

***Boletim de Pesquisa* 58**
e Desenvolvimento ISSN 1516-4675
Maio, 2011

**Determinação de Resíduos de Paclobutrazol
em Manga (*Mangifera indica* L.) por
Cromatografia Acoplada a Espectrometria de
Massas (LC-MS/MS)**





ISSN 1516-4675

Maio, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 58

**Determinação de Resíduos de
Paclobutrazol em Manga
(*Mangifera indica L.*) por
Cromatografia Acoplada a
Espectrometria de Massas (LC-
MS/MS)**

Vera Lúcia Ferracini
Sônia C. N. de Queiroz
Maria Aparecida Rosa
Paulo R. C. Lopes

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2011

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3311-2700 Fax: (19) 3311-2640
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membro Nato: *Adriana M. M. Pires*

Membros: *Lauro Charlet Pereira, Vera Lúcia S. S. de Castro,
Maria Conceição P. Y. Pessoa, Nilce Chaves Gattaz e Luiz
Alexandre Nogueira de Sá*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Alexandre R. da Conceição*

1ª edição eletrônica
(2011)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Ferracini, Vera Lúcia.

Determinação de resíduos de paclobutrazol em manga (*Mangifera indica* L.) por cromatografia acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) / Vera Lúcia Ferracini, Sônia C. N. de Queiroz, Maria Aparecida Rosa, Paulo R. C. Lopes. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

16 p. – (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 58).

1. Regulador de crescimento. 2. Resíduo químico. 3. Manga. I. Ferracini, Vera Lúcia. II. Queiroz, Sônia C. N. de Queiroz. III. Rosa, Maria Aparecida. IV. Lopes, Paulo R. C. I. Título. II. Série.

CDD 631.89

© Embrapa 2011

Sumário

Resumo	05
Abstract	06
Introdução	07
Material e Métodos	08
Resultados e Discussão	10
Conclusões	13
Referências.....	14

Determinação de Resíduos de Paclobutrazol em Manga (*Mangifera indica* L.) por Cromatografia Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

*Vera Lúcia Ferracini*¹

*Sônia C. N. de Queiroz*²

*Maria Aparecida Rosa*³

*Paulo R. C. Lopes*⁴

Resumo

Paclobutrazol (PBZ) é um regulador de crescimento que tem sido utilizado para alterar o ciclo fenológico da mangueira visando a produção de frutos em qualquer época do ano. É bastante utilizado na região nordeste do Brasil e a determinação dos resíduos na fruta é importante pois há pouco conhecimento sobre o acúmulo desta substância na planta em condições brasileiras. Para isso foi necessário adaptar um método analítico para determinar resíduos de paclobutrazol em frutos de manga. Após a extração do PBZ na matriz o extrato foi analisado por LC-MS/MS. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para o PBZ foram de $0,25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e $1,25 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. As recuperações foram de 82 a 94% e se encontram dentro da faixa considerada aceitável, que é de 70-120%. Após a validação o método foi empregado na determinação de resíduos de PBZ em amostras de manga coletadas na região do Vale do São Francisco.

Palavras-chave: manga; LC-MS/MS; resíduos de paclobutrazol.

¹Química, Ph. D. em Química, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. veraf@cnpma.embrapa.br

²Química, Ph. D em Química, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340 - Km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. sonia@cnpma.embrapa.br

³Química, Doutora em Química, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. maria@cnpma.embrapa.br

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 152 - Zona Rural - Caixa Postal 23, Petrolina, PE. proberto@cpatsa.embrapa.br

Determination of Paclobutrazol Residues in Mango (*Mangifera indica* L.) by chromatography - mass spectrometry (LC-MS/MS)

Abstract

Paclobutrazol (PBZ) is a growth regulator that has been used to change the physiological cycle of the mango plants in order to produce fruit in any season. It is widely used in northeastern Brazil and the determination of residues on the fruit is important because little is known about the accumulation of this substance in the plant for Brazilian conditions. For this it was necessary to adapt an analytical method for determining residues of PBZ in mango fruits. After extraction of the PBZ from the matrix, the extract was analyzed by LC-MS/MS. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) obtained for the PBZ were $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $1.25 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The recoveries were 82 to 94% and are within the range considered acceptable, which is 70-120%. After the validation the method was applied to determine residues in PBZ samples collected in the region of the San Francisco Valley.

