



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
PARA DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIOURÉIA EM
URINA EMPREGANDO HPLC-UV**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Catiucia Souza Vareli

Santa Maria – RS, Brasil

2008

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIOURÉIA EM URINA
EMPREGANDO HPLC-UV**

por

Catiucia Souza Vareli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIOURÉIA EM URINA
EMPREGANDO HPLC–UV**

Elaborada por
Catiucia Souza Vareli

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renato Zanella

(Orientador- Presidente)

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Ionara Regina Pizzutti

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 28 de março de 2008

À Deus, que nunca me desamparou, nos momentos mais difíceis....guiando-me, iluminando meu caminho e dando-me a força e a sabedoria necessárias para prosseguir na busca da realização dos meus sonhos.

Graças, porém, a Deus, que sempre nos conduz em triunfo e, por meio de nós, manifesta em todo lugar a fragrância de seu conhecimento, porque Ele dá sabedoria e da sua boca, vem a inteligência e o discernimento.

II Coríntios 2:14 e Provérbios 2:6

Aos meus amados e queridos pais, Pedro e Cleonice, que apesar de toda a dificuldade enfrentada, sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos. Mesmo em meio às privações, ensinaram-me desde pequena a senda do bom caminho e os bons princípios e valores da vida. Cada momento vivido juntos, está guardado para sempre no meu coração. Dedico este trabalho pra vocês....Em nome de todo o meu amor. Amo vocês!

Ao Meu amado esposo Moacir, que foi o meu amparo, meu baluarte, meu oásis em meio ao deserto de saudades da família e nos momentos mais difíceis, acreditando na minha capacidade, me incentivando a realizar os meus sonhos e que suportou a ausência e a saudade quando estive tão distante! Amorção, você existir é um presente de Deus...Obrigada por tudo. Te Amo!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de poder participar da pós-graduação em química, através da realização deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Ionara Regina Pizzutti pela co-orientação neste trabalho, ajudando-me desde a escolha do tema, assim como em muitas discussões. Por abrir as portas de seu laboratório dando-me a oportunidade de participar do grupo de pesquisa desde o início da iniciação científica, pelos valores compartilhados e pela amizade. Obrigada pelo apoio e por todo o incentivo. Sei que nossa relação vai além do lado profissional, nossa amizade é sincera e real, são amigos como você que fazem a vida valer a pena.

A todos os amigos, que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, especialmente aos amigos Bárbara Noronha, Wagner, Cristiano, Jefferson, Laís e Bárbara Reichert, pela amizade e pela disposição em sempre ajudar. Obrigada pelos momentos de descontração e por ajudarem a proporcionar um ótimo ambiente de trabalho. Que Deus conserve em nosso meio os sentimentos verdadeiros, sem interesse, onde se preza por reais valores e princípios.

À amiga Rosselei, que me apresentou ao grupo de pesquisa, introduzindo-me no mundo científico, obrigada por todo o apoio, amizade e companheirismo, tenho certeza que nossa amizade não ficará por aqui, irá muito além, na eternidade e se Deus permitir nos encontraremos embaixo da árvore da vida.

Aos amigos que sempre me deram força pra continuar meu trabalho na pós, tendo sempre uma palavra de ânimo.

Agradeço as valiosas sugestões encaminhadas pela banca de qualificação, especialmente à professora Solange Garcia, por suas sugestões na área de toxicologia clínica, as quais enriqueceram o trabalho escrito, muito obrigada.

Ao CEPARC, por ter cedido seu espaço físico para a realização da etapa final deste trabalho.

Ao Ademir e a Valéria, pela atenção de sempre e pela simpatia a todos, e a todos os funcionários da UFSM que de alguma forma contribuíram para meus conhecimentos acadêmicos.

Aos meus queridos pais Pedro e Cleonice pelo amor, incentivo e por toda a força. Aos meus sobrinhos Wenderson e Ana Caroline por entenderem mesmo sendo tão pequenos o porque da tia estar tão longe e não poder passar mais tempo

juntos. Aos meus queridos irmãos Solange, Ênio e Joaquim, saibam que apesar da distância que nos separam, vocês estão sempre pertinho de mim, em um lugar muito especial, em meu coração. Obrigada pelo amor, amizade e pelo incentivo. Amo vocês. A minha sogra Ignês, e minhas cunhadas Dione e Nelci por todo o incentivo.

