



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
HERBICIDAS EM FLUIDO BIOLÓGICO"**

Autora

Joseane Montagner Pozzebon

Orientadora

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim



1150054045



IQ

T/UNICAMP P879d

Dezembro de 2002

UNIDADE	<u>IO</u>
Nº CHAMADA	<u>TUNICAMP</u>
	<u>P879 d</u>
V	EX
TOMBO BC/	<u>54045</u>
PROC.	<u>124103</u>
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<u>R\$ 11,00</u>
DATA	<u>21/05/03</u>
Nº CPD	

bibliod 294019

CM00183374-8

**CHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

P879d

Pozzebon, Joseane Montagner
Desenvolvimento de métodos de
extração, separação e quantificação de
herbicidas em fluido biológico / Joseane
Montagner Pozzebon. -- Campinas, SP: [s.n],
2002.

Orientadora: Isabel Cristina S. F. Jardim.

Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. CLAE. 2. Pesticida. 3. Urina. I. Jardim,
Isabel Cristina S. F. II. Universidade Estadual
de Campinas. III. Título.

A Deus por tudo.

Aos meus pais Darcí e Margarida

Pelo amor e amparo.

Sempre presentes,

nos mínimos gestos e

nos máximos esforços

na "distância mais profunda"

meu eterno reconhecimento.

Sem vocês nada disso seria possível.

Amo vocês!

Aos meus irmãos

Liziane e Giovani

Pela presença constante, principalmente nos momentos mais difíceis dando-me coragem para desafiar e prosseguir sempre, minha eterna gratidão.

A você Ale,

Pelo estímulo, compreensão e eterna paciência, características que o torna tão especial.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim,

por tudo que me ensinou ao longo destes anos de convivência. Foi um privilégio ser sua orientada, pois com você aprendi Cromatografia e aprendi a desenvolver pesquisa espelhando-me no seu exemplo de amor e dedicação à carreira. Obrigada amiga Bel, se assim me permite, pelos ensinamentos de vida, por me apoiar nesta caminhada da vida, sem que, em momento algum fizesse cobranças.

À Profa. Carol e ao Prof. Kenn,

pelo apoio e amizade. não obstante os limites vislumbrou-me possibilidades; não bastassem os ensinamentos, provocou-me iniciativas além da pesquisa, auxiliando-me na construção de um projeto de vida, de realização e de contribuição social. O meu profundo agradecimento.

À amiga Sônia,

pelas sugestões, boa vontade e assistência em todos os aspectos. Não poderia deixar de te agradecer!

Ao Prof. Wagner Vilegas,
pela disposição e colaboração na realização das análises
por espectrometria de massas envolvidos no trabalho. Além
dos incentivos, conselhos e a amizade.

À amiga Miriam (My),
pelo carinho, incentivo, apoio e amizade no decorrer
desses anos.

Aos amigos Lourdes (Lulu), Claudinha e André,
mesmo distantes sempre torceram para o meu sucesso e
preservaram nossa amizade.

À Lúcia e a Nilva colegas e companheiras de apartamento,
pelas conversas e "forças" recebidas durante todos esses
anos.

Ao grupo "antigo" do LabCrom Carla, Dania, Zahra, Rosely,
Tânia, Gláucia, Lúcio, Edivan, César, Marquinhos, Valtinho,
Ricardo e Roberto I(zil),
pelo companherismo, conversas e prontidão efetiva no dia-
a-dia, além dos momentos de festas.

A todo o pessoal do laboratório Priscila (Pri), Deborah, Camila,
Lika, Karen, Laís, Josimara, Mariza, Allan, Roberto II, Daniel,
Leonardo e Marcelo,
pelo companherismo e incentivo.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências
Médicas da Unicamp,
pela avaliação do protocolo para coleta de amostras
biológicas.

À Sueli e a Tereza do Centro de Controle de Intoxicações da
Unicamp,
pela amizade, apoio e colaboração durante este trabalho.

Ao Prof. Roberto e aos funcionários do Instituto Agronômico de Campinas - Piracicaba,
que proporcionaram a realização de coletas das amostras reais.

Aos voluntários que participaram deste trabalho,
pela valiosa colaboração.

A todos os professores do Departamento de Química Analítica da Unicamp
meus sinceros agradecimentos.

A todo o pessoal da biblioteca e xerox Dara, Elaine, Lúcia, Nelson, Rose, Toninho, Paula e Samuel,
pela colaboração constante, paciência e total apoio.

Aos colegas da Seção de Pós-Graduação André, Bel, Celi e Rodrigo
pelo companherismo, tolerância e carinho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

Título: "Desenvolvimento de Métodos de Extração, Separação e Quantificação de Herbicidas em Fluido Biológico".

Autor: Joseane Montagner Pozzebon

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias baseadas em extração, pré-concentração e separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), visando a determinação, em urina, de alguns herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar, 2,4-D, atrazina, simazina, ametrina, diuron, linuron e alguns de seus metabólitos. Para o herbicida 2,4-D foram comparadas as técnicas de extração líquido-líquido (ELL) convencional e a temperatura sub-zero (ELL-TSZ). Os herbicidas pertencentes a classe das triazinas, atrazina, simazina e ametrina, foram extraídos através de ELL e extração em fase sólida (EFS), e separadas por CLAE com detecção UV-Vis e por espectrometria de massas (EM). As uréias substituídas, diuron e linuron, foram extraídas por EFS utilizando o sorvente C-18 comercial e preparado no Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do IQ-Unicamp (LabCrom) através de imobilização térmica de poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) sobre sílica. A separação dos herbicidas foi conseguida por CLAE, utilizando colunas C-18 comercial e recheada no LabCrom, com fase estacionária, poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), sobre sílica, imobilizada por microondas.

As metodologias desenvolvidas, foram devidamente validadas através das seguintes figuras de mérito: curvas analíticas, linearidade, recuperação, detectabilidade (limite de detecção e limite de quantificação), precisão (repetibilidade e intermediária), estabilidade e robustez.

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados, com sucesso, na análise de urinas de agricultores de plantio de cana-de-açúcar. Não foram observados níveis detectáveis dos herbicidas estudados nas amostras analisadas.

ABSTRACT

Title: "Development of Methods of Extraction, Separation and Quantification of Herbicides in a Biological Fluid".

Author: Joseane Montagner Pozzebon

Supervisor: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

In this work methods of extraction, pre-concentration and separation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the determination in urine of some herbicides applied in the production of sugar cane were developed. The herbicides were: 2,4-D, atrazine, simazine, ametrine, diuron, linuron and their metabolites. For 2,4-D, the techniques of conventional liquid-liquid extraction (LLE) and sub-zero temperature extraction (LLE-SZT) were compared. Herbicides belonging to the class of triazines, atrazine, simazine and ametrine, were extracted by LLE and by solid phase extraction (SPE), and separated by HPLC using detection with UV-Vis and mass spectrometry (MS). The substituted ureas, diuron and linuron, were extracted by SPE using comercial C-18 sorvent and sorvent prepared by LabCrom using the thermal immobilization of poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) onto silica. The separation of these herbicides was by HPLC, utilizing a comercial C-18 column or one packed by LabCrom with poly(methyocylsiloxane) (PMOS) stationary phase, immobilized by microwaves.

The methodologies were validated through the following figures of merit: analytical curve, linearity, recovery, detectability (detection limit and quantification limit), precision (repeatability and intermediate), stability and robustness.

The methods developed were applied, with success, for the analysis of urine of workers from worked in sugar cane production plantations. None of the herbicides studied in this project were detected in these urine samples.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica:

- Licenciatura Química - Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 1995.
- Mestrado em Química Analítica - Instituto de Química da UNESP - Araraquara .
" Estudo Analítico de Líquens: *Neuropogon aurantiaco-ater* e *Cladonia verticillaris*", 1998.
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas.

2. Artigos Publicados:

- "Cromatografia em Contracorrente de Gotejamento na Separação de Substâncias Fenólicas de *Neuropogon aurantiaco-ater*"
Joseane M. Pozzebon, Neli Kika Honda e Wagner Vilegas
Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 4 (2001) 47.
- "Application of New High Performance Liquid Chromatography and Solid Phase Extraction Material for the Analysis of Pesticides in Human Urine"
Joseane M. Pozzebon, Sônia C. N. Queiroz, Marcos A. Kapor, Lúcio F. Melo e Isabel C. S. F. Jardim
Journal of Chromatography A, 987/1-2 (2003) 381.
- "Development of Solid Phase Extraction for the Triazines: Application to Biological Sample"
Joseane M. Pozzebon, Sônia C. N. Queiroz e Isabel C. S. F. Jardim

Journal of Liquid Chromatography & Related Technology, 26 (2003) 767-776.

- "Determination of some Triazines and a Metabolite in Human Urine by LC-ESI-MS"

Joseane M. Pozzebon, Wagner Vilegas e Isabel C. S. F. Jardim

Journal of Chromatography A, 987/1-2 (2003) 381.

3. Artigos Submetidos a Publicação:

- "Application of Subzero-Temperature Liquid-Liquid Extraction for the HPLC Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Urine"

Joseane M. Pozzebon, Sônia C. N. Queiroz e Isabel C. S. F. Jardim

Journal of Chromatography B.

- "Determination of Phenylurea Herbicides in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography"

Joseane M. Pozzebon e Isabel C. S. F. Jardim

Journal of the Brazilian Chemical Society.

- "Determination of Triazine Herbicides in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography"

Joseane M. Pozzebon, Sônia C. N. Queiroz e Isabel C. S. F. Jardim

Journal of Chromatography B.

4. Participação em Congressos:

4.1. Resumos apresentados em congressos nacionais: 6

4.2. Resumos apresentados em congressos internacionais: 4

5. Estágio Realizado Durante o Doutorado:

- "Aplicação de HPLC-MS (Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massas) na determinação e validação de metodologia para a análise de resíduos de pesticidas em amostras biológicas", realizado na UNESP - Araraquara.

6. Seminário Proferido Durante o Doutorado:

- "Análise de Pesticidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", apresentado ao Curso de Química da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

ÍNDICE GERAL

DESCRIÇÃO	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxxiii
ABREVIATURAS.....	xxxix
GLOSSÁRIO DOS PRINCIPAIS TERMOS.....	xlili
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
I. Introdução.....	3
I.1. Impacto dos Pesticidas.....	3
I.2. Contexto Atual.....	5
I.2.1. Legislação.....	6
I.3. Toxicidade dos Pesticidas.....	9
I.3.1. Dados Estatísticos das Intoxicações por Pesticidas.....	12
I.4. Cinética e Metabolismo dos Pesticidas.....	12
I.4.1. Absorção e Distribuição dos Pesticidas no Organismo....	13
I.4.2. Biotransformação, Eliminação e Excreção.....	15
I.4.3. Aspectos Toxicológicos dos Herbicidas Estudados.....	16
I.4.3.1. Pesticidas Derivados da Uréia.....	17
I.4.3.2. Pesticidas Triazínicos.....	20
I.4.3.3. Pesticida Fenoxiacético.....	23
I.5. Análises de Urina.....	26
I.5.1. Importância.....	26
I.5.2. Formação.....	27
I.5.3. Composição.....	27

1.5.4. Volume.....	28
1.5.5. Coleta e Manipulação.....	28
1.5.6. Estocagem.....	29
1.5.7. Tipos de Amostras.....	29
1.6. Exigências Atuais dos Métodos Analíticos.....	30
1.7. Metodologias Analíticas.....	32
1.7.1. Amostragem.....	33
1.7.2. Preparo da Amostra.....	33
1.7.2.1. Extração Líquido-Líquido (ELL).....	34
1.7.2.1.1. Aplicações de ELL a Fluídos Biológicos.....	35
1.7.2.2. Extração em Fase Sólida (EFS).....	38
1.7.2.2.1. Aplicações de EFS a Fluídos Biológicos.....	42
1.8. Métodos Cromatográficos para Análise de Pesticidas.....	45
1.8.1. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	47
1.8.1.1. Espectrometria de Massas e Interfaces da Cromatografia Líquida.....	48
1.8.1.1.1. Interface Electrospray (ES).....	49
1.8.1.1.2. Interface de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI).....	52
1.9. Validação de Métodos Analíticos.....	57
1.9.1. Linearidade.....	58
1.9.2. Exatidão.....	59
1.9.3. Precisão.....	60
1.9.4. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	61
1.9.5. Sensibilidade.....	63
1.9.6. Seletividade.....	64
1.9.7. Robustez.....	64
1.9.8. Estabilidade.....	65

CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	67
II.1. Objetivos Gerais.....	69
II.2. Etapas do Trabalho.....	69
CAPÍTULO III - ASPECTOS GERAIS.....	71
III.1. Seleção dos Pesticidas	73
III.2. Parâmetros Espectrofotométricos dos Pesticidas.....	74
III.3. Instrumentação Analítica.....	77
III.4. Equipamentos e Acessórios Utilizados nas Análises Laboratoriais.....	78
III.5. Solventes e Reagentes Empregados.....	79
III.6. Limpeza da Vidraria.....	80
III.7. Filtração de Reagentes e Solventes.....	80
III.8. Estudo da Estabilidade e Pesticidas em Urina Testemunha.	80
III.9. Amostras Reais.....	81
III.9.1. Procedimento de Coleta das Amostras.....	83
III.10. Amostra Testemunha.....	84
CAPÍTULO IV- DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO UNIRRESÍDUO DE 2,4-D EM URINA HUMANA....	85
IV. Desenvolvimento de Metodologias para Determinação Unirresíduo de 2,4-D em Urina Humana.....	87
IV.1. Parte Experimental.....	87
IV.1.1. Instrumentação.....	87
IV.1.2. Preparo das Soluções Padrão.....	87

IV.1.3. Preparo da Amostra.....	88
IV.1.3.1.Extração Líquido-Líquido à Temperatura Sub-Zero (ELL-TSZ).....	88
IV.1.3.2. Extração Líquido-Líquido Convencional (ELL).....	88
IV.1.4. Estudo da Estabilidade do 2,4-D em Urina Testemunha.....	89
IV.2. Resultados e Discussão.....	89
IV.2.1. Avaliação da Extração Líquido-Líquido à Temperatura Sub-Zero (ELL-TSZ).....	89
IV.2.2. Validação das Metodologias.....	91
IV.2.3. Estabilidade do 2,4-D em Urina Testemunha.....	93
IV.3. Aplicação do Método.....	93
IV.3.1. Grupo Controle.....	94
IV.3.2. Grupo Estudo.....	95
IV.4. Conclusões Parciais.....	97

CAPITULO V - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE TRIAZINAS EM URINA HUMANA POR CLAE-UV E CLAE-EM..... 99

V.1 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO CLAE-UV.....	101
V.1.1. Parte Experimental.....	101
V.1.1.1. Instrumentação.....	101
V.1.1.2. Preparo das Soluções Estoque e Padrão.....	101
V.1.1.3. Seleção da Fase Móvel.....	102
V.1.1.4. Preparo da Amostra.....	102
V.1.1.5. Estudo da Estabilidade das Triazinas em Urina Testemunha.....	105
V.1.2. Resultados e Discussão.....	106

V.1.2.1. Definição das Condições Cromatográficas de Separação das Triazinas.....	106
V.1.2.2. Desenvolvimento do Método por Extração Líquido-Líquido Seguido por CLAE-UV.....	108
V.1.2.3. Validação da Metodologia de Extração Líquido-Líquido Seguida por CLAE-UV.....	110
V.1.2.4. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Seguida por CLAE-UV.....	113
V.1.2.5. Validação da Metodologia de Extração em Fase Sólida Seguida por CLAE-UV.....	115
V.1.2.6. Estabilidade das Triazinas em Urina Testemunha..	116
V.2 -DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO CLAE-EM.....	117
V.2.1. Parte Experimental.....	118
V.2.1.1. Condições de Análise Usadas na CLAE-EM.....	118
V.2.1.2. Preparação da Solução Estoque.....	118
V.2.1.3. Seleção da Fase Móvel.....	120
V.2.1.4. Preparo da Amostra.....	120
V.2.2. Resultados e Discussão.....	120
V.2.2.1. Otimização das Condições Cromatográficas.....	120
V.2.2.2. Validação da Metodologia por CLAE-EM.....	124
V.3-COMPARAÇÃO ENTRE OS DETECTORES EMPREGADOS.....	126
V.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	127
V.4.1. Grupo Controle.....	127
V.4.2. Grupo Estudo.....	129
V.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS.....	130

VI- DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE URÉIAS

SUBSTITUÍDAS EM URINA HUMANA POR CLAE-UV.....	133
VI.1. DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS URÉICOS ATRAVÉS DE TUBOS COMERCIAIS E CONFECCIONADOS NO LABCROM PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, SEGUIDA POR CLAE.....	135
VI.1.1. Parte Experimental.....	135
VI.1.1.1. Instrumentação.....	135
VI.1.1.2. Preparo da Solução Estoque.....	136
VI.1.1.3. Preparo de Tubos de Extração no LabCrom.....	136
VI.1.1.4. Preparação da Amostra.....	137
VI.1.1.5. Estudo da Estabilidade das Uréias Substituídas em Urina Testemunha.....	140
VI.1.2. Resultados e Discussão.....	141
VI.1.2.1. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Utilizando Tubos Comercias, Seguido de Quantificação por CLAE-UV.....	141
VI.1.2.2. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Utilizando Tubos Confeccionados no LabCrom, Seguido de Quantificação por CLAE-UV.....	142
VI.1.2.3. Validação das Metodologias Utilizando Tubos de Extrações Comerciais ou Confeccionados no LabCrom, Seguido de CLAE-UV.....	144
VI.1.2.4. Estudo da Estabilidade das Uréias Substituídas em Urina Testemunha.....	147
VI.2. DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS URÉICOS ATRAVÉS DE COLUNA CROMATOGRÁFICA CONFECCIONADA NO LABCROM, SEGUIDA POR CLAE-UV.....	148
VI.2.1. Metodologia Analítica para Determinação dos Herbicidas Diuron, Linuron em Urina Usando	

Coluna Recheada com FE Poli(metiloctilsiloxano) ...	149
VI.2.1.1. Parte Experimental.....	149
VI.2.1.1.1. Instrumentação.....	149
VI.2.1.1.2. Preparo da Solução Estoque.....	150
VI.2.1.1.3. Preparo da Amostra por EFS Utilizando Tubos de Extração Confeccionados no LabCrom.....	150
VI.2.1.2. Resultados e Discussão.....	150
VI.2.1.2.1. Otimização de Preparo das Amostras de Urina para Determinação Cromatográfica dos Herbicidas Uréicos.....	150
VI.2.1.2.2. Validação da Metodologia para Análise dos Compostos Uréicos Baseada em Extração em Fase Sólida com Tubos de PMODS e Coluna Cromatográfica de PMOS, Confeccionados no LabCrom.....	152
VI.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	154
VI.3.1. Grupo Controle.....	155
VI.3.2. Grupo Estudo.....	156
VI.4 - CONCLUSÕES PARCIAIS.....	157
VII - CONCLUSÕES FINAIS.....	159
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
IX - ANEXOS.....	177

ÍNDICE DE TABELAS

DESCRIÇÃO	PÁGINA
I.1. Classificação toxicológica dos pesticidas.....	11
I.2. Números de casos de exposição ocupacional ou acidental às principais classes de pesticidas, atendidos no Centro de Toxicologia do Hospital Universitário de Campinas, nos anos de 2000 e 2001.....	12
I.3. Propriedades físico-químicas dos herbicidas uréicos.....	18
I.4. Propriedades físico-químicas dos herbicidas triazina.....	21
I.5. Toxicidade aguda de herbicidas triazínicos.....	23
I.6. Propriedades físico-químicas do 2,4-D.....	24
I.7. Classificação genérica para a escolha da fase sólida apropriada em EFS.....	40
I.8. Principais interfaces, modo de detecção e parâmetros de validação utilizados em espectrometria de massas para análise de pesticidas, em diversas matrizes.....	55
III.1. Características dos padrões dos herbicidas e metabólitos estudados.....	74
III.2. Valores de concentração das soluções calibradoras de cada pesticida estudado.....	75
III.3. Valores de λ_{max} e de absorvidade molar (ϵ) dos herbicidas e metabólitos estudados.....	76
III.4. Perfis dos indivíduos do grupo controle em relação ao sexo, idade, uso de cigarros e de medicamentos.....	82
III.5. Perfis dos indivíduos do grupo estudo em relação ao sexo, idade, uso de cigarros e de medicamentos.....	83
IV.1. Curva analítica e intervalo de linearidade para a solução padrão do 2,4-D.....	91

IV.2. Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para a solução padrão do 2,4-D.....	91
IV.3. Parâmetros de validação obtidos para o 2,4-D, após a aplicação de ELL e ELL-TSZ e análise por CLAE.....	92
IV.4. Porcentagem de degradação de 2,4-D em urina testemunha, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento, em um período de 3 semanas.....	93
V.1. Curva analítica e intervalo de linearidade para as triazinas obtida com as soluções padrão	111
V.2. Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das triazinas por CLAE-UV.....	112
V.3. Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a ELL e análise por CLAE-UV.....	113
V.4. Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a EFS e análise por CLAE-UV.....	116
V.5. Valores de degradação obtidos através do estudo de estabilidade das triazinas durante 3 semanas.....	117
V.6. Parâmetros de análise utilizados por CLAE-EM.....	119
V.7. Íons característicos e íons selecionados para a quantificação dos herbicidas usando o modo de ionização positiva.....	123
V.8. Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das triazinas.....	124
V.9. Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das triazinas por CLAE-EM.....	125
V.10. Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a EFS e análise por CLAE-EM.....	125
V.11. Comparação entre os detectores, EM e UV, em termos de detectabilidade.....	127
VI.1. Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das uréias substituídas utilizando coluna cromatográfica comercial, C-18.....	144

VI.2. Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das uréias substituídas, utilizando EFS, tubo C-18 e coluna cromatográfica C-18 comerciais.....	145
VI.3. Recuperações das uréias substituídas, após utilização de tubos de extrações comerciais e confeccionados no LabCrom seguida de análise por CLAE utilizando coluna cromatográfica comercial.....	146
VI.4. Valores de precisões obtidos para as uréias substituídas, após a EFS com o sorvente preparado no LabCrom e análise por CLAE utilizando coluna cromatográfica C-18 comercial.....	147
VI.5. Valores de degradação obtidos através do estudo de estabilidade das uréia substituídas durante 3 semanas.....	148
VI.6. Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das uréias substituídas utilizando coluna cromatográfica confeccionada no LabCrom.....	152
VI.7. Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das uréia substituídas, utilizando tubos e coluna cromatográfica confeccionada no LabCrom.....	153
VI.8. Parâmetros de validação obtidos para as uréias substituídas, após a EFS e análise por CLAE-UV, utilizando tubo e coluna cromatográfica confeccionados no LabCrom.....	154

ÍNDICE DE FIGURAS

DESCRIÇÃO	PÀGINA
I.1. Inter-relação de compostos químicos contaminantes dos diferentes compartimentos do ambiente.....	4
I.2. Herbicidas derivados da 3,4-dicloranilina e formação dos contaminantes 3,4,3',4'-tetracloroazobenzeno (TCAB) e 3,4,3',4'-tetracloroazoxibenzeno (TCAOB).....	19
I.3. Produtos de biotransformação da atrazina. (1) 2-cloro-4-etilamino-6-amino-2-atrazina; (2) 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina; (3) 2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina; (4) 2-hidróxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina e (5) 2-hidróxi-4,6-diamino-s-triazina.....	22
I.4. Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos).....	39
I.5. Faixa de aplicação das interfaces de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e electrospray.....	49
I.6. Esquema da interface ES utilizada em equipamentos da Hewlett Packard.....	50
I.7. Esquema da interface APCI utilizada em equipamentos da Hewlett Packard.....	52
I.8. Comparação gráfica de dois métodos, A e B, quanto à sensibilidade.....	63
III.1. Estruturas dos herbicidas e alguns dos metabólitos estudados: 1) diuron; 2) linuron; 3) 3,4-dicloroanilina; 4) simazina; 5) atrazina; 6) ametrina; 7) 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5 triazina; 8) 2-hidróxi atrazina e 9) 2,4-D.....	73
IV.1. Cromatogramas obtidos para a urina testemunha pelo método de ELL-TSZ. A) branco da urina e b) urina fortificada com 160 µg L ⁻¹ de 2,4-D. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de	

guarda, Nova-Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v), pH ~ 3 (H ₃ PO ₄), vazão: 0.4 mL min ⁻¹ , detecção: UV, 230 nm.....	90
IV.2. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo RAA, do grupo controle, após ELL-TSZ e CLAE. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.....	95
IV.3. Cromatogramas das amostras de urina coletadas do indivíduo SJF, grupo estudo, após ELL-TSZ e CLAE. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.....	96
IV.4. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo SJF, grupo estudo, (pós-exposição) e fortificada com padrão de 2,4-D, extraído após ELL-TSZ e analisada por CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.....	97
V.1. Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por ELL e quantificação das triazinas por CLAE.....	103
V.2. Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por EFS e quantificação das triazinas por CLAE.....	104
V.3. Cromatograma obtido na separação da mistura dos herbicidas triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM MeOH:H ₂ O (50:50, v/v); vazão: 0,7 mL min ⁻¹ ; detecção UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina....	106
V.4. Cromatogramas obtidos para a separação da mistura dos herbicidas triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v); vazão na Figura V.4a: 0,5 mL min ⁻¹ ; e vazão na Figura V.4b: 0,7 mL min ⁻¹ detecção UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.....	107
V.5. Cromatograma obtido para a separação da mistura dos herbicidas	

- triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60,v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5 mL min⁻¹ detecção UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina..... 108
- V.6. Cromatograma do branco da urina após extração ELL com dietil éter. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5 mL min⁻¹; detecção: UV, 220 nm;..... 109
- V.7. Cromatogramas obtidos após extração ELL modificada, a) branco da urina testemunha, b) amostra testemunha fortificada com 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ das triazinas. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5 mL min⁻¹; detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina..... 110
- V.8. Cromatogramas obtidos após aplicação da extração em fase sólida: a) branco da amostra de urina testemunha b) amostra de urina fortificada com as triazinas e eluidas com CHCl₃. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); detecção UV, 220 nm; vazão: 0,5 mL min⁻¹..... 115
- V.9. Cromatograma obtido na separação da mistura dos herbicidas triazínicos e dois metabólitos por CLAE. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (50:50, v/v), pH 3 (CH₃COOH); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5 triazina 2) simazina 3) atrazina 4) 2-hidróxi atrazina 5) ametrina..... 121
- V.10. Cromatograma do branco da urina testemunha após extração

EFS. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (50:50, v/v), pH 3 (CH ₃ COOH); vazão: 0,3 mL min ⁻¹ ; detecção: UV, 220 nm.....	122
V.11. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo MAG, grupo controle, após ELL e CLAE-UV. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v) pH 9 (NH ₄ OH); vazão: 0,5 mL min ⁻¹ ; detecção: UV, 220 nm.....	128
V.12. Cromatogramas das amostra de urina coletadas do indivíduo PR, grupo estudo, após ELL. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições cromatográficas: idem à Figura V.11.....	129
V.13. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo PR, grupo estudo (pós-exposição) fortificada com padrões simazina, atrazina e ametrina, após ELL e CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem a Figura V.11. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.....	130
VI.1. Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por EFS e quantificação dos compostos uréicos por CLAE-UV.....	139
VI.2. Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração EFS com tubos comerciais C-18. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção: UV, 254 nm. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.....	142
VI.3. Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração por EFS com sorvente preparado no LabCrom. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção:	

UV, 254 nm. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.....	143
VI.4. Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração EFS com tubos de PMODS, confeccionados no LabCrom. Condições cromatográficas: coluna analítica recheada no LabCrom com FE PMOS sílica 5 μm ; volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção: UV, 254 nm; Identificação dos picos: 1) diuron 2) linuron.....	151
VI.5. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo AMS, grupo controle, após EFS utilizando tubos e coluna comerciais. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H ₂ O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção: UV, 254 nm.....	155
VI.6. Cromatogramas das amostras de urina coletada do indivíduo RJ, grupo estudo, após EFS utilizando tubos e coluna C-18 comerciais. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições cromatográficas: idem à Figura VI.5.....	156
VI.7. Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo RJ, grupo estudo (pós-exposição), fortificada com padrões diuron, linuron e 3,4-dicloroanilina, extraída com tubos C-18 comerciais, e analisada por CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem à Figura VI.5. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.....	157

ABREVIATURAS

- ACN: Acetonitrila
- APCI: Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (Ionização Química à Pressão Atmosférica)
- API: Atmospheric-Pressure Ionization (Ionização a Pressão Atmosférica)
- AOAC: American Association of Official Analytical Chemists
- BCR: Community Bureau of Reference
- CCI: Centro de Controle de Intoxicações
- CG: Cromatografia Gasosa
- CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
- CI: Ionização Química
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas
- CV: Coeficiente de Variação
- DAD: Detector por Arranjo de Diodos
- DCA: Dicloroanilina
- DL₅₀: Dose Letal para 50% da População
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- EFS: Extração em Fase Sólida
- ELL: Extração Líquido-Líquido
- ELL-TSZ: Extração Líquido-Líquido à Temperatura Sub-Zero
- EM: Espectrometria de Massas
- EM-EM: Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas
- EI: Impacto de Elétrons
- ES: Electrospray

- EPA: Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
- FAB: Fast Atom Bombardment (Bombardeamento por Átomos Rápidos)
- FAO: Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)
- FDA: Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Drogas, dos Estados Unidos da América)
- FID: Flame Ionization Detector (Detector por Ionização em Chama)
- FM: Fase Móvel
- IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis
- ICH: International Conference on Harmonization
- IPCS: International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional sobre Segurança Química)
- K_D : Coeficiente de Distribuição
- LIN: Linearidade
- LD: Limite de Detecção
- LQ: Limite de Quantificação
- MCPA: Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
- MA: Ministério da Agricultura e do Abastecimento
- MeOH: Metanol
- MIP: Molecularly Imprinted Polymer (Polímero Impresso Molecularmente)
- MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas
- MS: Ministério da Saúde
- NPD: Nitrogen-Phosphorus Detector (Detector de Nitrogênio-Fósforo)
- NIDA: National Institute of Drug Abuse
- PB: Particle Beam (Feixe de Partícula)
- PMODS: Poli(metiloctadecilsiloxano)
- PMOS: Poli(metiloctilsiloxano)

- S-DVB: Estireno-Divinilbenzeno
- SIM: Selective Ion Monitoring (Monitoramento por Íon Seletivo)
- SRM: Selected Reaction Monitoring (Monitoramento de Reações Seletivas)
- TCAB: 3,4,3',4'- Tetracloroazobenzeno
- TCAOB: 3,4,3',4'- Tetracloroazoxibenzeno
- TOF: Time of Flight (Tempo de Vôo)
- t_R : Tempo de Retenção
- TS: Termospray
- UV-Vis: Ultravioleta-visível
- USP: United States Pharmacopeia
- WHO: World Health Organization (OMS= Organização Mundial da Saúde)
- WTO: World Trade Organization (OMC= Organização Mundial do Comércio)

GLOSSÁRIO DOS PRINCIPAIS TERMOS

Absorção: introdução da substância na corrente sangüínea através de diferentes vias (respiratória, oral, cutânea, subcutânea, intramuscular, etc).

Agente Tóxico ou Toxicante: qualquer agente químico que provoca efeitos considerados nocivos ao interagir com um organismo vivo.

Agrotóxico: é dado pela legislação federal (Lei n.^o 7.802/89) para os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso em setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais, com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Amostra Aleatória: amostra coletada em qualquer horário.

Aplicação Dorsal: o reservatório contendo a solução de pesticidas é fixado nas costas e a aplicação é feita com as mãos.

Avaliação do Risco: processo compreendido pelas etapas de identificação do perigo, avaliação da dose-resposta, avaliação da exposição e a caracterização do risco.

Avaliação Toxicológica: avaliação através dos conceitos toxicológicos.

Carcinogênese: processo anormal, não controlado, de diferenciação e proliferação celular, inicialmente localizado, mas que pode ser disseminado pelo organismo provocando a sua morte.

Dose: quantidade de substância teste administrada. É expressa como massa da substância, por unidade de massa do animal (mg kg^{-1} massa viva) ou como massa da substância teste pela massa do alimento ou água (mg kg^{-1} alimento ou mg L^{-1} água).

Dose Letal 50: quantidade necessária, em miligramas por quilo de massa corpórea, para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos a experimentos.

Ecotoxicológico: ciência que estuda o efeito de agentes tóxicos ao ecossistema.

Exposição: termo qualitativo ou quantitativo que define o contato da substância com a superfície externa ou interna do organismo.

Exposição Assintomática: exposição a agentes tóxicos sem manifestação de sintomas.

Intoxicação: processo patológico causado por substâncias endógenas ou exógenas e caracterizado por distúrbio fisiológico, em consequência das alterações bioquímicas no organismo. Esse processo é evidenciado por sinais e sintomas ou mediante dados laboratoriais.

Modo Sistêmico: ação que ocorre distante do local de absorção após ser absorvido.

Monitorização: atividade sistemática, contínua ou repetitiva, relacionada à saúde e desenvolvida para implantar medidas corretivas sempre que se façam necessárias.

Monitorização Ambiental: medida e avaliação de agentes no ambiente para estimar a exposição ambiental e o risco à saúde por comparação dos resultados com referências apropriadas.

Monitorização Biológica: medida e avaliação de agentes químicos ou de seus produtos de biotransformação em tecidos, secreções, ar exalado ou alguma combinação destes.

Mutagênese: alterações qualitativas ou quantitativas nas bases do DNA ou pela quebra ou perda da estabilidade cromossômica.

Risco Toxicológico: probabilidade de que uma substância produza um efeito tóxico em um sistema biológico, submetido a determinadas condições de exposição.

Substância Endógena: substâncias essenciais produzidas no próprio organismo.

Substância Exógena: substâncias químicas não produzidas no próprio organismo.

Teratogênese: alteração no desenvolvimento embrio-fetal, motivada por agentes endógenos ou exógenos.

Toxicidade: é a medida relativa do risco de aparecimento de um efeito tóxico num sistema biológico, produzido por uma substância sob certas condições controladas de exposição.

Tratamento Sintomático: tratamento não específico para a doença e sim para os sintomas apresentados.

Xenobiótico: substâncias químicas estranhas ao organismo; dependendo das condições de exposição podem agir como toxicante.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. IMPACTO DOS PESTICIDAS

Os pesticidas são denominados de agrotóxicos, defensivos agrícolas, produtos fitossanitários ou praguicidas. O objetivo do seu uso é aumentar a produção de alimentos, evitando a proliferação das pragas. Entretanto, eles causam problemas ao ambiente (solos, rios, lençóis freáticos), podendo romper o ecossistema natural do homem devido a exposição a esses pesticidas durante a sua manipulação e aplicação. Os resíduos de pesticidas nas culturas podem afetar a saúde das pessoas que trabalham na lavoura tanto no plantio como na colheita ou a população em geral, ao utilizar alimentos contaminados ou, então, ao consumir água contendo resíduos dos pesticidas. Dependendo da finalidade para os quais são destinados, os pesticidas são denominados de inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, entre outros. O surgimento de um pesticida se deu em laboratório, sendo aos poucos investigados os aspectos de sua utilidade e suas avaliações toxicológicas em seres vivos, animais ou vegetais, e os possíveis danos ao meio ambiente, bem como a sua potencialidade para os fins que são destinados. A partir desses enfoques surgiu a possibilidade de vir a ser comercializado para uso na agricultura.

Após a segunda guerra mundial, na década de 30, teve início o uso de pesticidas na agricultura.

O aumento constante de uso de pesticidas na agricultura tem causado preocupações, quanto aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Essa preocupação decorre dos casos de doenças registradas em seres humanos e das alterações ambientais, que parecem ter como origem os pesticidas.

Exposições continuadas, por períodos longos, a níveis relativamente baixos de pesticidas podem afetar a saúde humana, levando a casos crônicos, mal definidos, às vezes, extremamente graves. Portanto, para prevenir os efeitos adversos que podem ocorrer devido ao uso de pesticida, considerando toxicidade

e exposição, faz-se necessário efetuar a monitorização ambiental, a fim de minimizar os efeitos nocivos.

Existem concentrações máximas permitidas estabelecidas para compostos químicos contaminantes da atmosfera, água e alimentos. Tais concentrações pressupõem que, se a exposição for mantida em níveis mais baixos que os valores a eles atribuídos, nenhum efeito nocivo é esperado na maioria dos indivíduos [1].

A monitorização ambiental, entretanto, ao estimar a intensidade da exposição, não é totalmente satisfatória para evitar o risco decorrente da exposição ocupacional. A intensidade e a duração da exposição aos contaminantes da atmosfera, alimentos e água são diferentes entre os indivíduos.

Outro fator a ser considerado é a inter-relação entre os compostos contaminantes dos diferentes compartimentos do ambiente (solo, ar, água e alimentos), o que dificulta a avaliação dos riscos, para os seres vivos, com base em determinações realizadas apenas em um ou outro componente do meio (Figura I.1).

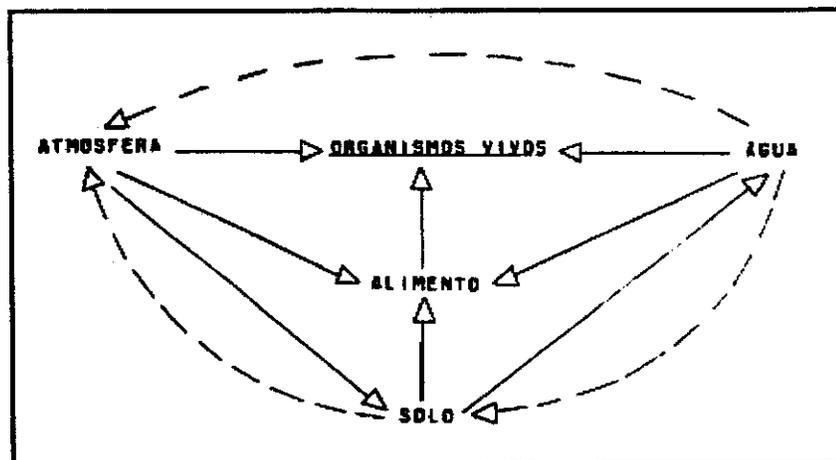


Figura I.1 – Inter-relação de compostos químicos contaminantes dos diferentes compartimentos do ambiente [1].

A fim de minimizar a possível contaminação humana ou dos alimentos e avaliar o risco tóxico, devem ser feitas várias considerações [1]:

- dispor de informações a cerca das concentrações consideradas normais;

- decidir qual nível, de um dado efeito, é considerado indesejável;
- orientar os trabalhadores quanto ao seu uso incorreto;
- estabelecer um diálogo com o indivíduo no qual o exame foi realizado, explicando os resultados e interpretação dos mesmos.

I.2. CONTEXTO ATUAL

No Brasil, o uso de pesticidas na agricultura depende do registro fixado pelos órgãos competentes, Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MA) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Os órgãos competentes, citados acima, se expressam através da Lei n.º 7.802/89 e dos Decretos n.º 98.816/90 e 991/93, que a regulamentam.

Através de documentos, estabelecidos em portarias pelos órgãos governamentais, são apresentadas as diretrizes e as orientações para autorização de registro, permissão de uso e critérios para a avaliação quanto a eficácia, ao potencial de periculosidade à saúde e ao meio ambiente, dos pesticidas que estão sendo propostos.

Para Covello e Merkhofer [2]: "A avaliação do risco à saúde e ao ambiente é um campo relativamente novo. Está sendo desenvolvida em diversas frentes, por especialistas de disciplinas distintas, incluindo epidemiologia, toxicologia, engenharia e estatística. Entretanto, quase todos os livros focalizam parte de tópicos disponíveis sobre método de avaliação: esses foram desenvolvidos especificamente, por tipos de riscos, de acordo com a preocupação do autor".

Quanto a avaliação do potencial de periculosidade a mesma está sendo acompanhada pelo Ministério da Saúde através da legislação em vigor, classificando os produtos conforme o grau de toxicidade aguda. A avaliação é realizada através de resultados de estudos de laboratório em animais, quanto ao potencial de carcinogênese, metabolismo e excreção, efeitos hormonais, mutagênese e teratogênese [3].

Os resultados obtidos nos estudos são interpretados pelos organismos internacionais, Organização Mundial da Saúde (WHO), Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), Food and Drug Administration (FDA), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA), uma vez estabelecidas as Diretrizes e Orientações do Ministério da Saúde, através da Portaria n.º 3/92.

I.2.1. Legislação

A legislação referente aos pesticidas usados na agricultura, para o controle de pragas e doenças, relativa aos aspectos de saúde humana, está contida na Lei n.º 7.802, de 11 de julho de 1989, no Decreto n.º 98.816, de 11 de janeiro de 1990 (posteriormente alterado pelo Decreto n.º 991, de 24 de novembro de 1993) e nas diretrizes baixadas pelo Ministério da Saúde, através da Portaria n.º 3, de 16 de janeiro de 1992 e da Portaria n.º 14, de 24 de janeiro de 1992.

A legislação vigente dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de pesticidas.

Quanto à saúde, a legislação refere a necessidade de obedecer as diretrizes e as exigências do órgão federal responsável pelo setor da saúde.

A Lei n.º 7.802/89 contém no art. 3º & 6º dispositivos proibindo o registro de produtos [3]:

- a) para os quais o Brasil não disponha de métodos de desativação de seus componentes, de modo a impedir que os resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;
- b) para os quais não haja tratamento eficaz no Brasil;

- c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;
- d) que provoquem distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor, de acordo com os procedimentos e experiências atualizadas da comunidade científica;
- e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais;
- f) cujas características causem danos ao meio ambiente.

Nesta lei também está estabelecido que o registro de um novo pesticida será concedido somente se a sua ação tóxica ao ser humano e ao meio ambiente for comprovadamente igual ou menor aos já registrados para o mesmo fim, segundo os parâmetros fixados na sua regulamentação.

O Decreto n.º 98.816/90, que regulamenta a Lei n.º 7.802/89, estabelece, entre outros que:

- a) A classificação toxicológica é definida como a diferenciação dos pesticidas em classes, em função de sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico ao homem, aos seres vivos e ao meio ambiente. Os níveis de classificação, no que se refere a toxicidade humana, são: classe I - extremamente tóxico; classe II - altamente tóxico; classe III - medianamente tóxico; e classe IV - pouco tóxico;
- b) Para a obtenção do registro, o interessado deve encaminhar ao Ministério da Saúde um relatório técnico contendo dados e informações exigidos por esse Ministério e dos quais constem, necessariamente:
 - método analítico e sua detectabilidade, para avaliar o resíduo de pesticidas remanescente no produto vegetal ou animal;
 - os resultados das análises quantitativas efetuadas, indicando a persistência de resíduos;
 - as tolerâncias disponíveis, de preferência em nível internacional;

- os dados biológicos, envolvendo os aspectos bioquímicos e os ensaios toxicológicos;
 - os dados relativos ao potencial mutagênico e carcinogênico em animais.
- c) Quando organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante de acordos e convênios, alertarem para os riscos, desaconselhando o uso do pesticida, caberá ao órgão federal registrante avaliar os problemas e as informações apresentadas, consultando o órgão oficial de Agricultura, Saúde ou Meio Ambiente, conforme o caso.
- d) Procedida a análise técnica, a autoridade competente poderá tomar uma ou mais das seguintes medidas:
- proibir ou suspender o uso;
 - cancelar ou suspender o registro;
 - restringir o uso através de atos específicos;
 - proibir, suspender ou restringir a importação;
 - propor a mudança da formulação e do método de aplicação;
 - restringir a comercialização.
- e) O Ministério da Saúde, ao proceder a avaliação da toxicidade, deve observar os seguintes parâmetros:
- toxicidade da formulação;
 - presença de problemas toxicológicos especiais - carcinogênese, mutagênese, neurotoxicidade, teratogênese, ação hormonal e comportamental;
 - persistência no ambiente;
 - bioacumulação;
 - tipo de formulação;
 - método de aplicação.
- f) Os rótulos de pesticidas devem apresentar:

- Na coluna central os dizeres: "É obrigatório o uso de equipamentos de segurança, proteja-se", os símbolos de perigo e a classificação toxicológica.
 - Na coluna da direita as precauções de uso e recomendações gerais, quanto aos primeiros socorros; tratamentos, no que diz respeito à saúde humana e telefone dos centros de informações toxicológicas.
- g) Os folhetos e bulas devem conter instruções de uso do produto, limitações de uso, equipamento de proteção individual, dados relativos à proteção da saúde humana, efeitos agudos, crônicos e colaterais.
- h) A receita para uso agrícola deverá ser específica para cada problema e deverá conter a recomendação técnica e as informações quanto ao intervalo de segurança, precauções de uso, os primeiros socorros nos casos de acidentes e orientações quanto à utilização de equipamento de proteção individual.

Conforme consta da Lei n.º 7.802/89 e do Decreto n.º 98.816/90, constituem impedimentos legais: o potencial de causar câncer, mutações teratogêneses, alterações hormonais que afetem a reprodução e para os quais há ausência de tratamento médico no Brasil.

I.3. TOXICIDADE DOS PESTICIDAS

Os pesticidas são substâncias tóxicas, podendo sua utilização oferecer ou não perigo para o ser humano. A segurança que se pode ter em seu uso está diretamente relacionada com a toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo em que se fica exposto a ele durante a aplicação.

Considera-se, portanto, que o principal problema acarretado pelos pesticidas é a sua utilização indiscriminada, sem qualquer preocupação com a segurança. Esta não se deve limitar aos que os aplicam, mas estender-se a todos, desde os operários da indústria que os fabricam até a população em geral,

consumidora de produtos nos quais eles são aplicados. Para garantir o nível desejável de segurança é necessário avaliar a utilização de cada produto, a relação risco/benefício [3].

A classificação toxicológica mostra o perigo potencial do pesticida, caso o mesmo venha a ser ingerido, inalado ou ficar em contato com a pele. Ela está baseada em dados de toxicidade aguda do produto, obtidos em estudos com animais de experimentação, através da dose letal a 50% da população exposta (DL₅₀).

A ação tóxica somente se manifesta quando o nível da substância atinge certos limites, e continua enquanto esse nível não for reduzido. Isso permite considerar dois tipos de intoxicação:

- a) Aguda: ocorre a exposição à grandes quantidades de pesticidas, por um período curto. Esta intoxicação se apresenta de várias maneiras:
 - acidental, mais frequentemente em crianças e em adultos, geralmente devido a erros grosseiros de manuseio;
 - ocupacional, relatada desde a produção até a aplicação;
 - criminosa, incluindo homicídios e suicídios.
- b) Crônica: ocorre devido a exposição à pequenas quantidades de pesticida por um período longo.

Estas são as regras gerais, mas dependem de outros fatores como, por exemplo, a sensibilidade individual, fatores genéticos, etc.

Estudos de toxicidade oral e dérmica servem como indicadores da toxicidade aguda, permitindo seu enquadramento em uma das categorias toxicológicas. No entanto, a classificação toxicológica será feita somente depois de constatado que o pesticida não apresenta nenhum fator de impedimento legal para o seu registro [4].

No Brasil a classificação toxicológica dos pesticidas obedece às recomendações da WHO - The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, aprovadas pela 28ª Assembléia Mundial da Saúde em 1975 que são revisadas a cada dois anos.

Na **Tabela I.1** são mostrados os critérios de classificação toxicológica adotados pelo Brasil, através de recomendações da Organização Mundial da Saúde [5].

Na avaliação toxicológica não existem dados que devem ser considerados de maior ou menor importância, todos devem ser igualmente avaliados. Existem poucas informações sobre riscos de lesão em órgãos específicos ou sobre possíveis efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos, neurotóxicos e comportamentais. De fato, ainda se conhece muito pouco sobre a toxicidade real dessas substâncias, principalmente como possíveis agentes de intoxicações crônicas.

Tabela I.1 - Classificação toxicológica dos pesticidas [5].

Classificação toxicológica	DL ₅₀ oral (mg kg ⁻¹)		DL ₅₀ dérmica (mg kg ⁻¹)	
	Produto sólido	Produto líquido	Produto Sólido	Produto líquido
Ia Extremamente perigoso	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
Ib Altamente perigoso	5-50	20-200	10-100	40-400
II Moderadamente perigoso	50-500	200-2.000	100-1.000	400-4.000
III Levemente perigoso	Superior a 500	Superior a 2.000	Superior a 1.000	Superior a 4.000

Fonte: IPCS/OMS (1996)

I.3.1. Dados Estatísticos das Intoxicações por Pesticidas

Segundo o Centro de Controle de Intoxicações de Campinas (SP), nos anos de 2000 e 2001 observou-se um total de 11 atendimentos relativos às exposições ocupacionais ou acidentais aos pesticidas na região de Piracicaba, São Paulo.

A Tabela I.2 apresenta a relação das classes de pesticidas envolvidos nos casos atendidos.

Tabela I.2 - Números de casos de exposição ocupacional ou acidental às principais classes de pesticidas, atendidos no Centro de Toxicologia do Hospital Universitário de Campinas, nos anos de 2000 e 2001.

PESTICIDAS	2000		2001	
	ACIDENTAL	OCUPACIONAL	ACIDENTAL	OCUPACIONAL
	Nº. CASOS	Nº. CASOS	Nº. CASOS	Nº. CASOS
Herbicidas	2	0	0	0
Inseticidas	5	0	2	2
Fungicidas	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0
TOTAL	7	0	2	2

Centro de Controle de Intoxicação de Campinas (SP), Fonte: CCI-UNICAMP, 2002.

I.4. CINÉTICA E METABOLISMO DOS PESTICIDAS

O sistema que envolve a intoxicação baseia-se em três elementos básicos: pesticida (agente tóxico), o organismo e a resposta (sinais e sintomas).

Como outros xenobióticos, os pesticidas são transportados através do sangue e a sua passagem através das membranas celulares depende dos seguintes fatores [6]:

➤ **Solubilidade:** a passagem dos compostos através das membranas celulares, de natureza protéica e lipídica, será determinada pela sua maior ou menor lipossolubilidade. Compostos lipossolúveis atravessam rapidamente as membranas enquanto que para compostos com baixa lipossolubilidade ocorre o contrário.

➤ **Grau de Ionização:** compostos tóxicos, na sua maioria, são ácidos ou bases fracas e possuem um ou mais grupos funcionais capazes de se ionizarem. O grau de ionização depende do pK do composto e do pH da solução (meio em que o composto está dissolvido). As membranas celulares são permeáveis às formas não ionizadas do composto tóxico e relativamente impermeáveis às formas ionizadas.

1.4.1. Absorção e Distribuição dos Pesticidas no Organismo

A absorção de uma substância depende da via pela qual ela penetra no organismo, tais como:

- a. respiratória (pelos pulmões), envolvendo a aspiração de partículas, gases ou vapores.;
- b. dérmica (através da pele);
- c. gastrointestinal, após ingestão de alimentos ou água contaminada.

a. Absorção respiratória

A absorção dos pesticidas no organismo humano pela via respiratória ocorre devido ao fato dos pesticidas encontrarem-se na atmosfera na forma de partículas sub-micrométricas, que facilitam seu ingresso por esta via. O contato do sistema respiratório com a atmosfera externa (o volume de ar que alcança as vias respiratórias varia de 5 a 6 L min⁻¹, em organismos em repouso e pode atingir 30 L min⁻¹, dependendo da atividade e esforço físico) influencia a quantidade de pesticidas introduzidos no organismo. A extensa área pulmonar, aproximadamente 90 m², e a superfície alveolar, de aproximadamente 70 m², mantêm contato com os compostos tóxicos presentes no ar. Como a via respiratória é permeável e ricamente vascularizada, permite a absorção rápida e eficiente, ocorrendo a retenção dos pesticidas nos cílios das vias aéreas superiores [7].

As partículas se depositam em 3 regiões do sistema respiratório, na nasofaringe, na traqueobrônquica e nos alvéolos.

A exposição aos pesticidas em níveis tóxicos resulta em uma variedade de sintomas e sinais, que dependem do pesticida usado, da dose absorvida e das condições de saúde do indivíduo. A contaminação por inalação (respiratória) apresenta os seguintes sintomas: ardor na garganta e pulmões, tosse, rouquidão e congestionamento das vias respiratórias.

b. Absorção dérmica

A absorção dos pesticidas através desta via é a mais importante, podendo ser mais intensa quando se utilizam formulações oleosas e depende fundamentalmente da lipossolubilidade, grau de ionização, tamanho da molécula e hidrólise do pesticida nas condições de pH da epiderme e derme. Os pesticidas lipossolúveis atravessam rapidamente as membranas, que são lipoprotéicas, e, portanto, são mais facilmente absorvidos.

Quando a substância tóxica entra em contato com a pele pode ocorrer: a) uma barreira efetiva criada pela pele ou pelo filme lipídico ou pelo suor; b) uma irritação primária causada pela reação da substância tóxica com a superfície da pele; c) uma irritação produzida pela combinação da substância tóxica com proteínas dos tecidos d) penetração da substância tóxica no folículo sebáceo ingressando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, agindo de modo sistêmico [6,8].

Os sintomas apresentados pela contaminação por contato são: irritação (pele seca e rachada), mudança de coloração da pele (áreas amareladas ou avermelhadas) e descamação (pele escamosa ou com aspecto de sarna).

c. Absorção gastrointestinal

Na absorção gastrointestinal influenciam várias características dos pesticidas, destacando-se a sua constante de dissociação, o seu grau de lipossolubilidade da forma não ionizada, a sua solubilidade no pH do estômago ou do intestino, a sua massa molar e a sua estabilidade [8].

1.4.2. Biotransformação, Eliminação e Excreção

As substâncias xenobióticas (pesticidas, produtos carcinogênicos, etc.), que penetram no organismo, podem sofrer algum tipo de biotransformação. As principais reações envolvidas neste processo são: oxidação, redução, hidrólise e conjugação [6].

Essas substâncias possuem graus variados de lipossolubilidade, desde pouco solúveis em lipídios, portanto bastante polares, até ionizáveis no pH fisiológico. As primeiras atravessam as membranas orgânicas com dificuldade e são excretadas pelo rim. No entanto, são biotransformadas formando produtos

mais polares, com menor ou sem nenhuma atividade tóxica. As segundas atravessam as membranas orgânicas com facilidade e embora sejam filtradas ao nível glomerular renal, são reabsorvidas pelos túbulos renais e permanecem no organismo. Essas substâncias devem passar por um processo de biotransformação produzindo compostos polares, que são desprovidos de atividade tóxica e são excretados pelos rins, bile, ar expirado, suor e saliva. Este processo é responsável pela duração da ação e pela concentração da substâncias xenobióticas no sangue e nos tecidos [6,8].

1.4.3. Aspectos Toxicológicos dos Herbicidas Estudados

Dentre os vários pesticidas, a classe dos herbicidas foi selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho. Tendo como objetivo destruir, matar ou controlar o crescimento de ervas prejudiciais à agricultura, os herbicidas se dividem em inorgânicos e orgânicos. A classe dos herbicidas orgânicos, que se tornou problema ao meio ambiente, engloba os derivados do ácido carbâmico e ditiocarbamato; da uréia; das triazinas; dos clorados; do ácido fenoxiacético; da anilina; de nitrogênio quaternário, etc.

Os herbicidas também são classificados em função de seu uso como: *não seletivos* que destroem todas as plantas sem distinção de espécie, sendo aplicados, por exemplo, nas construções e manutenções de rodovias, ferrovias, etc.; e os *seletivos*, que são específicos para determinadas ervas daninhas e não causam danos às culturas. O modo de ação nas plantas pode ser por *contato*, aplicação direta nas plantas, destruindo-as na forma total ou parcial, ou por *translocação* ou *sistêmico*, absorção pela planta que tenha sido tratada, exercendo sua ação em determinadas partes dela.

Da mesma maneira que os herbicidas atuam destruindo os vegetais, quando mal utilizados podem causar intoxicação ao homem. Para evitar que isto se torne drástico, desenvolveram-se metodologias para determinação de alguns

herbicidas pertencentes as classes das uréias substituídas, triazinas e fenoxiacético.

A seguir será apresentada uma descrição das propriedades gerais, absorção, biotransformação, excreção e toxicidade de cada pesticida estudado.

1.4.3.1. Pesticidas Derivados da Uréia

a. Propriedades

Os pesticidas uréicos, diuron e linuron, são cristalinos, muito pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Esses herbicidas apresentam ação pré e pós-emergente no controle de plantas daninhas nas culturas de cana-de-açúcar, algodão, café, citros, chá, abacaxi, banana e uva [9-12].

As propriedades físico-químicas dos herbicidas uréicos [13,14] estão apresentadas na **Tabela I.3**.

Os derivados da uréia decompõem-se por hidrólise, com formação de derivados de anilina, ou através de reações oxidativas. Em função de sua decomposição no meio ambiente, são classificados como moderadamente persistente, podendo permanecer no solo por vários meses após a sua aplicação [15].

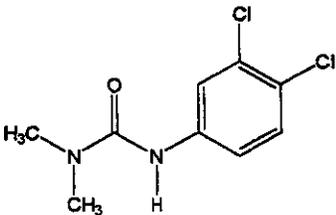
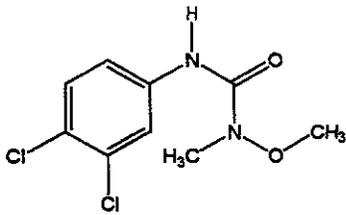
b. Absorção e Biotransformação

Os pesticidas pertencentes a classe das uréias são absorvidos pelo trato gastrointestinal e via respiratória.

A biotransformação desses pesticidas no organismo se dá através de processos de N-desalquilação e hidroxilação do anel aromático, com reações semelhantes àquelas que ocorrem no ambiente. A biotransformação do diuron

ocorre por N-desalquilação com formação de 3,4-diclorofenil-uréia, com posterior conversão a 3,4-dicloroanilina [16].

Tabela I.3 - Propriedades físico-químicas dos herbicidas uréicos.

CARACTERÍSTICAS	DIURON	LINURON
Fórmula estrutural		
Nome químico (IUPAC)	3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia	3-(3,4-diclorofenil) 1-metóxi-1-metiluréia
Nomes comerciais	Diuron 500 SC, Cention 800, Diuron Nortox, Diuromex, Herburon 800, Karmex 800, etc.	Lorox 500, Afalon 500 SC, Linurex 50, etc.
Fórmula molecular	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$
Massa Molar ($g\ mol^{-1}$)	233,1	249,0
PF ($^{\circ}C$)	158-159	93-94
Solubilidade em água ($mg\ L^{-1}$)	42 ($25^{\circ}C$)	75 ($25^{\circ}C$)
Solventes orgânicos nos quais ocorre solubilidade	acetona, benzeno, óleo vegetal, estearato de butila	Etanol, éter dietílico, clorofórmio, tolueno, benzeno, acetona

c. Toxicidade

Estes herbicidas, derivados da uréia, são atóxicos, apresentando uma DL_{50} aguda oral em ratos, de $3.400\ mg\ kg^{-1}$ para o diuron e $> 4.000\ mg\ kg^{-1}$ para o linuron.

No processo de síntese da 3,4-dicloroanilina, ou na obtenção de herbicidas que tenham grupamentos 3,4-diclorofenil, diuron e linuron, ocorre a condensação de duas moléculas da dicloroanilina, produzindo dois contaminantes, o 3,4,3',4'-

tetracloroazobenzeno (TCAOB) e o 3,4,3',4'-tetracloroazobenzeno (TCAB), sendo ambos de alta lipossolubilidade. Os níveis de TCAB variam de 0,15 a 3,38 mg L⁻¹ para diuron e de 0,91 a 10,28 mg L⁻¹ para linuron. Deve-se tomar cuidados no uso e manuseio desses herbicidas devido a presença destes contaminantes. Pode também ocorrer a degradação de diuron e linuron no solo, através de peroxidases geradas por microorganismos, produzindo 3,4-dicloroanilina, que é convertida em TCAB e após TCAOB, como mostrado na Figura I.2 [6,8].

Estudos demonstraram que o TCAB é mutagênico, potencialmente carcinogênico, e o TCAOB, provoca aparecimento de dermatites em indivíduos expostos.

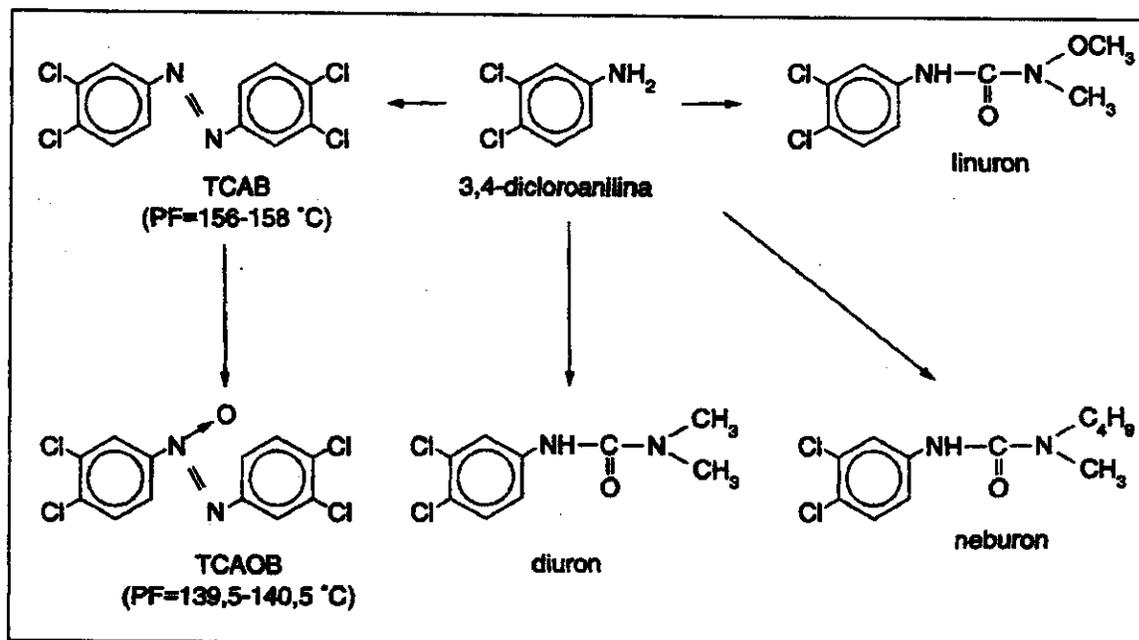


Figura I.2- Herbicidas derivados da 3,4-dicloroanilina e formação dos contaminantes 3,4,3',4'-tetracloroazobenzeno (TCAB) e 3,4,3',4'-tetracloroazobenzeno (TCAOB).

d. Tratamento das Intoxicações

Os herbicidas uréicos raramente causam envenenamentos agudos ou acidentais, portanto o tratamento médico é sintomático.

1.4.3.2. Pesticidas Triazínicos

a. Propriedades

Nesta classe de herbicidas estão incluídos todos os compostos com estrutura da 1,3,5-triazina (ou s-triazina). As substituições ocorrem nas posições 2,4 e 6. Os radicais substituintes na posição 2 são -Cl ou -SCH₃ e nas posições 4 e 6 são substituintes amínicos.

Estes pesticidas triazínicos são usados em aplicações pré e pós-emergência em culturas de sorgo, milho e cana-de-açúcar. A atrazina é também utilizada no controle de plantas daninhas em lagos [16].

Os herbicidas s-triazínicos são pouco solúveis em água e muito solúveis em solventes orgânicos, com exceção da simazina. Na **Tabela 1.4** estão listadas as propriedades físico-químicas [17] dos herbicidas triazínicos estudados.

b. Absorção, Biotransformação e Excreção

Os compostos s-triazínicos são absorvidos pela via respiratória, dérmica e trato gastrointestinal.

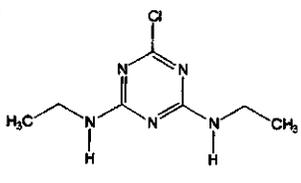
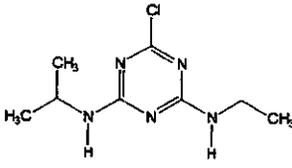
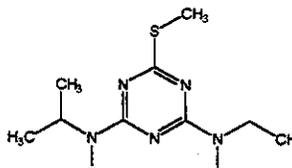
A biotransformação destes pesticidas envolve processo de N-desalquilação e conjugação do produto formado. O grupo isopropil é mais facilmente removido que o etil, sendo que os radicais -Cl e -SCH₃ permanecem intactos [8].

A absorção dérmica da atrazina representa cerca de 16% da concentração aplicada diretamente sobre a pele do homem. Durante a absorção dérmica o composto é biotransformado por processos oxidativos, como mostrado na **Figura I.3**, formando derivados hidroxilados e amínicos.

A atrazina, administrada em ratos em doses de 30 mg kg⁻¹, é excretada através da urina (66%) e fezes (18%) nas primeiras 72 horas,

A simazina segue a mesma rota de biotransformação da atrazina, portanto, a excreção urinária de metabólitos bi-dealquilados, deisopropilados e deetilados pode ser usada para o monitoramento biológico.

Tabela I.4 - Propriedades físico-químicas dos herbicidas triazina.

CARACTERÍSTICAS	SIMAZINA	ATRAZINA	AMETRINA
Fórmula estrutural			
Nome químico (IUPAC)	2-cloro-4,6-bis-etilamino-s-triazina	2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina	2-tiometil-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina
Nomes comerciais	Gesatop, Sipazina 800 PM, Simanax SC, Herbazin 800 PM, etc..	Gesaprin 800 PM, Herbitrin, Siptran 800 PM, Atrazinax 500, etc..	Gesapax
Fórmula molecular	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	C ₉ H ₁₇ N ₅ S
Massa Molar (g mol⁻¹)	201,66	215,68	227,35
PF (°C)	225-7	171-4	84-6
Dissociação ácida (pK_a)	1,62 (25 ^o C)	1,70 (25 ^o C)	4,1(20 ^o C)
Solubilidade em água (mg L⁻¹)	5 (20 ^o C)	70 (22 ^o C)	185 (20 ^o)
Solventes orgânicos nos quais ocorre solubilidade	Acetona, etanol, clorofórmio, éter dietílico, acetato de etila	Pouco solúveis: éter etílico, metanol, clorofórmio	metanol, tolueno, hexano

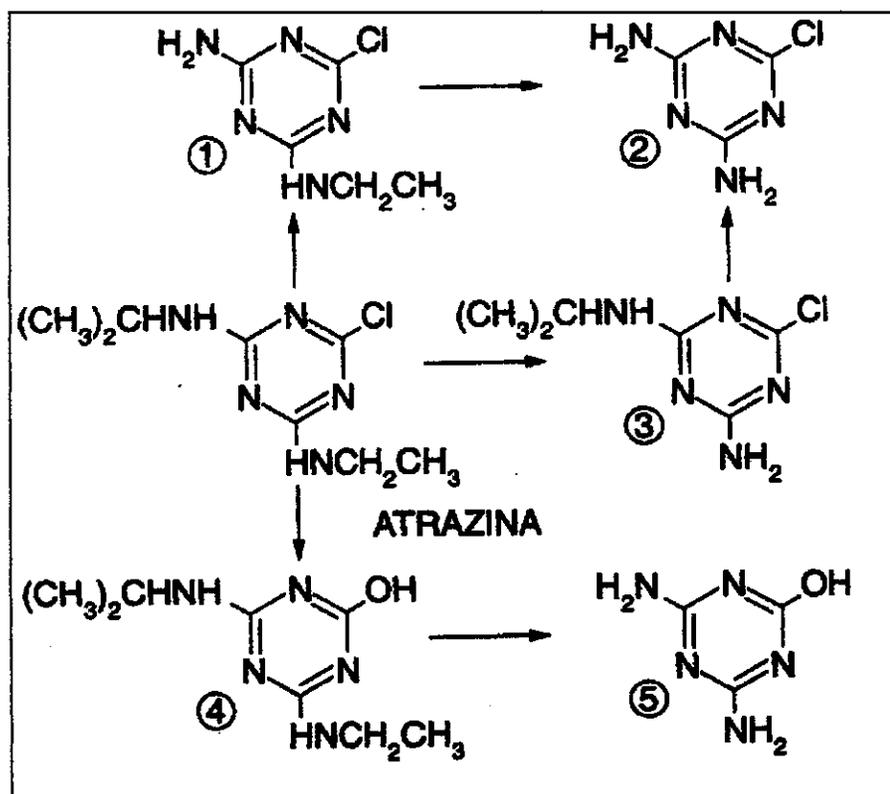


Figura I.3- Produtos de biotransformação da atrazina. (1) 2-cloro-4-etilamino-6-amino-2-atrazina; (2) 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina; (3) 2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina; (4) 2-hidróxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina e (5) 2-hidróxi-4,6-diamino-s-triazina.

c. Toxicidade

Estes herbicidas triazínicos apresentam baixa toxicidade aguda com relação ao DL_{50} [8], o que pode ser comprovado na **Tabela I.5**.

O fígado constitui o órgão alvo na ação tóxica da simazina, durante as exposições prolongadas.

Tabela I.5 - Toxicidade aguda de herbicidas triazínicos [8].

COMPOSTOS	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹) em ratos	
	Via oral	Via dérmica
Atrazina	2.000	3.000
Simazina	5.000	5.000
Ametrina	3.750	-

d. Sintoma e Tratamento das Intoxicações

Nas exposições ocupacionais prolongadas a estes herbicidas podem ocorrer dermatites por contato.

No caso de contato com a pele devem ser feitas trocas de roupas e banhos com muita água e sabão. A lavagem gástrica com água ou soro fisiológico são importantes no caso de ingestão. O tratamento para este tipo de intoxicação é sintomático [16].

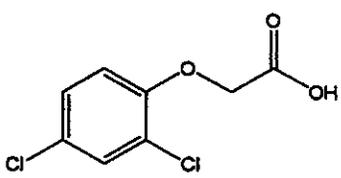
1.4.3.3. Pesticida Fenoxiacético

a. Propriedades

Os pesticidas fenoxiacéticos são classificados em função do número de átomos de cloro ligados ao anel aromático. Destaca-se o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é constituído de dois átomos de cloro, e é um sólido de leve odor fenólico com as características físico-químicas [14] mostradas na **Tabela I.6**. O pesticida é disponível em formulações simples ou em mistura com outros herbicidas como o linuron, glifosato e com o ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) [16].

Estes herbicidas são indicados para as culturas de arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar, em reflorestamentos, na manutenção de ferrovias e das áreas onde existem equipamentos de alta tensão.

Tabela I.6 - Propriedades físico-químicas do 2,4-D.

CARACTERÍSTICAS	2,4-D
Fórmula estrutural	
Nome químico (IUPAC)	2,4-diclorofenoxiacético
Nomes comerciais	Tordon, DMA
Fórmula molecular	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Massa Molar (g mol⁻¹)	221,04
PF (°C)	140,5
Dissociação ácida (pK_a)	2,73 (25°C)
Solubilidade em água (mg L⁻¹)	620 (25°C)
Solventes orgânicos nos quais apresenta solubilidade	Etanol, acetona, heptano, tolueno, éter dietílico

b. Absorção, Biotransformação e Excreção

Os herbicidas fenoxiacéticos são absorvidos pelo trato gastrointestinal e respiratório, sendo que a absorção por via dérmica é considerada de pequena importância nas exposições ocupacionais e ambientais.

Os pesticidas fenoxiacéticos, depois de absorvidos pelo organismo, são distribuídos uniformemente, concentrando-se no tecido gorduroso, músculos, fígado, rins, baço, pâncreas, cérebro e pulmões [8]. Estes compostos são excretados na urina sob forma inalterada, livres ou conjugados com amino-ácidos. O 2,4-D é quase que totalmente excretado na urina, sob forma inalterada, na proporção de 3 a 5% a cada hora, durante as primeiras 12 horas. Quando da

administração oral, cerca de 76% do composto é excretado nas primeiras 96 horas. Nas exposições ocupacionais a excreção máxima do 2,4-D ocorre de 16 a 40 horas, depois de cessada a absorção [8].

c. Toxicidade e Sintomas

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético é um inibidor moderado da fosforilação oxidativa e têm ação tóxica direta sobre os músculos estriados e uma possível ação tóxica sobre os nervos periféricos [18].

A toxicidade aguda dos pesticidas fenoxiacéticos pode ser evidenciada através de valores de DL_{50} em ratos, sendo que por via oral é de 375 mg kg^{-1} e na via dérmica de 2.000 mg kg^{-1} [8].

No homem, quando da ingestão de doses elevadas, a morte é precedida por espasmos nos membros, relaxamento dos esfíncteres, diminuição dos reflexos, hipotensão, dificuldade respiratória e coma profundo. Também ocorrem distúrbios cardíacos com fibrilação auriculares e, às vezes, ventriculares, responsáveis por possíveis óbitos [16].

Nos envenenamentos não letais há o aparecimento de um quadro tardio caracterizado por sensibilidade muscular, fadiga, insônia e depressão moderada.

Nas exposições ocupacionais são comuns, além da irritação dos olhos, nariz e garganta, o aparecimento de erupções cutâneas e alterações urinárias.

O controle biológico das exposições ocupacionais ao 2,4-D pode ser realizado pela determinação do pesticida em amostras de urina. Porém, estudos realizados não permitiram o estabelecimento de valores precisos como limite biológico para o controle das exposições humanas. Em exposições assintomáticas foram constatados concentrações urinárias de 2,4-D de 40 a 100 mg L^{-1} [16].

O valor de limite biológico para exposição ocupacional proposto por um grupo de estudo do "Scientific Committee on Pesticides of the International Commission on Occupational Health" foi de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ [19].

d. Tratamento das Intoxicações

No tratamento de intoxicações, medidas que provocam vômito e lavagem gástrica com soro fisiológico, são indicadas nos casos de ingestão, desde que realizadas em tempo hábil.

Na intoxicação aguda, o tratamento específico é apenas sintomático, com assistência adequada às condições respiratórias, sendo que os casos graves exigem monitoração cardíaca.

A remoção do agente tóxico do organismo, realizada no início dos sinais e sintomas do envenenamento, é possível através da hemodiálise [6].

I.5. ANÁLISES DE URINA

I.5.1. Importância

A medicina laboratorial teve início com a análise de urina. Antigamente os médicos, muitas vezes, não viam o paciente, apenas sua urina. Embora não contassem com os métodos atuais, sofisticados, eram capazes de diagnosticarem a partir de observações básicas, como cor, turvação, odor, volume e viscosidade da urina. É interessante notar que características urinárias ainda está sendo relacionadas pelos laboratórios hoje em dia. Contudo, os modernos métodos de análise urinária ampliaram seu campo de ação, abrangendo não só o exame físico, mas também químico [20].

1.5.2. Formação

A urina é formada continuamente nos rins. Trata-se, na realidade, de um ultrafiltrado do plasma, a partir do qual são reabsorvidos glicose, aminoácidos, água e outras substâncias essenciais ao metabolismo do organismo [21].

1.5.3. Composição

A urina é constituída por uréia, substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, dissolvidas em água, hormônios, vitaminas e medicamentos. Podem ocorrer grandes variações na concentração dessas substâncias devido à influência de fatores como ingestão alimentar, atividade física, metabolismo orgânico e função endócrina, o que dificulta o estabelecimento de níveis normais. O principal componente inorgânico dissolvido na urina é o cloreto, seguido pelo sódio e potássio. A uréia, resíduo metabólico produzido no fígado a partir da utilização de proteínas e aminoácidos, representa quase metade dos corpos sólidos dissolvidos na urina [20]. Entre outras substâncias orgânicas estão a creatinina e o ácido úrico. Uma vez que a uréia e a creatinina estão presentes em concentrações muito maiores na urina que em outros líquidos orgânicos, a demonstração de alto teor de uréia e creatinina pode servir como identificação da urina [20].

A urina também pode conter elementos que não fazem parte do filtrado plasmático, como células, cristais, muco e bactérias, que, em níveis elevados, podem ser indício de doença [22].

I.5.4. Volume

O volume de urina depende de quantidade de água excretada pelos rins. A água é o principal constituinte do organismo e, portanto, a quantidade excretada, em geral, é determinada pelo estado de hidratação do corpo. Os fatores que influenciam o volume de urina são: ingestão de líquidos, perda de líquidos por fontes não-renais, variações na secreção do hormônio anti-diurético e necessidade de excretar grandes quantidades de solutos, como glicose ou sais. Levando-se esses fatores em consideração, pode-se observar que, embora o volume urinário diário médio seja de 1200 a 1500 mL, podem ser consideradas normais os limites de 600 a 2000 mL [20].

I.5.5. Coleta e Manipulação

A urina é um material biologicamente perigoso, o que exige certas precauções na coleta e manipulação.

O descarte da urina pode ser feito numa pia, jogando-se depois grande quantidade de água. O recipiente no qual a amostra ficou armazenada deve ser descartado como lixo com risco biológico.

Pelo fato da amostra de urina ser de fácil e rápida obtenção, muitas vezes, ocorrem certos descuidos no tratamento da amostra após a coleta, ocasionando a decomposição da urina, havendo, portanto, a necessidade de empregar técnicas corretas no manuseio da amostra. Vários são os cuidados que se deve ter com a amostra [20], tais como:

- A amostra deve ser coletada em recipiente limpo e seco. Recomenda-se o uso de recipientes descartáveis, possibilitando a eliminação de contaminação decorrente de lavagem incorreta. As tampas de rosca tendem a produzir menores vazamentos, quando bem fechadas, do que as de encaixe.

- O recipiente de amostra deve ser devidamente etiquetado com a identificação do indivíduo e da coleta.
- Caso as amostras não possam ser analisadas de imediato devem ser refrigeradas ou adicionar conservante químico como, timol, ácido bórico, formaldeído, tolueno, fluoreto de sódio e fenol.

I.5.6. Estocagem

O método de estocagem mais usado é o da refrigeração, que é capaz de evitar a decomposição bacteriana da urina [22]. A temperatura ideal de estocagem é de -20°C . É necessário deixar que a amostra volte à temperatura ambiente antes da análise química, isso poderá dissolver alguns uratos amorfos. Quando a amostra tiver de ser transportada a grandes distâncias e não for possível refrigerar, deve-se acrescentar conservantes químicos. O conservante ideal deve ser bactericida e inibir a urease para que não venham a interferir nas análises químicas. Infelizmente, o conservante ideal ainda não foi encontrado. Portanto, é importante escolher um conservante que se ajuste melhor às necessidades da análise [22].

I.5.7. Tipos de Amostras

Para que a amostra de urina seja representativa do estado metabólico do indivíduo, às vezes é necessário controlar certos aspectos da coleta, como hora, dieta, medicamentos ingeridos e procedimento empregado. É importante dar instruções aos indivíduos quando eles tiverem de seguir procedimentos de coleta. Existem vários tipos de coletas de amostra dependendo da finalidade a que se destina.

Amostras coletadas aleatoriamente ou a primeira urina do dia são úteis em exames de triagem, para detectar anormalidades bem evidentes. Já as amostras coletadas a cada 24 horas (tempo marcado) têm por finalidade realizar testes bioquímicos quantitativos, uma vez que determinadas substâncias químicas presentes na urina, precisam ser exatamente quantificadas, ao invés de acusar apenas sua presença ou ausência [20].

Neste trabalho padronizou-se o horário das coletas no final da jornada de trabalho, devido a vários fatores, dependentes das atividades diárias, como exercícios, refeições e metabolismo orgânico do indivíduo.

I.6. EXIGÊNCIAS ATUAIS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de analisar pesticidas em amostras biológicas e ambientais, para efeito de regulamentação e controle, depara-se continuamente com problemas analíticos complexos, porque uma grande variedade de substâncias, estruturalmente diferentes, deve ser determinada em um amplo número de produtos agrícolas. Por outro lado, para que se possa fazer diagnósticos médicos, devido a intoxicações, tornam-se necessárias análises rápidas. Órgãos internacionais de controle exigem atualmente métodos analíticos que possam oferecer resultados seguros e de forma rápida, em um tempo inferior a 24 horas [23].

Alguns aspectos legais devem ser levados em consideração, na área de resíduos de pesticidas. Os fabricantes devem fornecer dados de estudos de campo relativos aos pesticidas e aos metabólitos, para que se possa efetuar o registro do pesticida, enquanto que os órgãos públicos devem impor e fazer cumprir os níveis máximos legais e realizar controles analíticos no ambiente. Portanto, de acordo com as necessidades, os fabricantes tendem a desenvolver métodos que são adequados para a análise de pesticidas em particular e de seus metabólitos mais importantes em uma ou em várias matrizes. Por mais que os métodos sejam utilizados para fazer cumprir a legislação, ou mesmo para

confirmar resultados, os laboratórios de controle empregam métodos que cobrem uma ampla faixa de pesticidas, de famílias distintas, ou utilizam métodos seletivos, que se aplicam aos pesticidas de uma mesma família ou de um único princípio ativo. Portanto, nem sempre tais métodos são suficientemente sensíveis para todos os pesticidas que está sendo analisados [24].

Durante os últimos anos, a introdução de novos pesticidas, a necessidade de maiores controles, o custo das análises e a confiabilidade dos resultados analíticos praticamente obrigaram a fazer uma revisão e melhoria nos métodos analíticos empregados.

Deste modo, vários autores [25-27] já comentaram a necessidade de se introduzirem algumas modificações nas diferentes etapas experimentais dos métodos analíticos atuais, de modo a simplificá-los e adaptá-los às necessidades dos órgãos de controle. Também, em um futuro próximo, a maioria dos métodos de análise deverão dispor de procedimentos que respeitem mais a saúde humana e o meio ambiente.

Os seguintes objetivos devem ser destacados para que haja investigação e desenvolvimento de novos métodos para análises de pesticidas:

De um modo geral:

- Simplificar e automatizar os procedimentos de tratamento das amostras;
- Reduzir o consumo de solventes orgânicos, eliminando aqueles que são tóxicos;

Quanto à etapa de extração e purificação:

- Miniaturizar os procedimentos de partição líquido-líquido ou substituir por outros procedimentos, como a extração em fase sólida (EFS);
- Minimizar o número de etapas de bancada;
- Simplificar os procedimentos convencionais (cromatografia em colunas de adsorção, cromatografia de permeação em gel), por meio da utilização de técnicas miniaturizadas como extração em fase sólida (EFS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou técnicas "on-line" de

extração/purificação combinadas, que envolvam menores quantidades de solventes;

Quanto à etapa de separação e detecção cromatográfica:

- Potencializar a utilização da CLAE para a análise de pesticidas que não possam ser separados por cromatografia gasosa (CG), sem derivatização prévia;
- Incorporar às etapas de determinação por espectrometria de massas (EM), de modo a confirmar as estruturas e poder quantificar em níveis mais baixos;
- Utilizar detectores mais versáteis;

Quanto a aplicação dos novos métodos:

- Aplicar os novos métodos de análise à amostras reais.

I.7. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As áreas que têm interesse em análise de compostos encontrados em amostras biológicas são muitas: ambiental, análises clínicas, farmacêutica, medicina legal, etc. [28-30].

A análise cromatográfica de compostos presentes em matriz biológica requer métodos eficientes. As razões para isto são inúmeras, destacando-se a complexidade da matriz, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas, que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração dos compostos a serem analisadas, a nível de traços [31].

Para isto necessita-se de procedimentos analíticos, que podem ser divididos em três etapas: (i) amostragem (ii) preparo da amostra, isolar e pré-concentrar a substância a ser determinada por tratamento adequado da amostra e pré-concentrar (iii) análise para identificação e/ou quantificação dos compostos e de eventuais produtos de biotransformação.

1.7.1. Amostragem

A amostragem se refere a coleta e estocagem das amostras. Na análise de pesticidas em matrizes biológicas esta etapa é muito importante e a amostra deve ser representativa do estado metabólico do indivíduo, necessitando de cuidados e controle na coleta como descrito no sub-item 1.5.6.

A quantidade de amostra coletada deve ser suficiente para realizar a análise e possível repetição.

Um fator importante a considerar é a estabilidade da matriz, bem como dos pesticidas e seus metabólitos, que podem vir degradar na amostra biológica durante a coleta, processamento, estocagem, preparação e análise.

Um tempo de estocagem longo aumenta a probabilidade de degradação de certos pesticidas em amostras biológicas [32]. Portanto as análises de amostras biológicas devem ser realizadas o mais rápido possível após a coleta, antes que ocorra a degradação dos pesticidas.

1.7.2. Preparo da Amostra

Dentre as várias etapas envolvidas no preparo de amostras complexas, destacam a extração do analito da matriz, o "clean up" (remoção de impurezas), o ajuste de condições (ex. pH), o ajuste de volume e a pré-concentração. A etapa de "clean-up" é importante a fim de eliminar compostos oriundos da matriz que podem interferir no método analítico. Em análises cromatográficas, a remoção de interferentes preserva a vida das colunas analíticas além de evitar a co-eluição dos interferentes com o analito de interesse.

Existem várias técnicas de preparo da amostra, descritas na literatura [33]. Para amostras sólidas podem-se citar a extração com fluido pressurizado, com Soxhlet, com Soxhlet automatizada, por microondas, ultrassônica e com fluido supercrítico. Como este trabalho baseou-se em amostra líquida, urina, serão

descritas as duas técnicas mais utilizadas neste caso, a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS).

1.7.2.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)

A análise de compostos presentes em amostras biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência é difícil, por causa do grande número de substâncias presentes na matriz e porque os compostos de interesse encontram-se em baixos níveis de concentração [34].

A extração de compostos endógenos da matriz, se não for feita cuidadosamente, removendo totalmente os compostos, pode prejudicar a detecção do analito.

A técnica de extração líquido-líquido (ELL) é clássica no preparo de amostras complexas, baseando-se na Lei de Distribuição de Nernst. O analito é distribuído entre dois líquidos imiscíveis e existe uma relação definida entre a atividade do analito nas duas fases em equilíbrio, a uma dada temperatura e pressão [35]. A constante de equilíbrio é conhecida como coeficiente de partição ou coeficiente de distribuição (K_D). O valor desta constante é dado pela razão das solubilidades do analito nos dois solventes. O valor de K_D pode ser aumentado pelo ajuste do pH, prevenindo a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa [36,37].

O analito pode estar presente em diversas formas, dissociado, ou complexado com qualquer outro componente da amostra, assim como pode interagir com um dos solventes. Extrações sucessivas e afinidade do soluto pelo tipo de solvente extrator (hexano, diclorometano, clorofórmio, etc.) aumentam a eficiência e seletividade da extração [38,39].

A ELL possui suas vantagens por ser de baixo custo (utiliza tubos de centrífuga ou funil de separação), poder utilizar um grande número de solventes

puros, fornecendo uma ampla faixa de solubilidade e seletividade e os analitos podem ser extraídos da maior parte dos componentes endógenos, dependendo da escolha do solvente e do pH [40,41]. Além disso, pode ocorrer a denaturação das proteínas [30], evitando a contaminação da coluna cromatográfica.

Como desvantagens da ELL pode-se citar: impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra; formação de emulsões, resultando em um grande consumo de tempo; amostras que possuem alta afinidade pela água não são totalmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito; pode ocorrer adsorção do analito na vidraria; pode ocorrer decomposição de compostos instáveis termicamente; difícil automação; susceptível a erros e sujeita a contaminação.

1.7.2.1.1. Aplicações de ELL a Fluidos Biológicos

A CLAE foi empregada na análise de 8 herbicidas clorofenóxi (entre eles 2,4-D) e 2 benzonitrilas para auxiliar nos diagnósticos de envenenamento agudo. Várias amostras de fluidos biológicos (sangue, plasma ou urina), após ELL, foram analisadas em coluna Spherisorb S5 utilizando como fase móvel ortofosfato diidrogênio de potássio (50 mmol L^{-1} , pH 3,5) e acetonitrila (3:1 v/v). Este método foi capaz de separar a mistura dos herbicidas clorofenóxidos e benzonitrila. O limite de detecção foi de 10 mg L^{-1} para cada classe dos herbicidas, e as estimativas de desvios padrão relativos foram menores que 8%, para todos os analitos [42].

Um procedimento automatizado foi desenvolvido para a preparação e análise, usando CG, de 34 drogas básicas e neutras presentes em amostra de urina. A preparação consistiu de ELL de $250 \mu\text{L}$ de urina, em solução alcalina, com $100 \mu\text{L}$ de éter metil terc-butílico. Após separação, a fase orgânica foi automaticamente injetada no cromatógrafo e analisada. Foram conseguidas altas

recuperações e o limite de detecção da maioria das drogas foi menor que $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo boa exatidão e precisão [43].

Clarke [44] descreveu a extração líquido-líquido para o isolamento de drogas em urina de paciente que ingeriu uma superdosagem, por tentativa de suicídio ou por engano. O procedimento de preparo da amostra foi muito trabalhoso, uma vez que o pH da amostra foi várias vezes ajustado a valores ácido e básico e as fases orgânicas e aquosas separadas foram extraídas com vários solventes como éter etílico, clorofórmio, acetato de etila:álcool isopropílico (9:1 v/v). A identificação e/ou quantificação dessas drogas foram feitas por CLAE ou CG.

Beeson et al. [45], desenvolveram um método de diluição isotópica para quantificar, na urina, metabólitos da atrazina, malation e 2,4-D. A amostra de urina foi enriquecida com uma solução isotópica combinada com padrão interno. Foi ajustado o pH da urina para 3,7 com adição de 10% de ácido sulfúrico. Em uma parte desta amostra foi adicionado éter etílico, após o ajuste do pH. A amostra foi misturada, em um amostrador rotatório, por 5 min em 30 rpm e, após, centrifugada por 10 min em 2000 rpm. A camada orgânica foi transferida para um outro tubo e a etapa de extração foi repetida, incluindo a rotação e centrifugação. As camadas orgânicas foram combinadas em um mesmo tubo e concentrada à aproximadamente $50 \mu\text{L}$. Em seguida a amostra foi analisada usando a CLAE-EM-EM. Os limites de detecção foram menores que $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, obtendo alta exatidão e precisão.

Através da CLAE-EM, usando interfaces de impacto de elétrons e ionização química, foram identificados diuron e seus 4 metabólitos em urina [46]. O pré-tratamento da amostra foi feita com $250 \mu\text{L}$ da urina, na qual foi adicionado 1 mL de um tampão borato (50 mmol L^{-1}), pH 10. A seguir, a amostra foi extraída com 10 mL de diclorometano. A camada orgânica foi evaporada e o resíduo foi redissolvido em $500 \mu\text{L}$ de fase móvel para ser injetado no cromatógrafo a líquido.

Um método foi desenvolvido para determinação de anilina halogenada (3,4-dicloroanilina, cloroanilina e bromoanilina) em urina usando a CLAE com detecção eletroquímica. 10 mL de urina foram hidrolisadas por adição de HCl. Os tubos,

contendo as amostras, foram aquecidos por 1 h. A seguir os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a solução foi lavada várias vezes com hexano, o qual foi descartado. Foi adicionado NaOH para neutralização e as anilinas foram extraídas sucessivas vezes com hexano. Para retornar as anilinas para a fase aquosa, as frações hexânicas combinadas foram extraídas com uma solução de 5% de H₃PO₄ e, após ajuste, o volume final foi injetado diretamente no cromatógrafo a líquido [47].

Os herbicidas diuron e vários metabólitos, a) 1-(3,4-diclorofenil)-3-metil uréia (nordiuuron), b) 3,4-diclorofenil uréia (bisnordiuuron), c) 6-hidróxi-3,4-diclorofeniluréia e d) 3,4-dicloroanilina, foram determinados por CLAE com detecção por UV [48]. Os pesticidas foram extraídos através da extração líquido-líquido (ELL) com ajuste da urina em pH 2 e extraída com diclorometano, e a camada orgânica foi transferida para um tubo. Após, a urina foi ajustada em pH 11 e reextraída novamente com diclorometano. A camada orgânica foi evaporada até à secura. O resíduo foi analisado em um cromatógrafo a líquido. As recuperações dos metabólitos (a), (b) e (d), extraídos da urina, foram determinados. O metabólito fenólico (c) foi extraído com uma eficiência de 40% em pH na faixa de 2 a 7 e 0% em pH 11.

Um método de derivatização foi utilizado no preparo da amostra para determinar 2,4-D em urina por CG [49]. A amostra de urina foi fortificada com solução estoque de 2,4-D, acidificada com HCl e extraída com benzeno. O extrato benzênico foi coletado e agitado em um tubo com sulfato de sódio anidro. A reação de metilação foi realizada pela adição de uma solução de sulfato de dimetil no extrato benzênico e mantida à 55^oC, por 10 min. A seguir foi adicionado solução de cloreto de sódio saturado e benzeno. A mistura foi agitada e centrifugada à 2500 rpm por 5 min. O extrato benzênico contendo éster metílico foi evaporado à 0,5 mL. A eluição de 2,4-D metilado foi feita através de uma coluna de sílica gel usando benzeno-hexano. O extrato de urina, contendo éster metilado de 2,4-D, foi colocado em uma coluna pré-lavada com 40% benzeno-hexano e 60% benzeno-hexano e eluído com uma mistura de benzeno-hexano. O eluato foi

coletado e concentrado à 5 mL, sendo que uma alíquota de 5 μ L foi injetada no cromatógrafo a gás.

1.7.2.2. Extração em Fase Sólida (EFS)

A extração em fase sólida (EFS) existe na sua forma moderna desde a década de 70, com a introdução dos tubos de extração. Entretanto, foi a partir de 1994 que a EFS adquiriu maior popularidade, quando os fabricantes introduziram 84 produtos EFS e inúmeras fases estacionárias. O interesse pela EFS tem diminuído a preferência por ELL, mesmo em métodos oficiais como os propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) [50].

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido, baseada nos mecanismos da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. Dessa forma fundamenta-se na interação molecular específica entre o analito e o sorvente e posterior eluição do composto de interesse com um solvente apropriado [51]. O sucesso dessa técnica depende da afinidade relativa da substância a ser extraída da matriz com o sorvente e da facilidade de eluição dessa substância pelo solvente extrator [52].

Existem várias formas de operação da EFS, tais como pré-concentração de analitos presentes a nível de traços, isolamento do analito da matriz ou isolamento da matriz do analito e como recipiente para estocar e transportar amostra [53].

A EFS emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa. Um cartucho típico é formado por um tubo de propileno podendo conter 50 a 500 mg de sorvente.

Em geral, existem cinco etapas no procedimento de EFS: 1) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; 2) condicionamento do sorvente com solvente adequado, para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 3) adição da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 4) limpeza (lavagem) do tubo, para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 5) eluição e coleta do analito [54]. A

Figura I.4 mostra as principais etapas envolvidas na EFS quando o objetivo é isolar um composto presente em uma amostra complexa.

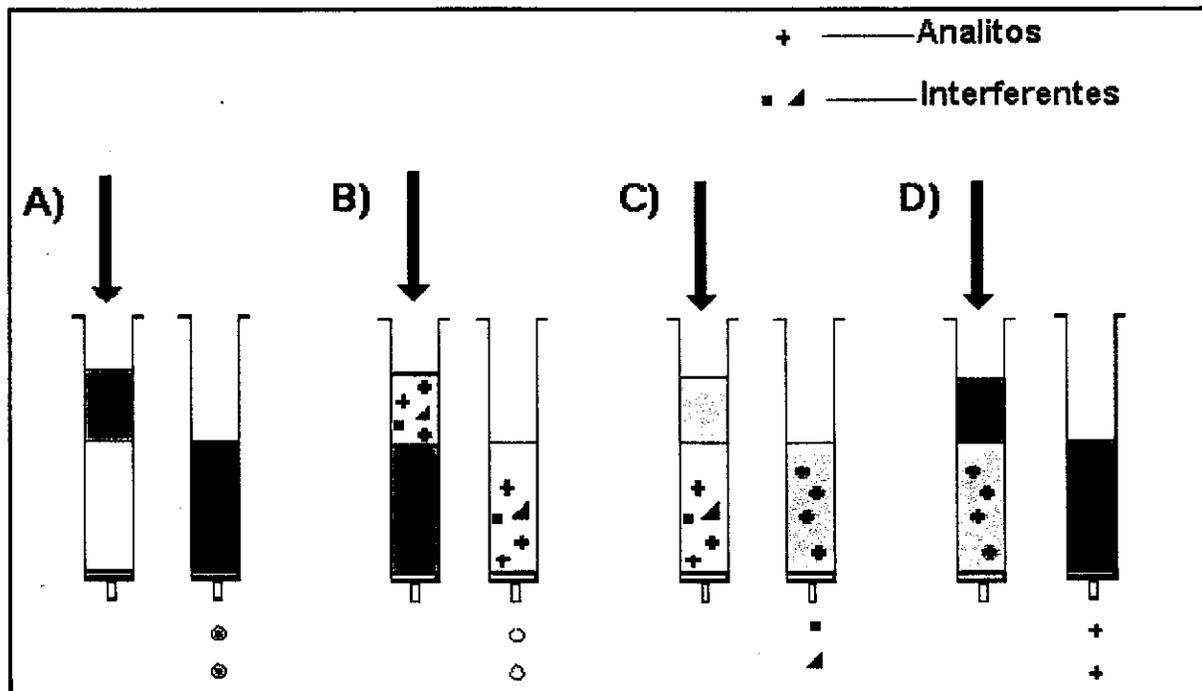


Figura I.4 – Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos).

Atualmente, existe um grande número de sorventes disponíveis comercialmente. A Tabela I.7 cita alguns exemplos de fases sólidas.

A escolha da fase sólida está condicionada à polaridade do analito. Se este for polar, a fase escolhida deverá ter característica polar ou moderadamente polar. Dependendo da escolha do solvente de condicionamento e de eluição, os grupos mais usados como sorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em 3 grupos: 1) fase reversa (FR), quando o solvente é menos polar que o solvente de eluição; 2) fase normal (FN), quando o solvente é menos polar que o sorvente e 3) troca iônica (TI).

Tabela I.7 - Classificação genérica para a escolha da fase sólida apropriada em EFS.

Analito	Fase sólida
<p>• Solúvel em solvente orgânico:</p> <p>Polar</p> <p>Moderadamente polar</p> <p>Não Polar</p>	<p>Ciano (CN) Diol(COHC(OH)) Amino (NH₂)</p> <p>Sílica gel (SiOH) Florisil (Mg₂SiO₃) Alumina (Al₂O₃)</p> <p>Octadecil(C₁₈) Octil(C₈) Cicloexil(C₆H₁₂) Fenil(C₆H₆)</p>
<p>• Solúvel em água</p> <p> Iônico: catiônico</p> <p> Iônico: aniônico</p> <p> Não iônico</p>	<p>Ciano(CN) Ácido Carboxílico (COOH) Ácido sulfônico (C₆H₅-SO₃H)</p> <p>Amino (NH₂)</p> <p>mesmo critério para analito solúvel em solvente orgânico, com exceção dos apolares.</p>

Fonte: Zief, M.; Kiser, R. Solid-phase extraction sample preparation. J. T. Baker Inc., USA.

Os dois principais mecanismos de retenção do composto de interesse no suporte sólido são a adsorção e a partição [54]. Estes mecanismos estão associados a processos químicos e físicos que atuam durante o processo de separação. Dentre as principais forças químicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente (fase sólida) destacam-se as forças iônicas, ligações de hidrogênio (pontes de hidrogênio), interações do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido (forças de dispersão).

O processo de adsorção de uma molécula ou íon em uma matéria sólida é um processo dinâmico que ocorre com a diminuição da energia livre até alcançar um mínimo, que é o ponto de equilíbrio. A concentração do analito no solvente de eluição ou na fase sólida será dada pelo coeficiente de distribuição parcial. Quando comparado com a ELL, o coeficiente de distribuição em EFS é maior, porque o processo de adsorção envolve dois mecanismos: adsorção na superfície da matéria sólida e interações do analito com o solvente de eluição [55].

No mecanismo de partição as fases utilizadas são quimicamente ligadas, onde existe uma película líquida de material orgânico, recobrando a superfície de um suporte sólido, geralmente a sílica. As interações, baseadas em diferenças de solubilidade, ocorrem entre os compostos de interesse e os grupos orgânicos, que podem ser cadeias de hidrocarbonetos simples (fase reversa), cadeias de hidrocarbonetos ligados a grupo funcional polar (fase ligada polar) ou fase ligada de troca iônica [54].

A EFS têm provido algumas melhorias na remoção de substâncias de fluídos biológicos, incluindo redução do volume do solvente extrator, maior rapidez na análise devido a eliminação de etapas de centrifugação e filtração, aumento da eficiência da extração, ausência de formação de emulsões, menor manuseio do analista, volume de evaporação diminuído e fácil mecanização quando comparada a tradicional extração por solvente (ELL) [56-58]. Outras vantagens são: maior seletividade, limpeza do extrato e resultados mais reprodutíveis [51]. Como desvantagem pode citar o alto custo dos tubos, que são importados.

Nos últimos anos, a extração em fase sólida tem sido utilizada em laboratórios como um recurso excelente para extrair xenobióticos de matrizes biológicas. Várias classes de substâncias podem ser efetivamente extraídas e separadas, de acordo com as suas propriedades físico-químicas, através desta técnica [59].

I.7.2.2.1. Aplicações de EFS a Fluidos Biológicos

A EFS usando resina XAD-2[®], Celite 560[®] e sílica ligada a octadecil (C-18) tem sido usada para remover drogas livres e conjugadas e esteróides presentes na urina [60].

Um procedimento de EFS foi desenvolvido para isolar drogas ácidas, básicas e neutras em plasma, podendo também ser usado para amostra de urina. As recuperações das 25 drogas testadas excederam 82%. Após o plasma ter sido diluído com tampão fosfato (pH 6), as drogas foram extraídas usando uma coluna Bond Elut Certify[®]. Drogas ácida e neutras foram eluídas com acetona/clorofórmio (1:1 v/v) e as drogas básicas foram eluídas com acetato de etila amoniaco 2%. As frações foram analisadas por CG, com uma coluna capilar e detector FID [61].

Colunas Bond Elute Certify[®] e Clean Screen DAU[®] foram testadas com relação a reprodutibilidade, apresentando bons resultados [62]. Silica quimicamente ligada, carbono grafitizado e troca iônica foram utilizados em EFS para isolar herbicidas como ácido 2,4 diclorofenoxiacético [63].

Duas revisões descreveram procedimentos de EFS para análises dos pesticidas e contaminantes orgânicos [64], incluindo a classe das triazinas e produtos de degradação [65], destacando o alto potencial das resinas de poliestireno divinilbenzeno em relação a C-18, para enriquecimento de traços de compostos polares em água.

Atualmente aumentou o interesse em colunas recheadas com suporte contendo anticorpo ou com polímeros impressos molecularmente, conhecidos como MIP, na análise de drogas bem como de herbicidas da classe das triazinas presentes em amostras biológicas. As etapas de extração, concentração e isolamento são possíveis em um único passo [66]. Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros sintéticos com sítios de reconhecimento e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos [31].

Um procedimento "on-line" foi desenvolvido por Bjarnason et al. [67], consistindo de EFS empregando um polímero impresso molecularmente (MIP), seguida de análise por CLAE, usando coluna C-18 para detecção de triazinas,

como simazina, atrazina, propazina e seu metabólito terbutilazina em amostras aquosas contendo ácidos húmicos. Este procedimento está sendo investigado para análise de urina. O bom desempenho e a alta seletividade de MIP mostraram que ele pode ser usado, favoravelmente, para separar amostras enriquecidas com pesticidas em união com a cromatografia em fase reversa. Entretanto esta é uma técnica que ainda não está muito difundida e bem estabelecida para ser implantada em análises de rotina.

Kumazawa et al. [68] publicaram uma metodologia para análise de triazinas em urina e soro humano, usando cartucho Sep-Pak C18, o qual foi pré-condicionado com 10 mL de clorofórmio. Depois de adicionar água destilada às amostras de soro e de urina, contendo os herbicidas simazina, atrazina, propazina, cianazina, ametrina e prometrina, elas foram percoladas no tubo C-18 e a eluição foi feita com clorofórmio/metanol (9:1 v/v). Os herbicidas foram determinados por CG com detecção por ionização em chama (FID) e por fósforo-nitrogênio (NPD). Os limites de detecção obtido para as triazinas em CG usando FID e NPD foram de 0,2-1,4 µg e 20-60 ng para 1mL de soro ou urina, respectivamente.

Dois métodos foram desenvolvidos para a determinação de atrazina e seus metabólitos em urina. Um deles utilizou a extração ácida com sorvente fenil e o outro a extração básica em coluna C2, seguidos de análise por cromatografia gasosa (CG), CG-EM e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A retenção ou exclusão dos materiais imunoreativos da urina utilizando cada uma destas técnicas de EFS também foi avaliada usando a técnica ELISA. Com a EFS usando sorvente fenil foram identificados alguns compostos de degradação, isto é, os metabólitos, porém a atrazina não foi detectada por CG ou CG-EM. Já a combinação de EFS, CLAE e imunoensaio mostrou limite de detecção de aproximadamente 20 ng mL⁻¹ para atrazina e seus metabólitos [69].

Bodalbai et al. [70] descreveram um método para determinação de atrazina e seus metabólitos em urina, o qual consistiu na precipitação de proteínas, acidificação seguida de EFS, em tubo de troca-iônica, para remover os compostos aniônicos em pH 3. A seguir, a amostra foi basificada e submetida à extração

líquido-líquido com acetato de etila. Finalmente, a amostra foi purificada por EFS em tubo de sílica, para remover compostos apolares e os altamente polares que ficaram sorvidos na sílica. As determinações foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Um procedimento de EFS usando tubo de estireno-divinilbenzeno (S-DVB) para extração e "clean-up" dos herbicidas, atrazina, simazina, ametrina e prometrina e os metabólitos dialquilados da atrazina, presentes em amostras de urina, foi desenvolvido e otimizado por CLAE e CG [71]. O tubo de extração de S-DVB foi condicionado pela passagem de acetonitrila e água deionizada e a seguir a amostra de urina foi percolada pelo tubo a uma vazão de 5 mL min^{-1} . Quando as amostras foram analisadas por CLAE, os tubos de S-DVB foram lavados com 20 mL de acetonitrila e quando analisados por CG a lavagem foi feita com 20 mL de água. Em ambos os casos os pesticidas foram eluídos com acetona e o eluato foi evaporado com N_2 . Para análises por CLAE o resíduo foi diluído em 2 mL de água e para análises por CG em 2 mL de n-hexano e agitado em vortex por 1 min. Os limites de detecção obtidos para a urina foram de 10 ng mL^{-1} para os herbicidas analisados por CLAE e CG e 20 ng mL^{-1} para as clorotriazinas monodialquiladas analisadas por CLAE.

Um método para determinar 2,4-D em amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente foi desenvolvido [72]. O 2,4-D foi extraído usando a EFS com tubos C-18. Inicialmente os tubos foram condicionados com acetato de etila, metanol e água. A seguir 10 mL de urina foram transferidos para o tubo de extração. O tubo da centrifuga, onde estava a urina, foi lavado com água acidificada, 1% de ácido sulfúrico em água, e após agitação, em vortex, foi transferida para o tubo de extração. Este procedimento de lavagem foi repetido com adição de 0,5 mL de água acidificada. Os analitos foram eluídos usando acetato de etila. O extrato foi derivatizado com uma solução de diazometano e evaporado com N_2 . O resíduo foi reconstituído em 0,4 mL de solução contendo $0,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de crisene- d_{12} em tolueno. O crisene- d_{12} foi usado como um padrão interno para determinar por CG, a concentração de 2,4-D. A faixa de recuperação para

amostra de urina fortificada com 2 e 20 ng mL⁻¹ foi de 100% e 93%, respectivamente. O limite de detecção foi estimado em 0,75 ng mL⁻¹.

Dois métodos para a quantificação de 2,4-D e de ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) em urina foram comparados [73]. O primeiro foi um método de CLAE usando coluna C-8, com supressão iônica e detecção por arranjo de diodos. Os extratos de urina foram purificados por EFS em colunas capilares de sílica. O limite de detecção do método foi de 15 µg L⁻¹ para ambos os compostos. O coeficiente de variação para a concentração de 125 µg L⁻¹ foi de 6,2% para o 2,4-D e de 6,8% para o MCPA. A média das recuperações das análises foi 81% para o 2,4-D e 85% para o MCPA. O segundo método baseou-se em CG, onde os compostos foram derivatizados com pentafluorbenzilbrometo para éster pentafluorbenzil, e separados em uma coluna capilar. Antes de ser analisado por CG, a amostra de urina foi purificada por EFS em coluna capilar. Este método apresentou limite de detecção de 1 µg L⁻¹ para ambos os compostos e coeficientes de variação para a concentração de 30 µg L⁻¹ foi de 8% para o 2,4-D, e de 5,5% para o MCPA. A média de recuperação foi de 87% para o 2,4-D e 94% para o MCPA.

I.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISE DE PESTICIDAS

O ponto de referência para selecionar o método cromatográfico mais adequado para o estudo de pesticidas, nas áreas ambiental e médica, são as suas propriedades físico-químicas. A baixa concentração em que se encontram os pesticidas em matrizes biológicas e em amostras do meio ambiente exigem detectabilidade elevada.

Na década de 60, a cromatografia gasosa (CG), utilizando colunas recheadas, foi adotada devido à sua capacidade de analisar multirresíduo de pesticidas. Através do desenvolvimento de colunas capilares e detectores mais seletivos e mais sensíveis, aumentaram o número de pesticidas detectados em

uma única análise. Devido a estas características a CG é a técnica mais amplamente utilizada para análise de resíduos de pesticidas [74].

O crescente aumento no uso de substâncias mais solúveis em água e, portanto, mais polares, tornou a CLAE um método atraente na determinação de pesticidas. Além disso, vários pesticidas utilizados atualmente são termicamente instáveis, ou não são voláteis, necessitando de etapas de derivatização para serem analisados por CG [75,76]. Por exemplo, os herbicidas pertencentes a classe das uréias são termolábeis e degradam em isocianatos e/ou anilinas, como é o caso do metabólito 3,4-dicloroanilina, formado na decomposição térmica dos herbicidas diuron e linuron. Embora tal degradação represente uma solução para contaminação do meio ambiente, a análise destes pesticidas por CG requer uma etapa de derivatização, que faz com que o tempo e o custo da análise sejam mais elevados, e algumas vezes resulte em recuperações insatisfatórias. Poucos trabalhos na literatura ressaltam a avaliação de dicloroanilinas, como um metabólito, em urina de pessoas expostas ou não ocupacionalmente [77].

Vários tipos de pesticidas, pertencentes a diferentes classes, podem ser adequadamente separados e determinados por CLAE. O uso frequente da CLAE com fase reversa se deve: (i) à grande disponibilidade de colunas analíticas de alta resolução; (ii) ao aumento da detectabilidade dos detectores de UV-Vis e por arranjo de diodos; (iii) ao desenvolvimento de detectores sensíveis e seletivos (por exemplo: fluorescência, espectrometria de massas ou eletroquímico); (iv) à facilidade de acoplamento das etapas de pré-concentração e análise das amostras e (v) à possibilidade do desenvolvimento de métodos multirresíduos. Lawrence e Turton [78] listaram 166 pesticidas que foram analisados por CLAE usando colunas analíticas de fase reversa, a base de octadecil, ciano (CN), NH₂ e outros.

Com a recente introdução no mercado do equipamento de CLAE acoplado ao espectrômetro de massas, análises mais eficientes estão sendo obtidas. O potencial da CLAE-EM em separar, confirmar e quantificar analitos polares torna esta técnica um atrativo para análise de uma vasta classe de pesticidas [79]. Esta técnica cromatográfica será descrita a seguir.

1.8.1. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

Recentemente grandes avanços em instrumentação e no desenvolvimento de novas e revolucionárias técnicas revitalizaram, acentuadamente, a Espectrometria de Massas (EM), que constitui hoje uma das mais abrangentes técnicas instrumentais, com amplas aplicações em diversos campos da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Com seus novos horizontes e amplas perspectivas de desenvolvimento, a EM vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial, tanto em pesquisas aplicadas como nas mais fundamentais. A EM tem exercido papel de grande destaque, com crescente atuação, podendo ser acoplada a CLAE ou a CG.

A espectrometria de massas se tornou uma técnica importante na análise molecular dos analitos fornecendo dados de massa molar e de sua estrutura. Os íons e suas cargas elétricas são controlados por vários campos elétricos, sendo separados pela razão massa/carga (m/z) no analisador de massas. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da massa/carga. O espectrômetro de massas é constituído das seguintes partes: introdução da amostra, fonte de ionização ou interface, analisador de massas, detector de íons e aquisição de dados.

A fonte de ionização é responsável pela produção dos íons após a injeção da amostra no espectrômetro de massas. A ionização dos íons pode ser realizada por vários métodos, sendo os principais o de impacto de elétrons (EI) e ionização química (CI).

Uma vez formado os íons, eles são analisados pelo analisador de massas, de acordo com a sua razão massa/carga. Os analisadores de massas mais comuns são quadrupolo (triplo quadrupolo), setor magnético, "íon trap" (quadrupolo "íon trap") e "time of flight" (quadrupolo TOF) [80].

A grande vantagem do detector EM é que ele pode ser considerado um detector universal para a CLAE, e também seletivo, possui boa detectabilidade (baixos limites de detecção), pode ser utilizado para a confirmação de analitos

(massa molar e informação estrutural), fornece informações sobre a pureza dos picos e sua alta seletividade possibilita a análise de compostos com picos sobrepostos.

1.8.1.1. Espectrometria de Massas e Interfaces da Cromatografia Líquida

Apesar do grande interesse no acoplamento de Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas algumas incompatibilidades próprias às técnicas tiveram que ser superadas. As três maiores dificuldades em combinar estas duas técnicas analíticas poderosas foram:

- Aparente incompatibilidade de introduzir as altas vazões usadas em CLAE, geralmente 1 mL min^{-1} , empregando colunas convencionais de CLAE, as denominadas colunas analíticas, para o interior do alto vácuo do espectrômetro de massas;
- A incompatibilidade dos solventes usados como fase móvel em CLAE, que frequentemente envolvem o uso de aditivos não voláteis, tais como tampões, reagentes par-iônico, etc.;
- A dificuldade de ionização de compostos altamente polares, instáveis termicamente, iônicos e de massa molar alta.

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de minimizar as incompatibilidades existentes, através do emprego de diferentes interfaces. Uma interface é um dispositivo colocado entre o cromatógrafo e o EM que serve para remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons.

Existem diferentes tipos de interfaces para CLAE-EM [81-83], tais como direct liquid introduction, continuous-flow, fast atom bombardment (FAB), particle beam (PB), termospray (TS), electrospray (ES) ou atmospheric-pressure chemical ionization (APCI).

Ultimamente, estão sendo muito utilizadas as interfaces baseadas em ionização a Pressão Atmosférica (API), que inclui a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a electrospray (ES). Na **Figura I.5** está representado um diagrama esquemático, que indica as áreas de aplicação das interfaces de electrospray e APCI, em termos de polaridade e de massa molar do analito de interesse [84]. Como pode ser visto CLAE-EM com ES é a interface mais abrangente.

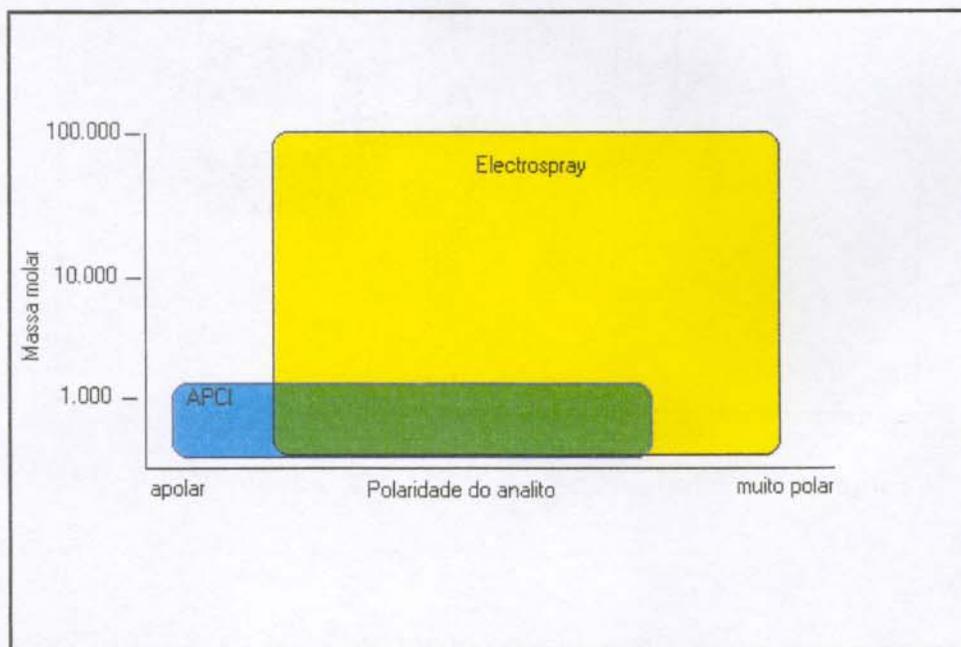


Figura I.5 - Faixa de aplicação das interfaces de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e electrospray.

1.8.1.1.1. Interface "*Electrospray*" (ES)

A interface "*electrospray*" é uma técnica simples de introdução de líquidos no espectrômetro de massas, opera à pressão atmosférica e à temperatura moderada, constituindo em uma ionização suave. O processo de ionização em "*electrospray*", conforme mostra a **Figura I.6**, se divide nas seguintes etapas:

nebulização da solução da amostra em gotas altamente carregadas, liberação dos íons das gotas e transporte dos íons para a região de alto vácuo do analisador de massas do EM.

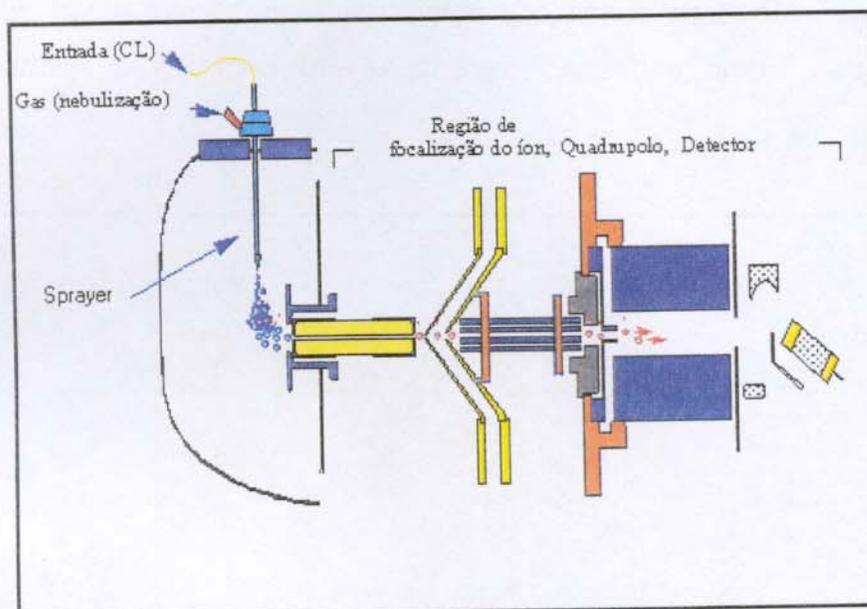


Figura 1.6 - Esquema da interface ES utilizada em equipamentos da Hewlett Packard [79].

O mecanismo de ionização resulta da evaporação de moléculas neutras do solvente acompanhada pelo aumento da força do campo elétrico na superfície da gota. A densidade de carga nas gotas aumenta até atingir o limite de instabilidade *Rayleigh*, onde a instabilidade da superfície, induzida pelo campo, ocasiona a formação de um jato de líquido na superfície da gota, emitindo gotas menores, também carregadas, (explosões coulômbicas) [85-87]. Este processo de evaporação na superfície das gotas continua até um certo campo elétrico crítico, quando se inicia a emissão direta de íons dessolvatados das microgotas. A evaporação das gotas é estimulada pelo uso de um gás contra-corrente aquecido ou por aquecimento do capilar.

A ionização "*electrospray*" pode ser afetada por vários fatores, tais como parâmetros de operação do EM como vazão do gás de nebulização, N_2 , e de

secagem, pressão e temperatura; voltagem do capilar e corrente da câmara. Considerando as soluções químicas também pode ser obtida uma boa ionização levando-se em conta o efeito do pH do tampão (depende do pK_a do analito); composição do tampão (volatilidade, concentração e presença de aditivos e seleção do solvente).

Na interface de "electrospray" deve-se utilizar tampões com pH altos para íons negativos e pH baixos para íons positivos:



O tampão deve ser volátil e possuir concentração baixa ($< 50 \text{ mmol L}^{-1}$). Os aditivos utilizados no modo íon positivo são ácidos acético ou fórmico (1-2%), trifluoroacético (0,1%). No modo íon negativo se utiliza NH_4OH ou trietilamina (0,5%).

A técnica de ES apresenta vantagens por ser a interface mais sensível que existe para CLAE-EM; é útil em uma larga faixa de polaridade do analito (média e alta); é útil na análise de moléculas grandes com múltiplas cargas, proteínas e peptídeos e é de fácil operação e manutenção [88]. Como qualquer técnica apresenta desvantagens: adutos podem ser formados com íons ou moléculas neutras presentes na solução, (por exemplo amônio ou sódio); requer vazões menores ou iguais a 1 mL min^{-1} ; é menos útil para analitos apolares e a composição da fase móvel pode influenciar na ionização.

1.8.1.1.2. Interface de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)

A ionização química à pressão atmosférica (APCI) é uma técnica de ionização que ao atuar à pressão atmosférica consegue altos rendimentos para analitos menos polares.

A **Figura 1.7** mostra o esquema da interface APCI, que consiste de uma sonda de entrada da amostra provida de um nebulizador pneumático, inserido em uma câmara de nebulização aquecida, onde se encontra um eletrodo em forma de agulha (corona de descarga). Este produz uma descarga elétrica, que se mantém entre este eletrodo e um contra-eletrodo situado no final da câmara de nebulização [89].

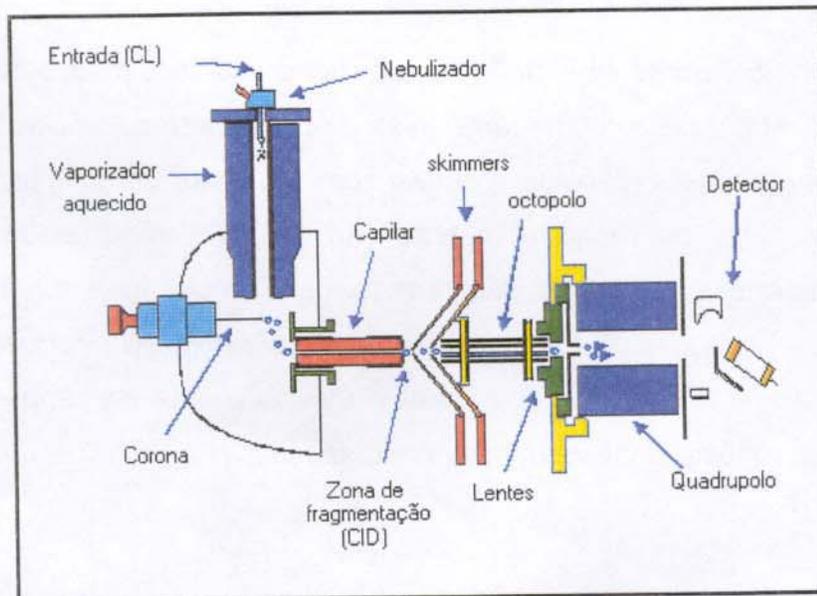
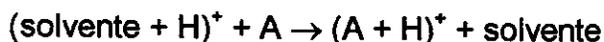
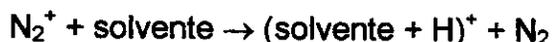
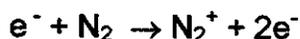


Figura 1.7 - Esquema da interface APCI utilizada em equipamentos da Hewlett Packard [79].

A fase móvel, contendo as moléculas do analito, atravessa a sonda, e é convertida em aerosol, graças à ação de um gás nebulizador, o nitrogênio.

Pequenas gotas são formadas, algumas delas contendo excesso de carga positiva ou negativa, que avançam pela câmara aquecida (sonda), dessolvando-se pouco a pouco, sendo arrastadas por um fluxo de nitrogênio (contra-corrente). Ao diminuir-se o tamanho das gotas, aumenta-se o campo elétrico em seu interior, favorecendo então a repulsão iônica por repulsão de partículas carregadas de igual sinal.

A descarga, presente na fonte, produz um plasma de íons reativos do solvente, o que origina o mecanismo de ionização química (CI), normalmente por adição de prótons, formação de adutos ou reação de troca de carga, quando se opera no modo íon positivo, ou por abstração de um próton, anexação de ânions ou reação de captura de elétrons, quando se opera no modo íon negativo. Este mecanismo, que coexiste com o de evaporação iônica, produz íons $(M+H)^+$ positivos e $(M-H)^-$ negativos. As reações que ocorrem para ionização do analito no modo íon positivo são:



A interface APCI tem a vantagem de aceitar vazões de 1 a 4 mL min⁻¹, apresenta boa detectabilidade para compostos menos polares e com massas molares não muito altas, sendo complementar a ES e é menos sensível aos efeitos das soluções químicas. Como desvantagens, esta interface não pode ser empregada na análise de compostos termicamente instáveis e moléculas grandes multicarregadas como peptídeos; é menos adequada para fase móvel com alta concentração de acetonitrila e tampões com alta força iônica e requer que os analitos possuam alguma volatilidade.

A combinação EM-EM fornece possibilidades adicionais, porque ambos os analisadores podem ser operados em um modo de varredura ("scan") ou em um modo de íon seletivo (SIM). O modo de monitoramento de reação selecionada (SRM; SIM em ambos os analisadores), algumas vezes denominado

monitoramento de reações múltiplas, MRM, é uma poderosa técnica para a quantificação de pequenas quantidades de analitos em matrizes complexas [90].

Nos últimos anos é crescente o emprego de CLAE-EM na análise de amostras biológicas e ambientais [28,91]. A preparação da amostra é realizada por extração líquido-líquido, por extração em fase sólida "off-line" ou "on-line" em colunas de fase reversa, ou imunoafinidade [92].

As condições cromatográficas usadas são bastantes similares as clássicas colunas C-18, com eluição isocrática ou por gradiente, usando misturas de tampões voláteis, tais como acetato de amônia, com pH variável e modificadores orgânicos, tais como metanol ou acetonitrila. Adição de pré-coluna ou de pós-coluna de ácidos voláteis, tais como ácido fórmico, ácido acético ou trifluoroacético, melhoram a ionização do analito. ES ou APCI são normalmente empregadas em combinação com detecção por EM e EM-EM.

A confirmação da presença de pesticidas em amostras reais tem sido feita por CLAE/EM com diferentes interfaces e matrizes, mas a maioria dos estudos estão sendo realizados com soluções preparadas com padrões de pesticida.

A **Tabela 1.8** resume as matrizes, método de extração, interface, modo de detecção e os parâmetros de validação obtidos na análise de diversos pesticidas.

Tabela I.8 - Principais interfaces, modo de detecção e parâmetros de validação utilizados em espectrometria de massas para análise de pesticidas, em diversas matrizes.

Pesticidas	Matrizes	Método de Extração	Interface	Modo de detecção	Parâmetros de validação	Ref.
Diuron e Metabólitos	urina (u) e plasma (p)	ELL	CI e EI	scan	LD: 30 ng mL ⁻¹ LD: 100 ng mL ⁻¹	[84]
Atrazina	urina	ELL	APCI	SIM	R: 65-75%	
2,4-D	urina	ELL	APCI	SIM	LD: 0,53 µg L ⁻¹ LIN: 0,5-50 µg L ⁻¹ R: 59-64%	[85]
Atrazina e Metabólitos	urina	EFS	FAB	EM-EM,	LD: 0,43 µg L ⁻¹ LIN: 0,5-50 µg L ⁻¹ R: 77-110%	[85]
Organofosforados ou Carbamatos	urina e Sangue urina	ELL	APCI	scan SIM, scan EM-EM	LD: 20 ng mL ⁻¹ R: 75%	[86] [80]

Triazinas e Feniluréias	água superficial	EFS	APCI	EM-EM	LD: 0,1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ LIN: 0,1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$	[88]
Feniluréia	água superficial	EFS	ES	SIM	LD: 6-75 $\mu\text{g L}^{-1}$	[89]
Feniluréia	água superficial	EFS	ES	SIM	LD: 1-20 $\mu\text{g L}^{-1}$	[90]
Feniluréia	água superficial	EFS	APCI	SIM	LD: 5-10 $\mu\text{g L}^{-1}$	[28]
Triazinas	água superficial	EFS	ES	SIM	LD: 1-20 $\mu\text{g L}^{-1}$	[89]
Triazinas	água superficial	EFS	ES	SIM	LD: 40-300 $\mu\text{g L}^{-1}$	[91]

ELL: extração líquido-líquido; EFS: extração em fase sólida; CI: ionização química; EI: impacto de elétrons; APCI: ionização química à pressão atmosférica; FAB: bombardeamento por átomos rápidos; ES: electrospray; SIM: monitoramento por ion

I.9. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Métodos cromatográficos são utilizados na determinação qualitativa e quantitativa de drogas, pesticidas e fármacos tanto na pesquisa como no controle de qualidade.

No desenvolvimento de um método analítico, a validação é uma etapa de importância fundamental, para garantir que o mesmo seja confiável, exato, específico e reprodutível. Conforme definição existente na USP, a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como "o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer" [93]. Os laboratórios de análise devem realizar a validação de métodos para atender ao governo ou a outros órgãos regulamentadores, sendo que os dados obtidos devem fazer parte do conjunto de informações, que será apresentado às agências como US Food and Drug Administration (FDA); Association of Official Analytical Chemists (AOAC); US Environmental Protection Agency (EPA).

Com base em resultados da "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)" foi elaborado um guia de validação de métodos cromatográficos para bioanálises [94].

Dessa forma, toda vez que for desenvolvido um método, o mesmo deve ser validado. Existem vários parâmetros para validação de métodos: linearidade, exatidão (recuperação), precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, especificidade, robustez e estabilidade. Esses termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítica e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito. Muitos desses termos são familiares e usados diariamente em laboratório.

A seguir serão definidos os principais parâmetros de validação [32,93-102].

1.9.1. Linearidade

A linearidade corresponde a faixa ou intervalo de concentração no qual o sinal produzido pelo detector é diretamente, ou por transformação matemática bem definida, proporcional à concentração do analito. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão, obtida da resposta do detector versus a concentração, através da equação linear:

$$y = ax + b$$

onde, y é a resposta dada em termos de área do pico, ou altura do pico se ele for simétrico, x é a concentração, a é o coeficiente angular (inclinação) e b o coeficiente linear (intersecção). O coeficiente angular deve ser reprodutível e o coeficiente linear não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve apresentar um coeficiente de correlação (r) maior que 0,99.

A linearidade é determinada pela análise de uma série de calibradores, ou seja, soluções de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho, sendo que esta varia em função da finalidade da análise. Por exemplo, em análise de drogas de abuso presentes em amostras biológicas, a faixa de concentração dos calibradores deve abranger desde o limite de quantificação (LOQ) até três ordens de magnitude, ou seja, 1 a 1000 ng mL⁻¹, se o LOQ for de 1 ng mL⁻¹. Por outro lado, em análises de resíduos de pesticidas a faixa de concentração pode abranger apenas uma ordem de magnitude, uma vez que se espera encontrar níveis muito baixos de concentrações [95]. O número de calibradores é definido em função da faixa de concentração de interesse, devendo ser de, no mínimo, cinco. Cada nível de concentração na curva deve ser a média de três medidas.

1.9.2. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. Exatidão de métodos de análise de amostra de origem biológica é expressa em porcentagem do erro sistemático e pode ser representada pela equação [96]:

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100$$

A baixa exatidão é proveniente de erros sistemáticos que contribuem para desvios ou tendências nos resultados. Assim, a exatidão pode mostrar uma tendência de $\pm 2\%$, associada ao valor médio significando que os resultados estão 2% acima ou abaixo do valor real.

Os erros sistemáticos ocorrem, em geral, pelas seguintes causas: perda da substância devido à baixa recuperação da extração; solução padrão inadequada; medidas volumétricas imprecisas; falta de aferição de balanças acarretando erros de pesagem; reagentes contaminados ou presença de substâncias interferentes na amostra [95].

Em análises toxicológicas, onde as concentrações de interesse estão a níveis de traços ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou mg L^{-1}), exatidão de até 20 % são aceitáveis.

A exatidão deve ser verificada em testes intra e inter-ensaios.

A exatidão também pode ser expressa como a porcentagem de recuperação (R) de quantidades conhecidas do analito adicionado ou fortificado na matriz limpa da amostra (branco ou placebo) ou em outras palavras, recuperação é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação, expressa através da seguinte fórmula:

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100$$

Embora níveis de recuperação de aproximadamente 100% sejam desejáveis em análise de resíduos, onde se trabalha com concentrações a nível de $\mu\text{g L}^{-1}$, a recuperação de um analito que se encontra em concentrações abaixo de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ é considerada aceitável estando no intervalo de 60 a 110% desde que a recuperação seja precisa e exata e em concentrações acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ o intervalo aceito é de 80 a 100% [97, 98].

Existem dois tipos de amostras para avaliar a exatidão de um método analítico:

- **Amostras certificadas:** são amostras que foram submetidas à análise por laboratórios credenciados, de renome internacional, em que, após estudo estatístico, é estabelecida a concentração esperada. As amostras certificadas podem ser fornecidas por instituições como o *National Institute of Drug Abuse* (NIDA) o *Community Bureau of Reference* (BCR), o *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [95].
- **Amostras adicionadas de padrão:** são amostras livres do analito, nas quais é adicionado o padrão e submetidas ao método de análise. Deve-se escolher amostra de concentração conhecida do analito, uma vez que podem existir diferenças de interação entre o analito e a matriz.

1.9.3. Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de análises. O termo empregado para avaliar a precisão é o coeficiente de variação (CV) ou estimativa do desvio padrão relativo em um número significativo de amostra [99], obtido através da equação:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

onde, s = estimativa do desvio padrão e \bar{X} = média das medidas em replicata.

A precisão, expressa em termos de CV, deve ser menor que 15%, sendo que este valor pode atingir até 20%, dependendo da complexidade da matriz e da finalidade a que se propõe a análise [97].

A precisão deve ser medida em três diferentes níveis:

- **Precisão intra-ensaio ou Repetibilidade:** corresponde aos resultados obtidos para várias análises de amostras homogêneas, usando o mesmo método, o mesmo laboratório, o mesmo equipamento, feito pelo mesmo analista em um curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser realizada a partir de um mínimo de nove determinações (ex. três níveis, três repetições cada um).
- **Precisão intermediária ou Inter-ensaio:** expressa o efeito das variações dentro do laboratório em diferentes dias.
- **Reprodutibilidade:** refere-se aos resultados obtidos em colaboração com outros laboratórios, envolvendo diferentes analistas, diferentes dias e usando diferentes equipamentos.

1.9.4. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com um certo nível de confiança, utilizando um determinado método analítico. É expresso como uma

concentração em uma determinada relação sinal-ruído, usualmente 3:1. De acordo com Taylor, é o ponto onde o valor da medida é maior que a incerteza a ela associada [100].

Existem dois tipos de limite de detecção, cada um com um objetivo específico [95]:

Limite de detecção do instrumento é definido como a concentração ou quantidade do analito que produz um sinal ou resposta maior que 3s (onde s= desvio padrão de uma série de medida do branco). Em geral, o limite de detecção do instrumento é utilizado como um guia para o estabelecimento do limite de detecção do método.

Limite de detecção do método é a menor concentração ou quantidade do analito em uma matriz que, submetida ao procedimento analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método.

Limite de quantificação do método representa a menor concentração ou quantidade do analito na matriz que pode ser detectada com uma exatidão e precisão aceitáveis, utilizando um determinado processo analítico. O LQ é determinado em relação sinal-ruído, usualmente de 10:1.

De acordo com recomendações da IUPAC [101,102] os limites de detecção e quantificação também podem ser calculados da seguinte maneira: Deve ser usada amostras onde a concentração esteja o mais próximo possível do limite de detecção.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{\text{coefic. angular}} \qquad LQ = 10 \times \frac{s}{\text{coefic. angular}}$$

sendo, s = desvio padrão do coeficiente linear.

I.9.5. Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como sendo a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A forma de se estabelecer a sensibilidade é através da inclinação da curva analítica que possibilite a medida em qualquer ponto [95]. O gráfico é obtido colocando-se o valor observado, área ou altura do pico na ordenada como função da concentração do analito (abscissa).

Através do gráfico, ilustrado na **Figura I.8**, observa-se que quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração, sendo que o método A é mais sensível que o B. Quanto maior for o coeficiente angular, maior será a sensibilidade do método.

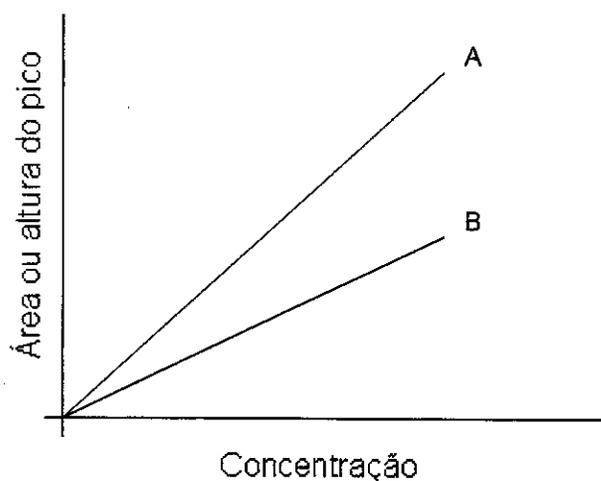


Figura I.8 - Comparação gráfica de dois métodos, A e B, quanto à sensibilidade.

1.9.6. Seletividade

A seletividade de um método representa sua capacidade de avaliar o analito na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação em matrizes complexas. Corresponde ao grau de interferência de espécies como impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam outras eluições simultâneas [93,103].

Para alguns autores o termo seletividade é sinônimo de especificidade uma vez que ambos demonstram a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros interferentes na matriz.

Para se determinar a seletividade de um método analítico deve-se analisar várias amostras da mesma matriz e determinar a proporção da interferência dos componentes à matriz. O teste de pureza é o mais empregado para avaliar a especificidade através de modernas técnicas hifenadas, tais como, a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), CLAE-EM, etc.

1.9.7. Robustez

Corresponde a capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros operacionais e ambientais. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição orgânica da fase móvel, pH, força iônica, temperatura, colunas de diferentes procedências, etc. De acordo com ICH, a robustez deve ser considerada nos primeiros passos do desenvolvimento do método. Se os resultados do método ou outras medidas são sensíveis à variação dos parâmetros, estes devem ser adequadamente controlados.

I.9.8. Estabilidade

Vários pesticidas e seus metabólitos são relativamente instáveis em amostras biológicas e podem degradar durante a coleta e o processamento das amostras, estocagem e preparação.

Diversos são os fatores que podem afetar a estabilidade dos pesticidas em amostras biológicas e eles podem variar dependendo do tipo de pesticida considerado. Como na maioria dos estudos realizados raramente as amostras biológicas são analisadas imediatamente após a coleta, faz-se necessário avaliar a estabilidade do analito para determinar o tempo de estocagem das amostra. Um tempo longo de estocagem das amostras biológicas aumenta a probabilidade de degradação dos pesticidas e seus metabólitos. Entretanto conhecendo-se a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação [32,104].

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo fundamental deste trabalho foi desenvolver metodologias para extração, separação e quantificação unirresidual de 2,4-D e multirresidual de uréias substituídas, e das triazinas (atrazina, simazina e ametrina) e seus metabólitos como 3,4-dicloroanilina, 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina e 2-hidróxi-atrazina, presentes em urina humana, para futura monitorização da exposição de aplicadores em cana-de-açúcar aos pesticidas estudados. Os métodos desenvolvidos de extração líquido-líquido (ELL), extração líquido-líquido à temperatura sub-zero (ELL-TSZ), e extração em fase sólida (EFS) seguida de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), devem ser rápidos e confiáveis.

II.2. ETAPAS DO TRABALHO

Para atingir os objetivos propostos, as seguintes etapas de trabalho foram seguidas:

- Na etapa de isolamento do herbicida da matriz, otimizar os procedimentos de extração líquido-líquido (ELL), extração líquido-líquido à temperatura sub-zero (ELL-TSZ), e extração em fase sólida (EFS).
- Na etapa de separação e detecção cromatográfica, desenvolver métodos cromatográficos sensíveis, com recuperação, precisão, detectabilidade, seletividade e robustez compatíveis com os parâmetros estabelecidos por órgãos competentes, ICH, USP e FDA.

CAPÍTULO III

ASPECTOS GERAIS

III.1. SELEÇÃO DOS PESTICIDAS

Os pesticidas utilizados neste estudo são classificados como herbicidas, pertencem à importantes classes: ácido fenoxiacético, feniluréias e triazinas e foram selecionados devido serem aplicados em lavouras de cana-de-açúcar. As estruturas químicas dos pesticidas e alguns de seus metabólitos são mostradas na **Figura III.1** e suas características são na **Tabela III.1**.

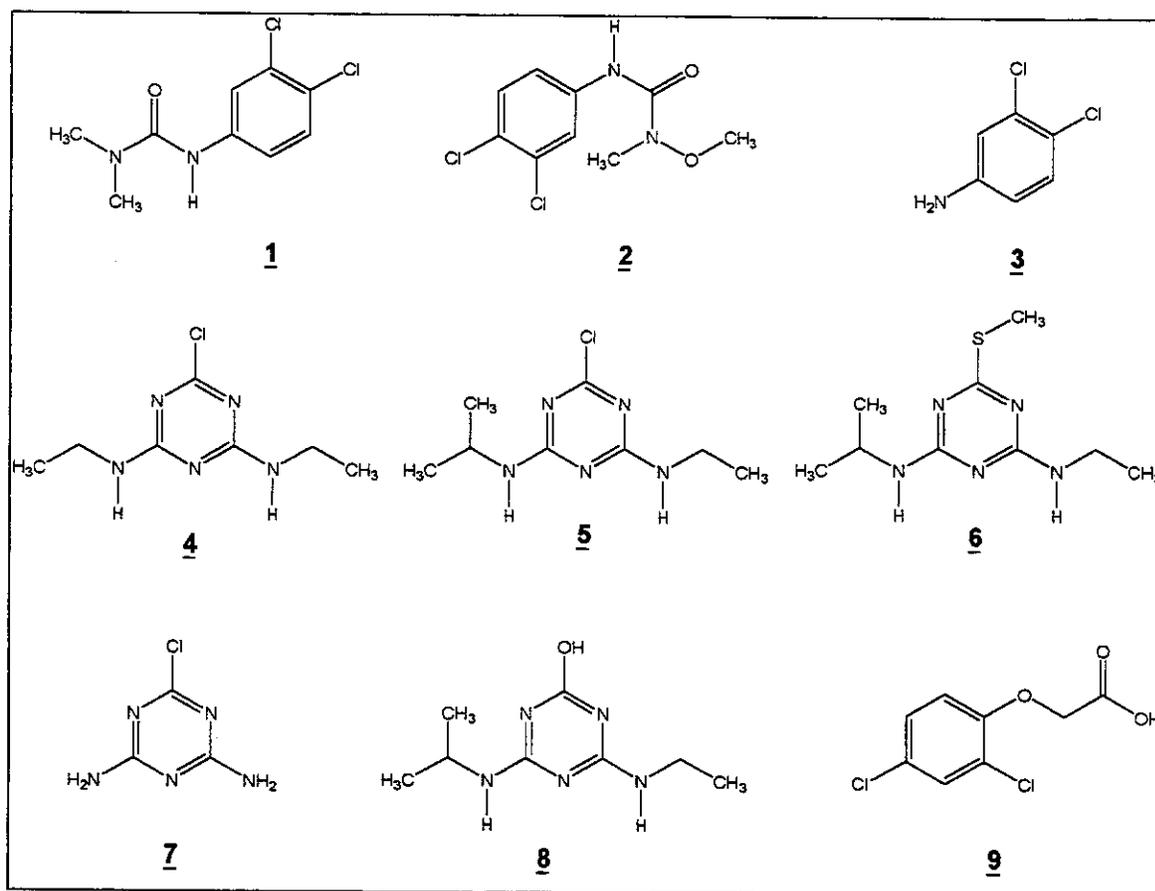


Figura III.1 - Estruturas dos herbicidas e alguns dos metabólitos estudados:

- 1) diuron; 2) linuron; 3) 3,4-dicloroanilina; 4) simazina; 5) atrazina; 6) ametrina; 7) 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina; 8) 2-hidróxi-atrazina e 9) 2,4-D.

Tabela III.1 - Características dos padrões dos herbicidas e metabólitos estudados.

Herbicida	Grau de pureza	Fornecedor	Classe	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
2,4-D	>99	Dow	Ácido fenoxiacético	600
Diuron	99,3	Du Pont	Feniluréia	42
Linuron	99,5	Hoescht	Feniluréia	75
3,4-dicloroanilina	98,0	Aldrich	Feniluréia	-
Simazina	98,3	Novartis	Triazina	5
Atrazina	97,7	Novartis	Triazina	70
Ametrina	96,8	Novartis	Triazina	185
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	96,0	Chem Service	Triazina	-
2-hidróxi-atrazina	98,0	Chem Service	Triazina	-

III.2. PARÂMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DOS PESTICIDAS

As soluções padrão dos herbicidas simazina, ametrina, atrazina, 2,4-D, diuron e linuron foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ (em metanol; Mallinckrodt, grau cromatográfico).

Por diluição da solução estoque, em metanol:água (60:40,v/v), obtiveram-se soluções dos pesticidas em várias concentrações, como pode ser verificado na **Tabela III.2**.

Tabela III.2 - Valores de concentração das soluções calibradoras de cada pesticida estudado.

Herbicida	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron; linuron; 3,4-dicloroanilina	250, 500, 700, 800, 1000, 1800
2,4-D; simazina; atrazina; ametrina; 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina; 2-hidróxi-atrazina	250, 400, 500, 750, 900, 1000

Em um espectrofotômetro UV por arranjo de diodos (Hewlett Packard 8452 A) mediram-se as absorvâncias das soluções em várias concentrações. O sinal foi monitorado entre 180 e 820 nm, mas para fins práticos trabalhou-se apenas entre 180 e 320 nm, região onde aparecem as bandas características dos herbicidas estudados.

Com os resultados obtidos foram traçadas as curvas analíticas de absorvância vs. concentração, no comprimento de onda de máxima absorvância de cada herbicida e também em um comprimento de onda no qual todas as espécies absorvem. A partir do coeficiente angular das curvas analíticas, calcularam-se os valores de absorvidade molar (ϵ) dos herbicidas, de acordo com a seguinte equação:

$$A = \epsilon bc$$

onde: A = absorvância

ϵ = absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = caminho ótico (1 cm)

c = concentração (mol L^{-1})

Os espectros dos herbicidas de uma mesma classe mostraram similaridade, porém eles diferiram entre classes distintas. Os valores de comprimento de onda

no qual houve absorvância máxima foram distintos entre as várias classes de pesticidas, o que torna difícil estabelecer um comprimento de onda único para detecção simultânea de todos os pesticidas. Uma comprovação disto pode ser observada na **Tabela III.3**, onde estão listados os valores de comprimento de onda de absorvância máxima (λ_{max}).

Tabela III.3 - Valores de λ_{max} e de absortividade molar (ϵ) dos herbicidas e metabólitos estudados.

Herbicida	λ_{MAX} nm	ϵ (λ_{MAX}) L mol ⁻¹ cm ⁻¹
2,4-D	230	11332
Diuron	250	16680
Linuron	254	12202
3,4-DCA	250	17346
Simazina	222	38938
Atrazina	222	39604
Ametrina	222	44841
2-cloro-4,6-diamino- 1,3,5-triazina	220	36699
2-hidróxi-atrazina	220	37365

O estudo dos parâmetros espectrofotométricos permitiu a avaliação dos valores de absortividade molar (ϵ) dos herbicidas, parâmetro este que dá uma boa indicação da sensibilidade do método para cada pesticida e a definição de um comprimento de onda onde todos os pesticidas absorvem, 234 nm. Este valor, em caso de análise multirresíduo de multiclases, pode resultar em sensibilidades

baixas para alguns herbicidas, o que exige a realização de injeções em dois ou mais comprimentos de onda distintos ou a utilização de um detector por arranjo de diodos.

III.3. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

Foram empregados dois cromatógrafos a líquido:

- a) Waters para CLAE-UV, consistindo de uma bomba de alta pressão do tipo pistão cabeça dupla (modelo Waters 510), um injetor Rheodyne (modelo 7725i), com alça amostradora de 10 μL , um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis de comprimento de onda variável (modelo Waters 486). Computador IBM Pentium de 90 MHz, contendo placa DT 2804 e software Chrom Perfect instalados para aquisição de dados cromatográficos.
- b) Shimadzu para CLAE-EM, consistindo de uma bomba binária (modelo LC-10 AS), um injetor Rheodyne (modelo 7725i), com alça amostradora de 10 μL , acoplado a um espectrômetro de massas, Platform VG II Fisons, splitter Valco, equipado com interface do tipo *electrospray*. Para otimização dos parâmetros do EM cada composto foi dissolvido em fase móvel (pH 3) e injetado separadamente. Para a CLAE-EM a temperatura da fonte de 150^oC foi otimizada. Nitrogênio foi usado como gás nebulizador e gás secante em vazões de 30 L h⁻¹ e 300 L h⁻¹, respectivamente.

As colunas cromatográficas utilizadas foram de aço inoxidável, com as seguintes especificações:

- i) Coluna cromatográfica comercial, Nova Pak (Waters), 150 mm x 3,9 mm d.i., recheada com C-18 quimicamente ligado à sílica, tamanho de partícula de 4 μm .

ii) Coluna de guarda comercial, Nova Pak (Waters), 20 mm x 3,9 mm d.i. recheada com C-18 quimicamente ligado à sílica, tamanho de partícula de 4 μm .

iii) Coluna confeccionada no LabCrom de 150 mm x 3,9 mm d.i., recheada com FE de poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) imobilizado por microondas a uma potência de 495 watts, por 900 segundos, sobre a sílica Spherisorb, tamanho de partícula de 5 μm .

III.4. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES LABORATORIAIS

- a) Manifold de extração em fase sólida (20 posições - Supelco);
- b) Sistema de água Milli-Q-Plus (Millipore);
- c) Sistema de filtração à vácuo (Sartorius);
- d) Bomba de vácuo (Primar, modelo 141);
- e) Banho de ultrassom (Thronton, modelo T14);
- f) Balança analítica, com precisão de 5 casas decimais (Ohaus, modelo AS 200);
- g) pHmetro (Digimed, modelo DM21) com eletrodo de vidro combinado e eletrodo Termocompensador (Digimed);
- h) Centrifuga Excelsa[®]II (Fanem, Modelo MP);
- i) Membranas filtrantes de polietileno de 0,45 μm de diâmetro de poro da Millipore, para filtração das soluções de trabalho ou da FM;
- j) Filtro Milex (Millipore) de 0,45 μm de diâmetro de poro, para filtração de amostras de urina.
- k) Agitador Vortex, Phoenix-AP56
- l) Seringas (Hamilton), para injeções no sistema cromatográfico, com capacidade de 100 μL .

- m) Tubos de extração em fase sólida, C-18, sílica modificada, tamanho de partícula 40 μm . Tubos comerciais de 3 mL (500 mg), Supelclean (Supelco).
- n) Tubos de extração em fase sólida (desenvolvidos no LabCrom), 6 mL, sílica da Fluka, tamanho de partícula de 40 μm e poli(metiloctadecilsiloxano) (PMDOS), imobilizado termicamente à 120 $^{\circ}\text{C}$, por 4 horas, e extraído com uma sequência de hexano e metanol.
- o) Tubos de centrifuga que tiveram seu fundo arredondado, substituindo o formato cônico, que poderia causar contaminações, mesmo efetuando a lavagem com Extran. O revestimento da tampa destes tubos foi substituída de borracha para teflon, a fim de evitar reações com solventes orgânicos, na etapa de extração, causando contaminação.
- p) Pipetas de vidro e descartáveis.
- q) Seringas de vidro (6 mL), pois as de polipropileno dão origem a picos artefatos.

III.5. SOLVENTES E REAGENTES EMPREGADOS

- Metanol – grau cromatográfico (Mallinckrodt)
- Clorofórmio – grau cromatográfico (Mallinckrodt)
- Acetonitrila – PA e grau cromatográfico (Tedia)
- Diclorometano – grau cromatográfico (EM Science)
- Ácido Fosfórico – PA (Mallinckrodt)
- Hidróxido de amônio- PA (Merck)
- Éter etílico- PA (Merck)
- Ácido Clorídrico – PA (Merck)
- Extran-2% alcalino (Merck)

III.6. LIMPEZA DA VIDRARIA

A vidraria utilizada foi previamente lavada em água corrente, a seguir foi imersa por 24 h, em detergente alcalino Extran - 2% (Merck), enxaguada seqüencialmente em água de torneira, água destilada e acetona. A vidraria foi seca ao ar e posteriormente guardada em armário fechado. Antes do uso, a vidraria foi lavada com um pequeno volume da solução ou solvente a ser utilizado.

III.7. FILTRAÇÃO DE REAGENTES E SOLVENTES

Todos os extratos e solventes foram filtrados em membranas filtrantes da Millipore, antes da análise cromatográfica. A fase móvel foi preparada adicionando uma certa quantidade de água ao solvente orgânico e filtrada em sistema de filtração à vácuo, Sartorius. A seguir foi ajustado o pH e a mistura foi degaseificada por 20 min, por aplicação simultânea de vácuo e ultrassom.

III.8. ESTUDO DA ESTABILIDADE DE PESTICIDAS EM URINA TESTEMUNHA

A estabilidade foi avaliada pela quantificação dos herbicidas adicionados na urina em dois níveis de fortificações. Para isto foram realizadas e ciclos de congelamento, ou seja, as amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por 12 horas, sendo então submetidos ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à -20°C por 12 horas, e assim, sucessivamente, até completar os três ciclos, quantificando-se os herbicidas após sucessivos tempos pré-determinados de estocagem [98,105]. A estabilidade foi determinada através de cálculos da

concentração média estimada em relação à concentração inicial no tempo zero, sem a estocagem. Foram consideradas estáveis as amostras que mantiveram as suas concentrações médias dentro de uma margem de até 10% inferior a concentração inicial do herbicida [99].

III.9. AMOSTRAS REAIS

Após o desenvolvimento e a validação de metodologias referentes às classes distintas de herbicidas, as mesmas foram aplicadas na análise de amostras reais. Para tal foram coletadas urinas de vários indivíduos na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizada em Piracicaba.

Para que este objetivo fosse alcançado as amostras foram colhidas após o consentimento formal por escrito, assinado pelo próprio indivíduo concordando com o protocolo do presente trabalho, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, conforme anexado nos **ANEXOS 1 e 2**.

A avaliação das amostras reais foram realizadas com dois grupos:

- **Grupo Controle**- 7 indivíduos, sendo 4 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, que não utilizaram medicamentos nas últimas 72 horas que precederam a coleta. Foram colhidas informações, através de um questionário, se o indivíduo era ou não fumante e usuário de medicamentos. Muitos destes indivíduos têm suas moradias dentro da Estação fazendo uso de alimentos e água ali existentes.

A **Tabela III.4** apresenta o perfil dos indivíduos do grupo de controle, com relação ao sexo, idade, uso de cigarros e medicamentos.

Tabela III.4 - Perfis dos indivíduos do grupo controle em relação ao sexo, idade, uso de cigarros e de medicamentos.

INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	USUÁRIO DE CIGARROS	USUÁRIO DE MEDICAMENTOS
MAG	F	46	N	N
RP	F	42	N	N
DAP	F	45	N	N
MAS	F	44	N	N
RAS	M	43	N	N
MAG	M	30	N	N
RAA	M	64	N	N

F = feminino, M = masculino, S = sim, N = não

- **Grupo Estudo**- 6 indivíduos que aplicam pesticidas em plantações de cana-de-açúcar, que poderiam estar ou não intoxicados. As análises foram feitas pré e pós-exposição aos pesticidas. Adotaram-se estes tipos de análise pelo fato de que há anos os mesmos indivíduos fazem aplicações dos pesticidas e o intuito de investigar a pré-exposição era avaliar se os herbicidas estudados já não se encontravam absorvidos no organismo dos aplicadores.

A **Tabela III.5** mostra os perfis dos indivíduos do grupo de estudo, com relação ao sexo, idade, uso de cigarros, medicamentos e tipo de aplicação.

Tabela III.5 - Perfis dos indivíduos do grupo de estudo, em relação ao sexo, idade, uso de cigarros, medicamentos e tipo de aplicação dos pesticidas.

INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	USUÁRIO DE CIGARROS	USUÁRIO DE MEDICAMENTOS	TIPO DE APLICAÇÃO
JJB	M	51	N	N	D
RJ	M	38	N	N	D
PR	M	43	N	N	D
SJF	M	39	N	N	D
VAA	M	43	S	N	D
AFF	M	55	S	N	T

M = masculino, S = sim, N = não, D = dorsal, T = trator

Foram excluídos deste grupo os indivíduos que fazem uso de medicamentos, fumantes e com problemas renais, devido a possíveis alterações no organismo, propiciando assim a eliminação de compostos endógenos, que dificultam a detecção dos pesticidas a serem investigados.

III.9.1. PROCEDIMENTO DE COLETA DAS AMOSTRAS

Para coletar uma amostra de urina que fosse representativa do estado metabólico do indivíduo, é necessário controlar certos aspectos da coleta como método, duração, hora, dieta e medicamentos ingeridos. Instruções foram transmitidas aos indivíduos quanto aos procedimentos da coleta. Dessa forma os seguintes cuidados foram tomados durante a coleta das amostras:

- As amostras foram coletadas sempre no final do dia, pois dependendo da substância a ser analisada sua concentração pode variar segundo as atividades do dia, como exercícios, refeições e metabolismo orgânico.
- A amostra foi coletada em recipiente limpo, seco e descartável por ser mais econômico e por eliminar uma possível contaminação decorrente de lavagem incorreta.
- Os recipientes foram devidamente etiquetados com a identificação dos indivíduos, evitando de serem trocados.
- O transporte dessas amostras ao laboratório foi realizado em caixas de isopor com gelo reciclável.
- A conservação dessas amostras foi feita sem conservantes, somente sob refrigeração (-20°C), evitando interferências nas análises químicas. A refrigeração evita a decomposição bacteriana da urina e precipita uratos e fosfatos amorfos, que não são de interesse na análise.

III.10. AMOSTRA TESTEMUNHA

A amostra testemunha de urina foi coletada da autora deste trabalho no final do dia. A quantidade de amostra coletada correspondeu a necessária para poder realizar o desenvolvimento de método e validação. A conservação das amostras foi feita sem conservantes químicos sob refrigeração à -20°C .

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO UNIRRESÍDUO DE 2,4-D EM URINA HUMANA

IV. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO UNIRRESÍDUO DE 2,4-D EM URINA HUMANA

Esta parte do trabalho teve por objetivo o desenvolvimento da extração líquido-líquido, através de um método convencional e outro que consiste da extração à temperatura sub-zero, empregando solventes imiscíveis e miscíveis em água, respectivamente, para extração de 2,4-D de amostra de urina fortificadas e posterior separação e quantificação por CLAE-UV.

IV.1. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1.1. Instrumentação

Foram utilizados o sistema de CLAE-UV, coluna analítica e de guarda comerciais, descritos no item III.3. Como fase móvel (FM) foi utilizada uma mistura de acetonitrila-água (40:60, v/v), ajustada a pH 3 com H₃PO₄, tendo sido empregada a eluição isocrática.

IV.1.2. Preparo das Soluções Padrão

A solução estoque do 2,4-D foi preparada na concentração de 1000 µg L⁻¹, em metanol. A partir desta solução foram preparadas, por diluição volume/volume, soluções de trabalho para fortificar as amostras e para construir as curvas analíticas (faixa de 80 µg L⁻¹ a 1000 µg L⁻¹). Essas soluções foram estocadas em geladeira à 4 °C, durante todo o processo de desenvolvimento e validação do método e permaneceram estáveis por pelo menos três meses.

IV.1.3. Preparo da Amostra

Duas técnicas de preparo de amostra foram empregadas:

IV.1.3.1. Extração Líquido-Líquido à Temperatura Sub-Zero (ELL-TSZ)

Em três tubos, contendo 1 mL de urina testemunha em cada, foram adicionados, separadamente, os seguintes volumes de acetonitrila: 0,5; 0,75 e 1 mL e o pH foi ajustado a ~3, com 400 μL de HCl (1 mol L^{-1}). As amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas do padrão 2,4-D.

A mistura de acetonitrila e urina foi centrifugada à 4000 rpm, por 5 min. A seguir, foi resfriada à temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min, para que ocorresse a separação das fases. A fase orgânica foi então removida. Esta etapa foi repetida mais três vezes. As 3 porções de fase orgânica foram transferidas para um mesmo tubo graduado e concentradas a 200 μL usando gás nitrogênio. Um volume de 10 μL foi injetado no cromatógrafo a líquido.

IV.1.3.2. Extração Líquido-Líquido Convencional (ELL)

O pH de 1 mL de urina foi ajustado a ~3, com 400 μL de HCl (1 mol L^{-1}). A seguir a amostra foi fortificada com uma concentração conhecida de 2,4-D e adicionou-se 1 mL de clorofórmio. A mistura foi homogenizada em vortex e centrifugada à 4000 rpm, por 5 min, para uma separação completa das fases.

A fase orgânica foi transferida para um outro tubo e a etapa de extração foi repetida 3 vezes. A seguir, as fases orgânicas foram misturadas e concentradas, usando gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 200 μL de acetonitrila e 10 μL foram injetados no cromatógrafo a líquido.

IV.1.4. Estudo da Estabilidade do 2,4-D em Urina Testemunha

O procedimento de estabilidade encontra-se descrito no item III.8. Para verificar a estabilidade do 2,4-D foi empregado a extração líquido-líquido à temperatura sub-zero, usando acetonitrila como solvente orgânico. A estabilidade foi avaliada em dois níveis de fortificação, 80 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, do 2,4-D em amostra de urina testemunha.

IV.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.2.1. Avaliação da Extração Líquido-Líquido à Temperatura Sub-Zero (ELL-TSZ)

Um método de extração foi aplicado ao herbicida 2,4-D, baseado em um trabalho da literatura [106], onde foi empregado a extração líquido-líquido à temperatura sub-zero seguida por CLAE para análise de drogas, não havendo publicações para os pesticidas.

A acetonitrila destaca-se entre os solventes orgânicos por apresentar ponto de fusão de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dessa forma, a acetonitrila é hidrofílica e miscível em água, em uma mistura 1:1(v/v), à temperatura ambiente. Entretanto, a miscibilidade da acetonitrila decresce em temperatura sub-zero, resultando na separação da acetonitrila da água. Baseando-se neste fenômeno, amostra de urina testemunha contendo o padrão 2,4-D foi misturada com acetonitrila e refrigerada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a separação das fases, o pesticida presente na fase orgânica foi injetado diretamente em um cromatógrafo a líquido, usando acetonitrila:água 40:60 (v/v) como fase móvel.

Vários tempos de resfriamentos foram testados: 5, 10, 15, 20 e 30 min para certificar qual o melhor tempo no qual se poderia obter uma boa recuperação fase orgânica. Verificou-se que quanto menor a quantidade de acetonitrila adicionada a

1 mL de urina, menor era o volume da fase orgânica (acetonitrila) recuperado após resfriamento em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min. Os volumes de fase orgânica recuperados foram 0,1; 0,25 e 0,8 mL quando 0,5; 0,75 e 1 mL de acetonitrila foram adicionados a 1 mL de urina, respectivamente. Acredita-se que parte da acetonitrila adicionada ficou retida pela fase aquosa após o resfriamento, pois quando pequenas quantidades de acetonitrila (0,5 e 0,75 mL) foram misturadas com a urina e resfriadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min, pode-se notar que a fase aquosa congelou-se e uma camada intermediária apareceu entre a acetonitrila e a fase aquosa congelada. Com isto tornou-se difícil transferir toda a acetonitrila para outro tubo.

Após ter sido realizado um estudo sobre o volume adequado de acetonitrila a ser utilizado no método de ELL-TSZ, optou-se por empregar 1 mL deste solvente orgânico. Os interferentes, extraídos da urina pelo método citado, eluíram em um tempo de retenção, t_R , inferior a 6,7 min (**Figura IV.1**) e eles não interferiram na detecção do 2,4-D, cujo t_R foi de 8,3 min.

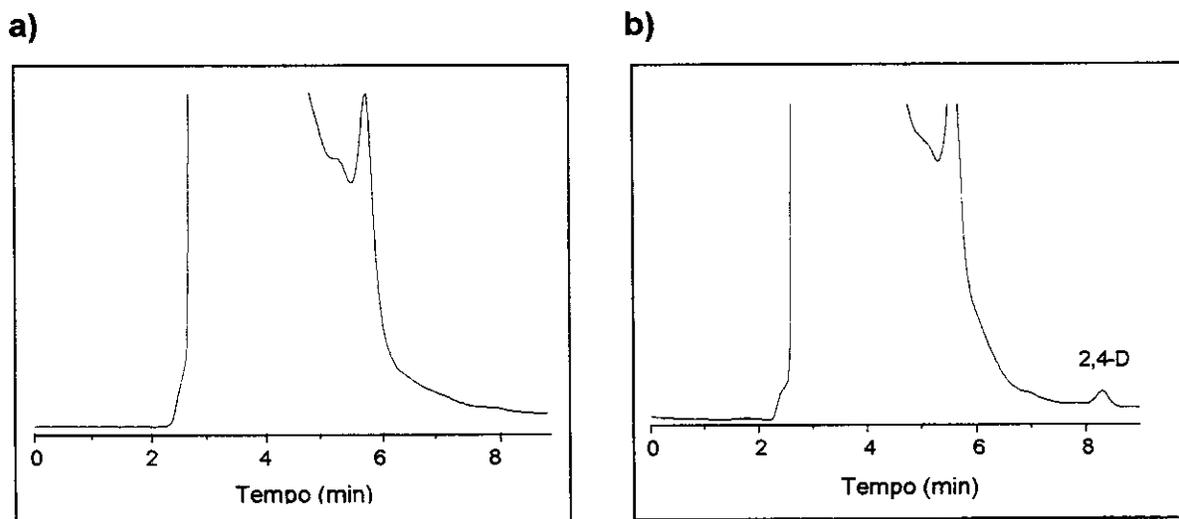


Figura IV.1 - Cromatogramas obtidos para a urina testemunha através do método de ELL-TSZ. a) branco da urina e b) urina fortificada com $160\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 ($4\text{ }\mu\text{m}$); volume de injeção: $10\text{ }\mu\text{L}$; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 3 (H₃PO₄), vazão: $0,4\text{ mL min}^{-1}$, detecção: UV, 230 nm.

IV.2.2. Validação das Metodologias

Os parâmetros da curva analítica obtidos para o 2,4-D estão apresentados na **Tabela IV.1**. Como pode-se observar, obteve-se excelente coeficiente de correlação, estando acima de 0,999.

Na **Tabela IV.2** encontram-se os valores de limite de detecção do instrumento, calculados usando 3 vezes a razão sinal/ruído. Os limites de quantificação correspondentes a 10 vezes a razão sinal/ruído e também os limites teóricos do método também estão contidos nesta tabela.

Tabela IV.1- Curva analítica e intervalo de linearidade para a solução padrão do 2,4-D.

Herbicida	a	b	r	Intervalo de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4-D	1822,22	268,52	0,9997	80-1000

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear; r = coeficiente de correlação

Tabela IV.2- Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para a solução padrão do 2,4-D.

Herbicida	LD* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4-D	26	80	5,2	16

* valores obtidos para o instrumento;

** valores teóricos obtidos para o método (após pré-concentração de 5 vezes).

As recuperações, **Tabela IV.3**, em níveis de fortificações (80, 120, 160 $\mu\text{g L}^{-1}$), obtidas pela técnica de ELL-TSZ foram menores que àquelas usando a ELL convencional, devido o fato que parte da acetonitrila adicionada ter ficado retida na fase aquosa, diminuindo a quantidade de acetonitrila recuperada após a extração por ELL-TSZ. A técnica de ELL-TSZ mostrou ser simples, devido a acetonitrila recuperada poder ser injetada diretamente no cromatógrafo. Ao contrário, a ELL convencional é trabalhosa, uma vez que o analito recuperado em clorofórmio tem que ser seco e ressuspendido em acetonitrila. Dessa forma a técnica de ELL-TSZ apresenta vantagens em relação a ELL convencional por ser mais simples e rápida.

Os valores de precisões (intra-ensaio e inter-ensaio) são mostrados na **Tabela IV.3**, para ambos os métodos e observa-se que, apesar dos valores obtidos para a ELL-TSZ terem sido pouco superiores aos de ELL, eles estão bem abaixo do valor máximo aceito na literatura, que é de 20%.

Ambos os métodos apresentaram-se robustos, uma vez que pequenas mudanças, tais como marca dos solventes da fase móvel, pequenas flutuações na temperatura, etc., não afetaram significativamente os resultados.

Tabela IV.3 - Parâmetros de validação obtidos para o 2,4-D, após a aplicação de ELL e ELL-TSZ e análise por CLAE.

Extração	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão - CV (%) (n=3)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios
ELL-TSZ	80	57	2,3	
	120	60	2,8	2,6
	160	63	1,8	
ELL	80	66	1,5	
	120	72	1,0	1,6
	160	80	1,0	

n= número de repetições.

IV.2.3. Estabilidade do 2,4-D em Urina Testemunha

A estabilidade do herbicida 2,4-D na urina testemunha após 3 ciclos de congelamento/descongelamento (-20 °C), que durou 3 semanas, foi determinada usando o método de extração ELL-TSZ. As análises, em 2 níveis de fortificações, 80 µg L⁻¹ e 160 µg L⁻¹, forneceram valores de degradação < 4,4% e < 2,7% (Tabela IV.4), respectivamente, mostrando a boa estabilidade do 2,4-D na matriz.

Tabela IV.4 – Porcentagem de degradação de 2,4-D em urina testemunha, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento, em um período de 3 semanas.

Herbicida	Fortificação (µg L ⁻¹)	Degradação(%)		
		Semanas		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
2,4-D	80	1,6	2,6	4,4
	160	1,0	2,1	2,7

IV.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Para verificar a eficácia do método e sua aplicabilidade, efetuou-se a análise de algumas amostras de urina, obtidas de indivíduos sujeitos a pré e pós-exposição ao 2,4-D. A escolha da metodologia a ser aplicada na análise das amostras reais foi baseada na rapidez, simplicidade e exatidão do método, pois em Centros de Intoxicações, os toxicologistas necessitam de análise rápida e eficiente para diagnosticar os casos de intoxicação.

Após terem sido desenvolvidas duas metodologias na determinação do 2,4-D que foram validadas, optou-se por utilizar a que envolve a técnica da ELL-TSZ por ser mais simples e rápida e também pelo fato da acetonitrila utilizada para a extração ser um ótimo solvente para desproteínizar a urina, proporcionando extratos sem muitos interferentes. Diante do grande número de análises realizadas para cada indivíduo, será exemplificado um cromatograma obtido para apenas um indivíduo por grupo.

IV.3.1. Grupo Controle

Foram realizadas análises de urina de sete indivíduos do grupo de controle aplicando o método de extração à temperatura sub-zero seguido de CLAE. Na **Figura IV.2** tem-se um cromatograma da urina de um dos indivíduos, onde não foi detectado nenhum pico do herbicida 2,4-D, na região indicada pela seta, que corresponde ao tempo de retenção de 8,3 min do 2,4-D, obtido no desenvolvimento da metodologia. Os cromatogramas de todos os demais indivíduos do grupo controle foram semelhantes aos da Figura IV.2, mostrando que os indivíduos selecionados não estavam contaminados por 2,4-D ao nível de detecção do método desenvolvido.

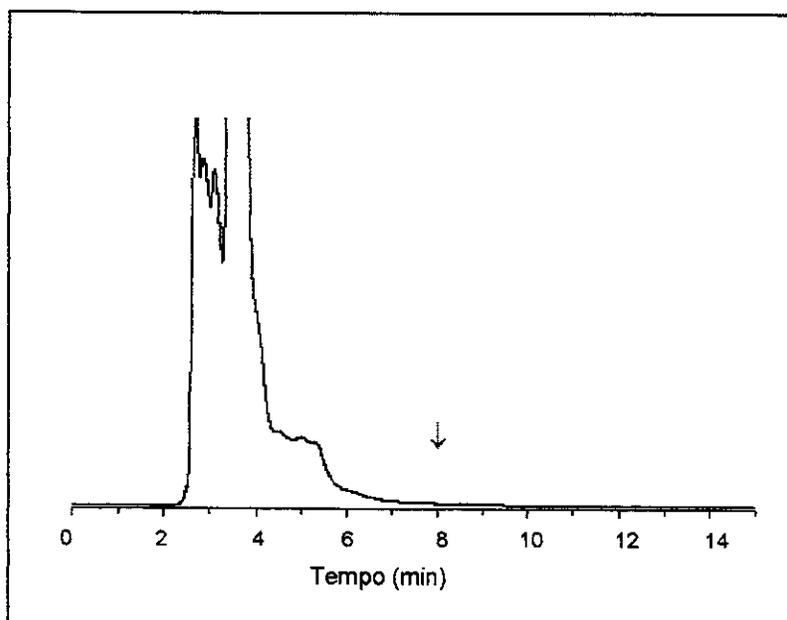


Figura IV.2 - Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo RAA, do grupo controle, após ELL-TSZ e CLAE. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.

V.3.2. Grupo Estudo

O número das urinas de indivíduos analisados neste grupo foram quatro, devido a exclusão da urina de dois indivíduos que eram fumantes.

As análises foram feitas pré-exposição, para descartar a hipótese dos indivíduos estarem intoxicados por aplicações realizadas em períodos anteriores. Para as avaliações pós-exposição foram realizadas coletas logo após o último dia da aplicação dos pesticidas na lavoura.

As **Figuras IV.3a e IV.3b** mostram os cromatogramas das amostras de urina do indivíduo SJF, nas avaliações pré-exposição e pós-exposição, respectivamente. Analisando estas figuras verifica-se que não foi detectado o herbicida 2,4-D, pois não se obteve nenhum pico em 8 min. Nas análises das

urinas de pré e pós-exposição, provenientes dos outros três indivíduos também não foi encontrado 2,4-D dentro do limite de detecção estabelecido pelo método.

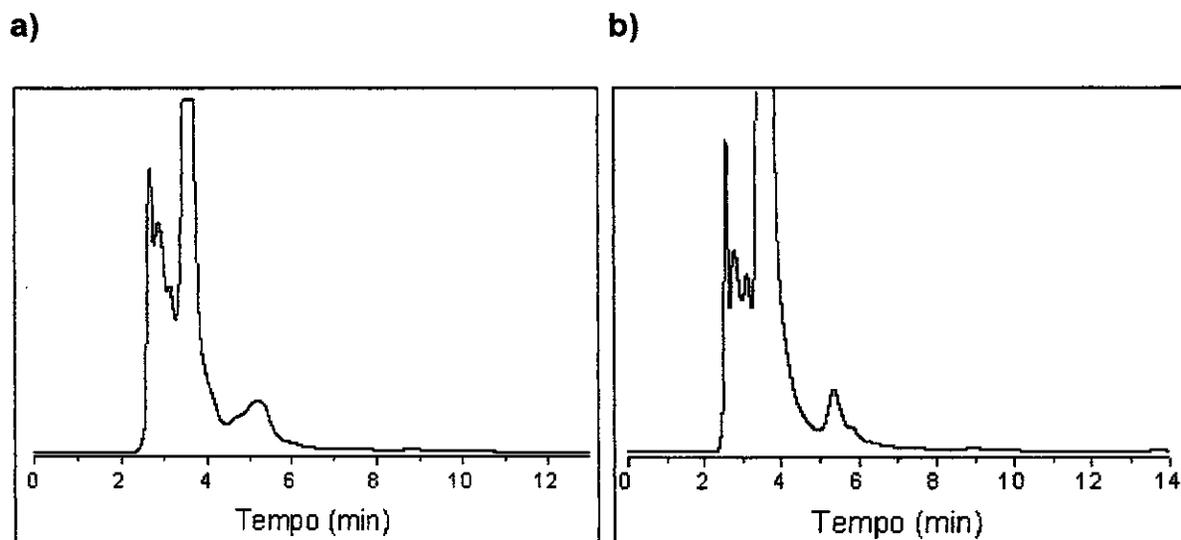


Figura IV.3 - Cromatogramas das amostras de urina coletadas do indivíduo SJF, grupo estudo, após ELL-TSZ e CLAE. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.

Como não foi detectada a presença do 2,4-D dentro do limite de detecção, foi feita a fortificação da urina do indivíduo SJF (pós-exposição), com $160 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão do herbicida, extraído pelo método de ELL-TSZ e analisado o extrato por CLAE, para poder comprovar a eficiência do método. O cromatograma obtido pode ser visualizado na **Figura IV.4**. Através deste cromatograma comprova-se que o 2,4-D elui em 8 min e o método pode ser aplicado à amostras reais

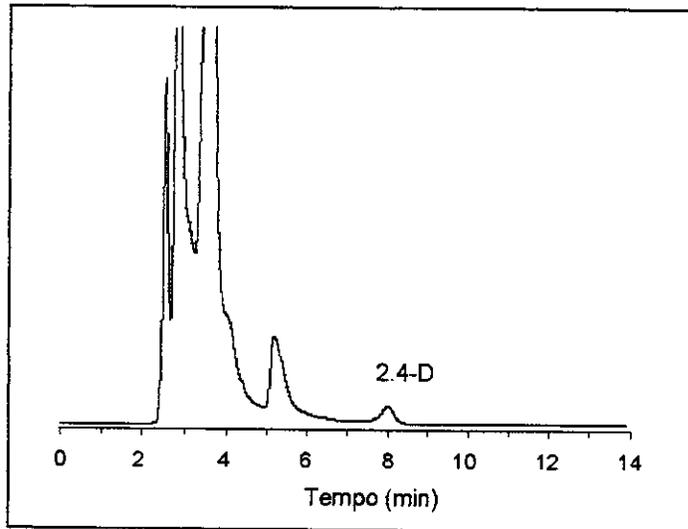


Figura IV.4 - Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo SJF, grupo estudo, (pós-exposição) e fortificada com padrão de 2,4-D, extraído por ELL-TSZ e analisada por CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem à Figura IV.1.

IV.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

- ✓ Através das metodologias propostas neste trabalho para determinação de 2,4-D, verifica-se que é possível trabalhar com menores quantidades de amostra, reduzindo-se, assim, os volumes de solventes orgânicos utilizados.
- ✓ Os métodos desenvolvidos, empregando a ELL-TSZ e ELL convencional mostraram bons parâmetros de validação, destacando que as recuperações obtidas através da ELL-TSZ apresentaram menores valores que a convencional, visto que o solvente extrator pode ter ficado retido na fase aquosa, diminuindo a quantidade do solvente recuperado.

- ✓ O tempo da ELL-TSZ em 30 min quando comparado a ELL convencional foi adequado, sendo que em toxicologia, as análises e resultados devem ser obtidos em curtos intervalos de tempo (poucos minutos até algumas horas), muitas vezes pode-se abrir mão da exatidão em benefício da rapidez.

- ✓ A escolha pelo método ELL-TSZ para avaliar as amostras reais foi devido a simplicidade e rapidez, uma vez que a acetonitrila é um ótimo solvente para desproteinizar a amostra de urina além de poder ser injetada diretamente no cromatógrafo.

- ✓ O tempo gasto para realizar a ELL foi maior quando comparada a ELL-TSZ visto que a eficiência da ELL se dá pelo número de extrações realizadas e na ELL-TSZ recuperou-se o analito já na primeira extração, em um tempo de 20 min.

CAPÍTULO V

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO
DE TRIAZINAS EM URINA HUMANA POR
CLAE-UV E CLAE-EM*

V – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE TRIAZINAS EM URINA HUMANA POR CLAE-UV E CLAE-EM

Esta parte do trabalho teve como objetivos:

- ✓ Desenvolver metodologias para determinação das triazinas, atrazina, simazina, ametrina, e alguns de seus metabólitos, usando duas técnicas de extração/pré-concentração, a EFS e a ELL, seguidas de CLAE.
- ✓ Comparar os métodos de detecção CLAE-UV e CLAE-EM na análise das triazinas.
- ✓ Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras reais.

V.1 – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO CLAE-UV

V.1.1. PARTE EXPERIMENTAL

V.1.1.1. Instrumentação

Foram utilizados o cromatógrafo a líquido, as colunas, analítica e de guarda, comerciais e os cartuchos para extração em fase sólida descritos no capítulo III, item III.4.

V.1.1.2. Preparo das Soluções Estoque e Padrão

Foram preparados soluções estoque individuais de cada triazina em metanol, nas seguintes concentrações: atrazina (101,4 mg L⁻¹), simazina (104,4

mg L⁻¹) e ametrina (104,4 mg L⁻¹). A partir destas, foi preparada uma solução padrão, contendo a mistura das 3 triazinas em uma concentração de 1000 µg L⁻¹ de cada uma delas. A partir desta solução foram preparadas soluções de trabalho, por diluição em metanol volume/volume para fortificar as amostras de urina testemunha e construir as curvas analíticas (faixa de 30 µg L⁻¹ a 600 µg L⁻¹).

V.1.1.3. Seleção da Fase Móvel

Para a separação das triazinas a serem estudadas foram analisadas as seguintes fases móveis MeOH:H₂O e ACN:H₂O nas proporções: 50:50; 60:40; 40:60 v/v. As FM tiveram o pH ajustado para conseguir uma melhor retenção das triazinas.

As identificações dos picos dos herbicidas foram obtidas comparando-se os tempos de retenção (t_R) dos herbicidas na mistura com os t_R dos padrões, injetados isoladamente.

V.1.1.4. Preparo da Amostra

A amostra de urina testemunha, após coletada, foi centrifugada para remoção de possíveis tecidos, e guardada em freezer à -20 °C. Para análise estas amostras foram descongeladas, centrifugadas novamente e submetidas ao procedimento analítico de extração.

Duas técnicas de preparo de amostra foram empregadas: extração líquido-líquido (**Figura V.1**) e extração em fase sólida (**Figura V.2**).

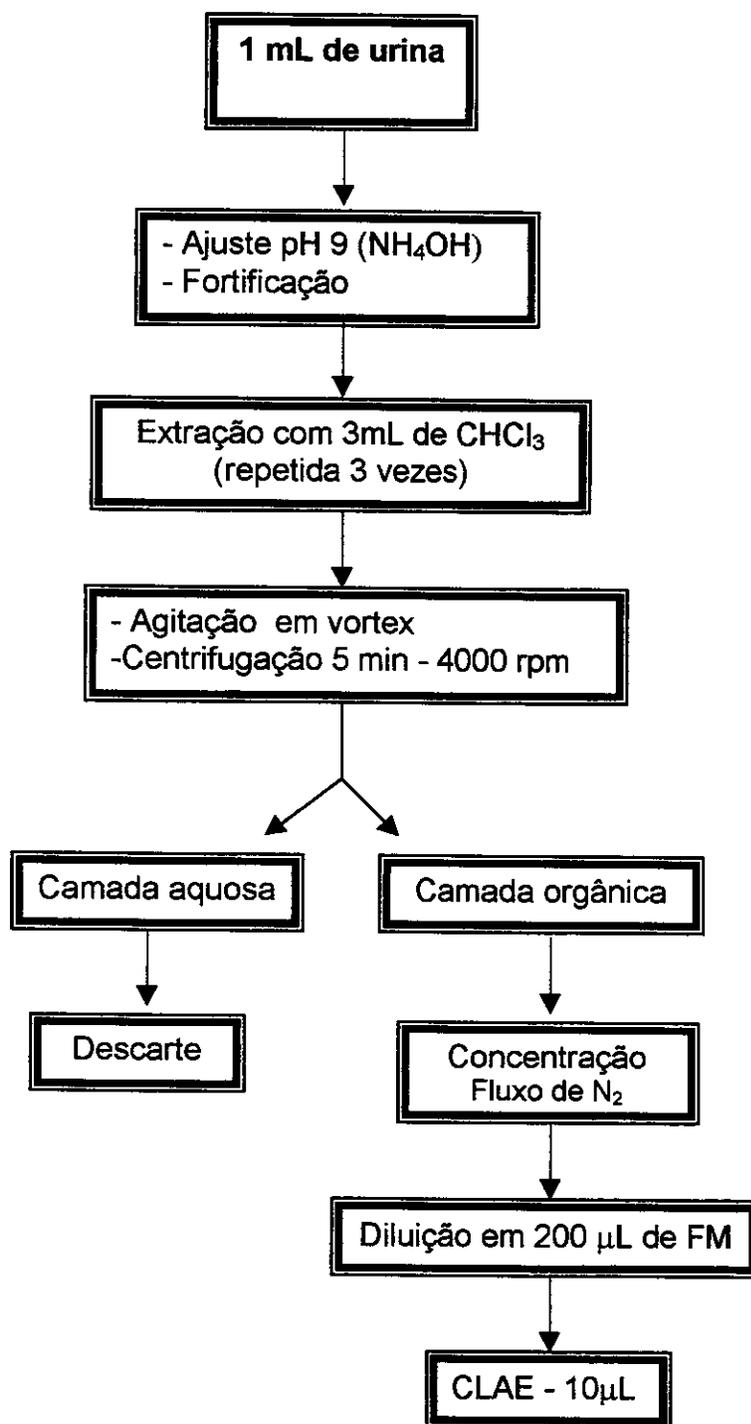


Figura V.1 - Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por ELL e quantificação das triazinas por CLAE.

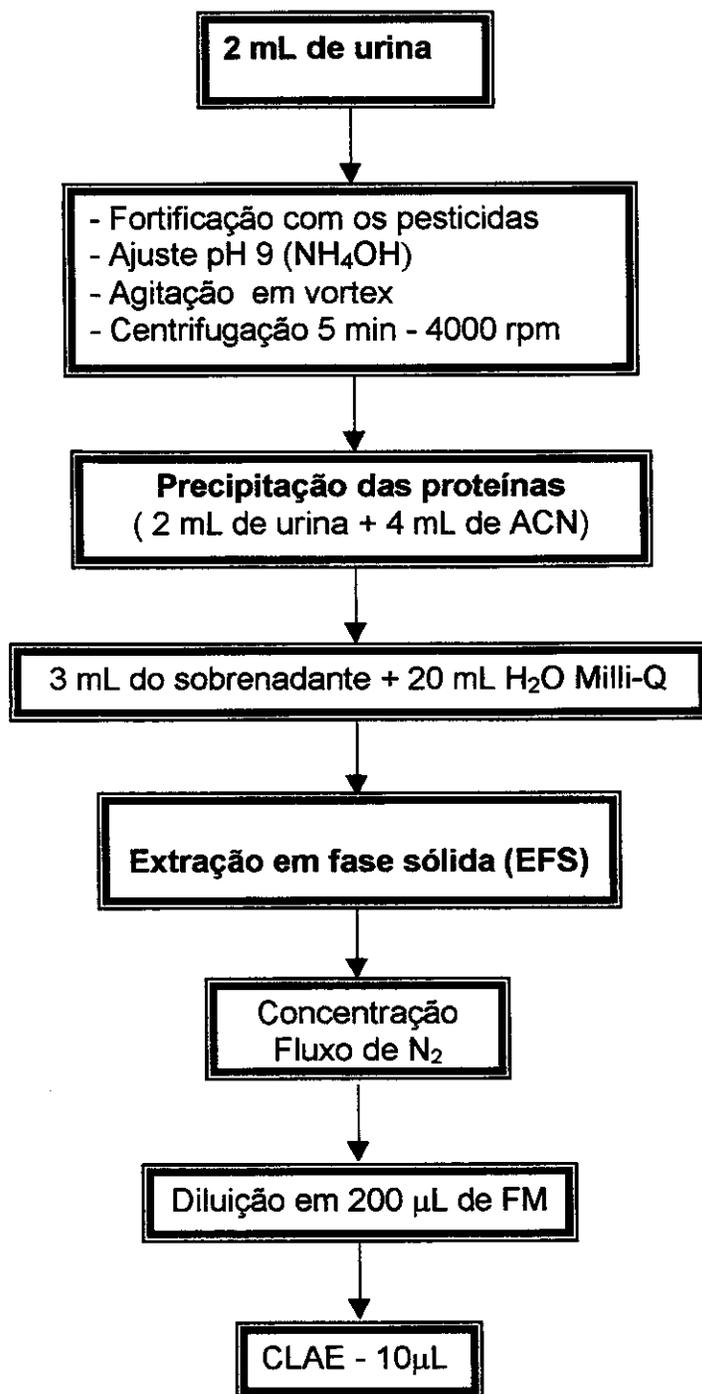


Figura V.2 - Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por EFS e quantificação das triazinas por CLAE.

Procedimento de EFS

- 1) Condiciona-se o tubo de extração passando-se por ele 10 mL de metanol;
- 2) Equilibra-se o tubo pela passagem de 5 mL de água Milli-Q;
- 3) Força-se a amostra a percolar através do tubo, com o auxílio de uma bomba de vácuo, a uma vazão de 3 mL min^{-1} ;
- 4) Lava-se o tubo com 5 mL de água Milli-Q;
- 5) Descarta-se o eluato e seca-se o leito sorvente pela passagem de ar comprimido;
- 6) Elui-se o analito com solvente orgânico.

Os solventes orgânicos utilizados para eluição: MeOH; CHCl_3 e CHCl_3 : MeOH (9:1v/v).

V.1.1.5. Estudo da Estabilidade das Triazinas em Urina Testemunha

A estabilidade foi avaliada através da quantificação das triazinas simazina, atrazina e ametrina adicionadas na urina em dois níveis de fortificações (80 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$). A técnica de extração empregada, neste estudo, para extrair as triazinas foi a EFS, descrita no fluxograma da **Figura V.2**. O procedimento do teste de estabilidade encontra-se descrito no item III.8.

V.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1.2.1. Definição das Condições Cromatográficas de Separação das Triazinas

A primeira etapa no desenvolvimento de metodologia analítica foi a separação cromatográfica dos pesticidas (padrões), a fim de selecionar a melhor FM e vazão nos quais os pesticidas pudessem ser separados e detectados sem a interferência de outros componentes da matriz. Utilizou a FM MeOH:H₂O em vazão de 0,7 mL min⁻¹, na separação dos padrões de triazinas (simazina, atrazina e ametrina). Conforme mostra o cromatograma da **Figura V.3** os pesticidas foram eluídos em um tempo de análise relativamente longo, uma vez que estes pesticidas são básicos e ficaram muito tempo retidos na fase estacionária. A ametrina foi o último composto a ser eluído, em 21 min. Este tempo torna-se um problema em análise clínica, onde se precisa de diagnósticos rápidos e eficiente para pacientes intoxicados.

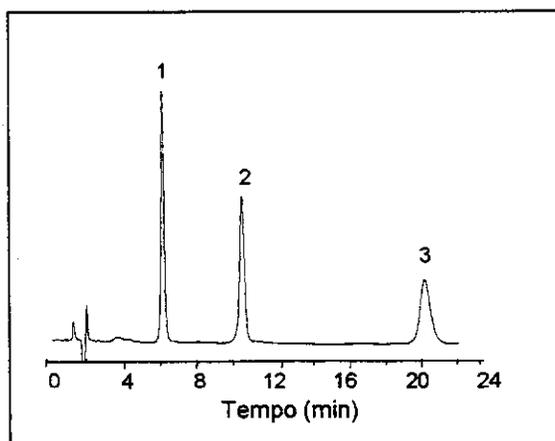


Figura V.3 - Cromatograma obtido na separação da mistura dos herbicidas triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 (4 μ m); volume de injeção: 10 μ L; FM MeOH:H₂O (50:50, v/v), vazão: 0,7 mL min⁻¹, detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

Conforme literatura [107], utilizando acetonitrila como FM ocorre a diminuição do "background" provocado pelos eluentes no comprimento de onda de 220 nm. Na mudança de metanol para acetonitrila observou-se uma diminuição do "background" na região de absorbância do UV (**Figura V.4**).

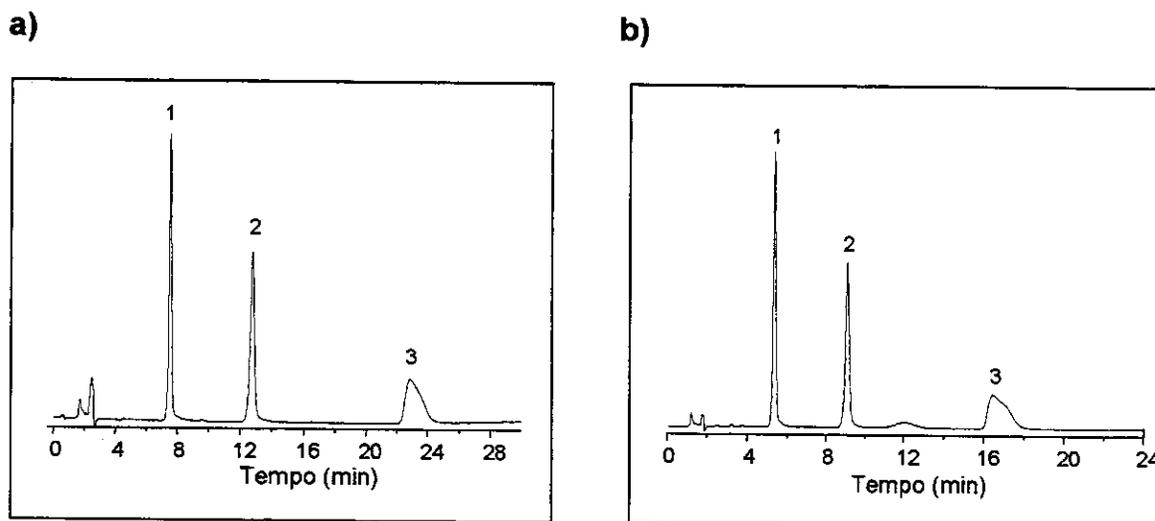


Figura V.4 - Cromatogramas obtidos para a separação da mistura dos herbicidas triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 (4 μ m); volume de injeção: 10 μ L; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹ (**Figura V.4a**), e vazão em 0,7 mL min⁻¹ (**Figura V.4b**); detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

Na tentativa de obterem picos mais estreitos e simétricos ajustou-se o pH da mistura dos pesticidas para 9. A **Figura V.5** mostra o cromatograma onde foi usado como FM: ACN:H₂O (40:60 v/v), pH 9 (NH₄OH) a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e comprimento de onda de detecção em 220 nm. Visualizando o cromatograma, verifica-se que a separação entre os herbicidas e o tempo de análise foram bons, sendo que o primeiro composto, a simazina, eluiu em t_R 6,7 min, não coincidindo com os interferentes, que eluíram no início da corrida cromatográfica. O último composto a eluir, a ametrina, em t_R = 17 min, apresentou um bom tempo de retenção e um perfil do pico mais simétrico. O ajuste do pH da FM auxiliou na

diminuição da retenção dos compostos, bem como na simetria dos picos dos pesticidas.

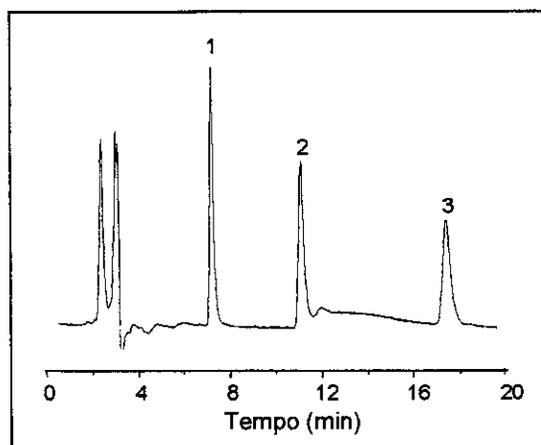


Figura V.5 - Cromatograma obtido para a separação da mistura dos herbicidas triazínicos. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5 mL min⁻¹; detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

V.1.2.2. Desenvolvimento do Método por Extração Líquido-Líquido Seguido de CLAE-UV

Dentre as várias etapas envolvidas na análise de urina, o procedimento de preparo da amostra é extremamente importante, pois é através dele que é possível isolar os analitos de interesse, com um mínimo de interferentes, que venham a gerar resultados errôneos na quantificação dos compostos de interesse.

Ao se empregar a ELL, qualquer pH pode ser utilizado, porém deve-se levar em conta a estabilidade e o caráter ácido-base do analito. Para que se obtenha sucesso em uma extração, o analito deve encontrar-se na forma não ionizado a

fim de facilitar a partição com a fase orgânica. Por essa razão, o valor do pH da fase aquosa pode necessitar de ajuste [35].

Inicialmente foi empregado um método de extração líquido-líquido desenvolvido por Clarke [44] para análise de drogas. Este método, quando aplicado ao "branco" da amostra testemunha, apresentou um cromatograma, que foi expandido, **Figura V.6**, mostrando muitos interferentes. Esses interferentes, possivelmente, são devido ao fato do éter etílico, utilizado para extrair o analito, extrair também outros compostos apolares presentes na matriz. Portanto, este procedimento de extração é inviável de ser utilizado, devido ao grande número de interferentes presentes, que podem eluir no mesmo tempo de retenção dos pesticidas estudados, dificultando a quantificação dos mesmos.

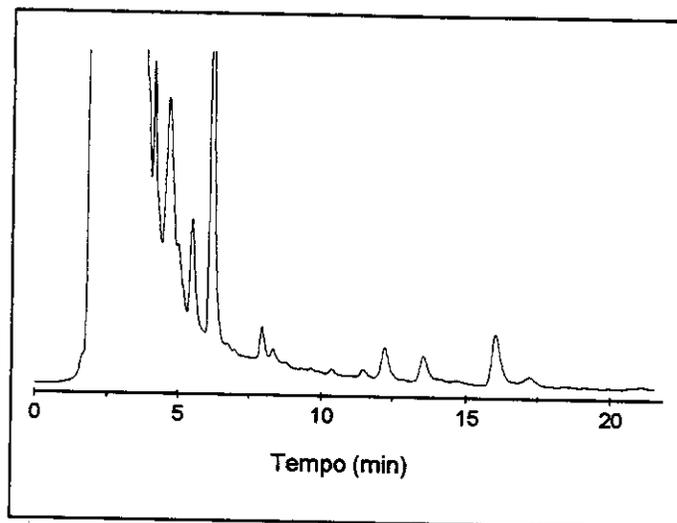


Figura V.6 - Cromatograma do branco da urina após extração ELL com dietil éter. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5mL min⁻¹; detecção: UV, 220 nm.

Realizou-se uma modificação no método de ELL, já desenvolvido por Clarke, para se adequar ao tipo de amostra em estudo, conforme mostra o fluxograma da **Figura V.1**, substituindo o éter etílico por clorofórmio. Analisando o "branco" da amostra testemunha, cromatograma da **Figura V.7a**, verifica-se que o

mesmo se apresenta mais limpo na região onde os pesticidas eluem do que o obtido na **Figura V.6**. A **Figura V.7b** mostra o cromatograma obtido após a urina testemunha ter sido fortificada com $80 \mu\text{g L}^{-1}$ dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina e extraída. Observa-se que os interferentes praticamente não interferem na quantificação dos analitos.

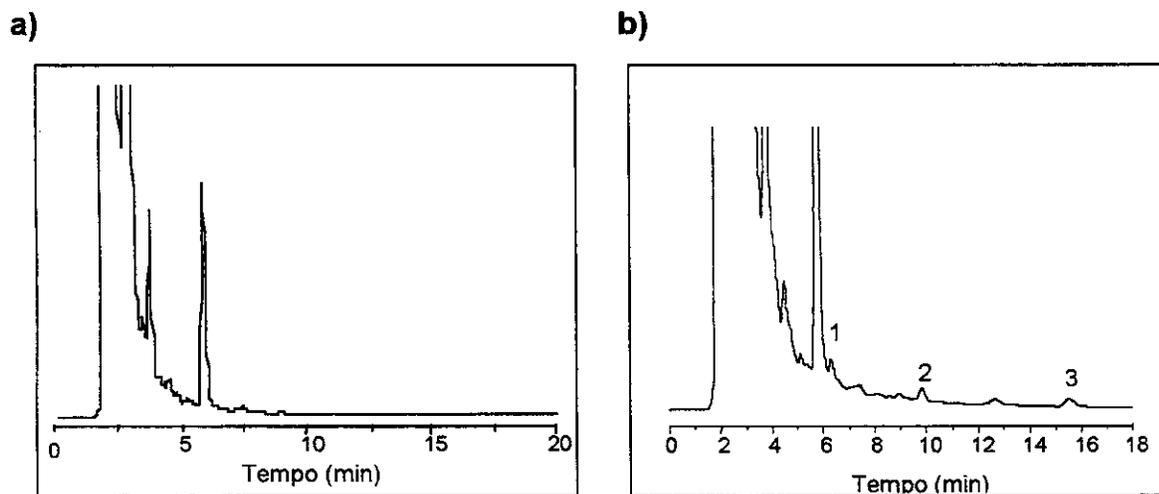


Figura V.7 - Cromatogramas obtidos após extração ELL modificada, a) branco da urina testemunha, b) amostra testemunha fortificada com $80 \mu\text{g L}^{-1}$ das triazinas. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 ($4 \mu\text{m}$); volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

V.1.2.3. Validação da Metodologia de Extração Líquido-Líquido Seguida por CLAE-UV

Após estabelecido o procedimento de extração e as condições cromatográficas de análise, a próxima etapa no desenvolvimento do método foi validá-lo.

Os valores obtidos para as curvas analíticas evidenciaram boa linearidade. A **Tabela V.1** apresenta os intervalos de linearidade para as triazinas estudadas. Como pode se observar, obtiveram-se excelentes coeficientes de correlação, estando todos acima de 0,9998.

Tabela V.1 - Curva analítica e intervalo de linearidade para as triazinas obtidas com as soluções padrão.

Herbicida	a	b	r	Intervalo de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Simazina	48,5	130,4	0,9998	40-600
Atrazina	58,5	177,5	0,9999	30-600
Ametrina	48,0	142,5	0,9999	40-600

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear e r = coeficiente de correlação.

Na **Tabela V.2** encontram-se os valores de limite de detecção do instrumento, calculados usando 3 vezes a razão sinal/ruído, e após a pré-concentração. Os limites de quantificação do instrumento foram correspondentes a 10 vezes a razão sinal/ruído. Observa-se que os herbicidas pertencem a mesma classe e, portanto, possuem LD e LQ semelhantes, pois quando são submetidos as mesmas condições de análise eles apresentam o mesmo comportamento.

Tabela V.2 - Valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das triazinas por CLAE-UV.

Herbicida	LD* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Simazina	13	40	2,6	8
Atrazina	10	30	2,0	6
Ametrina	13	40	2,6	8

* valores obtidos para o instrumento;

** valores teóricos obtidos para o método (após pré-concentração de 5 vezes).

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade e precisão inter-ensaio (intermediária), expressas pelo coeficiente de variação (CV). Para a repetibilidade foram realizadas nove determinações, uma vez que se trabalhou em três níveis de fortificações, realizando três extrações de cada nível e injetando cada extração três vezes no cromatógrafo (**Tabela V.3**). As análises foram realizadas no mesmo dia, desde o preparo da amostra até as injeções no cromatógrafo a líquido.

As precisões inter-ensaio foram realizadas para a fortificação intermediária a fim de avaliar a repetibilidade das análises em três dias consecutivos. Foram realizadas extrações em triplicatas das amostras, que foram analisadas no mesmo laboratório em dias diferentes. Os valores obtidos estão dentro da faixa aceitável, ou seja $\leq 20\%$, para análises toxicológicas [99].

Os resultados para as recuperações em níveis de concentrações (40, 50, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por ELL, estão apresentados na **Tabela V.3** e variaram na faixa de 50% a 93%. A simazina apresentou recuperações inferiores a atrazina e ametrina, devido a perdas deste herbicida durante o procedimento de extração. Embora níveis de recuperações de aproximadamente 100% sejam desejáveis, a recuperação de um analito pode ser tão baixa quanto 50 a 60% se a recuperação for precisa e reprodutível [98].

Tabela V.3 - Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a ELL e análise por CLAE-UV.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão - CV (%) (n=3)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios
Simazina	40	50	8,2	
	50	51	1,2	1,5
	80	63	3,4	
Atrazina	40	71	0,82	
	50	72	1,4	1,5
	80	86	1,3	
Ametrina	40	81	3,8	
	50	91	1,3	3,6
	80	93	0,75	

n= número de repetições.

V.1.2.4. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Seguida por CLAE-UV

A etapa inicial no desenvolvimento de um método de EFS consiste na seleção do solvente de eluição. Deve-se levar em conta na escolha do solvente as características do analito de interesse, da matriz e dos interferentes.

Proteínas e moléculas de alta massa molar, presentes em amostras biológicas (plasma, soro, urina etc.), podem deteriorar a coluna cromatográfica, que perde eficiência, podendo prejudicar a detecção e quantificação dos analitos. Por isso, em análises de matrizes biológicas deve-se usar coluna de guarda, às vezes necessitando de ultrafiltração da amostra ou precipitação das proteínas, antes da injeção.

O método de precipitação de proteínas [92,108] utilizado consistiu, basicamente, em dissolver a amostra em acetonitrila na proporção 1:2 v/v e centrifugar, sendo que o sobrenadante encontra-se livre das proteínas. O cromatograma obtido após a precipitação das proteínas seguido de EFS e análise por CLAE pode ser visualizado na **Figura V.8**, onde se observa que houve redução dos interferentes (proteínas e moléculas de alta massa molar), que são eluídos na região inicial.

Após precipitação das proteínas foram testados vários solventes de eluição dos analitos na EFS utilizando tubos de extração comercial C-18.

A escolha do melhor solvente de eluição baseou-se na análise do “branco” da amostra, levando-se em consideração o solvente que eluisse o mínimo possível de interferentes. Solventes muito polares, como o metanol, não são ideais para eluição dos pesticidas da amostra de urina, pois pode-se observar que no momento que o solvente passa através do tubo de extração ele também arrasta os interferentes da amostra, sendo que o eluato fica com a cor da urina, que foi percolada pelo tubo de extração. Este tipo de eluato não pode ser injetado no cromatógrafo, pois pode deteriorar a coluna cromatográfica. Mesmo ao usar o solvente menos polar em maior proporção misturado com um mais polar (CHCl_3 :MeOH, 9:1 v/v), os interferentes foram arrastados juntamente com o analito. Porém ao utilizar o CHCl_3 puro para a eluição, obteve-se, conforme mostra o cromatograma da **Figura V.8a**, um bom perfil do “branco testemunha”, sem interferentes na região onde os pesticidas são detectados, como pode ser visualizado no cromatograma da **Figura V.8b** para a urina testemunha fortificada.

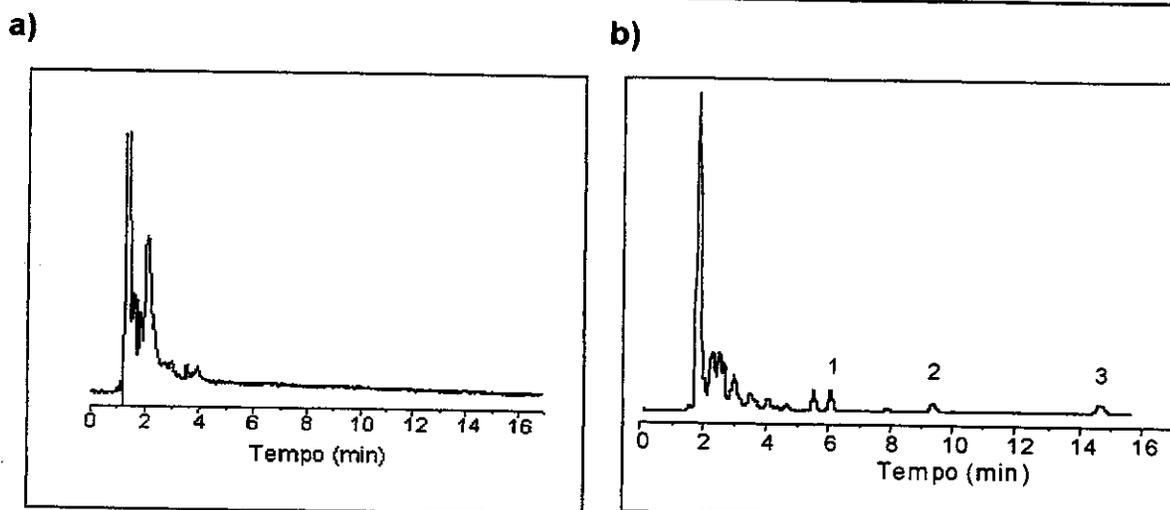


Figura V.8 - Cromatogramas obtidos após aplicação da extração em fase sólida: a) branco da amostra de urina testemunha b) amostra de urina testemunha fortificada com as triazinas a 80, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ e eluídas com CHCl_3 . Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova-Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH_4OH); vazão: 0,5 mL min^{-1} ; detecção: UV, 220 nm. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

V.1.2.5. Validação da Metodologia de Extração em Fase Sólida Seguida por CLAE-UV

Os valores da curva analítica obtidos a partir da solução trabalho e de limites de detecção e quantificação encontram-se, respectivamente, nas tabelas V.1 e V.2.

A **Tabela V.4** apresenta os valores dos parâmetros de validação, obtidos após procedimento de precipitação de proteínas e EFS da amostra de urina em três níveis de fortificações de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, para cada triazina estudada. Para cada concentração foram feitas três extrações e cada amostra foi injetada três vezes no sistema cromatográfico.

Tabela V.4 - Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a EFS e análise por CLAE-UV.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão - CV (%) (n=3)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios
Simazina	80	76	10	
	100	78	7,2	9,7
	150	70	8,8	
Atrazina	80	76	11	
	100	82	9,3	15
	150	73	9,8	
Ametrina	80	74	2,2	
	100	81	15	11
	150	72	11	

n= número de repetições.

Os valores de recuperações, nos 3 níveis de fortificação das triazinas, apresentaram resultados dentro da faixa de 70 a 82%, sendo aceitáveis para amostras biológicas, mostrando que é possível realizar a extração simultânea de herbicidas da mesma classe. Os valores de precisão apresentados, de um modo geral, foram muito bons, uma vez que foram inferiores a 20%.

V.1.2.6. Estabilidade das Triazinas em Urina Testemunha

O estudo de estabilidade das triazinas em urina testemunha foi realizada empregando o método de extração EFS seguida de CLAE. Os valores de degradação obtidos durante 3 semanas com 3 ciclos de congelamento/descongelamento são mostrados na **Tabela V.5**.

Tabela V.5 – Valores de degradação obtidos através do estudo de estabilidade das triazinas durante 3 semanas.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Degradação(%)		
		Semanas		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
Simazina	80	1,7	3,2	18
	150	3,8	5,6	22
Atrazina	80	1,2	6,0	19
	150	4,4	10	20
Ametrina	80	2,1	7,8	27
	150	4,0	10	20

Pode se observar que os pesticidas estudados foram estáveis por um período de 2 semanas, apresentando variações de concentração iguais ou inferiores a 10%. Com estes resultados conclui-se que ao analisar pesticidas em amostras biológicas deve-se tomar muito cuidado durante a coleta, estocagem e análises das amostras, pois muitos pesticidas são instáveis, podendo degradar facilmente.

V.2 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGANDO CLAE-EM

Nessa parte do trabalho, foi aplicada a técnica bastante sensível e seletiva de detecção, espectrometria de massas usando interface *electrospray-ES*, acoplada a CLAE, para a confirmação e quantificação dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina, e seus metabólitos 2-hidróxi-atrazina e 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina, presentes em urina. Inicialmente realizou-se um estudo para

estabelecer as condições cromatográficas por CLAE-EM na separação desses herbicidas e, em seguida procederam-se às análises com possível quantificação dos herbicidas. O objetivo principal foi verificar a detectabilidade e a aplicabilidade dessa técnica na análise dos herbicidas em questão, e compará-lo com o já estabelecido utilizando-se CLAE-UV.

Este estudo foi realizado no laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, contando com a colaboração do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

V.2.1. PARTE EXPERIMENTAL

V.2.1.1. Condições de Análise Usadas na CLAE-EM

O sistema de CLAE e o espectrômetro de massas estão descritos no item III.3. As condições de análise empregadas em CLAE-EM estão descritas na **Tabela V.6.**

V.2.1.2. Preparação da Solução Estoque

As soluções estoque das triazinas e metabólitos individuais foram preparadas em metanol nas seguintes concentrações: atrazina ($103,0 \text{ mg L}^{-1}$), simazina ($100,0 \text{ mg L}^{-1}$), ametrina ($102,0 \text{ mg L}^{-1}$), 2-hidróxi-atrazina ($104,0 \text{ mg L}^{-1}$) e 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (138 mg L^{-1}). Em seguida preparou-se uma solução contendo a mistura das triazinas e os metabólitos em uma concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada herbicida. Esta solução foi utilizada para fortificar as amostras e construir as curvas analíticas (faixa de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $800 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela V.6. Parâmetros de análise utilizados por CLAE-EM.

Condições de Análise	
Coluna Analítica	Nova Pak C18, 150 mm x 3,9 mm d.i. e tamanho de partícula de 4 μm .
Coluna de guarda	Nova Pak C18, 20 mm x 3,9 mm d.i. e tamanho de partícula de 4 μm .
Fase Móvel	Acetonitrila:Água (50:50, v/v), pH 3 (CH_3COOH);
Vazão da FM	0,3 mL min^{-1}
Eluição por Gradiente	Solvente A: ACN 100%; solvente B: $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 100:0,1 (v/v). Iniciou-se com 50% de A e 50% de B (18 min), a seguir utilizou 100% de A por 10 min.
Volume de injeção	10 μL
Bomba	binária (modelo LC-10 AS)
Aquisição de Dados	Software Masslynx
Vazão do gás nebulizador	30 L h^{-1}
Vazão do gás nitrogênio (gás secante)	$\sim 300 \text{ L h}^{-1}$
Voltagem do capilar	4000 V
Modo de formação de íons	positivo (íons protonados)
Temperatura da fonte de íons	150 $^{\circ}\text{C}$
Splitter	30 $\mu\text{L min}^{-1}$
Íons selecionados (SIM):	145, 202 e 216

V.2.1.3. Seleção da Fase Móvel

Para realizar a separação das triazinas foi analisada a FM ACN:H₂O nas proporções: 50:50 e 40:60 (v/v). A FM foi testada com uma variação de pH de 3 à 5, sendo que o ajuste em pH 3 com ácido acético resultou em uma melhor retenção das triazinas.

A ordem de eluição e identificação dos picos dos herbicidas foi feita comparando-se os tempos de retenção (t_R) dos herbicidas na mistura com os t_R dos padrões, injetados isoladamente.

V.2.1.4. Preparo da Amostra

A amostra de urina testemunha, após coleta, foi centrifugada, para remoção de possíveis tecidos, e conservada em freezer à -20 °C. Para análise, estas amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas novamente e submetidas ao procedimento de extração EFS, descrito no fluxograma da **Figura V.2**.

V.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.2.2.1. Otimização das Condições Cromatográficas

Uma das etapas no desenvolvimento de uma metodologia analítica é a separação cromatográfica dos analitos (padrões). Dessa forma, realizou-se no LabCrom, um estudo visando obter a melhor FM, pH e vazão para que os herbicidas triazínicos e os metabólitos pudessem ser detectados no UV-Vis, sem a interferência de outros componentes da matriz.

O pH e a variação na composição da FM influem diretamente na resolução dos picos. Avaliou-se a fase móvel em pH baixo, sendo que boa separação e

detectabilidade foi obtida com adição de ácido acético na FM, em pH 3,0. A FM ácida aumenta a ionização das moléculas que possuem caráter básico, melhorando assim a detecção destas substâncias no espectrômetro de massas. Diferentes condições foram testadas e a melhor, em termos de fase móvel, na qual se obteve uma boa separação das triazinas em relação aos interferentes, que eluem no início, está mostrada no cromatograma da **Figura V.9**.

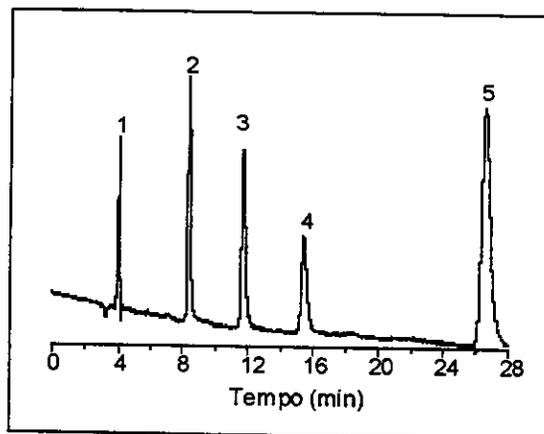


Figura V.9 - Cromatograma obtido na separação da mistura dos herbicidas triazínicos e dois metabólitos por CLAE. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (50:50, v/v), pH 3 (CH₃COOH); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção UV, 220 nm;. Identificação dos picos: 1) 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina 2) simazina 3) atrazina 4) 2-hidróxi-atrazina 5) ametrina.

Visualizando o cromatograma da **Figura V.9**, verifica-se que a separação entre os herbicidas foi muito boa nesta vazão, com exceção da ametrina que se apresentou com cauda e eluiu em um tempo maior por ser um pesticida mais básico, que deve ter tido uma maior interação com os grupos silanóis residuais da FE, ficando mais retida.

Após definir as condições cromatográficas que permitiram uma melhor separação dos pesticidas realizou-se a análise da urina testemunha, branco (**Figura V.10**), para avaliar se os pesticidas co-eluiriam com interferentes da

matriz. Pelo cromatograma pode se observar que o metabólito 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5- triazina (pico 1) elui na região de interferentes. Porém, através do uso de EM no monitoramento SIM foi possível detectar e quantificar este composto, pois seleciona-se o pico de m/z de interesse.

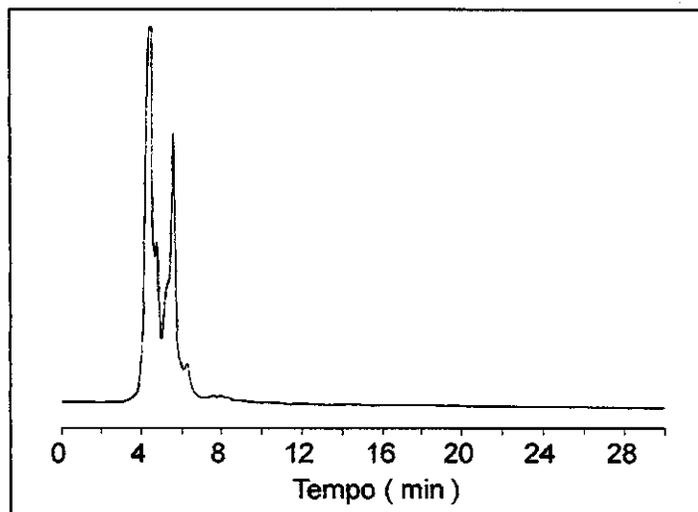


Figura V.10 – Cromatograma do branco da urina testemunha após extração EFS. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (50:50, v/v), pH 3 (CH₃COOH); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção: UV 220 nm.

Foram avaliadas também as condições de separação dos pesticidas utilizando eluição por gradiente, visto que o último pico da ametrina eluiu em tempo de retenção relativamente longo e apresentou um pico largo. Foi testado no cromatógrafo a líquido da Shimadzu, o qual está acoplado ao detector de EM, o seguinte programa de gradiente: solvente A: ACN 100%; solvente B: H₂O:CH₃COOH 100:0,1(v/v). O gradiente iniciou-se com 50% de A e 50% de B, manteve-se durante 18 min nesta condição, em seguida foi a 100% de A por 10 min e retornou as condições iniciais em 5 min.

Não se conseguiu boa repetibilidade para a ametrina e o metabólito 2-hidróxi-atrazina, pois houve degradação das soluções padrão, portanto eles não

foram analisados por CLAE-EM. Para os herbicidas atrazina, simazina e o metabólito 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5 triazina a separação e a repetibilidade das análises foram tão boas quanto as obtidas com as condições pré-estabelecidas no LabCrom com o emprego da eluição isocrática, FM ACN:H₂O (50:50, v/v), pH 3 (CH₃COOH); vazão: 0,3 mL min⁻¹ e detecção: UV 220 nm.

O limite de detecção no EM pode ser melhorado sensivelmente através da otimização da fase móvel e do uso do modo SIM (*Selective Ion Monitoring*). Os íons produzidos de cada herbicida e os íons de maior abundância foram selecionados para quantificação, conforme a **Tabela V.7**.

Tabela V.7 - Íons característicos e íons selecionados para a quantificação dos herbicidas usando o modo de ionização positiva.

Herbicida	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Íons produzidos (m/z)	Íon selecionado para quantificação
2-cloro-4,6- diamino-1,3,5- triazina	145	61, 85, 122, 132, 143, 145, 147	145
Simazina	201	61, 75, 85, 143, 145, 202, 204	202
Atrazina	215	61, 75, 86, 143, 145, 216, 218	216

Apesar da detectabilidade do EM ser maior que a do detector UV/Vis, não foi possível a injeção direta da amostra, sem tratamento prévio. Assim, foi necessário realizar a etapa de pré-concentração, por EFS, descrita no fluxograma da **Figura V.2**, de forma a adequar a concentração do analito à detectabilidade do detector.

V.2.2.2. Validação da Metodologia por CLAE-EM

Pelo emprego da CLAE-EM foram avaliados, através da construção de curvas analíticas, os parâmetros de linearidade na faixa, de 6 a 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os pesticidas 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina, simazina e atrazina. Estes valores estão descritos na **Tabela V.8**. Como pode-se observar, obtiveram-se excelentes coeficientes de correlação, estando todos acima de 0,9998.

Tabela V.8 - Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das triazinas.

Herbicida	Íon	a	b	r	Intervalo de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	selecionado				
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	146	545	448	0,9998	6-800
Simazina	202	3979	1265	0,9999	6-800
Atrazina	216	3915	1355	0,9999	6-800

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear e r = coeficiente de correlação.

A **Tabela V.9** apresenta os limites de detecção e de quantificação, do método de EFS seguido de análise por CLAE-EM, mostrando que os herbicidas apresentaram valores de LD e LQ semelhantes e satisfatórios, pelo fato de pertencerem a mesma classe e os valores obtidos após pré-concentração de 5 vezes.

Tabela V.9 - Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das triazinas.

Herbicida	LD*	LQ*	LD**	LQ**
	($\mu\text{g L}^{-1}$)			
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	2	6	0,4	1,2
Simazina	2	6	0,4	1,2
Atrazina	2	6	0,4	1,2

* valores obtidos para o instrumento;

** valores teóricos obtidos para o método (após pré-concentração de 5 vezes).

Os resultados para as recuperações das triazinas, obtidos por EFS estão apresentados na **Tabela V.10** e variaram na faixa de 82% a 114%, estando dentro do intervalo aceito na literatura [97].

Tabela V.10 - Parâmetros de validação obtidos para as triazinas, após a EFS e análise por CLAE-EM.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão - CV (%)	
			(n=3)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazinas	30	82	0,71	
	60	92	1,9	2,2
	120	101	1,0	
Simazina	10	92	0,65	
	20	102	0,55	0,87
	40	114	0,51	
Atrazina	30	84	2,4	
	60	91	0,64	0,79
	120	100	1,0	

n= número de repetições.

V.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DETECTORES EMPREGADOS

Os resultados de validação para as triazinas, obtidos através de detecção por EM, foram bons quando comparados com os de detecção no UV.

A **Tabela V.11** apresenta uma comparação feita entre os detectores espectrofotométrico de absorvância no UV/Vis de comprimento de onda variável (UV/Vis) e o espectrômetro de massas (EM) em termos de detectabilidade. No detector UV foi usado uma fase móvel alcalina de maneira que os pesticidas foram detectados na forma neutra, apresentando uma retenção adequada, porém um LD elevado. No detector EM foi usado uma fase móvel ácida, que ocasionou a ionização dos pesticidas fazendo com que eles fossem detectados em níveis mais baixos.

O detector de absorção no UV é simples, de custo satisfatório e adequado para análise de pesticidas que possuem grupos cromóforos, entretanto quando comparado ao EM apresenta limites de detecção mais elevados (**Tabela V.11**) e falha, sobretudo, na identificação dos pesticidas. Neste aspecto, o EM constitui em uma ferramenta de alta potencialidade, pois através do seu uso, é possível ter a confirmação da presença dos pesticidas, sendo que ele fornece informações estruturais, o que é de vital importância na análise de amostras reais, tanto biológica como provenientes do meio ambiente. Outra característica bastante atraente no EM é a sua universalidade, podendo analisar qualquer tipo de analito, porém ele também é seletivo, podendo ser ajustado para operar no modo íon seletivo, denominado *Selective Ion Monitoring* (SIM). Estas características são de grande importância na análise de pesticidas, pois a eluição dos mesmos pode coincidir com a dos interferentes, e monitorando o íon do pesticida conhecido torna-se possível a análise, tanto qualitativa quanto quantitativa, demonstrando a seletividade do detector.

As desvantagens do EM em relação ao detector UV é o seu custo elevado e a maior dificuldade em encontrar as condições adequadas para separação e quantificação de pesticida.

Tabela V.11 - Comparação entre os detectores, EM e UV, em termos de detectabilidade

Herbicida	LD-EM-SIM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD-UV ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Atrazina	0,4	2,0
Simazina	0,4	2,6

V.4 – APLICAÇÃO DO MÉTODO

Apesar da CLAE-EM mostrar mais adequada para análise de amostras reais, como não se dispunha deste equipamento no IQ-UNICAMP e o aparelho, no qual foi feito o desenvolvimento do método de CLAE-EM, no IQ-UNESP, Araraquara, não estar disponível, resolvemos fazer a avaliação da urina do grupo controle e estudo, empregando o procedimento esquematizado na **Figura V.1**.

V.4.1. Grupo Controle

Avaliando o cromatograma, **Figura V.11**, obtido após análise da amostra de urina do indivíduo MAG do grupo de controle, observou-se que o mesmo não apresentou níveis detectáveis pela metodologia desenvolvida dos herbicidas triazínicos, cujo aparecimento deveria ocorrer nas regiões marcadas pelas setas.

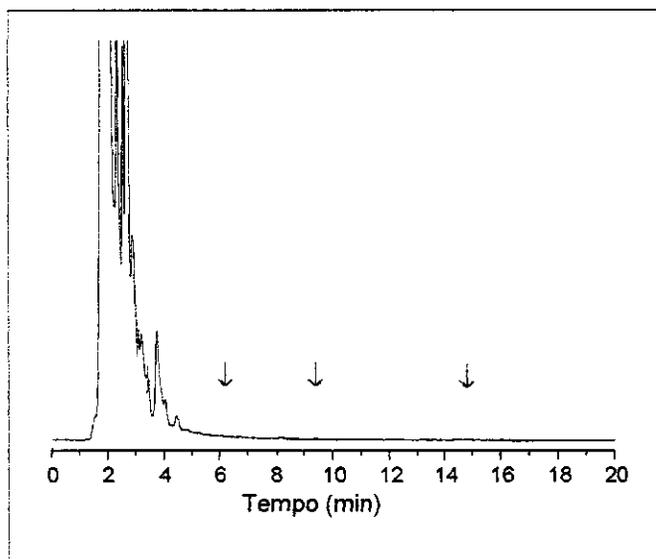


Figura V.11 - Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo MAG, grupo controle, após ELL e CLAE-UV. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v), pH 9 (NH₄OH); vazão: 0,5 mL min⁻¹; detecção: UV 220 nm.;

Os cromatogramas obtidos após análises das amostras de urina dos demais indivíduos do grupo controle foram semelhantes ao da **Figura V.11**.

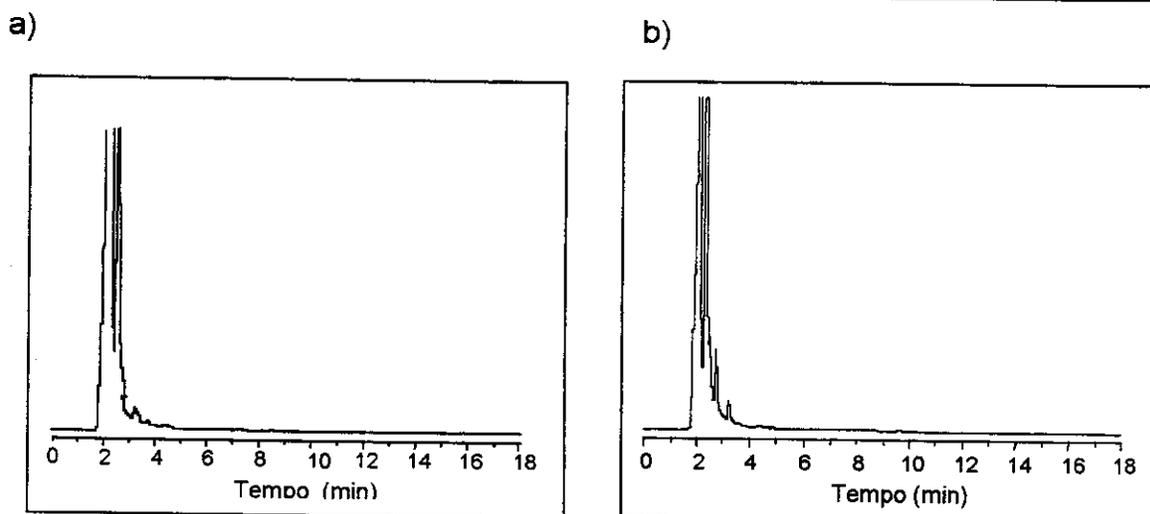


Figura V.12 - Cromatogramas das amostras de urina coletadas do indivíduo PR, grupo estudo, após ELL e CLAE-UV. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições cromatográficas: idem à Figura V.11.

V.4.2. Grupo Estudo

Neste grupo foram avaliadas as amostras de urina coletadas pré e pós-exposição, sendo que, respectivamente nas **Figuras V.12a e V.12b** são mostrados exemplos de cromatogramas obtidos para o indivíduo PR. Para este indivíduo e demais pertencentes ao grupo controle não foi detectada a presença dos herbicidas triazínicos, dentro do limite de detecção do método.

A Figura V.13 mostra que o método desenvolvido é adequado e eficiente, pois quando se fortificou, com $150 \mu\text{g L}^{-1}$ dos herbicidas triazínicos, a amostra de urina do indivíduo PR, pós-exposição, que estava com nível não detectado de pesticidas, Figura V.12, após ELL seguido de CLAE-UV, obteve-se um cromatograma onde se visualiza claramente a presença da simazina, atrazina e ametrina.

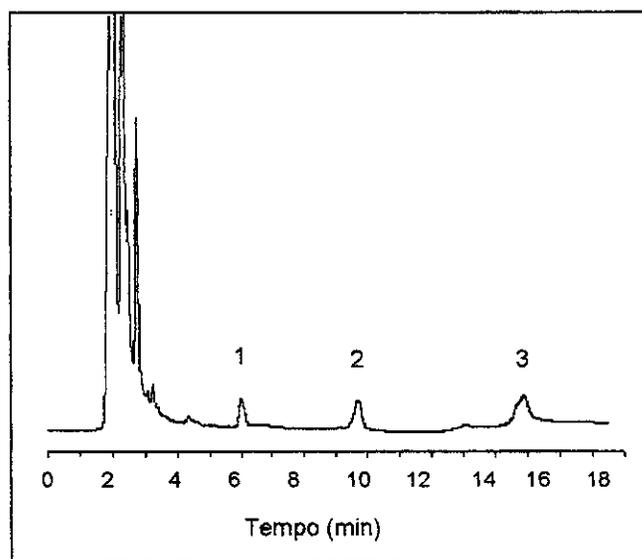


Figura V.13 - Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo PR, grupo estudo (pós-exposição) fortificada com padrões de simazina, atrazina e ametrina, após ELL e CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem a Figura V.11. Identificação dos picos: 1) simazina 2) atrazina 3) ametrina.

V.5 – CONCLUSÕES PARCIAIS

- ✓ Desenvolveram-se metodologias analíticas, devidamente validadas, com o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência e detectores UV e EM, para a determinação de triazinas e alguns de seus metabólitos em urina testemunha.
- ✓ Neste trabalho foram propostas duas técnicas de extração, a ELL e a de precipitação de proteínas seguido da EFS. O tempo gasto na extração ELL foi de aproximadamente 20 minutos. O método, ELL seguido de CLAE-UV, apresentou precisões e recuperações adequadas, para atrazina e ametrina, entretanto para simazina ocorreu perda no procedimento de extração.

- ✓ A EFS quando comparada a ELL foi de execução mais simples e juntamente com a CLAE-UV mostrou parâmetros de validação muito bons para atrazina, simazina e ametrina.

- ✓ O método de detecção influencia nos resultados, sobretudo em relação à detectabilidade, seletividade e identificação. Dessa forma, constatou-se que a detecção por EM, utilizando o modo SIM, em relação à UV é mais seletiva e permite a confirmação dos pesticidas, o que é muito importante em análise de multirresíduos pertencentes a uma mesma classe.

CAPÍTULO VI

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO
DE URÉIAS SUBSTITUÍDAS EM URINA
HUMANA POR CLAE-UV*

VI- DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE URÉIAS SUBSTITUÍDAS EM URINA HUMANA POR CLAE-UV

O emprego da extração em fase sólida (EFS) tornou-se atraente no "clean up" e pré-concentração de analitos devido às suas vantagens. Portanto, nesta parte do trabalho foram desenvolvidas metodologias, baseadas em EFS, para extrair e pré-concentrar os herbicidas uréicos, diuron, linuron e seu metabólito 3,4-dicloroanilina da urina, seguida de determinação por CLAE-UV. Durante o desenvolvimento dos métodos verificou a aplicabilidade da EFS utilizando sorventes C-18 de diferentes procedências e também a potencialidade da coluna cromatográfica de poli(metiloctilsiloxano) imobilizada por microondas, confeccionada no LabCrom, na determinação dos pesticidas.

VI.1. DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS URÉICOS ATRAVÉS DE TUBOS COMERCIAIS E CONFECCIONADOS NO LABCROM PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, SEGUIDA POR CLAE

VI.1.1. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1.1.1. Instrumentação

Estes experimentos foram realizados em um sistema de CLAE-UV, empregando coluna analítica e de guarda comerciais, descritos no item III.3.

VI.1.1.2. Preparo da Solução Estoque

Os padrões dos herbicidas diuron, linuron e seu metabólito 3,4-dicloroanilina estão descritos, quanto a sua procedência e grau de pureza, na **Tabela III.1**. Primeiramente foram preparadas soluções estoques de cada um dos pesticidas, em metanol, nas seguintes concentrações: diuron ($100,9 \text{ mg L}^{-1}$), linuron ($102,8 \text{ mg L}^{-1}$) e 3,4-dicloroanilina ($103,9 \text{ mg L}^{-1}$). A partir destas, foi preparada uma solução padrão, com a mistura dos três herbicidas uréicos, em uma concentração de $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um deles. Partindo da solução padrão, outras soluções de trabalho foram preparadas para fortificar e construir as curvas analíticas, por diluição volume/volume. Essas soluções foram estocadas em geladeira ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durante todo o desenvolvimento e validação do método e permaneceram estáveis por pelo menos três meses.

Os solventes utilizados como constituintes das fases móveis e como solventes extratores e de eluição (acetonitrila, metanol, diclorometano) foram de grau cromatográfico, e o reagente NH_4OH , empregado para ajustar o pH da urina, foi grau PA, com sua procedência descrita no item III.5.

VI.1.1.3. Preparo de Tubos de Extração no LabCrom

O objetivo primordial na utilização de tubos de extração nos quais o sorvente foi preparado no LabCrom foi avaliar o potencial desses materiais, empregando-os na determinação de pesticidas em urina. Esta parte do preparo de sorventes para serem utilizados em EFS foi feito pela pesquisadora Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz em sua tese de doutorado [79], onde propôs a substituição da reação comum com um organoclorossilano pela adsorção do polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), que é um polissiloxano, que atua como fonte das cadeias alifáticas do tipo C-18; por um processo de sorção física dos polímeros sobre a sílica, seguida de imobilização térmica e a eliminação da etapa de capeamento.

Resumidamente, os sorventes para EFS foram preparadas através do recobrimento da sílica, Fluka, de tamanho de partículas de 40 a 60 μm , com uma solução de poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) em pentano. Após agitação de 3 horas e evaporação do solvente orgânico, o sorvente foi submetido a imobilização térmica a 120 $^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. A seguir o sorvente foi extraído com uma sequência de hexano e metanol, em bomba de alta pressão convencional, e, por último, em metanol, usando uma bomba de enchimento a uma pressão de 1000 psi (6,9 MPa).

Os tubos foram confeccionados utilizando uma seringa tipo hipodérmica, com corpo de polipropileno de 5 mL (Ibrasgamma), recheada com 500 mg de sorvente, que ficou retido por meio de dois filtros de polietileno, com tamanho de poros de 20 μm .

VI.1.1.4. Preparação da Amostra

O método de preparo da amostra teve por base a extração em fase sólida (EFS), a qual depende da afinidade da substância a ser extraída com a matriz biológica e com o sorvente e da facilidade de eluição dessa substância com o solvente extrator.

O fluxograma da **Figura VI.1** mostra o procedimento completo de extração adotado onde foram utilizados tubos de EFS comercial, do tipo C-18, de 3 mL, Supelco, e tubos confeccionados no LabCrom. Para a otimização da extração dos compostos uréicos e eliminação dos interferentes endógenos, de forma adequada, foram feitas várias alterações no procedimento de extração, das quais se destacam mudanças no valor de pH da amostra, solvente de eluição e remoção de proteínas.

A simplicidade e eficiência dos métodos de remoção de proteínas e precipitação de outros materiais endógenos na preparação de amostras garantem o seu amplo emprego, de forma isolada ou em conjunto com outros métodos de purificação, por exemplo a EFS.

Como já foi visto anteriormente, a presença de proteínas pode levar a danos na coluna cromatográfica e também pode interferir na quantificação do analito, pois este pode estar ligado a essas proteínas e não ser extraído completamente.

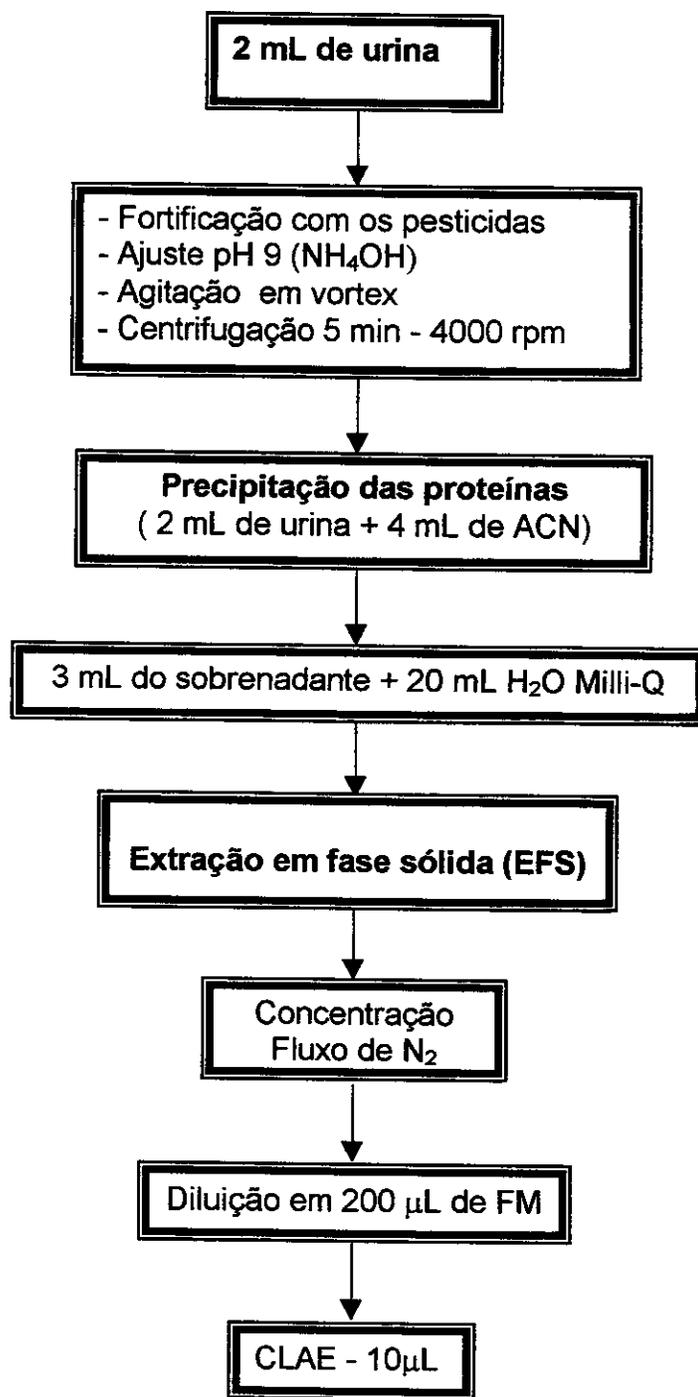


Figura VI.1- Fluxograma completo do tratamento de amostra de urina por EFS e quantificação dos compostos uréicos por CLAE-UV.

Procedimento de EFS

- 1) Condiciona-se o tubo de extração passando-se por ele 10 mL de metanol;
- 2) Equilibra-se o tubo pela passagem de 5 mL de água Milli-Q;
- 3) Força-se a amostra a percolar através do tubo, com o auxílio de uma bomba de vácuo, a uma vazão de 3 mL min⁻¹;
- 4) Lava-se o tubo com 5 mL de água Milli-Q;
- 5) Descarta-se o eluato e seca-se o leito sorvente pela passagem de ar comprimido;
- 6) Elui-se o analito com 3 mL de diclorometano.

VI.1.1.5. Estudo da Estabilidade das Uréias Substituídas em Urina

Testemunha

A estabilidade foi avaliada através da quantificação das uréias substituídas adicionadas na urina testemunhas nos seguintes níveis de fortificação: diuron (30, 120 µg L⁻¹), linuron (50, 200 µg L⁻¹) e o metabólito 3,4-dicloroanilina (100, 400 µg L⁻¹). O procedimento de estabilidade foi feito conforme descrito no item III.8.

A técnica de extração empregada para extrair os herbicidas diuron, linuron e seu metabólito 3,4-dicloroanilina foi a EFS, utilizando tubos de extrações comerciais, seguindo procedimento descrito no fluxograma da **Figura VI.1**.

VI.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

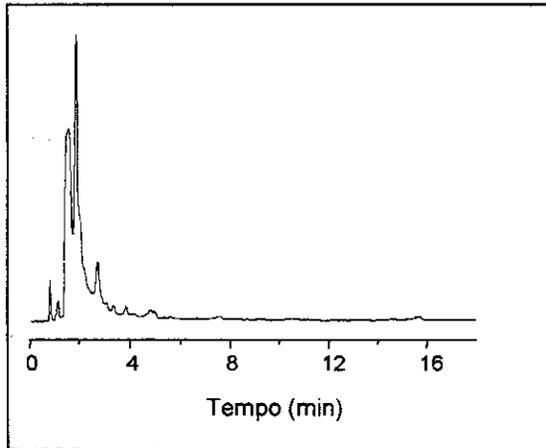
VI.1.2.1. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Utilizando Tubos Comerciais, Seguido de Quantificação por CLAE-UV

A preparação da amostra assume uma grande importância antes da análise, pois é a etapa responsável pela remoção da maioria dos interferentes da matriz. A urina, sendo uma matriz complexa, contendo multi-componentes, podendo ter a interferência de muitos destes compostos no processo de análise, necessita de isolamento seletivo e de pré-concentração. Para que se pudesse obter uma boa seletividade, inicialmente foi proposta uma metodologia analítica que fornecesse condições para uma separação adequada dos herbicidas. Como ponto de partida para o desenvolvimento dessa metodologia foi realizada a precipitação das proteínas com objetivo de eliminar compostos endógenos para que eles não interferissem na detecção dos analitos de interesse [108].

Apesar dos pesticidas selecionados pertencerem a mesma classe e possuírem caráter neutro, foram realizadas extrações variando o pH da matriz para que se pudesse obter uma melhor detecção destas espécies. Diferentes condições foram testadas e a melhor, em termos de simetria de pico, foi obtida com o ajuste do pH da urina igual a 10 (básico). Também foram testadas várias condições de fase móvel, sendo a melhor mostrada na **Figura VI.2**.

A separação obtida, visualizada na **Figura VI.2b**, utilizando como FM ACN:H₂O (40:60, v/v), vazão de 0,8 mL min⁻¹ e detecção UV em 254 nm, foi muito boa, bem como o tempo de análise. Na **Figura VI.2a** tem-se o branco da urina testemunha, onde se verifica que os interferentes não causam problemas na análise dos herbicidas uréicos.

a)



b)

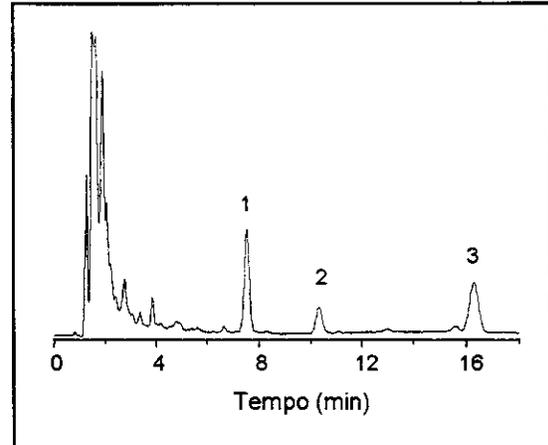


Figura VI.2 – Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração EFS com tubos comerciais C-18. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção: UV, 254 nm. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.

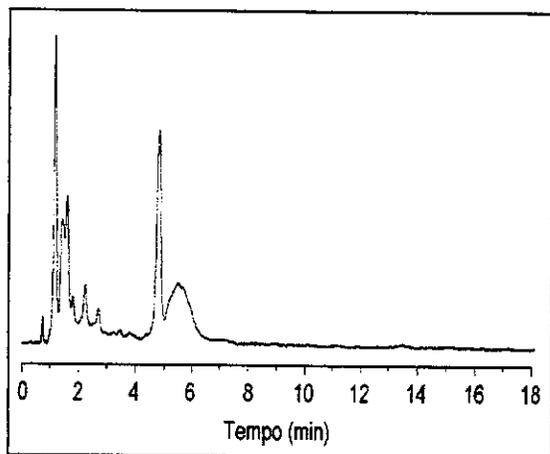
VI.1.2.2. Desenvolvimento do Método por Extração em Fase Sólida Utilizando Tubos Confeccionados no LabCrom, Seguido de Quantificação por CLAE-UV

A extração em fase sólida é um método útil para pré-concentrar os analitos ou mesmo para limpeza de amostras por possuir várias vantagens quando comparada com a ELL, mas como desvantagem os tubos apresentam preços muito altos e, para o Brasil, são importados. Assim, foi proposto um novo processo para obtenção de sorventes C-18, destinados a extração em fase sólida, a fim de tornar mais viável economicamente a aplicação desta técnica.

Os tubos de extração, após serem confeccionados, foram testados para avaliar a sua capacidade de reter os herbicidas como o diuron, linuron e 3,4-dicloroanilina presentes em urina testemunha, seguindo o procedimento de EFS descrito no fluxograma da **Figura VI.1**. A **Figura VI.3** apresenta os cromatogramas obtidos para uma amostra de urina testemunha (branco) e urina fortificada com os herbicidas uréicos.

Os picos dos interferentes que eluíram tanto no branco como na amostra fortificada são provenientes, provavelmente, de interferentes das amostras que não ficaram retidas nos tubos confeccionados no laboratório, uma vez que eles não apareceram na **Figura VI.2**, na qual se utilizou o tubo comercial, entretanto eles não interferem na detecção dos herbicidas em estudo. O composto 3,4-dicloroanilina não apresentou boa repetibilidade e precisão inter-ensaio quando da utilização deste tipo de tubo, dificultando a sua análise quantitativa.

a)



b)

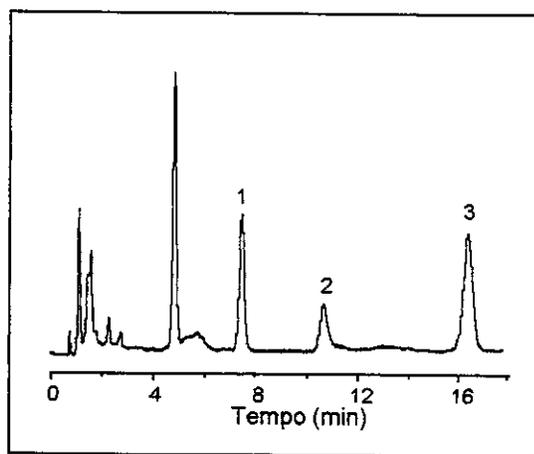


Figura VI.3 – Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração por EFS com sorvente preparado no LabCrom. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção: UV, 254 nm. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.

V.1.2.3. Validação das Metodologias Utilizando Tubos de Extrações Comerciais ou Confeccionados no Labcrom, Seguido de CLAE-UV

A **Tabela VI.1** apresenta os intervalos de linearidade e os parâmetros da curva analítica para as uréias substituídas estudadas. Através dos valores obtidos evidenciou-se uma linearidade boa, com valores excelentes de coeficiente de correlação.

Tabela VI.1 - Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das uréias substituídas utilizando coluna cromatográfica comercial, C-18.

Herbicida	a	b	r	Intervalo de Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron	175,8	62,25	0,9998	30-1000
3,4-dicloroanilina	53,5	32,7	0,9997	100-2000
Linuron	439,5	55,3	0,9999	50-1200

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear e r = coeficiente de correlação.

A **Tabela VI.2** apresenta a detectabilidade dos compostos uréicos quando do emprego da CLAE-UV e a utilização de coluna cromatográfica C-18 comercial. Os valores de limite de detecção foram calculados usando 3 vezes a razão sinal/ruído. Os limites de quantificação foram correspondentes a 10 vezes a razão sinal/ruído.

Tabela VI.2 - Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das uréias substituídas, utilizando EFS, tubo C-18 e coluna cromatográfica C-18 comerciais.

Herbicida	LD* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron	10	30	2,0	6
3,4-dicloroanilina	33,5	100	6,5	20
Linuron	16,5	50	3,5	10

* valores obtidos para o instrumento;

** valores teóricos obtidos para o método (após pré-concentração de 5 vezes).

Os resultados de recuperação em níveis de fortificações de 30, 60 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diuron; de 50, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para linuron e 100, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 3,4-dicloroanilina, obtidos após utilização de EFS com tubos comerciais e confeccionados no LabCrom estão apresentados na **Tabela VI.3**.

Observa-se que existem semelhanças nas recuperações obtidas para o diuron e linuron com o emprego de diferentes tubos de extração, mostrando que o tubo confeccionado no laboratório é tão eficiente quanto ao comercial, podendo ser utilizado na determinação de diuron e linuron, com um custo reduzido de análise. As recuperações do metabólito 3,4-dicloroanilina, usando tubo comercial foram menores que as obtidas para diuron e linuron e, com os tubos confeccionados no LabCrom, não se obteve repetibilidade.

Tabela VI.3 - Recuperações das uréias substituídas, após utilização de tubos de extrações comerciais e confeccionados no LabCrom seguida de análise por CLAE utilizando coluna cromatográfica comercial.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
		(Tubos comerciais)	(Tubos confeccionados no Labcrom)
Diuron	30	91	88
	60	95	89
	120	100	97
Linuron	50	80	80
	100	82	83
	200	88	95
3,4-dicloroanilina	100	50	-
	200	60	-
	400	70	-

As precisões calculadas em termos de repetibilidade ou intra-ensaios, são mostradas na **Tabela VI.4**.

A precisão inter-ensaios foi avaliada em três dias consecutivos. Foram realizadas três extrações para a concentração intermediária sendo injetada três vezes em cada uma das extrações. Os valores de precisões envolvendo sorventes de diferentes procedências apresentaram-se abaixo de 20%, estando dentro da faixa aceitável para amostras biológicas [99]. Os valores obtidos para o diuron e linuron mostram que os tubos confeccionados no LabCrom são competitivos com os disponíveis comercialmente.

O metabólito 3,4-dicloroanilina não apresentou repetibilidade e precisão inter-ensaio quando da utilização de tubo confeccionado no LabCrom, dificultando sua análise quantitativa.

Tabela VI.4 - Valores de precisões obtidos para as uréias substituídas, após a EFS com o sorvente preparado no LabCrom e análise por CLAE utilizando coluna cromatográfica C-18 comercial.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	* Precisão - CV (%) (n=3)		** Precisão - CV (%) (n=3)	
		Intra- ensaios	Inter- ensaios	Intra- ensaios	Inter- ensaios
Diuron	30	1,7		0,85	
	60	1,4	1,0	1,0	1,0
	120	2,0		0,25	
Linuron	50	0,72		1,0	
	100	0,65	0,82	1,2	1,3
	200	1,2		0,85	
3,4-dicloroanilina	100	1,6			
	200	0,42	0,45	-	-
	400	1,2			

n= número de repetições;

* Valores de precisões utilizando tubos comerciais;

** Valores de precisões utilizando tubos confeccionados no Labcrom.

VI.1.2.4. Estudo da Estabilidade das Uréias Substituídas em Urina

Testemunha

O estudo de estabilidade das uréias em urina testemunha foi realizada empregando o método de extração EFS, utilizando tubos de extrações comerciais, seguida de CLAE-UV. Os valores de degradação, obtidos durante 3 semanas com 3 ciclos de congelamento/descongelamento, são mostrados na **Tabela VI.5**.

Tabela VI.5 – Valores de degradação obtidos através do estudo de estabilidade das uréia substituídas durante 3 semanas.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Degradação (%)		
		Semanas		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
Diuron	30	2,5	7,0	15
	120	0,62	6,4	13
Linuron	50	3,2	8,0	10
	200	0,33	2,3	9,7
3,4-dicloronilina	100	Nd	nd-	nd
	400	3,6	10	28

nd: não apresentou detectabilidade.

Pode se observar que os pesticidas estudados diuron e 3,4-dicloroanilina foram estáveis em urina por um período de 2 semanas, sendo que o linuron foi estável por até 3 semanas com variações na concentração igual ou inferior a 10%, conforme literatura [99].

VI.2. DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS URÉICOS ATRAVÉS DE COLUNA CROMATOGRÁFICA CONFECCIONADA NO LABCROM, SEGUIDA POR CLAE-UV

Para que mais um dos objetivos fosse alcançado avaliou-se o potencial de colunas confeccionadas pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) na separação de compostos uréicos em urina.

A preparação de fases estacionárias no LabCrom surgiu com a finalidade de desenvolver uma nova tecnologia baseada no recobrimento da superfície da sílica, por meio da sorção de um polímero, seguido de imobilização, para promover uma maior estabilidade para a fase estacionária. Dessa forma, a preparação da coluna confeccionada no laboratório para a determinação de herbicidas em urina foi trabalho de um aluno de mestrado, Marcos André Kapor que teve por objetivo utilizar um meio de imobilização, até então inédito, a radiação microondas, a fim de obter fase estacionária com alta eficiência, estabilidade química e recobrimento dos grupos silanóis do suporte.

VI.2.1. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DOS HERBICIDAS DIURON, LINURON EM URINA USANDO COLUNA RECHEADA COM FE POLI(METILOCTILSILOXANO)

VI.2.1.1. PARTE EXPERIMENTAL

VI.2.1.1.1. Instrumentação

As análises cromatográficas foram feitas no cromatógrafo a líquido descrito no item III.3.

A coluna cromatográfica utilizada neste trabalho consistiu de um tubo de aço inoxidável, de dimensão de 150 mm x 3,9 mm d.i., recheada, no LabCrom, com fase estacionária preparada a partir de sílica Spherisorb (Phase Separation), 5 µm, não ativada, recoberta com uma carga de 50% de poli(metiloctilsiloxano) PMOS imobilizada em forno de microondas a uma potência de 495 watts, por 900 segundos e extraída com CHCl₃:CH₃OH (30:10 v/v) a uma pressão de 34,5 MPa. Maiores detalhes sobre a preparação da fase estão descritos na referência [109].

VI.2.1.1.2. Preparo de Solução Estoque

O preparo da solução estoque foi feito como descrito no item V.1.1.1.2., com exceção que a solução padrão continha uma mistura dos herbicidas diuron e linuron em uma concentração de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um deles.

VI.2.1.1.3. Preparo da Amostra por EFS Utilizando Tubos de Extração Confeccionados no LabCrom

O preparo dos tubos de sílica (PMODS), para ser utilizado na EFS, está descrito no item VI.1.1.3. Estes cartuchos foram empregados na análise dos herbicidas uréicos usando o procedimento de preparo de amostra já detalhado no item VI.1.1.4.

VI.2.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.2.1.2.1. Otimização de Preparo das Amostras de Urina para Determinação Cromatográfica dos Herbicidas Uréicos

Inicialmente fez-se a precipitação das proteínas, e em seguida avaliou-se o ajuste do pH da matriz (urina testemunha) a fim de que se pudesse obter uma boa seletividade no método a ser empregado. Dessa forma foram realizadas extrações variando o pH da matriz, onde se selecionou o pH básico, que gerou picos mais simétricos. Uma vez acertado o pH da amostra procedeu-se a EFS. A separação obtida, que pode ser visualizada na **Figura VI.4b**, utilizando a FM ACN:H₂O (40:60, v/v), vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção UV em 254 nm, foi muito boa, com tempo de análise satisfatório. Na **Figura VI.4a** tem-se o branco da

urina, onde se verifica que os interferentes não causam problemas na detecção dos herbicidas uréicos.

O tempo de análise poderia ter sido diminuído pelo uso de uma vazão maior ou mudando a composição da FM para ACN:H₂O (50:50, v/v). Entretanto, como havia a intenção de determinar também o metabólito 3,4-dicloroanilina, utilizou a FM descrita acima. A inclusão do metabólito não foi possível devido a falta de repetibilidade nas análises, ocasionada provavelmente porque as fases estacionárias, confeccionadas no LabCrom não são reproduzíveis para amostras básicas, possivelmente devido a sua adsorção nos grupos silanóis residuais.

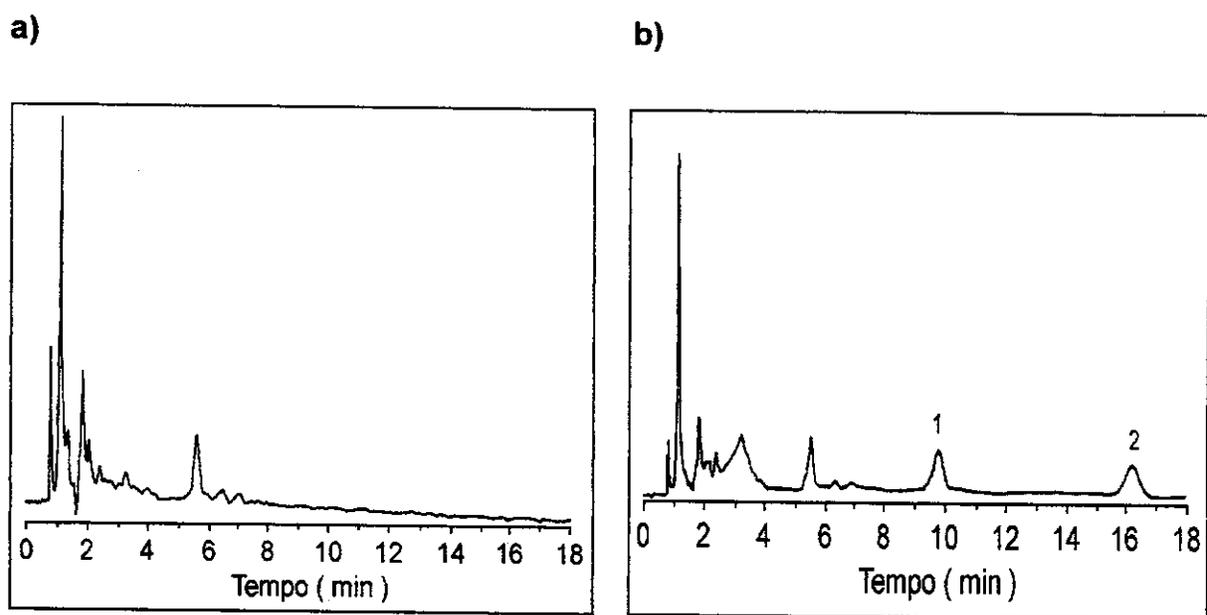


Figura VI.4 - Cromatogramas: a) branco da urina testemunha b) urina testemunha após fortificação e extração EFS com tubos de PMODS confeccionados no LabCrom. Condições cromatográficas: coluna analítica recheada no LabCrom com FE (PMOS) sílica 5 μm ; volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção: UV, 254 nm. Identificação dos picos: 1) diuron 2) linuron.

VI.2.1.2.2. Validação da Metodologia para Análise dos Compostos Uréicos Baseada em Extração em Fase Sólida com Tubos de PMODS e Coluna Cromatográfica de PMOS, Confeccionados no LabCrom

Após estabelecido o procedimento de extração e as condições cromatográficas de análise, mencionadas no item anterior, a próxima etapa foi validar o método desenvolvido.

Os parâmetros de linearidade, obtidos para os compostos uréicos, estão descritos na **Tabela VI.6**. Como pode-se observar, obtiveram-se excelentes coeficientes de correlação, estando todos acima de 0,999 e os intervalos de linearidade foram semelhantes aos conseguidos usando tubos e colunas comerciais.

Na **Tabela VI.7**, são mostradas as detectabilidades, determinadas através dos limites de detecção e quantificação, após EFS e CLAE-UV. Os valores de limite de detecção e de quantificação do método, para os dois herbicidas, foram da mesma ordem de grandeza obtidos ao utilizar os tubos e colunas comerciais (**Tabela VI.2**). Estes valores comprovam a potencialidade dos tubos de extração e colunas cromatográficas confeccionadas no LabCrom.

Tabela VI.6 - Curva analítica e intervalo de linearidade para as soluções padrão das uréias substituídas utilizando coluna cromatografia confeccionada no LabCrom.

Herbicida	a	b	r	Intervalo de Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron	308,5	52,3	0,9998	40-1000
Linuron	13,7	45,5	0,9999	60-1500

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear e r = coeficiente de correlação.

Tabela VI.7 - Valores de limites de detecção e quantificação para as soluções padrão das uréia substituídas, utilizando tubos e coluna cromatográfica confeccionados no LabCrom.

Herbicida	LD* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron	14	40	2,8	8,0
Linuron	22	60	4,5	12

* valores obtidos para o instrumento;

** valores teóricos obtidos para o método (após pré-concentração de 5 vezes).

A Tabela VI.8 mostra os resultados de recuperação das uréias em urina, por EFS utilizando tubos de extrações confeccionados no LabCrom. Elas variaram na faixa de 95% a 103% para diuron e 85% a 100% para linuron, sendo consideradas excelentes.

As precisões intra-ensaios (repetibilidade) e inter-ensaios ou intermediária expressas pelo coeficiente de variação (CV), são mostradas na **Tabela VI.8** e estão dentro do intervalo aceito na literatura.

Tabela VI.8 - Parâmetros de validação obtidos para as uréias substituídas, após a EFS e análise por CLAE-UV, utilizando tubo e coluna cromatográfica confeccionados no LabCrom.

Herbicida	Fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Precisão - CV (%) (n=3)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios
Diuron	40	95	1,8	
	80	99	0,38	1,6
	160	103	1,4	
Linuron	60	85	1,5	
	120	98	0,78	1,0
	240	100	0,37	

n= número de repetições.

VI.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Duas metodologias foram desenvolvidas e validadas utilizando a extração em fase sólida (EFS) com tubos de extração comercial e confeccionado no LabCrom. Quando se utilizaram tubos confeccionados no LabCrom para EFS, bons valores das figuras de mérito foram obtidos para os compostos diuron e linuron, porém o seu metabólito não apresentou boa repetibilidade e precisão inter-ensaio.

Pelo fato que os compostos diuron e linuron podem ser biotransformados em 3,4-dicloroanilina e sendo que bons resultados de validação do método foram obtidos através da EFS com tubos comerciais optou-se por utilizá-lo na análise de amostra reais.

VI.3.1. Grupo Controle

Na **Figura VI.5** está um cromatograma oriundo da urina de um indivíduo do grupo de controle, que apresentou muitos interferentes, possivelmente resultantes da sua própria dieta alimentar. Entretanto, estes interferentes não comprometeram a possível detecção dos herbicidas e seus metabólitos, que deveriam ser detectados nas regiões marcadas com seta.

Ao realizar as análises das urinas dos demais indivíduos pertencentes ao grupo controle não se verificou a presença dos herbicidas estudados em níveis detectáveis pelo método utilizado.

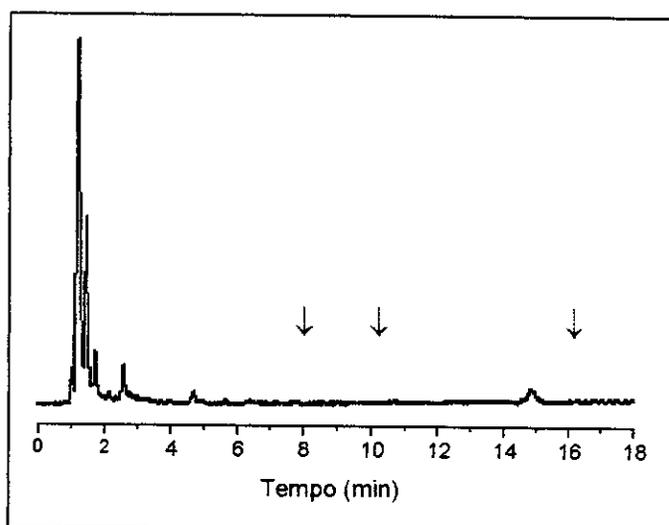
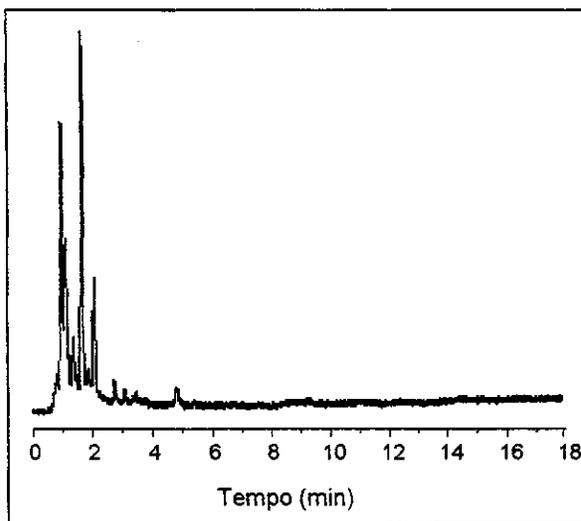


Figura VI.5- Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo AMS, grupo controle, após EFS utilizando tubo comercial. Condições cromatográficas: colunas, analítica e de guarda, Nova Pak C-18 (4 μm); volume de injeção: 10 μL ; FM ACN:H₂O (40:60, v/v); vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção: UV, 254 nm.

VI.3.2. Grupo Estudo

Nas **Figura VI.6a** e **VI.6b** são mostrados os cromatogramas obtidos com as amostras de urina de um indivíduo pertencente ao grupo de estudo. Verifica-se que as regiões onde poderiam aparecer os picos dos herbicidas apresentam-se livres de qualquer sinal, indicando que o indivíduo analisado não se encontra contaminado com os herbicidas analisados nos níveis de detecção da metodologia proposta. Os cromatogramas obtidos para os outros indivíduos do grupo de estudo foram semelhantes ao da **Figura VI.6**.

a)



b)

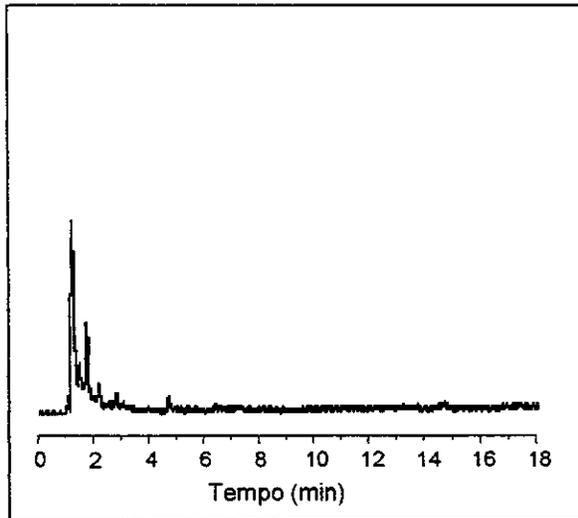


Figura VI.6- Cromatogramas das amostras de urina coletada do indivíduo RJ, grupo estudo, após EFS utilizando tubo C-18 comercial. a) pré-exposição e b) pós-exposição. Condições Cromatográficas: idem à Figura VI.5.

Pelo fato do cromatograma obtido com amostra de urina do indivíduo RJ (pós-exposição) ter apresentado limpo na região de eluição dos pesticidas, fortificou-se a amostra com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões dos herbicidas uréicos e fez a

EFS, seguida de análise por CLAE-UV, usando coluna comercial, para comprovar que o método desenvolvido é eficiente, conforme mostrado na **Figura VI.7**.

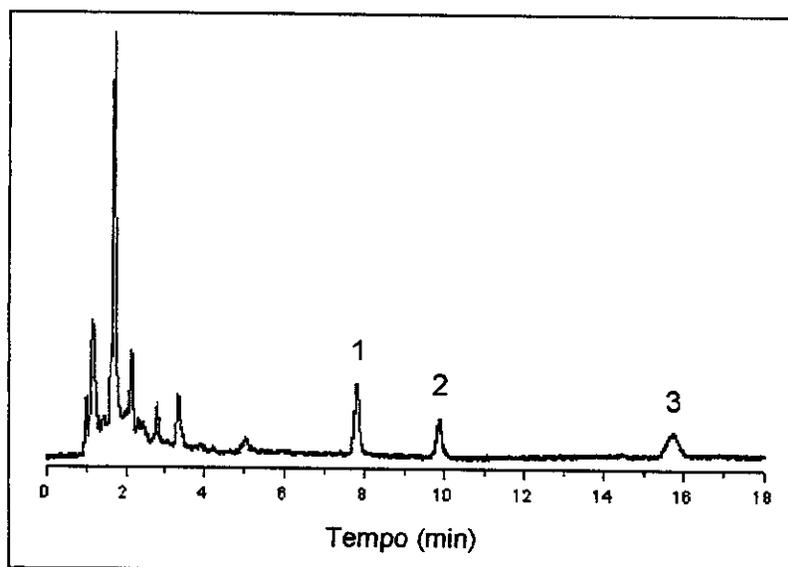


Figura VI.7- Cromatograma da amostra de urina coletada do indivíduo RJ, grupo estudo (pós-exposição), fortificada com padrões diuron, linuron e 3,4-dicloroanilina, extraída com tubos C-18 comerciais, e analisada por CLAE-UV. Condições cromatográficas: idem à Figura VI.5. Identificação dos picos: 1) diuron 2) 3,4-dicloroanilina 3) linuron.

VI.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

- ✓ Os valores de recuperação obtidos usando os dois tipos de tubos para EFS foram bons, mostrando que os tubos confeccionados no LabCrom são competitivos com os comerciais.
- ✓ A coluna recheada com FE de PMOS sobre sílica, imobilizada por microondas, é potencialmente útil na análise de compostos uréicos em urina, podendo concorrer com as comerciais.

- ✓ As metodologias desenvolvidas nesta parte do trabalho, enfatizando o emprego da extração em fase sólida com a utilização de tubos comerciais e confeccionados no LabCrom, as quais apresentaram boas figuras de mérito, podendo ser empregadas na análise de amostras reais.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES FINAIS

VII – CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ Três técnicas de extração foram testadas, a extração líquido-líquido convencional, extração à temperatura sub-zero e a extração em fase sólida. Verificou-se que cada uma delas apresenta as suas vantagens e desvantagens e é impossível selecionar uma única técnica para análise de todas as classes de pesticidas estudados, pois cada um deles tem as suas características físico-químicas que vão influenciar na extração.
- ✓ O ponto comum e positivo em todas as técnicas de extração utilizadas foi a possibilidade de pré-concentrar os pesticidas tomando-os adequados ao nível de detecção disponíveis nos detectores empregados. Este aspecto é muito importante na análise de pesticidas presentes em diversos tipos de matrizes, como água, solo, urina e alimentos onde, normalmente, eles se encontram em níveis baixos de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).
- ✓ Verificou-se que os tubos de PMODS-sílica, confeccionados no LabCrom, embora tenham extraído um maior número de interferentes da urina, que os tubos C-18 comerciais, mostraram-se adequados para extrair e pré-concentrar os herbicidas diuron e linuron. As vantagens apresentadas por estes tubos são menor custo e simplicidade de preparação, visto que um menor número de etapas está envolvido.
- ✓ Duas metodologias foram desenvolvidas, a ELL e EFS para determinação dos herbicidas simazina, atrazina, ametrina, 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina e 2-hidróxi-atrazina em amostra de urina testemunha, sendo que os analitos após extraídos e pré-concentrados através EFS forneceram melhores recuperações em relação a ELL.

- ✓ A coluna de PMOS-sílica, confeccionada no LabCrom, apresentou-se eficiente na separação dos herbicidas diuron e linuron, sendo, neste caso, competitiva com a coluna comercial.

- ✓ No desenvolvimento de metodologias para determinação de pesticidas triazínicos utilizaram-se dois tipos de detectores: o espectrofotométrico de absorção no UV-Vis de comprimento de onda variável e o espectrômetro de massas (EM). Analisando a Tabela V.11 verificou-se que o limite de detecção do EM é cerca de cinco vezes menor do que UV na análise de atrazina e simazina.

- ✓ O uso do detector UV apresenta vantagens na análise de pesticidas conhecidos em uma amostra, pois é de baixo custo, fácil manuseio, menos trabalhoso nas determinações das condições cromatográficas e permite maior liberdade na escolha da fase móvel. Entretanto apresenta deficiência na análise de amostras reais, principalmente, por não possibilitar a confirmação dos pesticidas e nem a análise da pureza do pico cromatográfico.

- ✓ O EM, embora, atualmente, não seja de uso comum nos laboratórios de pesquisa e de indústrias brasileiras, devido ao seu custo elevado, apresenta uma série de vantagens, que, juntamente com o fato do preço do equipamento estar sendo gradativamente reduzido e aperfeiçoamentos estarem sendo introduzidos, em um futuro próximo, estará mais disponível para análises de rotina. As principais vantagens observadas neste detector é o seu caráter tanto universal como seletivo, a possibilidade de determinar a pureza do pico cromatográfico e a confirmação da identidade do analito.

- ✓ Foram desenvolvidas várias metodologias para determinação de resíduos isolados (ou métodos unirresiduais) e de multirresíduos de pesticidas de uma mesma classe, presentes em amostra de urina, empregando

diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatografia líquida de alta eficiência para separação e quantificação. Após a validação destes métodos, conclui-se que eles podem ser utilizados na análise de urina de pessoas expostas ocupacionalmente ou não aos herbicidas auxiliando em diagnósticos e na monitorização de aplicação de medidas terapêuticas no controle dos sintomas causados pela exposição prolongada aos herbicidas estudados.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ROSA, D.H.V.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; FERNÍCOLA, N.A.G.G., *Monitorização biológica da exposição humana a agentes químicos*, FUNDACENTRO, 1991, 67p.
- [2] COVELLO, V; MERKHOFFER, M., *Risk assessment methods: approaches for assessing health and environmental risks*, New York, Plenum Press, 1993, 318p.
- [3] KOTAKA, E.T.; ZAMBRONE, F.A.D., *Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos*, Campinas, SP:ILSI, 2001, 160p.
- [4] BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. *Diário Oficial da União*, de 4/2/92, Brasília.
- [5] World Health Organization, *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1996-1997*, Genebra, IPCS/UNEP/ILO/WHO, 63p.
- [6] LARINI, L., *Toxicologia*, 3ªed., São Paulo, Manole, 1997, 301p.
- [7] SALGADO, P.E.T., *Noções gerais de toxicologia ocupacional*, São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde/Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 1989, 115p.
- [8] OGA, S., *Fundamentos de Toxicologia*, São Paulo, Atheneu, 1996, 515p.
- [9] BOLYGÓ, E.; ATRAYA, N.C., Solid-phase extraction for multi-residue analysis of some triazole and pyrimidine pesticides in water, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **339** (1991) 423.
- [10] HIDALGO, C.; SANCHO, J.V.; HERNÁNDEZ, F., Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection, *Anal. Chim. Acta* **338** (1997) 223.
- [11] BALINOVA, A., Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water, *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 319.
- [12] BALINOVA, A., Solid-phase extraction followed by high-performance liquid-

- chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking-water, *J. Chromatogr. A* **643** (1993) 203.
- [13] ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N., *Guias de Herbicidas*, 2^a ed., Londrina: Fundação do Instituto Agrônômico do Paraná, 1988.
- [14] Pesticide information profiles of extension toxicology network (EXTOXNET), <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html>, 2002.
- [15] LISKA, I.; SLOBODNIK, J., Comparison of gas and liquid-chromatography for analysing polar pesticides in water samples, *J. Chromatogr. A* **733** (1996) 235.
- [16] LARINI, L., *Toxicologia dos Praguicidas*, São Paulo, Sarvier, 1999, 230p.
- [17] RICHARDSON, M.L., *The dictionary of substances and their effects*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, vol.1, 1992.
- [18] SCHVARTSMAN, S., *Intoxicações agudas*, 4^a ed., São Paulo, Sarvier, 1991, p.266.
- [19] MARONI, M., Miscellaneous pesticides, *Toxicology* **143** (2000) 5.
- [20] Strasinger, S.K., *Uroanálise e fluidos biológicos*, 3^a ed., São Paulo, Premier, 1998. 213p.
- [21] www.nsbri.org/Human PhysSpace/focus4/ep.urine.html, 2002.
- [22] GRAFF, S.L., *Análisis de orina - Atlas Color*, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.S., 1983, 222p.
- [23] NUNES, G.S., Análise de inseticidas N-metilcarbamatos em amostras vegetais, empregando técnicas cromatográficas, imunoensaio (ELISA) e biossensores amperométricos., Tese de Doutorado, UNESP, Araraquara, 1999.
- [24] AMBRUS, A.; THIER, H.P., IUPAC reports on pesticides 21 application of multiresidue procedures in pesticides residues analysis, *Pure Appl. Chem.* **58** (1986) 1035.
- [25] PLIMMER, J.R.; HILL, K.R.; MENN, J.J., *Pesticide design: Outlook for the future. Pesticide residues in food: technologies for detection*. Lancaster, Technomic Publishing Co. 1990.
- [26] SAWYER, L.D., *The development of analytical methods for pesticide*

- residues*. Appendix B: Research in Pesticides. Lancaster, Technomic Publishing Co. 1990.
- [27] SEIBER, J.N., *Conventional pesticide analytical methods: Can they be improved?* Lancaster, Technomic Publishing Co. 1990.
- [28] POLETTI, A., Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques, *J. Chromatogr. B* **733** (1999) 47.
- [29] HUBERT, PH.; CECCATO, A.; CHIAP, P.; TOUSSAINT, B.; CROMMEN, J., Preparation des échantillons d'origine biologique préalable à leur analyse chromatographique, *J. STP Pharma Prat.* **9** (1999) 160.
- [30] DRUMMER, O. H., Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis, *J. Chromatogr. B* **733** (1999) 27.
- [31] QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F., Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quím. Nova* **24** (2001) 68.
- [32] PENG, G.W., Analysis of drugs and other toxic-substances in biological samples for pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr.* **531** (1990) 3.
- [33] LEBLANC, G., A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples, *LC-GC* **19** (2001) 1120.
- [34] FALCÓ, P.C.; HERNÁNDEZ, R.H.; CABEZA, A.S., Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples, *J. Chromatogr.* **619** (1993) 177.
- [35] DAY, R.A.; UNDERWOOD, A.L., *Quantitative analysis*, 6^a ed., New Jersey, Prentice-Hall Int. 1991. 685p.
- [36] SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.; GLAJCH, J.L., *Practical HPLC method development*, 2^a ed., New York, John Wiley & Sons, 1997, p.110.
- [37] MAJORS, R.E., Liquid extraction techniques for sample preparation, *LC-GC* **14** (1996) 934.
- [38] FIFIELD, F.W.; KEALEY, D., *Analytical chemistry, Principles and practice*, 4^a ed., Londres, 1995, 560p.
- [39] PARRILA, P.; VIDAL, J.L.M., HPLC determination of pesticides in green

- bean samples after SPE clean-up, *Chromatographia* **43** (1996) 265.
- [40] BARCELÓ, D., Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment, *Analyst* **116** (1991) 681.
- [41] HYÖTYLÄINEN, T.; ANDERSSON, T.; RIEKKOLA, M.L., Liquid chromatographic sample clean-up coupled on-line with gas-chromatography in the analysis of beta-blockers in human serum and urine, *J. Chromatogr. Sci.* **35** (1997) 280.
- [42] FLANAGAN, R.J.; RUPRAH, M., HPLC measurement of chlorophenoxy herbicides, bromoxynil, and loxynil, in biological specimens to aid diagnosis of acute-poisoning, *Clin. Chem.* **35** (1989) 1342.
- [43] SORIANO, C.; GUERRA, J.M.; CARRERAS, D.; RODRÍGUEZ, C.; RODRÍGUEZ, A.F.; CORTÉS, R., Automated analysis of drugs in urine, *J. Chromatogr. B* **687** (1996) 183.
- [44] CLARKE, E.G.C., *Clarke's isolation and identification of drugs*, 2^a ed., London, The Pharmaceutical Press, 1986.
- [45] BEESON, M.D.; DRISKELL, W.J.; BARR, D.B., Isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Anal. Chem.* **71** (1999) 3526.
- [46] VERHEIJ, E.R.; van DER GREEF, J.; LA VOS, G.F.; van DER POL, W.; NIESSEN, W.M.A., Identification of diuron and 4 of its metabolites in human post mortem plasma and urine by LC/MS with a moving-belt interface, *J. Anal. Toxicol.* **13** (1989) 8.
- [47] LORES, E.M.; MEEKINS, F.C.; MOSEMAN, R.F., Determination of halogenated anilines in urine by high-performance liquid-chromatography with an electrochemical detector, *J. Chromatogr.* **188** (1990) 412.
- [48] Van-BOVEN, M.; LARUELLE, L.; DAENENS, P., HPLC analysis of diuron and metabolites in blood and urine, *J. Anal. Toxicol.* **14** (1990) 231.
- [49] VURAL, N.; BURGAZ, S., A gas-chromatographic method for determination of 2,4-D residues in urine after occupational exposure, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **33** (1984) 518.

- [50] MAJORS, R.E., A review of modern solid-phase extraction, *LC-GC*, Suppl. S, (1998) 8.
- [51] CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A., Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole-blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column, *J. Anal. Toxicol.* **16** (1992) 351.
- [52] MCDOWALL, R.D., Sample preparation for biomedical analysis, *J. Chromatogr.* **492** (1989) 3.
- [53] MAJORS, R.E., Sample Preparation for HPLC and gas chromatography using solid-phase extraction, *LC-GC* **4** (1986) 972.
- [54] FONT, G.; MANES, J.; MOLTÓ & PICÓ, Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis in water, *J. Chromatogr.* **642** (1993) 135.
- [55] LISKA, I.; KRUPCIK, J.; LECLERCQ, P.A., The use of solid sorbents for direct accumulation of organic-compounds from water matrices - A review of solid-phase extraction techniques, *J. High Resolut. Chromatogr.* **12** (1989) 577.
- [56] CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A., Semiautomated solid-phase extraction procedure for drug screening in biological-fluids using the aspec system in combination with clean screen of columns, *J. Chromatogr.* **613** (1993) 289.
- [57] LOGAN, B.K.; STAFFORD, D.T.; TEBBETT, I.R.; MOORE, C.M., Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation-exchange solid-phase extraction and high-performance liquid-chromatography with diode-array detection, *J. Anal. Toxicol.* **14** (1990) 154.
- [58] SCHEURER, J.; MOORE, C.M., Solid-phase extraction of drugs from biological tissues, *J. Anal. Toxicol.* **16** (1992) 264.
- [59] CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A., Determination of basic drugs extracted from biological matrices by means of solid-phase extraction and wide bore capillary gas-chromatography with nitrogen phosphorus detection, *J. Anal. Toxicol.* **18** (1994) 150.
- [60] FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A., Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis, *J. Chromatogr. B* **713** (1998) 51.

- [61] CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A., A single column procedure and Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine, *J. Forensic Sci.* **37** (1992) 61.
- [62] WELLS, M.J.M.; YU, L.Z., Solid-phase extraction of acidic herbicides, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 237.
- [63] PICHON, V., Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 195.
- [64] SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B., Determination of organonitrogen pesticides in large volumes of surface water by liquid-liquid and solid-phase extraction using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 217.
- [65] ANDERSON, L.I., Molecular imprinting for drug bioanalysis - A review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay, *J. Chromatogr. B* **739** (2000) 163.
- [66] LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S.J.F., Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis, *J. Chromatogr. B* **689** (1997) 221.
- [67] BJARNASON, B.; CHIMUKA, L.; RAMSTRÖM, O., On-line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment, *Anal. Chem.* **71** (1999) 2152.
- [68] KUMAZAWA, T.; SATO, K.; SENO, H.; SUZUKI, O., Rapid isolation with Sep-Pak C18 cartridges and capillary gas chromatography of triazine herbicides in human body fluids, *Forensic Sci. Int.* **54** (1992) 159.
- [69] LUCAS, A.D.; JONES, A.; GOODROW, M.H.; SAIZ, S.G.; BLEWETT, C.; SEIBER, J.N.; HAMMOCK, B.D., Determination of atrazine metabolites in human urine - Development of a biomarker of exposure, *Chem. Res. Toxicol.* **6** (1993) 107.
- [70] BODALBAI, L.H.; YORKLEY, R.A.; CHEUNG, M.W., Analytical method for the determination of atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in urine by gas chromatography mass selective detection, *J. Agric. Food*

- Chem.* **46** (1998) 161.
- [71] MENDAS, G.; DREVENKAR, V.; ZUPANCIC-KRALJ, L., Solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene sorbent for high-performance liquid or gas chromatographic determination of urinary chloro- and methylthiotriazines, *J. Chromatogr. A* **918** (2001) 351.
- [72] THOMPSON, T.S.; TREBLE, R.G., Solid phase extraction of 2,4-D from human urine, *Chemosphere* **8** (1996) 1515.
- [73] APREA, C.; SCIARRA, G.; BOZZI, N., Analytical methods for the determination of urinary 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in occupationally exposed subjects and in the general population, *J. Anal. Toxicol.* **21** (1997) 262.
- [74] van DER HOFF, G.R.; van ZONEN, P., Trace analysis of pesticides by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* **843** (1999) 301.
- [75] BUDDE, W.L.; BEHYMER, T.D.; BELLAR, T.A.; HO, J.S., Liquid-chromatography mass-spectrometry - An emerging technology for non volatile compounds, *J. Am. Water Works Assoc.* **82** (1990) 60.
- [76] MOYE, H. A., *Analysis of pesticide residues*, New York, John Wiley, 1981, 467p.
- [77] WITTLE, k.; HAJIMIRAGHA, H.; DUNEMAN, L.; BEGEROW, J., Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure, *J. Chromatogr. B* **755** (2001) 215.
- [78] LAWRENCE, J.F.; TURTON, D., High-performance liquid-chromatographic data for 155 pesticides, *J. Chromatogr.* **159** (1978) 207.
- [79] QUEIROZ, S.C.N., " Determinação multirresíduos de pesticidas em água por CLAE com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para extração em fase sólida", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- [80] DAS, K.G. *Pesticide analysis*, New York: Marcel Dekker, 1981, 467p.
- [81] NIESSEN, W.M.A.; van DER GREEF, J., *Liquid chromatography-mass spectrometry: principles and applications*, New York, Marcel Dekker, 1992.

- [82] LEVSEN, K., Mass spectrometry in environmental organic, *Org. Mass Spectrom.* **23** (1988) 406.
- [83] SLOBODNÍK, J.; van BAAR, B.L.M.; BRINKMAN, U.A.TH., Column liquid-chromatography mass-spectrometry-selected techniques in environmental applications for polar pesticides and related-compounds, *J. Chromatogr. A* **703** (1995) 81.
- [84] NIESSEN, W.M.A.; TINKE, A.P., Liquid chromatography-mass spectrometry - General principles and instrumentation, *J. Chromatogr. A* **703** (1995) 37.
- [85] BRUINS, A.P., Mechanistic aspects of electrospray ionization, *J. Chromatogr. A* **794** (1998) 345.
- [86] WATSON, J.T., *Introduction to mass spectrometry*, 3 ed, Philadelphia: New York; Lippincott-Paven, 1997.
- [87] KEBARLE, P., A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrometry* **35** (2000) 804.
- [88] HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V., *Mass Spectrometry: principles and applications*, New York, Masson, 1996, 340p.
- [89] KARASEK, F.W.; HUTZINGER, O.; SAFE, S., *Mass spectrometry in environmental science*, New York, Plenum Press, 1985.
- [90] MAURER, H.H., Liquid chromatograph-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology, *J. Chromatogr. B* **713** (1998) 3.
- [91] HOGENDOOM, E.; van ZONEN, P., Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis, *J. Chromatogr. A* **892** (2000) 435.
- [92] HENION, J.; BREWER, E.; RULE, G., Sample preparation for LC/MS/MS. Analyzing biological and environmental samples, *Anal. Chem. News and Features* (1998) 650 A.
- [93] SWART, M.E.; KRULL, I.S., Validação de métodos cromatográficos, *Pharm. Technol.*, 1998, p.12.
- [94] HUBERT, PH.; CHIAP, P.; CROMEMMEN, J.; BOULAMGER, B.;

- CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; CHEVALIER, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M.C.; LAURENTIE, M.; NIVET, J.C., The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory, *Anal. Chim. Acta* **391** (1999) 135.
- [95] CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S., Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral, *Rev. Bras. Toxicol.* **11** (1998) 1.
- [96] QUATTROCCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.I.A.; LABA, R.F., *Introducción a la HPLC - Aplicación y práctica*, Buenos Aires, Artes Gráficas Farro S.A., cap.12, 1992, p. 301-328.
- [97] JENKE, D.R.; CORPORATION, B.H.; CENTER, W.B.G.S.; LAKE, R., Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters, *Instrum. Sci. Technol.* **26** (1998) 1.
- [98] Guidance for Industry, "Bioanalytical methods validation for human studies", <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, 2002
- [99] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M.C., Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas, *Rev. Farm. Bioquím.* **30** (1994) 49.
- [100] TAYLOR, J.K., *Quality assurance of chemical measurements*, 2 ed., Chelsea, Lewis Publishers, 1987, 79 p.
- [101] ICH Q2A Text on Validation of Analytical Procedures, 1995, Geneva.
- [102] ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, Geneva.
- [103] KRULL, I.; SWARTZ, M., Validation viewpoint, *LC-GC* **15** (1997) 534.
- [104] SHA, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVRAY, I.J.; SKELLY, J.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; MCDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPECTOR, S., Analytical method validation - Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *J.Pharm. Sci.* **81** (1992) 309.

- [105] CAUSON, R., Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion, *J. Chromatogr. B* **689** (1997) 175.
- [106] YOSHIDA, M.; AKANE, A., Sub-zero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* **71** (1999) 1918.
- [107] SACCHERO, G.; APONE, S.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E., Chromatographic behavior of triazine compounds, *J. Chromatogr. A* **668** (1994) 365.
- [108] BLANCHARD, J., Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis, *J. Chromatogr.* **226** (1981) 455.
- [109] KAPOR, M. A., Preparação de fases estacionárias SiO₂ (PMOS), imobilizadas por microondas para cromatografia líquida de alta eficiência, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 2001.

CAPÍTULO IX

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA O GRUPO CONTROLE

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HERBICIDAS EM FLUÍDO BIOLÓGICO "

Nome do voluntário:

Idade:

RG:

Endereço:

Nome do responsável legal (se voluntário menor):

Idade:

RG:

Grau de parentesco:

Prova documental:

Endereço:

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de um estudo para testar um novo método para auxiliar o diagnóstico das intoxicações por pesticidas.

Estou ciente que para participar deste estudo serei submetido a coleta única de 50 mL de urina.

Fui informado que não há necessidade de jejum e que não será administrado nenhum medicamento em meu organismo em decorrência desta pesquisa.

Fui informado que os indivíduos intoxicados por alguns tipos de pesticidas poderão ser beneficiados com esse novo método, porque nos casos de intoxicações é importante a análise de amostras de urina para auxiliar no diagnóstico.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver dúvidas sobre a pesquisa poderei procurar os pesquisadores Joseane Montagner Pozzebon ou Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina S.F. Jardim no Laboratório de Pesquisa em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - LABCROM telefone (019) 3788-3061.

Poderei ainda entrar em contato com a Secretaria de Comitê de Ética em Pesquisa para alguma reclamação pelo telefone (019) 3788-7232.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo, e recebi esclarecimento sobre minhas dúvidas oralmente.

Campinas, _____ / _____ de 2001.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável legal

Joseane Montagner Pozzebon
Química - Pesquisadora responsável
Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- LABCROM -

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA O GRUPO DE ESTUDO

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HERBICIDAS EM FLUÍDO BIOLÓGICO"

Nome do voluntário:

Idade:

RG:

Endereço:

Nome do responsável legal (se voluntário menor):

Idade:

RG:

Grau de parentesco:

Prova documental:

Endereço:

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de um estudo para testar um novo método para auxiliar o diagnóstico das intoxicações por pesticidas.

Estou ciente que para participar deste estudo serei submetido a coleta única de 50 mL de urina.

Fui informado que não há necessidade de jejum e que não será administrado nenhum medicamento em meu organismo em decorrência desta pesquisa.

Serei beneficiado com esse estudo porque nos casos de intoxicações é importante a análise de amostras de urina para auxiliar no diagnóstico. Fui informado que terei acesso ao resultado deste estudo realizado.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver dúvidas sobre a pesquisa poderei procurar os pesquisadores Joseane Montagner Pozzebon ou Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina S.F. Jardim no Laboratório de Pesquisa em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - LABCROM telefone (019) 3788-3061.

Poderei ainda entrar em contato com a Secretaria de Comitê de Ética em Pesquisa para alguma reclamação pelo telefone (019) 3788-7232.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo, e recebi esclarecimento sobre minhas dúvidas oralmente.

Campinas, _____ / _____ de 2001.

Assinatura do voluntário exposto

Assinatura do responsável legal

Joseane Montagner Pozzebon
Química - Pesquisadora responsável
Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- LABCROM -