Key-words: mango; LC-MS/MS; paclobutrazol residues.

Introdução

O paclobutrazol (PBZ) é um regulador de crescimento muito utilizado no cultivo da mangueira na região Nordeste do Brasil. A sua aplicação, além de diminuir significativamente o crescimento vegetativo das plantas, independente das condições de umidade do solo, promove boa floração, frutificação e fixação dos frutos permitindo a produção de mangas em qualquer época do ano na região do Submédio São Francisco. A dosagem de PBZ varia com a cultivar, com o porte e com o estado nutricional da planta. Para a cultivar Tommy Atkins, recomenda-se aplicar 1,0 grama do princípio ativo do produto por metro de diâmetro de copa. A aplicação do PBZ pode ser feita diretamente no solo ou por meio de pulverizações dirigidas à folhagem. A aplicação no solo é mais eficiente e pode ser feita tanto na projeção da copa, como junto ao tronco, devendo-se irrigar logo após, já que a água é o veículo de condução do produto até as raízes. Estudos conduzidos por Paraíba (2007) demonstram que o PBZ pode ser bioconcentrado nos frutos de manga.

O PBZ é absorvido através das raízes com mais eficiência do que através dos ramos e folhagem. Estudos conduzidos por Attiya et al. (1983) e Hampton (1988) demonstraram que este regulador de crescimento permanece ativo no solo por muitos anos e pode afetar severamente o crescimento e desenvolvimento dos cultivos subsequentes pela redução do vigor vegetativo.

Até o momento não foi definido o limite máximo de resíduos (LMR) de PBZ em manga, mas para maçã o LMR é de $0,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (CODEX ALIMENTARIUS, 1993). Considerando o mesmo LMR os autores concluíram que o tratamento em mangueiras, com este regulador de crescimento, nas dosagens específicas, não resulta em resíduos acima dos limites permissíveis para nenhum dos estágios do fruto, até mesmo após três anos consecutivos de tratamento.

O LMR para resíduos de PBZ em solo para a cultura da manga é de $0,02 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (ANVISA, 2008).

Sharma e Awasthi (2005) verificaram a presença de resíduos de PBZ em frutos de manga "Alphonso" de árvores tratadas com 20 e 40 mL de Cultar 25 SC (PBZ 25% w/v), com 5 e 10 g de PBZ, respectivamente, sendo os tratamentos feitos ao redor das plantas (30 cm largura e 30 cm de profundidade). Segundo Sharma e Awasthi (2005), embora resíduos de PBZ estivessem presentes nos frutos no início de formação e praticamente formados,

nos três anos de monitoramento, o mesmo não ocorreu em frutos já prontos para colheita. Os autores concluíram que o uso de PBZ continuamente, em doses recomendadas, poderá não resultar resíduos em frutos em níveis que possam causar algum risco para a saúde humana.

O objetivo deste trabalho foi analisar resíduos de PBZ em frutos de manga (Tommy Atkins) cultivada na região do vale do São Francisco para estimar possível acúmulo de PBZ em polpa de frutos de manga madura e gerar informações sobre este produto nas condições brasileiras.