Ao Pablo, por todo amor, carinho, cuidado e apoio desprendido. Obrigada, meu amor, por estar sempre ao meu lado e me ajudar a realizar os meus sonhos. Você é a prova viva de que Deus não errou ao criar o homem, pois é um exemplo de bondade, humildade e um exemplo pra mim. Te Amo.

À Deus pelo dom da vida. Tu és o meu Senhor e o que tenho de bom vem de Ti. Minha vida está em tuas mãos, feliz é o meu coração. Obrigada Senhor por esta conquista e por todas as maravilhas que Tu realizaste em minha vida e pelas queridas pessoas que Tu colocaste no meu caminho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIOURÉIA EM URINA EMPREGANDO HPLC–UV

Autora: Catiucia Souza Vareli
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 28 de março de 2008

Para atender a demanda mundial por alimentos, é essencial o emprego de pesticidas para proteger as culturas contra doenças e pragas, mas o uso imprudente e indiscriminado destes compostos pode resultar em contaminação dos alimentos e seus derivados, bem como no ambiente como um todo, aumentando, dessa forma, a preocupação em relação ao emprego dos pesticidas. Os pesticidas etileno-bis-ditiocarbamatos, da classe dos ditiocarbamatos, estão entre os fungicidas mais empregados em todo o mundo para o controle de pragas. Apesar de possuírem baixa toxicidade, um de seus produtos de degradação, a etilenotiouréia (ETU), é um metabólito tóxico, a qual possui efeitos teratogênicos, carcinogênicos, imunotóxicos e mutagênicos.

Neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método cromatográfico para a determinação dos resíduos de ETU em urina, empregando-se extração líquido-líquido e quantificação por HPLC-UV. O procedimento desenvolvido consiste na extração do analito de interesse, com 6 mL de diclorometano, adicionando-se $MgSO_4$ para auxiliar no processo de partição, ou seja, distribuição do composto entre as fases orgânica e aquosa. Posteriormente, centrifugou-se e evaporou-se uma alíquota do sobrenadante em banho de água à 44 °C, redissolvendo-se em água purificada e analisa-se em sistema HPLC, injetando-se 50 µL em coluna C18 com fase móvel MeOH:H₂O (10:90; v/v) e detecção por absorção de luz em 233 nm.

Para a validação do método avaliaram-se os seguintes parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). O LOD do método foi de 0,05 mg ETU L⁻¹ e o LOQ 0,2 mg ETU L⁻¹. As curvas analíticas apresentaram $r^2 > 0,998$ com linearidade entre 0,05 e 1,0 mg ETU L⁻¹. Os resultados de precisão foram excelentes, com valores de desvio padrão relativo entre 1,7 e 2,7%, e as recuperações foram de 85,6 a 95,4% para 3 níveis de fortificação: 0,05, 0,1 e 0,5 mg ETU L⁻¹.

Através dos resultados obtidos na validação, pode-se concluir que o método é apropriado para determinar resíduos de etilenotiouréia em urina. O método tem várias vantagens como: simplicidade, rapidez, e poder ser executado com equipamentos geralmente disponíveis nos laboratórios. Entretanto, poderia apresentar resultados ainda melhores em termos de sensibilidade, seletividade e confirmação da identidade da ETU, se fosse possível, por exemplo, a utilização de cromatógrafo à líquido acoplado à espectrômetro de massas, onde a pureza dos picos cromatográficos poderia ser avaliada e a detectabilidade poderia ser 3 ordens de magnitude menor (1000 vezes).

