PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM UVA POR CROMATOGRAFIA À LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA *

SANDRO NAVICKIENE**
MARIA LÚCIA RIBEIRO***

Descreve-se método para a determinação de resíduos do fungicida Carbendazim em amostras de uva. O procedimento compreende extração simples com hexano:acetato de etila (1:1, v/v) e análise por cromatografia à líquido de alta eficiência, empregando coluna de fase reversa, fase móvel composta de metanol:solução aquosa 1% de fosfato ácido de potássio (65:35) e detecção e quantificação na faixa ultra violeta visível (UV-VIS) a 286 nm. Os valores percentuais de recuperação de seis análises para cada um dos três diferentes níveis de fortificação (0,5; 1,0; 5,0 mg/Kg) variaram de 76 a 101%, com coeficientes de variação entre 4,5 e 10,4. Os limites de detecção e de quantificação do método foram de 0,2 e 0,5 mg/Kg, respectivamente. Estes resultados sugerem que o método estudado é sensível e eficiente para determinação de resíduos de Carbendazim em uva.

1 INTRODUÇÃO

O fungicida sistêmico Carbendazim, da classe dos benzimidazóis, é empregado no tratamento de frutas, vegetais e cereais, tanto no período de pré como no de pós-colheita, para evitar que doenças fúngicas reduzam o rendimento da produção e a qualidade dos produtos comercializados.

A fruticultura representa atividade de grande importância econômica e social para os países do Mercosul. A comercialização de frutas como laranja, limão, pêssego, uva, pêra, maçã, banana, morango, ameixa, mamão e melão rendeu ao Brasil US\$ 14 milhões em 1996 (1).

- * Trabalho desenvolvido na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Araraquara, SP.
- ** Pós-Graduando em Química, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP (e-mail: sandnavi@iq.unesp.br).
- *** Professora, Doutora em Química, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP.

Atualmente, somando pouco mais de 60.000 hectares, a cultura da videira encontra-se estabelecida em quatorze Estados brasileiros. Constitui-se na base de sustentação da exploração agroindustrial de algumas regiões, não somente pela produção de uvas de mesa, mas também como matéria-prima para elaboração de vinhos e derivados (2). As videiras e, consequentemente, as uvas, estão sujeitas a intensos ataques de mariposas como *Lobesia botrana* e *Clysis ambiquella* e ácaros como *Eotetranychus carpini*, que são insetos fitopatogênicos de fácil detecção e controle por pesticidas. Contudo, as ameaças sérias que podem levar à perda de produção são as doenças fúngicas, como míldio, oídio e mofo cinzento. Alguns fungicidas, como Carbenfendazim, são aplicados no controle destas pragas (3,4).

Monitoramentos dos resíduos de Carbenfendazim, portanto, são importantes para verificar se os níveis encontrados correspondem aos limites máximos de resíduos estabelecidos pelas legislações dos países exportadores e importadores para viabilizar a comercialização desta fruta e resguardar a saúde da população. Para tanto, é necessário o emprego de métodos analíticos sensíveis, associados com técnicas cromatográficas, que forneçam avaliação destes resíduos, seja durante o plantio, seja na etapa de pós-colheita.

Os métodos analíticos descritos na literatura empregam diferentes solventes para a extração de resíduos de Carbenfendazim de amostras de frutas, tais como: clorofórmio, metanol, acetato de etila e acetona (5-10, 13-17). Além disso, apresentam número razoável de etapas experimentais que os tornam muito laboriosos, pois consistem via de regra em: extração, filtração, transferência de alíquota para funil de separação, partição e uma etapa de remoção de água. A quantificação dos resíduos de Carbenfendazim, devido à labilidade térmica, é realizada por cromatografia à líquido de alta eficiência com detecção na faixa ultra-violeta visível (UV-VIS) ou fluorescência.

Neste trabalho descreve-se procedimento simplificado de extração de resíduos de Carbenfendazim em amostras de matriz de uva e sua determinação por cromatografia à líquido de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na faixa UV-VIS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EQUIPAMENTO

Cromatógrafo à Líquido Shimadzu, equipado com injetor Rheodyne, detector espectrofotométrico na região UV-VIS SPD-10A, bomba LC-10AS, acoplado a integrador Shimadzu G-R6A, coluna (125 x 4 mm, 5 µm) e pré-coluna de aço inox Lichrospher 100 RP-18, Merck.

As condições de operação foram: fase móvel - metanol:solução aquosa 1% de fosfato ácido de potássio - 65:35 (modo isocrático), v/v;

vazão da fase móvel, 0,4 mL/min; temperatura, 25 °C; volume injetado, 20 µL (loop) e detecção no UV-VIS, 286 nm.

2.2 MATERIAL

Acetato de etila, hexano e metanol (nanograde, Mallinckrodt), cloreto de sódio (p.a.), sulfato de sódio anidro (p.a.) e fosfato ácido de potássio (p.a.). O padrão certificado do princípio ativo Carbenfendazim (99% de pureza) foi adquirido do Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha).

2.3 AQUISIÇÃO, AMOSTRAGEM E PREPARO DA AMOSTRA DE UVA

Amostras de uva Niagara Rosada *in natura* foram adquiridas no comércio da cidade de Araquara, SP. O procedimento de amostragem consistiu em separar de maneira aleatória três porções de amostras de um quilo cada uma. As unidades amostradas foram misturadas e duas quartas porções em posições opostas foram tomadas, formando a amostra composta, da qual foram efetuadas reduções subsequentes de tamanho. Em liquidificador, porções de uvas foram homogeneizadas e armazenadas em recipientes selados sob atmosfera de nitrogênio, em freezer.

2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE CARBENDAZIM

A solução estoque do padrão certificado do fungicida Carbenfendazim foi preparada em metanol na concentração de 800 µg/mL. Posteriormente, por diluições sucessivas foram obtidas as soluções intermediárias e as de trabalho, utilizadas para a determinação da linearidade do detector, para a fortificação das amostras de uva e para a obtenção das curvas de calibração. As soluções foram mantidas em freezer (-18 °C).

2.5 FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE UVA

O procedimento de fortificação consistiu em adicionar, de forma homogênea, à 20 g de amostra testemunha, isto é, que não contém o fungicida em estudo, 1,0 mL de solução padrão de Carbenfendazim nas concentrações de 2,0; 4,0 e 20,0 ppm, de maneira a resultar nos níveis de concentração desejados: 0,5; 1,0 e 5,0 mg/Kg, respectivamente.

2.6 MÉTODO

Uma alíquota de 5 g de amostra foi transferida para erlenmeyer, juntamente com 2 g de cloreto de sódio (anidro) e 10,0 mL do sistema de solvente hexano:acetato de etila (1:1, v/v). A mistura foi homogeneizada com agitador de garra, durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para novo frasco e seco com 2 g de sulfato de sódio anidro. O extrato foi

concentrado até o volume de aproximadamente 1 mL em evaporador rotatório a 40 °C, retomado em 10,0 mL da fase móvel, sendo 20 µL analisados por cromatografia à líquido de alta eficiência. O esquema do procedimento experimental foi comparado com a sugestão de THARSIS et al. (1997) (Figura 1).

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM MATRIZ DE UVA

(1) Estudado.
(2) THARSIS et al. (1997).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos preliminares, referentes a procedimento *on-line* de microextração para determinação de acaricidas em clementina (11), bem como metodologia de análise de resíduos dos fungicidas Tiabendazol e Imazalil em laranja (12) nortearam a otimização das condições experimentais do método desenvolvido para amostras de uvas.

A fase móvel (metanol:solução aquosa 1% de fosfato ácido de potássio) foi testada em diferentes proporções de 50:50 a 65:35. A proporção 65:35 mostrou-se adequada, propiciando tempo de retenção de 5,18 min, compatível com a literatura (13) e permitindo a separação do pico do fungicida dos interferentes da matriz. Com a adição do modificador, fosfato ácido de potássio, na fase móvel (metanol-água) obteve-se excelente resolução para o Carbendazim. A identificação e a quantificação de Carbendazim foi realizada, utilizando detector UV-VIS, em 286 nm, que corresponde ao valor de absorção máxima do fungicida Carbendazim (13). A linearidade do detector compreendeu o intervalo de 0,1 a 10 ppm. A equação do gráfico de calibração foi $y = 9,72 + 247,58x$ com coeficiente de regressão de 0,9996.

A validação do método foi baseada na eficiência de recuperação de seis análises para cada um dos três níveis de fortificação (Tabela 1). As médias variaram de 90 a 96%, com coeficientes de variação de 4,5 a 10,4%. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,2 e 0,5 mg/Kg, respectivamente, calculados pelo procedimento estatístico descrito por THIER e ZEUMER (18). O valor de 5,0 mg/Kg é o limite máximo de resíduo permitido pelas legislações brasileira e internacional para a matriz de uva (19, 20).

TABELA 1 - EFICIÊNCIA DA RECUPERAÇÃO DE CARBENDAZIM EM AMOSTRAS DE UVA

Nível de Fortificação (mg/Kg)	Recuperação (%)	Média*	CV*
0,5	76 - 101	90	10,4
1,0	87 - 101	96	5,5
5,0	84 - 96	92	4,5

* média de seis análises.
* coeficiente de variação.

Na avaliação do método estudado frente aos apresentados pela literatura deve-se considerar os valores de recuperação (exatidão), coeficientes de variação (precisão) e a simplicidade do procedimento. A Tabela 2 resalta algumas diferenças entre o método proposto e os descritos para análise de Carbendazim em frutas por BUSHWAY et al.,

1991, GARRIDO *et al.*, 1997, e THARSIS *et al.*, 1997. Verifica-se que o valor de recuperação obtido (96%) é superior aos valores descritos pelos autores citados para níveis similares de fortificação, demonstrando a eficiência do método proposto e a redução significativa de massa de amostra e de volume de solvente empregado. Além disso, compreende uma única etapa de extração enquanto que o método de THARSIS *et al.* para matriz de uva envolve etapas de extração, partição, centrifugação e *clean up*. Estes dados evidenciam que o procedimento de análise estudado é simples, eficiente, econômico e viável para determinação de resíduos do fungicida Carbenrazim em matriz de uva.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM FRUTAS

Método	Massa de Amostra (g)	Volume Total de Solvente (mL)	Nível de Fortificação (mg/Kg)	Média (CV)*
Procedimento Estudado	Uva (5)	20	1,0	96 ^a (5,5)
GARRIDO <i>et al.</i>	Maçã (10)	65	1,0	82 ^b (5,7)
BUSHWAY <i>et al.</i>	Blueberry (50)	350	0,8	76 ^c (3,8)
THARSIS <i>et al.</i>	Uva (10)	68	1,2	75 ^d (2,6)

*média de: ^a5, ^b6, ^c6 análises, ^dcoeficiente de variação.

4 CONCLUSÃO

O método proposto para determinação de resíduos de Carbenrazim em amostras de uvas fortificadas mostrou-se rápido e eficiente. Sua principal característica é a realização de apenas uma etapa de extração, que representa considerável economia de vidraria, reagentes, solventes e também no tempo de análise, quando comparado com os métodos descritos na literatura.

Abstract

A simple and efficient method for the determination of residues of the fungicide Carbenrazim in grapes is described. The procedure is based on the simple extraction with hexane:ethyl acetate(1:1, v/v) of homogenized fruit sample and further analysis with HPLC-UV employing a reverse phase column, mobile phase composed of methanol.

1% potassium acid phosphate aqueous (65:35) and detection and quantification in UV-visible range (UV-VIS) in 286 nm. The percentual values of recuperation of the six analyses for each different levels of fortification (0.5; 1.0; 5.0 mg/Kg) ranged from 76 to 101%, with variation coefficients between 4.5 and 10.4. The detection and quantification limits of the method were of 0.2 and 0.5 mg/Kg, respectively. These results suggest that the studied method is sensitive and efficient for determination of residues of Carbenrazim in grape.

