

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AZADIRACTINA EM FOLHAS E FRUTOS DE *Azadirachta indica* POR CLAE-DAD

José Luiz Carneiro da Rocha¹; Dayse Alessandra Almeida Silva²; Marcos Paulo Leite da Silva³; Franceli da Silva⁴; Hugo Neves Brandão⁵;

¹Bolsista FAPESB, Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: luiz_farmaco@hotmail.com

²Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dayse.aasilva@hotmail.com

³Doutorando em Fitotecnia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: mpauloleite@hotmail.com

⁴Colaboradora, Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: franceli@ufrb.edu.br

⁵Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugohnb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: inseticidas, cromatograma, limonoides

INTRODUÇÃO

As plantas consistem em importantes fontes primárias de nutrientes para diversos animais. Tendo em vista seu estado fixo, os vegetais superiores desenvolveram estratégias de defesa contra o ataque de herbívoros, dentre elas destacam-se substâncias originadas do metabolismo secundário. Grande parte destes metabólitos é produzida ou tem sua concentração elevada em resposta ao dano tecidual causado pelo ataque de insetos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Nestes animais, os metabólitos vegetais de defesa apresentam ampla ação podendo agir sobre o comportamento, crescimento e desenvolvimento, afetando sua digestão e reprodução, por exemplo (HELDT, 2005).

Na agricultura, as pragas causadas por insetos constituem-se como um importante fator para o aumento do consumo de insumos agrícolas, causando elevação no preço final dos produtos. Entretanto, o principal problema na utilização de produtos químicos para o controle desses ataques, é o efeito nocivo dos produtos sintéticos largamente utilizados, tanto para o meio-ambiente, com sua persistência no solo e nas águas, quanto para a saúde dos aplicadores e dos consumidores de alimentos contaminados. Aliada a isso, a resistência aos inseticidas convencionais acarreta no aumento progressivo da quantidade e frequência de aplicações, bem como na redução de sua eficiência mesmo em dose mais elevadas (CRUZ, 2002). Em adição, atualmente as pragas estão desenvolvendo resistência, não somente aos inseticidas sintéticos organoclorados e organofosforados, mas também aos sintéticos naturais como os piretróides e rotenóides (GEORGES *et al*, 2008).

Neste âmbito, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de encontrar produtos alternativos aos sintéticos que sejam eficientes no controle de insetos indesejáveis, e que apresentem baixa toxicidade para os demais organismos, além de menor persistência no ambiente. Uma grande quantidade de compostos naturais oriundos de plantas que apresentam algum tipo de proteção ante o ataque de insetos já foi identificada (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os limonóides são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida. Tais substâncias foram isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae. Os limonóides são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade contra insetos, seja interferindo no crescimento, seja pela inibição de sua alimentação. (VIEIRA; FERNANDES; ANDREI, 2000).

Cerca de 100 triterpenóides têm sido identificados das sementes, madeira, cascas, folhas e frutos de *Azadirachta indica* (Meliaceae). (LUO *et al* 1999). A azadiractina A, isolada pela primeira vez por Butterworth e Morgan, e um grupo de outros limonóides estão intimamente associados à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos de *Azadirachta indica* e têm sido extensamente estudados, com o objetivo de se conhecer a química, biossíntese, toxicologia e o potencial inseticida deste grupo de compostos naturais. Os efeitos da azadiractina sobre insetos incluem repelência, deterrência alimentar, deterrência na oviposição, efeitos no desenvolvimento e deformações. (MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001; MULLA; TIANYUN, 1999; VIEIRA; FERNANDES; ANDREI, 2000; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi validar metodologia analítica para quantificação de azadiractina em folhas e frutos de *A. indica* por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector De Arranjo De Diodos (CLAE-DAD).

METODOLOGIA

As folhas e frutos de *A. indica* foram coletados em plantas localizadas na área experimental da sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), em Cruz das Almas, BA. As folhas e frutos de *A. indica* foram colocados para secar em secador de madeira, à sombra, na área externa do Insetário do Laboratório de Entomologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura até manter peso constante. Em seguida foram postos para secar em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 48 horas, após secagem foram triturados em liquidificador doméstico, acondicionados em sacos plásticos e armazenados à temperatura de 5° C em geladeira comercial. As exsiccatas de *A. indica* foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, sob n° HUEFS 196818.

As amostras (frutos e folhas), foram submetidas à extração por ultrassom. Foram adicionados, 50 mL de etanol em 5g de frutos moídos para extração dos analitos de interesse sob radiação de ultrassom constante por 10 min, a solução foi separada do sólido por filtração. A extração foi repetida 5 vezes e todo solvente agrupado. O mesmo procedimento foi utilizado para as folhas moídas.

Os extratos do fruto e da folha foram submetidos à extração em fase sólida para remoção dos interferentes apolares, através da filtração em cartucho (Solid-Phase Extraction - SPE) previamente condicionado com 5 mL de *n*-hexano. Foram solubilizados aproximadamente 20mg do extrato em *n*-hexano (1 mL) e transferidos para o cartucho. As amostras foram então lavadas com outros 4 mL de *n*-hexano e posteriormente removidas do cartucho com 1 mL de metanol. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD.

Os experimentos cromatográficos foram realizados com sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com injetor e detector de arranjo de diodo (DAD) VRW HITACHI L-2455, e forno VRW HITACHI L-2300. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (75 mm x 4 mm i.d.) (3µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5 µm) da Merck.