Material e Métodos

Áreas de estudo

As coletas de frutos de manga foram realizadas em julho de 2007 em três fazendas sendo que duas estão localizadas em Petrolina/PE (Fazenda 1 e Fazenda 2) e uma em Juazeiro/BA (Fazenda 3). As amostras foram coletadas em quatro locais diferentes (Fazenda I - parcela 1 e parcela 8), (Fazenda II - parcela 2) e (Fazenda III - parcela 1) sendo que para cada localidade foram amostradas três árvores e três frutos de cada árvore, considerando as partes superior, mediana e inferior. Na Fazenda I - parcela 1, a idade das plantas é de 13 anos; na Fazenda I - parcela 8, a idade das plantas é de cinco anos; e na Fazenda II - parcela 2 a idade das plantas é de sete anos e todas receberam duas aplicações de PBZ. No caso da Fazenda III - parcela 1, a idade das plantas é de quatro anos e receberam apenas uma aplicação de PBZ. Os frutos foram selecionados e a quantidade coletada foi de acordo com o tamanho mínimo da amostra (2,0 Kg), estabelecida no Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 216, de 15 de dezembro de 2006 (ANVISA, 2006). A região tem histórico de aplicação do PBZ desde 1995. Na Fazenda I - parcela 1 as aplicações ocorreram em dezembro de 2005 e dezembro de 2006. Na Fazenda I - parcela 8 as aplicações ocorreram em abril de 2005 e julho de 2006. Na Fazenda II as aplicações ocorreram em novembro de 2004 e novembro de 2006. Já na Fazenda II a aplicação ocorreu apenas uma vez em setembro de 2006. A amostra-testemunha enviada para o estudo foi coletada em uma fazenda em Juazeiro sem nenhuma referência quanto à distância das fazendas com histórico de aplicação do produto.

A aplicação do PBZ foi feita no solo ao redor da mangueira (30 cm largura e 30 cm de profundidade) por um e dois anos consecutivos e com aplicação de 20 mL do produto comercial Cultar 25 SC (PBZ 25% w/v), com 5 g de PBZ.

Após a coleta, as amostras foram recebidas no laboratório e armazenadas a -20°C por um período de 20 dias até a preparação para análise.

Preparo de Amostras

Os frutos foram cortados para separar o caroço e processados em equipamento adequado (processador) contendo gelo seco. Uma porção de 20 g foi extraída com 100 mL de solução de metanol: água (80:20, v/v) sob agitação durante 30 minutos, de acordo com o método descrito por Stahly e Buchanan

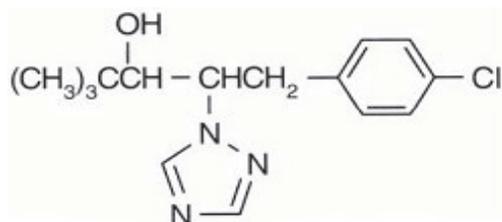


Fig. 1. Estrutura do paclobutrazol

(1986), sendo que no procedimento adotado não foi utilizado metanol gelado. Em seguida realizou-se a filtração, evaporação e nos 20 mL restantes foi ajustado o pH para 11 com solução de NaOH 6 Mol L^{-1} . A seguir foi feita a extração líquido-líquido com três porções de 30 mL de diclorometano evaporado e o extrato foi ressuscitado em 2 mL de solução de metanol: água (80:20, v/v). A limpeza dos interferentes foi feita usando cartucho de florisil de 500 mg e o extrato orgânico coletado neste processo foi evaporado e ressuscitado na fase móvel. As amostras foram transferidas para um frasco de injetor automático e analisadas por LC-MS/MS com ionização *eletrospray* (ESI).

Amostras fortificadas para os estudos de recuperação foram preparadas adicionando volumes adequados da solução do padrão de PBZ em dois níveis (1 x LOQ e 10 x LOQ), em triplicatas de 20 g de amostra de manga testemunha. Cada amostra fortificada foi homogeneizada e deixada em repouso por

30 minutos antes da extração. Todas as etapas posteriores foram feitas da mesma maneira das amostras.

Condições cromatográficas

Utilizou-se um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo com fonte de ionização *eletronspray* (ESI), modelo 1200 L da Varian. A coluna foi C18, (5 μm , 50 x 2 mm d.i.), a fase móvel empregada foi acetonitrila: ácido acético 0,1% (50:50, v/v) e a vazão 0,25 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 50 μL do extrato. O espectrômetro de massas operou em modo MRM no modo de ionização íon positivo. O software *MS Workstation* Versão 6-Varian foi usado para análise dos dados.