Palavras-chave: Pesticidas, Cromatografia, ETU, Ditiocarbamatos, Urina

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Programa de Post-Graduation in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DEVELOPMENT AND VALIDATION METHOD FOR THE DETERMINATION OF ETHYLENETHIOUREA IN URINE BY HPLC-UV

Author: Catiucia Souza Vareli
Adviser: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, March 28th, 2008

In order to supply the world-wide demand for food, it is essential to use the pesticides to protect the crops against pests and diseases. But the indiscriminate and injudicious use of these compounds have resulted in widespread contamination in food commodities and environment in all fields, increasing, this way, the preoccupation with chemical products use. Ethylene-bis-dithiocarbamate pesticides, from dithiocarbamate class, are among the most widely used fungicide to control pest. Beside their low toxicity, one of they degradation products, ethylenethiourea, is a toxic metabolite, which have teratogenic, carcinogenic, immunotoxic and mutagenic effects.

In the present work, it was developed and validated a chromatographic method for the determination of ethylenethiourea (ETU) residues in urine, using liquid-liquid extraction and HPLC quantification. The developed procedure consist of the interested compound extraction from urine, with 6.0 mL of dichloromethane, aditioning MgSO_4 to help in the partitioning process, that is, distribution os compound between organic and aqueous phase. After sample centrifugation, a supernatant aliquot was taken and evaporated, in water bath at 44 °C, and the final extract was redissolved in purified water and analyzed by HPLC-UV, injecting 50 μL in C18 column with mobile phase $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:90; v/v) and detection by UV light absorption at 233 nm.

To the validation study of the method, the following parameters were evaluated: detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), precision (under repeatability and reproducibility conditions) and accuracy as recovery. The method LOD was 0.05 mg ETU L⁻¹ and LOQ was 0.2 mg ETU L⁻¹. The analytical curve was linear between 0.05 to 1.0 mg ETU L⁻¹ with determination coefficient $r^2 > 0.998$. Very good precision with RSD between 1.7 and 2.7% was obtained and the recoveries ranged from 85.6 to 95.4% for 3 different spike level: 0,05, 0,1 and 0,5 mg ETU L⁻¹.

The results obtained in the validation step allow us to conclude that the method are quite appropriate to determine residue of ethylenethiourea in urine. The developed method has shown advantages, such as simplicity, quickness and that it could be applied in any laboratory. However, there are some points such as no ETU confirmation nether purity analysis of the chromatographic picks besides the low sensitivity and selectivity of the UV detection that would be much improved using a LC-MS/MS.

Keywords: Pesticides, Chromatography, ETU, Dithiocarbamates, Urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da etilenotiouréia.....	9
Figura 2 – Decomposição dos etileno-bis-ditiocarbamatos e suas prováveis rotas para a formação de Etilenotiouréia (ETU).....	10
Figura 3 – Produtos de degradação da etilenotiouréia (ETU), em meios biológicos e não biológicos.....	21
Figura 4 – Diagrama demonstrando o ruído na linha base e o sinal do LOD e do LOQ para o método cromatográfico.....	38
Figura 5 – Esquema do procedimento de extração das amostras de urina.....	46
Figura 6 – Espectro de absorção molecular da etilenotiouréia em solução (água purificada), na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	49
Figura 7 – Cromatograma obtido por HPLC-UV, através da injeção de solução padrão 1,0 mg ETU L ⁻¹ , nas condições cromatográficas otimizadas, (item 4.1), com tempo de retenção de 4,5 ± 0,03 min..	50
Figura 8 – Cromatograma obtido por HPLC-UV na análise do branco dos solventes e reagentes, nas condições cromatográficas otimizadas, (item 4.1).....	54
Figura 9 – Cromatograma obtido por HPLC-UV na análise da amostra “branco” de urina, conforme condições cromatográficas otimizadas, descritas no item 4.1.....	54
Figura 10– Curvas analíticas em água purificada e no extrato da matriz para etilenotiouréia, nas concentrações de 0,05 a 1,0 mg ETU L ⁻¹ , com as respectivas equações de reta e coeficientes de determinação...	56
Figura 11– Cromatograma obtido por HPLC-UV nas análises das soluções analíticas de ETU, correspondentes ao LOD (a) e ao LOQ (b) do instrumento, nas condições cromatográficas otimizadas (item 4.1).	58
Figura 12– Curva analítica preparada em extrato da matriz, utilizada nos ensaios de fortificação e recuperação, nas concentrações de 0,05 a 1,0 mg ETU L ⁻¹ ,.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas e suas respectivas estruturas químicas.....	8
Tabela 2 – Números de casos de intoxicação humana por agrotóxicos de uso agrícola, registrados de 1996 a 2003, em todas as regiões brasileiras.....	13
Tabela 3 – Classificação toxicológica, cor da faixa presente nos rótulos dos frascos de pesticidas e a Dose Letal (DL ₅₀), segundo a classificação toxicológica.....	18
Tabela 4 – Percentual de resultados insatisfatórios obtidos das amostras analisadas pela ANVISA, no Programa de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos, entre os anos de 2001 a 2006.....	22
Tabela 5 – Condições cromatográficas otimizadas para a separação e quantificação de etilenotiouréia (ETU) em urina.....	48
Tabela 6 – Condições metodológicas otimizadas para a extração de etilenotiouréia (ETU) da urina.....	50
Tabela 7 – Resultados obtidos nos testes de fortificação e recuperação, na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ , empregando-se diferentes volumes de diclorometano (3,0 a 7,0 mL), para a extração de etilenotiouréia da urina.....	52
Tabela 8 – Resultados dos testes de recuperação, empregando-se fluxo de nitrogênio e banho de água, a 44 °C, para a evaporação de etilenotiouréia em solução de diclorometano.....	53
Tabela 9 – Resultados dos cálculos do efeito matriz obtidos no estudo da linearidade, na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mg ETU L ⁻¹ , conforme condições cromatográficas descritas no item 4.1 (n=6).....	56