REFERÊNCIAS

- 1 SOARES, S. IEA faz estudo sobre frutas no Mercosul. O Estado de São Paulo, Suplemento Agrícola, 06 maio 1998.
- 2 MARTINS, F.P. Aspectos da viticultura brasileira [on line]. Jundiaí, 16 jun 1998. Disponível: <http://www.b7C/uva.htm> [Acesso em 16 jun. 1998].
- 3 CHAVES, B.A.; PADRA, M.C. Manejo post-cosecha de productos agrícolas. San José, Costa Rica: Editorial Universidade Estatal a Distancia, 1995. p. 67-76.
- 4 CARDOSO, C.O.N. et al. Guia dos fungicidas. Piracicaba: Summa Phytopathologica, 1976. p. 199-204.
- 5 MOTOHASHI, N.; NAGASHIMA, H.; MEYER, R. Simultaneous determination of fungicide residue citrus. J. Liq. Chromat., v. 13, n. 2, p. 345-355, 1990.
- 6 MOTOHASHI, N.; NAGASHIMA, H.; MEYER, R. High-performance liquid chromatography of fungicides in citrus fruits. J. Liq. Chromat., v. 14, n. 19, p. 3591-3602, 1991.
- 7 ANDERSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different glic multi-residue methods on crops containing pesticide residues. Fresenius J. Anal. Chem., v. 339, p. 365-367, 1991.
- 8 AGUERA, A.; CONTRERAS, M.; FERNANDEZ, A. Gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides of horticultural concern. J. Chromat. A, v. 655, p. 293-300, 1993.
- 9 KOINECHE, A. et al. Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials. Fresenius J. Anal. Chem., v. 349, p. 301-305, 1994.

- 10 CHIBA, M.; VERES, D.F. High performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of residual benomil and methyl 2-benzimidazole carbamate on apple foliage without cleanup. *J. Anal. Chem.*, v. 63, p. 1291-1295, 1980.
- 11 CABRAS, P. et al. Determination of buprofezin, pyridaben and tebufenpyrad residues by gas chromatography-mass-selective detection in clementine citrus. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 10, p. 4255-4259, 1998.
- 12 NAVICKIENE, S.; RIBEIRO, M.L. Rapid method for the determination of thiabendazole and imazail residues in orange by capillary column gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, v. 22, n. 5, p. 303-304, 1999.
- 13 DHOOT, J. S.; ROSARIO, A.R. DEL. Determination and confirmation of benomil and carbendazim in water using high-performance liquid chromatography and diode array detection. *J. Chromat. A*, v. 645, p. 178-181, 1993.
- 14 JIMENEZ, J.J.; ATIENZA, J.; BERNAL, J.L. HPLC with fluorescence detection for the study of benomil dissipation on treated lettuces. *J. Liquid Chromat.*, v. 17, n. 18, p. 3999-4017, 1994.
- 15 BUSHWAY, R.J. et al. Determination of thiabendazole in potatoes, fruits, and their processed products by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Inter.*, v. 78, n. 3, p. 815-820, 1995.
- 16 THARSIS, N. et al. Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromat. A*, v. 78, p. 95-101, 1997.
- 17 GARRIDO, J. et al. Chromatographic analysis of Imazail and Carbendazim in fruits method validation and residue monitoring program 1995. *J. Chromat. A*, v. 765, p. 91-97, 1997.
- 18 THIER, H. P.; ZEUMER, H. *Manual of pesticide residue analysis*. Weinheim, Germany: VHC, 1987. v.1, p. 37-44.
- 19 RELAÇÃO de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário: Portarias do Ministério da Agricultura. [Rio de Janeiro]: ILSI - Brazil (International Life Sciences Institute), 1995.
- 20 CODEX ALIMENTARIUS. *Pesticide residues in food*. Rome: FAO/WHO, 1992. v. 2