Resultados e Discussão

A identificação do PBZ ocorreu pela comparação do tempo de retenção do padrão e pela presença dos fragmentos (íons selecionados) 125, 167 e 236 que foram equivalentes nas amostras e no padrão. A fig. 2 mostra os cromatogramas e espectros de massas referentes a amostra testemunha fortificada com padrão de PBZ na concentração: (a) limite de quantificação do método, (b) 10 vezes o limite de quantificação e (c) padrão de paclobutrazol na concentração 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A curva analítica do PBZ mostrou ser linear na faixa de 0,001 – 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pois apresentou valores de coeficiente de determinação, $r^2 \geq 0,995$ e o gráfico de resíduos não demonstrou tendências. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para o PBZ foram de 0,25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 1,25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente.

Estes resultados indicam que o método é suficientemente sensível para detectar a presença do PBZ em níveis baixos de concentração.

A porcentagem de recuperação média das amostras fortificadas, em dois níveis (1x LOQ, 10x LOQ), em triplicatas e em três dias diferentes foi de 82 a 94% e se encontram dentro da faixa de 70-120%, que é considerada aceitável (SANCO, 2009).

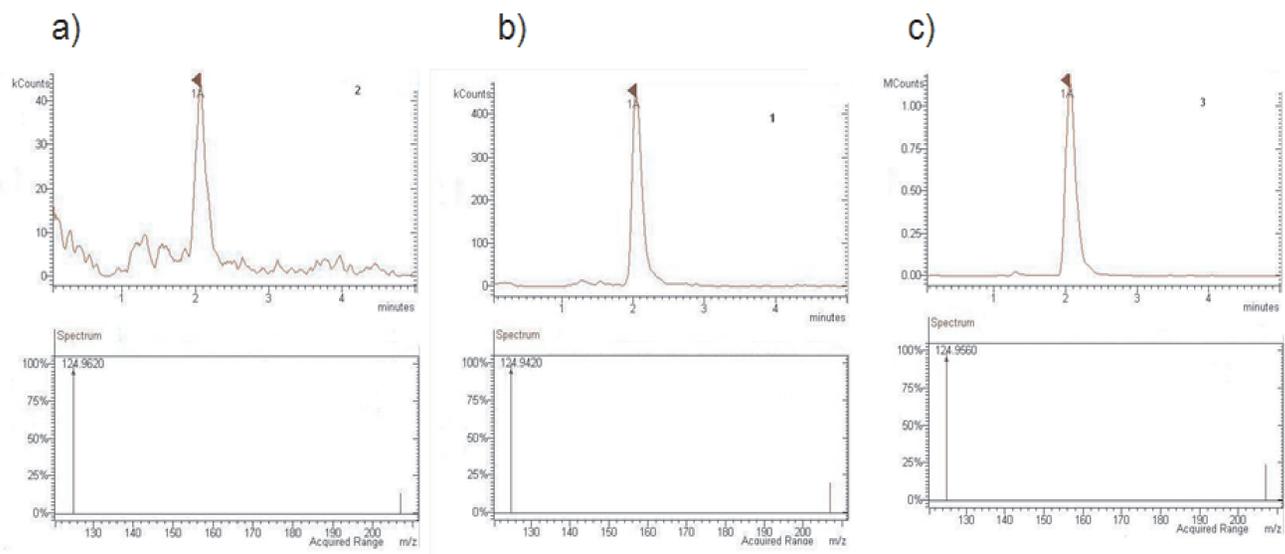


Fig. 2. Cromatogramas e espectros de massa das amostras fortificadas: a) 1x LOQ 1,25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$; b) 10 x LOQ -12,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e c) padrão de 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$

A precisão (repetitividade) foi calculada por meio de repetições realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. Os desvios-padrões relativos para o PBZ foram $\leq 15\%$ e estão em consonância com a literatura, onde valores $< 15\%$ são considerados aceitáveis (SANCO, 2009).

