg g⁻¹; linearidade para a faixa de concentração 0,2-10 µg g⁻¹ (padrões feitos na matriz), r = 0,99; recuperações na faixa de 75-104%; e precisão < 20% (RSD). Conforme demonstrado pela validação, o método multiresíduos desenvolvido mostrou ser adequado e pode ser utilizado para a determinação dos pesticidas em vagem de soja.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque mundial na produção de soja. Para garantir a produtividade são aplicados agroquímicos e o estudo do destino destes produtos na planta e no ambiente é de extrema importância. A absorção dos princípios ativos pela planta é o primeiro passo para acumulação na cadeia alimentar terrestre, os quais podem entrar via raiz ou foliar.

Para realizar estudos de bioconcentração e translocação dos pesticidas nas diferentes partes da planta (raiz, caule, folha e vagem) normalmente são utilizadas substâncias radiomarcadas, ¹⁴C, com posterior medição da radioatividade (radiações β) emitida por este isótopo radioativo.^{1,2} A utilização do ¹⁴C oferece várias limitações e inconvenientes inerentes ao uso de qualquer material radioativo, em especial no caso do Brasil, onde a grande maioria das substâncias radiomarcadas são de alto custo e de demorada obtenção devido a dependência do país fornecedor externo.³ Além disso, esta técnica não diferencia a molécula original (princípio ativo) dos metabólitos, dificultando a interpretação dos resultados. Uma alternativa interessante ao uso de métodos radiométricos na determinação quantitativa de compostos de interesse e seus metabólitos é o uso de técnicas cromatográficas de alta resolução. Por exemplo, na análise de pesticidas mais voláteis e estáveis termicamente, a cromatografia gasosa é a mais indicada, ao passo que para pesticidas polares ou hidrossolúveis a cromatografia líquida de alta eficiência é a mais adequada. Deve-se destacar como vantagem adicional desta técnica sua potencialidade em analisar pesticidas ao nível de traços, com grande

reprodutibilidade e sensibilidade, e a possibilidade de analisar mais de um pesticida ao mesmo tempo, com economia de materiais e de tempo.

Assim o presente trabalho descreve um método, baseado em extração líquido-líquido seguido de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), para determinação dos pesticidas imazaquim, tebuconazole, fluazifop-p-butil e seu metabólito fluzifop-p em vagem de soja.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes e solventes

Os solventes utilizados foram acetonitrila, grau resíduos, da TEDIA e hexano, grau P.A., da Merck. A água para preparo da fase móvel foi bidestilada, tratada com permanganato de potássio, refluxada e novamente destilada. O ácido fosfórico foi grau P.A. da Nuclear. Os padrões de pesticidas foram: imazaquim da Basf (pureza 99,6%), tebuconazol da Dr. Ehrenstorfer (pureza 98,5%), fluazifop-p-butílico da Zeneca (pureza 95,1%) e fluazifop-p da Singenta (pureza 100%).

2. Amostras

As amostras de vagem de soja utilizadas para fortificação foram provenientes de cultivo hidropônico em condições controladas, livres de pesticidas.

3. Procedimento de extração

Foram adicionados 10 mL de acetonitrila a 100 mg da amostra (seca em estufa por 24h, 45°C) triturada e esta mistura foi agitada por 1 h. O extrato foi filtrado quantitativamente sobre algodão, concentrado em rotaevaporador até a secura e ressuspenso em 1 mL de acetonitrila. A seguir, foi realizada partição com hexano (3 vezes 1 mL) para remoção de algumas impurezas, filtrado em membrana de 0,45 µm e injetado no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.

4. Preparo das soluções dos pesticidas

A solução estoque dos pesticidas individuais foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ em acetonitrila. Em seguida foi preparada uma solução contendo a mistura dos pesticidas na concentração de 25 mg L⁻¹. Esta solução foi utilizada para fortificar as amostras (concentrações finais: 1,0 µg g⁻¹; 2,5 µg g⁻¹ e 5,0 µg g⁻¹) e fazer as curvas de calibração (0,2 mg L⁻¹ à 10 mg L⁻¹).

5. Condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema cromatográfico da Shimadzu constituído de injetor manual Rheodyne modelo 7725i, bomba de alta pressão modelo LC-10ATVP, detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis modelo SPD-10AVVP, programa computacional para aquisição e tratamento dos dados CLASS VP. Fase móvel: eluição por gradiente, solvente A: ACN(100%) e solvente B: H₂O (pH = 3, ajustado com ácido fosfórico): ACN (90:10, v/v). Seqüência do gradiente (linear): 0,01s – 85%B; 26min. –

20%B; 30min – 50%B, 40min – 100%A, 50min – 100%A, 60min – 85%B, 70min – 85%B. Coluna analítica: Shim-pack C-18, 4,6x150 mm. Comprimento de onda: 225 nm (detector UV/Vis). Volume de injeção: 20 µL e vazão 1 mL min⁻¹.

6. Validação

A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos seguintes parâmetros:

- *Linearidade*: faixa ou intervalo de concentração no qual o sinal produzido pelo detector é diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcional a concentração do soluto nas amostras.
- *Limite de detecção (LOD)*: menor concentração ou quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico com um nível de confiança especificado ou ainda, que pode ser estatisticamente diferente do ruído. Pode ser calculada como sendo 3 s/r (s = sinal e r = ruído).
- *Limite de quantificação (LOQ)*: menor concentração do analito que pode ser medida com exatidão e precisão aceitáveis nas condições experimentais. Pode ser calculada como sendo 10 s/r (s = sinal e r = ruído).
- *Exatidão*: grau de concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico. A exatidão também pode ser expressa como a porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas do analito fortificado na matriz limpa (testemunha).

$$R(\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100$$

- *Precisão*: A precisão é o grau de concordância ou grau de dispersão entre resultados de medidas independentes, em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições experimentais pré-estabelecidas. A precisão é expressa como sendo o desvio padrão relativo (RSD):

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

onde: s = estimativa do desvio padrão e \bar{x} é a média do valor obtido.

Neste trabalho a precisão foi realizada em termos de repetibilidade, ou seja, no mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo instrumento e em um curto intervalo de tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise multiresíduos tem vantagens em relação ao método uniresidual pois é uma maneira efetiva de se determinar vários pesticidas com menor custo (usa menos solventes e reagentes) e em um espaço de tempo relativamente curto. Assim este trabalho apresenta um método para a determinação simultânea dos pesticidas

imazaquim, tebuconazole, fluazifop-p-butil e seu metabólito fluzifop-p em vagem de soja.

Para a extração dos pesticidas da matriz, vários solventes foram testados e o que apresentou melhor resultado foi a acetoneitrila, seguida de partição com hexano.

Os pesticidas selecionados pertencem a diferentes classes e possuem diferentes características físico-químicas. Devido à diferença na polaridade entre eles e a complexidade das matrizes, observou-se que a eluição isocrática não é uma escolha adequada por ocasionar um aumento no tempo de análise e alargamento dos picos mais retidos, dificultando a quantificação. Por esse motivo a eluição por gradiente é a melhor alternativa para este tipo de separação.

Após um estudo intensivo das condições cromatográficas obteve-se uma resolução adequada para os pesticidas imazaquim, fluazifop-p, tebuconazole e fluazifop-p-butil. A Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos para a vagem de soja na matriz branca e fortificada.

Para avaliar a performance de um método analítico, vários critérios devem ser observados antes de ser empregado como rotina. Por exemplo a recuperação do método deve ser de 70 – 110% com desvio padrão relativo < 20%⁴.

Além da eficiência da extração dos resíduos da matriz, as características da performance da etapa de remoção de interferentes (*cleanup*) estão diretamente relacionadas a qualidade dos dados gerados. A ausência de componentes da matriz no extrato purificado elimina a indução de efeitos da matriz^{5,6}. Porém é uma solução teórica que dificilmente é obtida na prática⁷. Muitas vezes é necessário várias etapas de purificação para se obter um extrato relativamente limpo, o que aumenta o tempo e o custo da análise. Assim deve-se estabelecer um compromisso entre esses fatores. Uma maneira de contornar o efeito matriz é preparar as soluções de calibração com extratos de matrizes brancas (matriz sem pesticida)⁸. Isto é considerado uma maneira efetiva de evitar erros derivados de efeitos de matriz na quantificação dos analitos e deste modo, uma calibração mais confiável pode ser obtida. Neste trabalho adotou-se este modo de preparo de calibração e, como mostra a Tabela 1, um coeficiente de correlação aceitável foi obtido para todos os pesticidas ($r = 0,99$).

O limite de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) também são parâmetros fundamentais que devem ser determinados, principalmente em análise de resíduos, uma vez que a concentração esperada está ao nível de traços. Estes valores foram obtidos e se encontram na Tabela 1. Os valores encontrados são suficientemente baixos para detectar e quantificar os pesticidas imazaquim, tebuconazole, fluazifop-p-butil e seu metabólito fluzifop-p em vagem de soja em estudos de translocação e bioconcentração destes pesticidas.

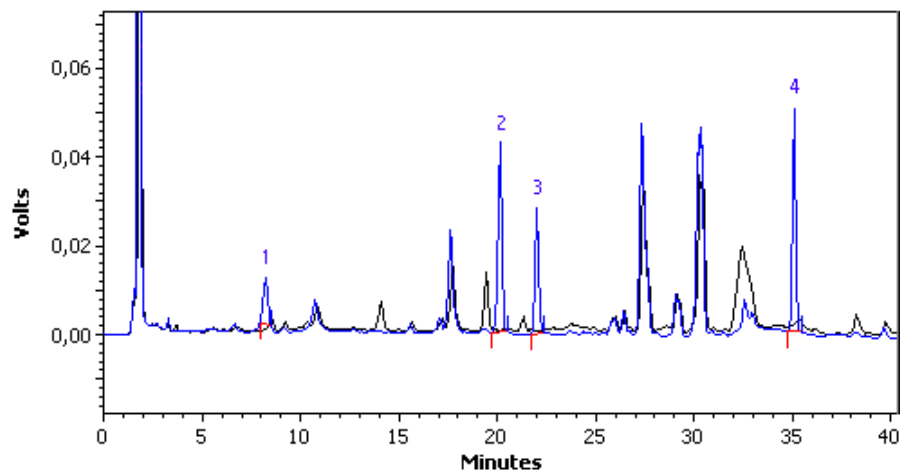


Figura 1. Cromatogramas da vagem da soja. Legenda: — matriz branca e — fortificado. 1) imazaquim, 2) Fluzifop-p, 3) tebuconazole e 4) fluzifop-p-butil.

A recuperação é dependente da concentração e por esse motivo foi avaliada na faixa de concentração esperada das amostras. Para isso foram calculadas em três concentrações (1; 2,5 e 5 $\mu\text{g g}^{-1}$). Foram realizados ensaios em triplicata e pode-se verificar que tanto a recuperação, 75-104%, quanto a precisão, <20% (em termos de repetibilidade), estão em consonância com a literatura⁴.

Tabela 1. Parâmetros de validação do método.

Pesticida	r^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperações médias (n=3) (%)			RSD (n=3) (%)		
				1 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2,5 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2,5 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Imazaquim	0,99	0,2	1,0	82,4	98,6	87,4	13,6	5,9	6,6
Fluzifop-p	0,99	0,2	1,0	93,6	97,2	74,9	4,7	4,3	19,1
Tebuconazole	0,99	0,2	1,0	104,1	102,9	103,9	2,6	3,5	1,4
Fluzifop-p-butyl	0,99	0,2	1,0	72,1	84,1	103,4	12,4	2,9	2,4

CONCLUSÕES

Conforme demonstrado pela validação, o método multiresíduos desenvolvido mostrou ser adequado e pode ser utilizado para a determinação dos pesticidas imazaquim, tebuconazole, fluzifop-p-butyl e seu metabólito fluzifop-p em vagem de soja. O método proposto será utilizado em estudos de translocação e bioconcentração.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. Trapp, M. Mathies, I. Scheunert, E.M. Topp. Modelling the bioconcentration of organic chemicals in plants. *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1246-1252.
2. U-B. Nandihalli, L.E. Bendixen. Absorption, translocation and toxicity of foliar-applied imazaquim in yellow and purple nutsedge (*Cyperus esculentus* and *C. rotundus*). *Weed Science* 36 (1988) 313-317.
3. F.M. Lanças, J.H.Y. Vilegas; M.S. Galhiane. Uso de Técnicas Cromatográficas para a Avaliação de Propriedades Físico-Químicas de Pesticidas em Solos. I. Determinação da Adsorção/Desorção. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 4 (1994) 39-48.
4. Council Directive 94/43/EC. *Off. J. Eur. Com.* L227 (1994) 31-55.
5. F.J. Schenck, S.L. Lehotay. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 51.
6. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, 3rd., Elsevier, Amsterdam, 1990.
7. J. Hajslová, K. Holadová, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempný. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 283-295.
8. F.J.E. Gonzáles, M.E. H. Torres, E.A. López, L. Cuadros-Rodríguez, J.L.M. Vidal, Matrix-effects of vegetable commodities in electro-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 155-165.