Tabela 10 – Valores de LOD e LOQ, para a ETU, do instrumento e do método, no sistema HPLC-UV, nas condições cromatográficas descritas no item 4.1.....	57
Tabela 11 – Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e de precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração, conforme as condições cromatográficas do item 4.1.....	58
Tabela 12 – Valores médios de recuperação e $RSD_{rm}\%$ em três níveis de concentração, nos ensaios de fortificação, e análise por HPLC-UV, seguindo as condições otimizadas, conforme o item 4.1.....	59
Tabela 13 – Valores médios de recuperação e $RSD_{rm}\%$ em três níveis de concentração, nos estudos de precisão intermediária, analisados por HPLC-UV, seguindo as condições cromatográficas otimizadas, descritas no item 4.1.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a – Coeficiente angular

AchE – Enzima Acetilcolinesterase

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b – Coeficiente linear

CS₂ – Dissulfeto de carbono

C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano

d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica

DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*

DCM – Diclorometano

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano, do inglês *Dichlorodiphenyltrichloroethane*

DL₅₀ – Dose letal para 50% do grupo em estudo

EBDC – Etileno-bis-ditiocarbamato

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*

EDA – Etilenodiamino

ELL – Extração Líquido-Líquido

EPA – Agência Americana de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

EPI – Equipamentos de Proteção Individual

ETU – Etilenotiouréia

EU – Etilenouréia

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização da Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FPD – Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons

GC-FPD – Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

GC-NPD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Nitrogênio e Fósforo

ha – hectare

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos, do inglês *Photo Diode Array Detector*

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Absorção no Ultravioleta

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, do inglês *The International Agency for Research on Cancer*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

K_D – Coeficiente de Distribuição

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MeOH – Metanol

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

N – Número de medidas

NPD – Detector para Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMOS – Poli(metiloctilsiloxano)

pK – Constante de ionização

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

r^2 – Coeficiente de determinação

REACH – Diretório Geral da Comissão Europeia do Meio Ambiente, do inglês *European Commission, Environment Directorate General*

rpm – Rotações por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi_m} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do método

RSD_{pi_i} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento

RSD_{pi} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD_r – Desvio padrão relativo para repetitividade

RSD_{ri} – Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento

RSD_{rm} – Desvio padrão relativo para repetitividade do método

s – Estimativa do desvio padrão absoluto

S – Sinal

SD – Desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Resíduos para Defesa Agrícola

SINITOX – Serviço Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

t_R – Tempo de retenção de um analito

TSH – Hormônio estimulante da tireóide, do inglês *Thyroid Stimulant Hormone*

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

v/v – volume por volume

x – Concentração do composto em estudo

y – Resposta do detector (área do pico ou valor de absorbância)

λ - comprimento de onda

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE 1** – Avaliação da estabilidade da etilenotiouréia em diclorometano, quando submetida à evaporação sob fluxo de nitrogênio e em banho de água, a 44 °C..... 77
- APÊNDICE 2** – Parâmetros das curvas analíticas obtidas nos estudos de linearidade na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mg ETU L⁻¹ 79
- APÊNDICE 3** – Valores médios de recuperação e RSD_{rm}%, em três níveis de concentração, nos ensaios de fortificação e recuperação e posterior análise por HPLC-UV..... 80

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1** – Características dos princípios ativos pertencentes à classe dos fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, dispostos em ordem alfabética..... 81
- ANEXO 2** – Características do zinebe, fungicida etileno-bis-ditiocarbamato proibido em vários países e não registrado no Brasil, mas muito empregado em várias partes do mundo..... 84
- ANEXO 3** – Características físico-químicas, nomes químicos, sinonímias e nomes comerciais da etilenotiouréia 85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pesticidas.....	4
2.1.1 Ditiocarbamatos.....	6
2.1.2 Etileno-bis-ditiocarbamatos.....	7
2.1.3 Etilenotiouréia.....	9
2.2 Contaminação ambiental.....	11
2.3 Exposição humana aos pesticidas.....	11
2.3.1 Dados de exposição e epidemiológico no Brasil.....	12
2.4 Toxicocinética e metabolismo dos pesticidas.....	14
2.4.1 Absorção dos pesticidas no organismo.....	14
2.4.1.1 Absorção respiratória.....	14
2.4.1.2 Absorção dérmica.....	14
2.4.1.3 Absorção gastrointestinal.....	15
2.4.2 Distribuição no organismo.....	15
2.4.3 Biotransformação, eliminação e excreção.....	15
2.5 Efeitos tóxicos dos pesticidas sobre a saúde.....	16
2.5.1 Toxicologia dos etileno-bis-ditiocarbamatos.....	18
2.5.2 Efeitos tóxicos da etilenotiouréia.....	20
2.6 Monitoramento de resíduos de pesticidas.....	21
2.6.1 Monitorização biológica	23
2.7 Limitações de pesquisas com pesticidas.....	24
2.8 Análise de urina.....	24
2.8.1 Importância.....	24
2.8.2 Formação e composição.....	25
2.8.3 Volume, coleta e manipulação.....	25
2.8.4 Estocagem e descarte.....	26

2.8.5 Tipos de amostra.....	26
2.9 Exigências atuais dos métodos analíticos para amostras biológicas.....	27
2.9.1 Amostragem.....	27
2.9.2 Preparo de amostra.....	28
2.9.3 Extração líquido-líquido.....	28
2.10 Métodos cromatográficos para análise de pesticidas.....	29
2.11 Validação de métodos cromatográficos.....	34
2.11.1 Curva analítica e linearidade.....	35
2.11.2 Especificidade.....	36
2.11.3 Exatidão.....	36
2.11.4 Precisão.....	36
2.11.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Instrumentação.....	39
3.2 Reagentes e solventes.....	39
3.3 Composto selecionado para estudo.....	40
3.4 Preparo das soluções.....	40
3.4.1 Solução estoque de ETU.....	40
3.4.2 Soluções analíticas intermediárias.....	40
3.5 Otimização das condições do sistema HPLC-UV.....	40
3.5.1 Escolha fase móvel e da vazão.....	41
3.5.2 Preparo da fase móvel e ajuste de pH.....	41
3.5.3 Escolha do comprimento de onda.....	41
3.5.4 Volume da alça de injeção.....	41
3.6 Otimização do tratamento da amostra.....	42
3.6.1 Escolha do volume e do solvente de extração.....	42
3.6.2 Adição de sal na extração líquido-líquido.....	42
3.6.3 Avaliação da estabilidade da ETU em diclorometano, quando submetida à evaporação em banho de água e sob fluxo de nitrogênio.....	43
3.7 Procedimento de coleta das amostras “branco” de urina.....	43
3.8 Análise dos solventes e reagentes.....	43
3.9 Análise da amostra “branco”.....	44

3.10 Procedimento de fortificação e extração das amostras.....	44
3.11 Limpeza da vidraria utilizada.....	46
3.12 Validação do método cromatográfico para determinação de ETU em urina.....	46
3.12.1 Curva analítica e linearidade.....	46
3.12.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
3.12.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	47
3.12.4 Recuperação.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Condições cromatográficas otimizadas.....	48
4.2 Extração líquido-líquido.....	51
4.2.1 Adição de sal na extração líquido-líquido.....	51
4.2.2 Escolha do volume e do solvente de extração.....	51
4.3 Avaliação da estabilidade da ETU em diclorometano, quando submetida à evaporação em banho de água e sob fluxo de nitrogênio.....	53
4.4 Análise dos solventes e reagentes.....	53
4.5 Avaliação da amostra “branco”.....	54
4.6 Validação de métodos cromatográficos.....	55
4.6.1 Curva analítica e linearidade.....	56
4.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	57
4.6.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	57
4.6.4 Recuperação.....	59
5. CONCLUSÕES.....	61
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICES.....	77
ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos sempre foi um dos maiores desafios da humanidade. Visando assegurar uma maior produtividade, uma quantidade considerável de pesticidas é empregada em alguma etapa da produção agrícola, quer seja no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita (CAMAROTO, *et al.*, 2004). A liberação do comércio de pesticidas para uso na agricultura elevou rapidamente seu consumo, especialmente de forma indiscriminada, o que se constitui um dos principais problemas de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (WAICHMAN *et al.*, 2007).

O Brasil, com uma extensão territorial de 8,5 milhões de km², tem um grande potencial para a agricultura, e está entre os países que mais utilizam estes produtos químicos, estando em quarto lugar no ranking do consumo mundial, sendo o oitavo no uso por hectare e o maior consumidor na América Latina (SILVA, 2005).

Os pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias usadas para prevenir ou controlar doenças e pragas (ervas daninhas, insetos, fungos), na regulação do crescimento das plantas, ou como desfolhante/desseccante. De acordo com a atividade, classificam-se em herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outros (RAMOS & SILVA FILHO, 2004).

Entre os fungicidas encontram-se os ditiocarbamatos, que são compostos organossulfurados, com ação contra um largo espectro de doenças causadas por fungos em muitas culturas agrícolas, abrangendo desde frutas e hortaliças até cereais de grande importância econômica (BLASCO *et al.*, 2004). O consumo mundial destes fungicidas é de aproximadamente 25.000 a 32.000 toneladas por ano (CORSINI *et al.*, 2005).

O principal sub-grupo dos ditiocarbamatos são os etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC), os quais são largamente empregados na agricultura em cereais, frutas, verduras, legumes, vinhedos e culturas de batatas, principalmente em regiões quentes e úmidas (OTHA *et al.*, 1998). Seu extensivo consumo mundial pode ser atribuído a sua baixa toxicidade aguda e sua curta permanência no ambiente. Mancozebe, manebe, zinebe e metiram são os mais empregados em formulações (LAURIA *et al.*, 2006). Os principais produtos da hidrólise e fotólise dos etileno-bis-

ditiocarbamatos são os metabólitos etilenotiouréia (ETU), etilenouréia (EU) e dissulfeto de carbono (CS₂) (GAECIÑUNO *et al.*, 2004a).

Os efeitos tóxicos dos EBDC são normalmente devidos à ETU, contaminante comum nas formulações destes compostos. Os estudos toxicológicos da ETU normalmente apontam efeitos oncogênicos e teratogênicos, carcinomas da tireóide em roedores e tumores de fígado em camundongos, podendo também ser mutagênica em ensaios de avaliação de danos cromossômicos (ELIA *et al.*, 1995).

Os pesticidas são responsáveis por 3 milhões de intoxicações agudas, com 220 mil mortes por ano, a maioria por acidente de trabalho, sendo que 70% ocorre em países em desenvolvimento, os quais empregam aproximadamente 70% dos pesticidas produzidos anualmente (BÉRMUDEZ-SALDAÑA *et al.*, 2005). Entretanto, a maior quantidade de casos de intoxicação e mortes decorrentes da exposição a estes agentes ocorre nos países desenvolvidos (DASGUPTA *et al.*, 2007).

