

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA DEGRADABILIDADE DE CARBENDAZIM

*C. M. M. de S. Silva, R. B. Abakerli, E. F. Fay,
Embrapa Meio Ambiente - Rodovia SP-340, km 127,5, Caixa Postal 69, 13820-000,
Jaguariúna, SP. celia@cnpma.embrapa.br*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi validar a metodologia que permita esta quantificação. Após seleção da coluna, tendo-se optado pela coluna de troca catiônica Shim-Pack WCS-1 e, as seguintes condições cromatográficas: temperatura da coluna 40°C; fase móvel: fosfato de amônio 0,0125M; fluxo: 0,2mL min.⁻¹ e detector de absorvância operando a 276nm, o método foi aplicado em ensaio de degradação de carbendazim, utilizando meio de cultura batata-dextrose (BD-50%) para a determinação das percentagens de recuperação do fungicida. O procedimento de extração utilizado neste trabalho permitiu a determinação dos resíduos de carbendazim com alta sensibilidade. A detecção positiva por CLAE foi baseada no tempo de retenção e no espectro do detector de conjunto de fotodiodos. A confirmação do pico foi possível pela comparação do tempo de retenção e o espectro de absorvância em ultravioleta da molécula teste, indicando índice de similaridade variando entre 0,99 e 1 entre a solução padrão de carbendazim e o meio de cultura suplementado com o fungicida.

INTRODUÇÃO

Carbendazim e benomil são compostos pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, possuem atividade fungicida e compartilham o mesmo modo de ação, isto é, interferem na mitose dos fungos, inibindo principalmente o desenvolvimento dos tubos germinais, a formação dos apressórios e o crescimento micelial (Davidse, 1982; Tomlin, 2000). No Brasil em 2001, 23% do uso de fungicidas utilizados pertenciam à classe dos benzimidazóis (Andef, 2003), que continuam entre os principais fungicidas utilizados na agricultura por controlar vários fungos patogênicos, além de apresentar características acaricidas (Rajagopal et al., 1984).

Por causa disso há um grande interesse na quantificação desses compostos nas avaliações de seu destino ambiental e em estudos sobre o seu efeito em organismos não alvo.

A degradação dos benzimidazóis no solo segue os mecanismos gerais da degradação de pesticidas sendo que a rota principal é a microbiológica (Tomlin, 2000). Uma completa degradação é alcançada apenas por meio de um pequeno número de linhagens microbianas que são capazes de crescer utilizando o pesticida como única fonte de carbono (Alexander, 1999). Experimentalmente a avaliação qualitativa e quantitativa da dissipação de um pesticida é feita por diversas técnicas, tais como o emprego da cintilação líquida com compostos radiomarcados (Musumeci et al., 1980; Singh & Chiba, 1993) ou com a utilização de cromatografia líquida ou gasosa (Dhoot & Rosario, 1993; Bernal et al., 1997). A técnica cromatográfica permite o acompanhamento simultâneo do desaparecimento do produto e o aparecimento de compostos intermediários ou metabólitos. Os fungicidas benzimidazóis são difíceis de

determinar por cromatografia gasosa devido a sua polaridade e são preferencialmente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Watkins, 1976). Existem relatos de determinações por fase reversa (Austin et al., 1976; Belanger, 1989; Singh & Chiba, 1993), fase normal (Bichi et al., 1989), ou troca iônica (Kirkland et al., 1973). Porém, poucos foram os métodos que separaram o carbendazim (CB) do seu produto de degradação 2-aminobenzimidazol (2-AB).