As condições de análise incluíram método isocrático de eluição conduzido com fase móvel de água (H₂O) e Acetonitrila (CH₃CN) na proporção (65:35), o solvente utilizado foi adquirido em grau CLAE e filtrado através de membranas PTFE (0,45 µm) da Millipore®. A água utilizada nas análises cromatográficas foi purificada usando-se um sistema de

purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O tempo de corrida de 5 minutos e fluxo de 1mL/min. A leitura do detector de arranjo de diodo foi realizada na faixa de 210 à 400 nm e a aquisição cromatográfica foi definida em 217 nm. O padrão utilizado foi Azadirachtin da Sigma-Aldrich, com ~95% de pureza.

O método foi validado de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos do padrão e da amostra, levando-se em consideração: tempo de retenção e espectro de ultravioleta (UV).

A linearidade foi determinada pela curva de calibração, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (R^2). A curva de calibração foi obtida por injeções triplicatas de seis soluções de diferentes concentrações do padrão externo, numa faixa de linearidade de 20-200 µg/mL. A solução estoque do padrão externo foi preparada à concentração de 1 mg/ml.

A precisão foi determinada pela injeção em triplicata de três soluções padrão de salicilato de metila. Esse parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo. A exatidão foi verificada pelo fator de recuperação. Amostras da matriz foram fortificadas com três soluções padrão de concentrações conhecidas (150, 100 e 50 µg/mL). As amostras fortificadas, juntamente com amostra de matriz não-fortificada, foram submetidas a todo o processo de extração e injetadas em CLAE.

O limite de detecção (LD) foi estimado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração multiplicado por 3, enquanto que o limite de quantificação (LQ) foi estimado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração multiplicado por 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seletividade foi determinada pela comparação dos cromatogramas, onde foram avaliados os tempos de retenção (aprox. 3,5 min). Além disso, foram comparados os espectros de UV do padrão e das amostras ($\lambda_{\text{máx}} = 210$ nm).

A linearidade foi avaliada pela elaboração de curva de calibração obtida pela injeção em triplicata de 6 concentrações de padrão externo. A curva de calibração ($y = 5.198.654,89x + 50.337,55$) mostrou-se adequadamente linear, como demonstra o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,99$.

A precisão do método foi determinada pelo desvio padrão relativo de três soluções padrão injetada em triplicata. Os resultados obtidos (0,6%, 1,07% e 3,95%) abaixo de 5% demonstram a precisão do método.

A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação de padrão de AZA, através da adição de soluções padrão em triplicatas de concentrações 150, 100 e 50 µg/mL adicionadas na matriz dos frutos. As taxas de recuperação variaram de 82,1%-87,3%, confirmando a exatidão do método utilizado.

O LD calculado para o método demonstrou que o mesmo mostra-se bastante sensível para a detecção do componente de interesse, sendo estabelecido em 0,2 µg/mL. Da mesma maneira, o LQ também permitiu quantificar concentrações bastante baixas de AZA, sendo determinado em 0,66 µg/mL, indicando que o método é suficientemente sensível.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os inseticidas naturais atuam como alternativa ao efeito nocivo dos produtos sintéticos largamente utilizados, tanto para o meio-ambiente, com sua persistência no solo e nas águas, quanto para a saúde dos aplicadores e dos consumidores de alimentos contaminados. Além disso, a resistência dos insetos aos inseticidas convencionais acarreta no aumento progressivo

da quantidade e frequência de aplicações, bem como na redução de sua eficiência mesmo em dose mais elevadas.

O que se pode considerar, dessa forma, é que a busca por substâncias naturais com efeito inseticida, se constitui em uma maneira promissora na contenção do ataque de pragas, por não interferir negativamente no meio ambiente, por apresentar baixo custo, fácil obtenção e menor probabilidade de surgirem espécies resistentes, como é o caso da azadiractina.

Dessa forma, a realização de validação de metodologia analítica visando a quantificação de substâncias voltadas para esse problema torna-se relevante. Sendo uma metodologia rápida e simples, exigindo pouca quantidade de material para análise, a técnica de CLAE-DAD se mostrou útil para a quantificação de azadiractina em frutos e folhas de *A. indica*, como foi comprovado com os resultados obtidos para cada parâmetro da validação.

REFERÊNCIAS

- BRASIL, Ministério da Saúde Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- CRUZ, I. 2002. Manejo da resistência de insetos pragas a inseticidas com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 15p.
- GEORGES, K.; JAYAPRAKASAM, B.; DALAVOY, S. S.; NAIR, M.G. 2008. Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*.
- HELDT, H. 2005. *Plant Biochemistry*. 3 ed. San Diego: Elsevier.
- LUO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D. 1999. Two Novel Azadirachtin Derivatives from *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products*, 62: 1022-1024.
- MARTINEZ, S. S.; VAN EMDEN, H. F. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotropical Entomology*.
- MULLA, M. S.; TIANYUN, S. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2): 133-52.
- TAIZ, L & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre, Artmed. 3ed.
- VIEGAS JÚNIOR, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26(3): 390-400.
- VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; AMDREI, C. C. 2000. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2 ed. Porto Alegre: Editora Universidade/ UFRGS/ Editora da UFSC, 2000. cap. 34.