Analisou-se 12 amostras de manga coletadas em três fazendas, localizadas na região do Vale do Rio São Francisco, com plantas variando de quatro a 13 anos de idade, com uma a duas aplicações anuais de PBZ aplicado a uma distância de 20-25 cm do tronco da mangueira. Os resultados encontrados para as 12 amostras coletadas foram menores do que o limite de detecção do método ($0,25 \mu\text{g Kg}^{-1}$), Tabela 1.

Estes resultados indicam que o uso consecutivo de dois anos de PBZ em plantações de manga nas doses recomendadas não mostraram resíduos em níveis detectáveis nos frutos, durante o período de colheita. Contudo, em áreas onde o produto é aplicado regularmente, pode haver risco de contaminação ambiental em razão dos resíduos serem persistentes no solo (FERRACINI et al., 2007).

Tabela 1. Amostras de manga analisadas

AMOSTRAS	$\mu\text{g Kg}^{-1}$	AMOSTRAS	$\mu\text{g Kg}^{-1}$
Fazenda 1 - Parcela 1 Idade da planta 13 anos 02 aplicações		Fazenda 1 - Parcela 8 Idade da planta 05 anos 02 aplicações	
árvore 10 - linha 8	< LOD	árvore 12 - linha 15	< LOD
árvore 14 - linha 5	< LOD	árvore 5 - linha 20	< LOD
árvore 18 - linha 4	< LOD	árvore 3 - linha 36	< LOD
Fazenda 2 - Parcela 2 Idade da planta 07 anos 02 aplicações		Fazenda 3 - Parcela 8 Idade da planta 04 anos 02 aplicação	
árvore 5 - linha 9	< LOD	árvore 3 - linha 3	< LOD
árvore 8 - linha 6	< LOD	árvore 10 - linha 6	< LOD
árvore 5 - linha 3	< LOD	árvore 18 - linha 10	< LOD

Conclusão

Nas fazendas com histórico de utilização do PBZ de uma ou duas aplicações, a presença de resíduos do PBZ, nos frutos das plantas analisadas, está abaixo do limite de quantificação do método ($1,25 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

Como os resíduos de PBZ persistem no solo por um longo período, conforme observado no estudo conduzido anteriormente por esta equipe, é recomendável que seja implementado o monitoramento e a adoção de boas práticas agrícolas, em áreas onde o PBZ é aplicado regularmente.

Referências

ADRIANSEN, E.; OGAARD, P. Residues of paclobutrazol and uniconazole in nutrient solutions from ebb and flood irrigation of pot plants. **Scientia Horticulturae**, v. 69, n.1-2, p. 73-83, 1997.

ANVISA. Resolução RDC nº 216, de 15 de dezembro de 2006. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/show>. Acesso em: 2007.

ANVISA. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/131107.htm> > . Acesso em: 2008.

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.) **Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand**, v. 13, p. 81-87, 1983.

FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N. de; ROSA, M. A.; PEDROSA, D. Determinação de paclobutrazol em solo por cromatografia líquida de alta eficiência. In: CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATÓRIOS, 4., 2007, Madrid. **Actas...** Madrid: IBEROLAB, 2007.

HAMPTON, J.G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 16, p. 167-172, 1988.

OSUNA-GARCÍA, J.A.; BAEZ-SAÑUDO, R.; MEDINA-URRUTIA, V.M.; CHÁVEZ-CONTRERAS, X. Paclobutrazol residues in Tommy Atkins mango fruits (*Mangifera indica* L.). **Revista Chapingo. Serie Horticultura**, v. 7, n. 2, p. 273-275, 2001.

PARÁIBA, L.C. Pesticide bioconcentration modelling for fruit trees. **Chemosphere**, v. 66, p. 1468-1475, 2007.

SANCO/10684/2009. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Implemented by 01/01/2010.

SHARMA, D.; AWASTHI, M.D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit and soil. **Chemosphere**, v. 60, p. 164, 2005.

STAHLY, E.A.; BUCHANAN, D.A. Extraction, purification and quantitation of paclobutrazol from fruit tree tissues. **Horticultural Science**, v. 21, n. 2, p. 534-535, 1986.

Embrapa

Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA