

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40

Método Validado para a Determinação de Ácido Salicílico em Folhas de Arroz por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Côrtes
Marta Cristina Corsi de Filippi
Valácia Lemes Silva-Lobo

Santo Antônio de Goiás, GO
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12, Zona Rural
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533-2123
Fax: (62) 3533-2100
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Pedro Marques da Silveira*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membros: *Camilla Souza de Oliveira*
Luciene Fróes Camarano de Oliveira
Flávia Rabelo Barbosa Moreira
Ana Lúcia Delalibera de Faria
Heloisa Célis Breseghello
Márcia Gonzaga de Castro Oliveira
Fábio Fernandes Nolêto

Supervisão editorial: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

Versão online (2015)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Côrtes, Márcio Vinícius de Carvalho Barros.

Método validado para a determinação de ácido salicílico em folhas de arroz por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) / Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortês, Marta Cristina Corsi de Filippi, Valácia Lemes Silva-Lobo. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2015.

16 p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 40)

1. Arroz – Cromatografia. 2. Ácido. I. Filippi, Marta Cristina Corsi de. II. Silva-Lobo, Valácia Lemes. III. Embrapa Arroz e Feijão. IV. Série.

CDD 633.18 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Sumário

| | |
|-----------------------------|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract..... | 6 |
| Introdução..... | 7 |
| Material e Métodos..... | 8 |
| Resultados e Discussão..... | 11 |
| Conclusão | 14 |
| Referências | 14 |

Método Validado para a Determinação de Ácido Salicílico em Folhas de Arroz por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Côrtes¹

Marta Cristina Corsi de Filippi²

Valácia Lemes Silva-Lobo³

Resumo

O objetivo deste trabalho foi validar analiticamente uma metodologia específica para a quantificação de ácido salicílico em folhas de arroz. Ela será utilizada em trabalhos subsequentes que visam a avaliação da relação entre o teor da molécula e o desenvolvimento da brusone e outras doenças em plantas de arroz. Foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que por meio do seu processo de validação apresentou-se: seletiva, precisa, linear, exata e robusta, com Limite de Detecção (LD) = 0,43 ng mL⁻¹ e Limite de Quantificação (LQ) = 1,45 ng mL⁻¹. A metodologia também foi avaliada como vantajosa devido à sua menor complexidade operacional e ao seu baixo custo relativo em relação aos métodos previamente reportados na literatura.

Palavras-chave: Ácido salicílico, CLAE, arroz.

¹ Farmacêutico, Mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

² Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

³ Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

Validation of a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Salicylic Acid Quantification in Rice Leaves

Abstract

The goal of this research was to validate a specific analytical method for the quantification of salicylic acid in rice leaves. It will be used in subsequent studies, which aim to determining the quantitative relationship of the molecule with the development of rice blast and other diseases in rice plants. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique was applied, which through its validation process presented: selectivity, precision, linearity, accuracy and robustness, with Detection Limit (DL) = 0.43 ng ml^{-1} and Quantification Limit (QL) = 1.45 ng ml^{-1} . The methodology was also evaluated as advantageous due to their lower cost and operational complexity in relation to methods previously reported in the literature.

Index terms: Salicylic acid, HPLC, rice.

Introdução

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico naturalmente presente nas diversas espécies vegetais, havendo evidências de que possui papel relevante na ativação das vias metabólicas relacionadas às respostas de defesa das plantas contra os patógenos (DEMPSEY et al., 1999).

Silverman et al. (1995), os primeiros a investigar a relação entre o teor de AS e a resistência do arroz a doenças, assim como Yang et al. (2004), obtiveram resultados semelhantes, indicando que a molécula participa da defesa constitutiva da planta. Contudo, não concluíram sobre o papel do AS na ativação dos mecanismos de defesa induzida na planta.

Várias metodologias foram descritas para a quantificação do AS em diversas espécies de plantas. Entretanto, a maioria das técnicas utilizadas são caracterizadas pelo custo elevado e alta complexidade, dependendo do uso de equipamentos sofisticados, e combinados, como por exemplo: eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-ESI-TOF-MS), descrita por Chen et al. (2011); e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), descrita por Engelberth et al. (2003), não podendo ser prontamente replicadas na maioria dos laboratórios de pesquisa em agronomia/fitopatologia.

O objetivo deste trabalho foi descrever e validar analiticamente uma metodologia específica para a quantificação de ácido salicílico em folhas de arroz, baseada na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), tendo como referência inicial três protocolos descritos para outras espécies de plantas (BOWLING et al., 1994; CHEN et al., 1999; YALPANI et al., 1991). As vantagens do método proposto são: a menor complexidade operacional e o seu menor custo relativo.

O método validado será disponibilizado para a aplicação em estudos futuros, que deverão relacionar o teor de AS com: (a) resistência da planta de arroz a doenças (principalmente à brusone, causada

pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, (b) tratamento com indutores de resistência bióticos, e (c) tratamento com indutores de resistência abióticos, que determinarão se o teor de AS pode ser considerado um indicador da ativação das respostas de defesa do arroz a patógenos ou a outros tipos de estresses.

Material e Métodos

Obtenção do extrato foliar de arroz para a quantificação do ácido salicílico

O extrato vegetal contendo ácido salicílico foi obtido pela fragmentação de amostras compostas de folhas de arroz, coletadas entre 15 e 23 dias após o plantio da cultura, previamente congeladas em nitrogênio líquido. Pesou-se 200 mg de planta fresca pulverizada em grau e pistilo. Ao material vegetal foi adicionado 1,5 mL de solução de metanol 95%. O material foi homogeneizado em agitador do tipo vortex por aproximadamente um minuto, e em seguida, centrifugado por cinco minutos a 10.000x g. Um mililitro do sobrenadante foi separado e a este foram adicionados 500 μ L ácido tricloroacético 5% e 500 μ L de solução contendo acetato de etila: ciclopentano: isopropanol (50:50:1). Após homogeneizar a mistura levemente por inversão, foram retirados 500 μ L da fase superior, e a essa fase, foram adicionados 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, a mistura foi agitada em vortex por trinta segundos e centrifugada por cinco minutos 10.000x g. O sobrenadante foi isolado e liofilizado até a secagem completa. O material seco foi resolubilizado em 100 μ L de solução metanol: tampão acetato 20 mM pH 5,0 (23:77 v/v) e filtrado em filtro de 0,45 μ m. Os extratos foram mantidos congelados a -20 °C até o momento da análise.

Sistema cromatográfico

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento da marca Perkin Elmer®, modelo Flexar®, equipado com bomba quaternária, forno, detector do tipo UV/visível e sistema de processamento de dados *software* Chromera®. Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Perkin Elmer® C18,

5 μm , 2,1 mm x 250 mm, mantida em temperatura de 35 ± 1 °C. A fase móvel foi composta por uma mistura metanol: tampão acetato 20 mM pH 5,0 (23:77 v/v), com fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, mantida sob condições isocráticas, durante 15 minutos, com detecção a 283 nm. As amostras foram injetadas em volumes de 20 μL e analisadas em triplicata. Todas as amostras e soluções padrão foram filtradas em filtros 0,45 μm antes da injeção. Para a realização dos testes de robustez também foram utilizados: (a) coluna C18 da marca Sigma-Aldrich®, (b) temperaturas de coluna de separação de 33 °C e 37 °C, e (c) fluxos de fase móvel de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, em substituição àqueles descritos anteriormente.

Validação do método analítico

Para a realização da validação do método analítico, tomaram-se como base os parâmetros descritos no documento do Inmetro (2011), em Ribani et al. (2004) e na dissertação de mestrado realizada por Reis (2013).

Seletividade

A seletividade do método analítico foi caracterizada pela comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção no ultravioleta, do padrão de referência de AS e do AS na amostra, por meio da análise dos cromatogramas. Coinjeções da amostra com o padrão também foram realizadas.

Linearidade

A linearidade do método analítico foi caracterizada pela construção de uma curva de calibração com o padrão de referência de AS em concentrações variando de 10,0 – 1000,0 ng mL^{-1} . A curva de calibração foi realizada em triplicata. A equação da reta foi obtida para a curva de calibração pelo método dos mínimos quadrados e expressa por “ $y = ax + b$ ”, em que “a” é o coeficiente angular e “b” o coeficiente linear. A faixa linear foi determinada pelo coeficiente de determinação (r^2).

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela relação entre as curvas padrão e a curva média, por meio das equações: “ $LD = (Dp \times 3)/IC$ ” e “ $LQ = (Dp \times 10)/IC$ ”, onde “ Dp ” é o desvio padrão de “ b ” das curvas padrão obtidas e “ IC ” é o coeficiente angular “ a ” da curva de calibração.

Precisão

A precisão foi determinada em níveis de repetibilidade (precisão intracorrída) e de precisão intermediária (precisão intercorrída), sendo expressas pelo coeficiente de variação (CV%), calculado pela equação: “ $CV\% = (Dp \times 100)/CMD$ ”, onde “ CMD ” é a concentração média determinada. O teste de repetibilidade foi realizado em um mesmo dia, por um único analista, a partir dos dados de cinco análises. A precisão intermediária foi realizada a partir de resultados de análises gerados por dois analistas, em diferentes datas, totalizando dez análises.

Exatidão

Para a determinação da exatidão, foi realizado o ensaio de recuperação do padrão de ácido salicílico, por meio de nove determinações, relativas ao intervalo linear do procedimento, nas concentrações 80%, 100% e 120%. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada e a concentração teórica correspondente, utilizando o cálculo da expressão: “ $Exatidão = (CME \times 100)/CT$ ”, em que “ CME ” é a concentração média experimental (concentração recuperada do padrão) e “ CT ” é a concentração teórica (concentração do padrão adicionado).

Robustez

A robustez do método foi analisada pela variação dos seguintes parâmetros: fluxo da fase móvel (0,15 e 0,25 mL min⁻¹), temperatura da coluna (33 °C e 37 °C) e a marca da coluna (Sigma-Aldrich® Supelco Analytical® C18, 5 µm, 2,1 mm x 250 mm). As médias dos teores de ácido salicílico, obtidas pelas variações no método, em uma mesma amostra, foram comparadas pelo teste de Tukey a 1%.

Resultados e Discussão

O tempo de retenção do AS foi de $5,6 \pm 0,07$ minutos e o pico de absorvância máxima foi obtido a 283 nm, a partir de uma amostra padrão de concentração igual a $500,0 \text{ ng mL}^{-1}$. Os resultados foram confirmados pela coinjeção da amostra de extrato vegetal com o padrão (Figura 1). Baseado nesses resultados, o método demonstrou-se seletivo, ou seja, capaz de avaliar de forma inequívoca a substância em exame em uma amostra complexa. Ressalta-se que caso a seletividade não fosse assegurada, outros parâmetros como a exatidão, a precisão e a linearidade estariam previamente comprometidos (RIBANI et al., 2004; US PHARMACOPEIAL CONVENTION, 1999).

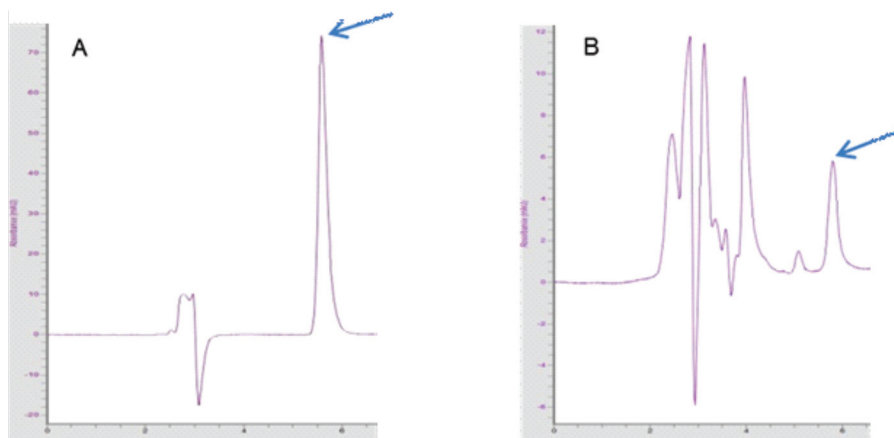


Figura 1. Cromatogramas: (A) padrão de ácido salicílico (AS) e (B) extrato vegetal produzido a partir de amostra de folhas de arroz adicionado de AS padrão. As setas indicam o pico da molécula de AS.

Na Figura 2, observa-se que o coeficiente de determinação linear (r^2) obtido pela regressão linear da curva padrão na faixa $10,0 - 1000,0 \text{ ng mL}^{-1}$ foi maior que 0,99, confirmando que o método foi capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro da faixa de aplicação determinada (ICH, 1996; RIBANI et al., 2004).

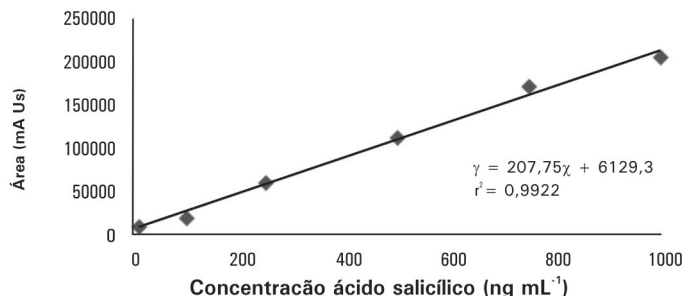


Figura 2. Curva padrão de ácido salicílico na faixa 10,0 – 1000,0 ng mL⁻¹.

O limite de detecção, valor que representa a menor concentração da substância examinada que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, foi calculado em 0,43 ng mL⁻¹. O limite de quantificação, valor que representa a menor concentração da substância sob análise e que pode ser quantificada, foi calculada em 1,45 ng mL⁻¹.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1996; RIBANI et al., 2004). Nesse caso específico, a precisão está relacionada ao efeito da variação do operador e do tempo de análise, nos resultados de análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório. Os resultados, tanto para a repetibilidade (precisão intracorrída), quanto para a precisão intermediária (precisão intercorrída), apresentaram CV abaixo de 1% (Tabelas 1 e 2), estando de acordo com o preconizado para a quantificação de analitos em concentrações maiores que 100 ng mL⁻¹ (RIBANI et al., 2004).

Tabela 1. Teores de ácido salicílico em uma mesma amostra de folhas de arroz, analisadas por um mesmo analista, em um mesmo dia (Teste de repetibilidade: precisão intracorrída).

| Replicatas | Teor de AS (ngg ¹) | Teor médio (ngg ¹) | DP (ngg ⁻¹) ¹ | CV (%) ² |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| 1 | 3606 | | | |
| 2 | 3624 | | | |
| 3 | 3620 | 3617,8 | 6,21 | 0,17 |
| 4 | 3618 | | | |
| 5 | 3621 | | | |

¹Desvio padrão.

²Coefficiente de variação.

Tabela 2. Teores de ácido salicílico em uma mesma amostra de folhas de arroz, analisadas por analistas diferentes, em dias diferentes (Teste de repetibilidade: precisão intercorrida).

| <i>Replicatas</i> | <i>Teor de AS (ngg⁻¹)</i> | <i>Teor médio (ngg⁻¹)</i> | <i>DP (ngg⁻¹)¹</i> | <i>CV (%)²</i> |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|
| 1 | 3606 | | | |
| 2 | 3624 | | | |
| 3 | 3620 | | | |
| 4 | 3618 | | | |
| 5 | 3621 | | | |
| 6 | 3672 | 3649,9 | 32,67 | 0,89 |
| 7 | 3686 | | | |
| 8 | 3684 | | | |
| 9 | 3679 | | | |
| 10 | 3689 | | | |

¹Desvio padrão.

²Coefficiente de variação.

O teste de exatidão foi realizado com base em ensaios de recuperação. Os valores percentuais de recuperação ficaram dentro do intervalo de 80% a 90% para os intervalos de adição analisados (80%, 100% e 120%) (Tabela 3). Devido à complexidade da amostra, podemos considerar que os intervalos de recuperação obtidos indicam que o método é exato ao que se propõe (RIBANI et al., 2004).

Tabela 3. Concentração e percentual de recuperação de ácido salicílico em amostra de folhas de arroz suplementadas com ácido salicílico grau padrão, nos níveis 80%,100% e 120%.

| <i>Nível de adição</i> | <i>Concentração de AS por repetição (ng mL⁻¹)</i> | <i>Concentração média de AS (ng mL⁻¹)</i> | <i>Concentração teórica de AS (ng mL⁻¹)</i> | <i>Exatidão ou percentual de recuperação (%)</i> | <i>DP¹ (%)</i> |
|------------------------|--|--|--|--|---------------------------|
| 80% | 325,7 | 329,6 | 402,3 | 81,9 | 0,9 |
| | 332,2 | | | | |
| | 331,0 | | | | |
| 100% | 434,9 | 430,2 | 503,1 | 85,5 | 0,8 |
| | 427,2 | | | | |
| | 428,5 | | | | |
| 120% | 511,4 | 512,2 | 601,7 | 85,1 | 0,6 |
| | 509,1 | | | | |
| | 516,0 | | | | |

¹Desvio padrão.

Não houve diferença significativa entre as médias dos teores de AS obtidos em relação aos parâmetros analisados no teste de robustez (Tabela 4). Esses resultados confirmaram que o método proposto é robusto, uma vez que os resultados das análises não se alteram significativamente frente a pequenas alterações no método.

Tabela 4. Teor médio de ácido salicílico em amostra de folhas de arroz, analisadas por CLAE, variando os parâmetros: fluxo da fase móvel, temperatura e marca da coluna de separação.

| <i>Parâmetros variados</i> | <i>Teor médio (ngg⁻¹)</i> | <i>DP (ngg⁻¹)¹</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Fluxo 0,15 mL min ⁻¹ | 3624,7a | 22,10 |
| Fluxo 0,20 mL min ⁻¹ | 3624,3a | 22,35 |
| Fluxo 0,25 mL min ⁻¹ | 3628,8a | 24,42 |
| Temperatura 33 °C | 3627,9a | 22,94 |
| Temperatura 35 °C | 3624,3a | 22,35 |
| Temperatura 37 °C | 3626,9a | 22,12 |
| Coluna C18 Perkin Elmer [®] | 3624,3a | 22,35 |
| Coluna C18 Sigma-Aldrich [®] | 3615,8a | 23,72 |

¹As médias foram comparadas pelo método de Tukey ($p=0,01$).

Conclusão

A metodologia descrita foi ajustada e validada para a quantificação de ácido salicílico especificamente em folhas de arroz, apresentando-se seletiva, precisa, linear, exata, robusta e também eficaz devido à sua menor complexidade operacional e baixo custo relativo em relação aos métodos citados na literatura.

Referências

BOWLING, S. A.; GUO, A.; CAO, H.; GORDON, A. S.; KLESSIG, D. F.; DONG, X. A mutation in Arabdopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1845-1857, Dec. 1994.

CHEN, C.; BELANGER, R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 5, p. 477-486, Aug. 1999.

CHEN, M. L.; HUANG, Y. Q.; LIU, J. Q.; YUAN, B. F.; FENG, Y. Q. Highly sensitive profiling assay of acidic plant hormones using a novel mass probe by capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 879, n. 13/14, p. 938-944, Apr. 2011.

DEMPSEY, D. A.; SHAH, J.; KLESSING, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, n. 4, p. 547-575, 1999.

ENGELBERTH, J.; SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; CARDOZA, Y. J.; HUANG, J.; TUMLINSON, J. H. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 312, n. 2, p. 242-250, Jan. 2003.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: Methodology**. 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

INMETRO (Brasil). **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008**, revisão 04, jul. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.

REIS K. B. **Extrato padronizado de *Ruta graveolens* L.:** avaliação do seu potencial no controle da brusone em arroz. 2013. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

SILVERMAN, P.; SESKAR, M.; KANTER, D.; SCHWEIZER, P.; METRAUX, J. P.; RASKIN, I. Salicylic acid in rice: biosynthesis, conjugation and possible role. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 2, p. 633-639, June 1995.

U. S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. **Validation of compendial methods 1225**. Rockville, 1999. 1 v.

YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; WILSON, T. M.; KLEIER, D. A.; RASKIN, I. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected Tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 8, p. 809-818, Aug. 1991.

YANG, Y.; QI, M.; MEI, C. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 909-919, Dec. 2004.