O objetivo deste estudo foi determinar as condições experimentais para separação e quantificação de carbendazim e seu metabólito 2-AB por CLAE e validar um método de extração deste do meio de cultura para aplicação nos ensaios de biodegradação. Que seja de nosso conhecimento, não foi abordado até o momento na literatura, nenhum método de determinação direta de carbendazim como proposto no presente trabalho, através de cromatografia de troca catiônica e conjunto de fotodiodos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes

Acetato de etila, para análise de resíduos, 99% puro; fosfato de amônio monobásico, para análise em CLAE, 99% puro; ácido clorídrico fumegante, para análise; carbendazim, padrão analítico 99% puro, e o correspondente grau técnico, lote D033, 99% puro, cedidos pela Empresa Hoechst, São Paulo, SP/Brasil. 2-aminobenzimidazol, padrão analítico 99% puro, Lab. Dr. Ehrenstorfer.

2. Equipamentos

Os procedimentos analíticos foram conduzidos utilizando-se um cromatógrafo líquido marca Shimadzu modelo LC-10AD, acoplado a um detector de ultravioleta com conjunto de fotodiodos, marca Shimadzu modelo SPD-M6A, equipado com um sistema deliberador de solvente, um autoinjeter Shimadzu modelo SIL-10A e um forno Shimadzu modelo CTO-10A.

3. Condições cromatográficas

Utilizou-se coluna de troca catiônica Shim-Pack WCX-1 de 5cm de comprimento por 4mm diâmetro interno. As condições cromatográficas foram: temperatura da coluna 40°C; fase móvel: fosfato de amônio 0,0125M; fluxo: 0,2mL min.⁻¹; comprimento de onda 276nm; volume de injeção 50µL. Nessas condições os tempos de retenção do carbendazim e do 2-aminobenzimidazol foram de aproximadamente 4,5 e 16 minutos, respectivamente.

A quantificação foi feita por interpolação utilizando-se regressão linear de curvas de calibração obtidas com soluções padrões de carbendazim versus a resposta (área do pico), obtida no cromatograma. Para o intervalo de concentrações utilizado (10-100µg.mL⁻¹), a correlação obtida foi de R²=0,999. As curvas foram obtidas com pelo menos 5 pares de concentração versus a resposta e foram construídas para cada determinação efetuada. Em amostras de meio de cultura fortificadas a 100µg.mL⁻¹, as porcentagens de recuperação variaram em torno de ± 70%.

4. Aplicação do método

O método foi aplicado para um ensaio de degradação de carbendazim utilizando-se meio de cultura batata-dextrose (BD 50%): caldo de batata, 10mL; dextrose, 10mg; água destilada, 1L. Este meio foi suplementado com CB ($100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), para determinação das porcentagens de recuperação do fungicida. Para tanto, Erlenmeyers contendo 150mL de meio de cultura (BD-50% + CB) foram incubados sob agitação constante (180rpm) à $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por períodos de 1, 2, 4, 7, 15 e 30 dias.

A determinação quantitativa da molécula parental, realizada a partir do primeiro dia após a incubação, foi conduzida por cromatografia de troca iônica após extração e purificação das amostras. As etapas desse processo seguiram a metodologia descrita por Austin & Briggs (1976) modificada por Silva (1996), descrita na Figura 1.

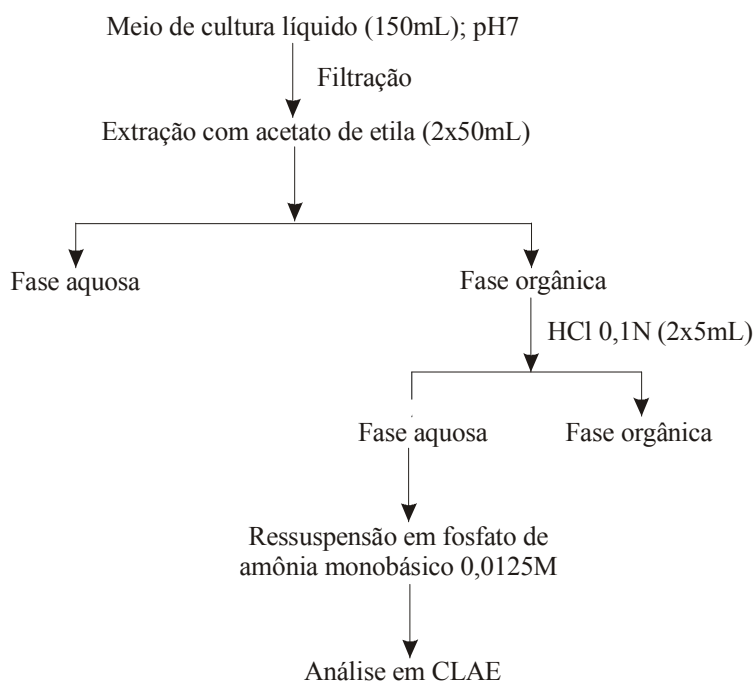


Figura 1. Etapas do processo de extração e purificação das amostras contendo carbendazim e 2-AB.

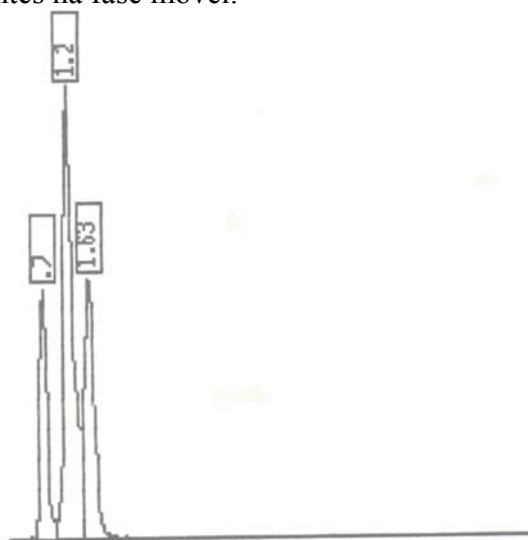
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 descreve os resultados obtidos para a separação de carbendazim de 2-AB em colunas de fase reversa e de troca catiônica utilizados neste desenvolvimento.

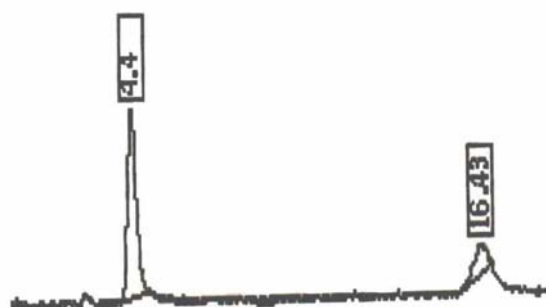
Tabela 1. Colunas, fase móvel e condições cromatográficas utilizadas na validação da metodologia para quantificação de resíduos de carbendazim.

Colunas	Tempo de retenção		Fluxo (mL min. ⁻¹)	Absorbância (nm)	Fase móvel (v/v)
	CB	2-AB			
Zorbax ODS, 25cm x 4,6mmx5µm		--	1	280-290	acetonitrila: água (50/50)
Nova Pack C18: 15cmx3,9mmx5µm	1,2	1,4	1	280-290	acetonitrila: água (50/50)
Nova Pack C18: 15cmx3,9mmx5µm	1,53	1,46	0,5	280-290	acetonitrila: água (50/50)
Nova Pack C18: 15cmx3,9mmx5µm	0,93	0,93	0,5	280-290	acetonitrila: água (85/15)
Nova Pack C18: 15cmx3,9mmx5µm	2,16	1,96	0,5	280-290	acetonitrila:acetato de amônio (68/32) e (85/15)
Lichrospher 100 5µm; 12cmx4mm	1,03	1,1	0,5	280-290	acetonitrila:água (85/15)
Shim-Pack WCX-1, 5cm x 4mmx5µm	4,36	16,49	0,2	276	Fosfato de amônio 0,0125M pH 4,6

A variação de comprimento da coluna, relação de solventes da fase móvel, variação de fluxo e utilização de tampão acetato de amônio pH 4,67 (0,0125M) não ofereceram separação dos compostos (Figura 2a). A separação foi obtida quando se utilizou coluna de troca catiônica e fase móvel com tampão fosfato de amônio, variando o pH entre 4,6 a 6,0 (Figura 2b). Optou-se por trabalhar em pH 4,6 (0,0125M) devido a excelente separação e menores tempos de retenção. Porém a utilização de coluna de troca catiônica para a separação cromatográfica, demandou para a aplicação do método em ensaios de biodegradação uma extração prévia dos compostos do meio de cultura, uma vez que este é rico em cátions que podem competir por sítios ativos do suporte da coluna prejudicando a sua resolução. Esta coluna permitiu a determinação de CB e 2-AB por períodos prolongados sem modificações das características cromatográficas. No entanto, foi observado ser necessário a sua regeneração periódica, devido à deposição de traços de cátions presentes na fase móvel.



(a)



(b)

Figura 2. Cromatogramas mostrando separação de carbendazim e 2-aminobenzimidazol. a) separação em fase reversa, coluna Nova Pack C18, fase móvel acetonitrila:água (85:15), fluxo 1 mL min^{-1} , comprimento de onda 280-290nm e b) separação por troca catiônica, coluna Shim Pack WCX-1, fase móvel fosfato de amônio dibásico $0,025\text{ M}$, pH 6,0; fluxo $0,2\text{ mL min}^{-1}$ e comprimento de onda 276nm.

Concentrações da ordem de $0,3\mu\text{g mL}^{-1}$ de carbendazim e $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ de 2-AB foram passíveis de detecção. Ensaio de recuperação efetuado com padrão de carbendazim, foram de $\pm 70\%$ para carbendazim e $\pm 30\%$ para o metabólito 2-AB. Portanto, o procedimento de extração utilizado nesse trabalho permitiu a determinação de carbendazim e de 2-AB, em meio de cultura líquido.

A Tabela 2 descreve os resultados de recuperação de carbendazim, aplicado na concentração de 100 mg mL^{-1} em meio de cultura BD-50% e incubados de 1 a 30 dias. Este resultado foi obtido com a aplicação do método descrito, nas amostras controle, dos ensaios de biodegradação.

Tabela 2. Recuperação de carbendazim (%) em meio de cultura (BD-50%) suplementado com o fungicida carbendazim ($100\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento*	Dias					
	1	2	4	7	15	30
M.C. + CB	70,45	75,21	72,86	71,78	70,25	70,93

*Legenda: CB = carbendazim; M.C. = meio de cultura

O método permitiu recuperação acima de 70% para CB. A formação de 2-AB não foi observada nos ensaios de biodegradação, quando utilizado *Alternaria alternata* como fungo degradador. Segundo Kirkland et al. (1973) este metabólito é mais sujeito a variação que o carbendazim e é mais difícil de extrair, devido a sua maior polaridade e a possibilidade de reação dos grupos amino livres da molécula com outros componentes do substrato.

Uma vez que as técnicas cromatográficas permitem a separação e a quantificação do composto parental e dos produtos de degradação, pode-se afirmar, considerando que a maioria dos fungicidas benzimidazóis absorvem fortemente a luz ultravioleta, que a separação nos fornece uma quantificação confiável de carbendazim. Esta seletividade é, em grande parte, resultado da alta eficiência da coluna de troca catiônica usada nesse

estudo. A quantificação foi baseada na comparação da área do pico da amostra em uma curva de regressão linear derivada dos padrões controle.

A confirmação da identidade do pico foi possível pela comparação do tempo de retenção e o espectro de absorvância em ultravioleta do carbendazim. As figuras 3 e 4 demonstram o cromatograma tridimensional e o espectro de absorvância da molécula de carbendazim, respectivamente, indicando índice de similaridade variando entre 0,99 a 1 entre a solução padrão de carbendazim e o meio de cultura suplementado com o fungicida.

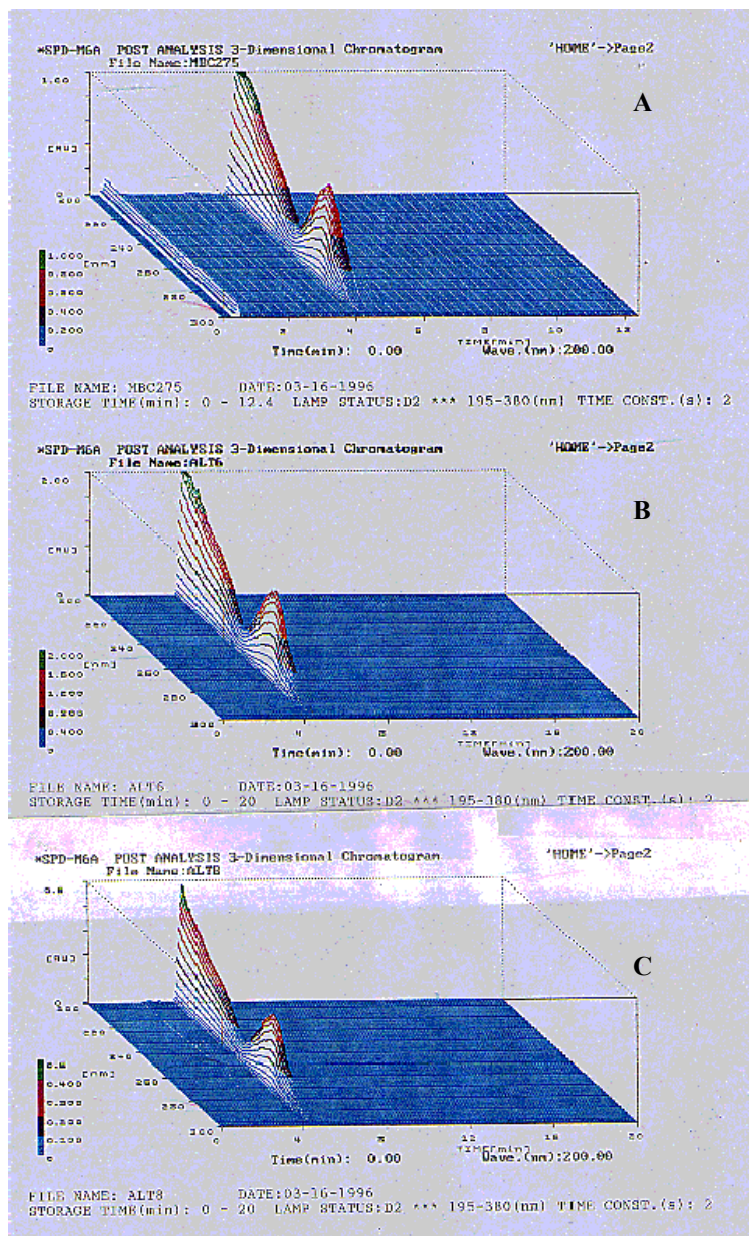


Figura 3. Cromatograma tri-dimensional da molécula de carbendazim em três diferentes condições: A) padrão de carbendazim; B) meio de cultura + carbendazim; C) meio de cultura + carbendazim + *Alternaria alternata*.

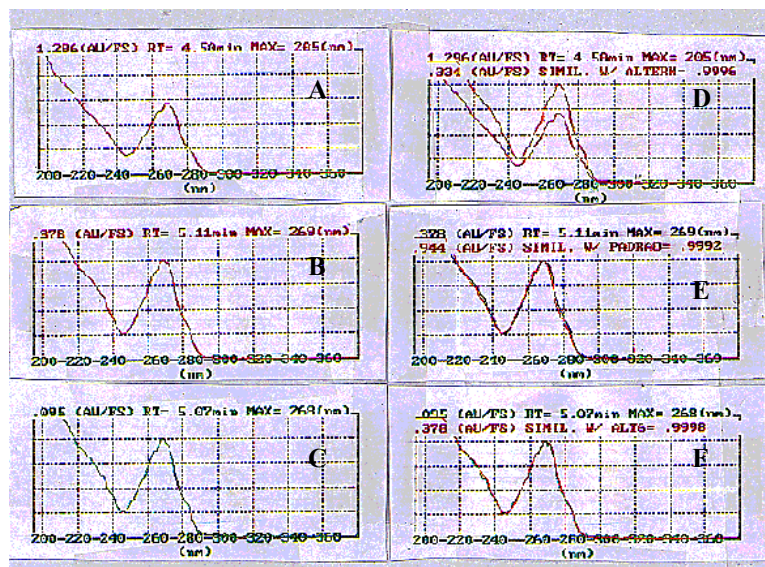


Figura 4. Espectro de absorvância da molécula de carbendazim em diferentes amostras: A) padrão de carbendazim; B) meio de cultura + carbendazim; C) meio de cultura + carbendazim + *Alternaria alternata*; D) índice de similaridade entre A e C; E) índice de similaridade entre A e B; F) índice de similaridade entre B e C.

CONCLUSÃO

- O método apresentado permitiu a determinação quantitativa de carbendazim com seletividade e sensibilidade adequada aos objetivos do trabalho de biodegradação
- Esta seletividade foi resultado da utilização de cromatografia de troca catiônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2.ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ANDEF – Associação Nacional de Defensivos Agrícolas. Disponível < <http://www.andef.com.br>> Acesso em: novembro de 2003.
- AUSTIN, D.J.; LORD, K.A.; WILLIAMS, I.H. High pressure liquid chromatography of benzimidazoles. *Pesticide Science*, v.7, p. 211, 1976.
- AUSTIN, D.J.; BRIGGS, G.G. A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies. *Pesticide Science*, v.7, n.2, p.201-210, 1976.
- BÉLANGER, A. Residues of azinphosmethyl, cypermethrin, benomyl and clorothalonil in a monarda and peppermint oil. *Acta Horticulture*, v. 249, p.67-73, 1989.
- BERNAL, J.L.; NOZAL, M.J. del; TORIBIO, L.; JIMÉNEZ, J.J.; ATIENZA, J. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. *Journal of Chromatography A*, v. 787, p. 129-136, 1997.

11. BICCHI, C.; BELLIARDO, F.; CANTAMESSA, L. Simultaneous determination of benzimidazole fungicides by HPLC on apples, pears and their pulps. *Pesticide Science*, v. 25, p. 355-360, 1989.
12. DAVIDSE, L.C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S.G. eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen: Centre of Agricultural Publishing and Documentation, 1982. P. 60-70.
13. DHOOT, J.S.; ROSARIO, A R. DEL Determination and confirmation of benomyl and carbendazim in water using high-performance liquid chromatography and diode array detection. *Journal of Chromatography*, v. 645, p. 178-181, 1993.
14. KIRKLAND, J.J.; HOLT, R.F.; PEASE, H.L. Determination of benomyl residues in soils and plant tissues by high-speed cation exchange liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.21, p. 368-371, 1973.
15. MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Persistência do fungicida carbendazim em amostras de solos do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, v. 5, p. 305-309, 1980.
16. RAJAGOPAL, B.S.; BRAHAMAPRAKASH, G.P.; SETHUNATHAN, N. Degradation of carbofuran by enrichment cultures and pure cultures of bacteria from flooded soils. *Environmental Pollution Series. A* v. 36, 1984.
17. SILVA, C.M.M.S. Biodegradação do fungicida carbendazim. Rio Claro: UNESP, 1996. 86p. (Tese de doutorado).
18. SINGH, R.P.; CHIBA, M. *Journal of Chromatography*, v. 643, p. 249-260, 1993.
19. TOMLIN, C.D.S. (ed.) *The pesticide manual*. 12. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000. p.135.
20. WATKINS, D.A.M. Benzimidazole pesticides: analysis and transformations. *Pesticide Science*, v. 7, p. 184-192, 1976.