Os pesticidas podem causar intoxicação aguda, subaguda e crônica, e os efeitos sobre a saúde dependem da forma de exposição e das características do produto (OPAS, 2006). Os trabalhadores rurais são os mais expostos aos pesticidas, por estarem em contato diário na sua vida laboral. Além deste grupo, a água, o solo, a vegetação, os animais e a população humana em geral também são vítimas destes agentes, já que seus resíduos podem ser altamente persistentes no ambiente, podendo contaminar um ecossistema durante um longo período de tempo, provocando sérios problemas de saúde (CAMAROTO *et al.*, 2004).

A monitorização biológica da exposição aos pesticidas, empregando-se métodos validados, tem o potencial de fornecer medidas qualitativas e quantitativas de dose interna, para estimar a exposição integrada, por todas as rotas, e avaliar os riscos à saúde, quando comparado com um padrão de referência apropriado (HE, 1999). Embora poucos, os dados disponíveis em humanos sugerem que a ETU pode ser considerada um biomarcador em monitorização biológica da exposição aos EBDC e seus resíduos (COLOSIO *et al.*, 2002).

Portanto, para construir um estudo epidemiológico e focar uma linha de prevenção, é necessário o desenvolvimento de métodos de análise para quantificar ETU em fluidos biológicos humanos (BALKI *et al.*, 2005). É importante que o método seja adequado para monitorar a exposição total dos trabalhadores e a absorção destes fungicidas por todas as rotas (PRINCE, 1985).

Muitos métodos cromatográficos já foram relatados na literatura para determinação de ETU em alimentos, partículas de ar, bebidas e fluido biológico humano, empregando-se a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) com Detecção por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detection*), Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) e Fotometria de Chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detection*); e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com Detecção Amperométrica, Eletroquímica, por absorção no UV, com Detecção por Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) e por MS (DOERGE & YEE, 1991; BALKI *et al.*, 2005).

Devido a baixa volatilidade da ETU, para que este composto possa ser analisado por GC é necessário uma etapa de derivatização, dificultando sua análise (GARCÍÑUNHO *et al.*, 2004a). Nas análises por HPLC, este procedimento não é necessário, o que torna esta técnica mais apropriada para a quantificação deste composto em amostras biológicas, especialmente quando se emprega fase reversa como fase estacionária, devido à polaridade da ETU, que é altamente polar.

Com base nestas informações, este trabalho objetivou desenvolver e validar um método analítico simples, rápido e eficiente para a quantificação de ETU em amostras de urina, empregando-se HPLC-UV. A urina foi o fluido biológico de escolha pelo fato desta matriz ser de fácil obtenção, ter disponibilidade diária, e principalmente por fornecer informações metabólicas do indivíduo, pois contém os produtos de degradação e metabólitos produzidos no organismo, os quais normalmente são eliminados na urina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas

O emprego de compostos químicos no combate às pragas teve início no século 17, quando se empregou pela primeira vez a nicotina das folhas de tabaco para controlar os insetos das árvores. A partir de 1804, os compostos inorgânicos no estado natural, como o arsênio, chumbo e cobre, foram empregados primeiramente como veneno para as unhas. Em 1860, os sais de cobre e de arsênio foram empregados no controle de besouros em batatas, no Colorado, USA.

Em 1892, os arseniatos de chumbo foram introduzidos como inseticidas inorgânicos, mas a era moderna dos pesticidas sintéticos começou nos anos de 1930 quando as propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foram descobertas por Muller, revolucionando o controle dos insetos no mundo (KAUSHIK & KAUSHIK, 2007).

Os pesticidas englobam uma grande variedade de compostos, incluindo inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, moluscocidas, nematocidas e outros, distribuídos em mais de 1000 substâncias ativas, incorporadas em torno de 35.000 preparações (RAMOS & SILVA FILHO, 2004; HE, 1999).

Nos Estados Unidos, existem mais de 21.000 pesticidas com mais de 900 ingredientes ativos em uso (QUACKENBUSH *et al.*, 2006; BARR & NEEDHAM, 2002), e aproximadamente 426 milhões de kg de ingredientes ativos de pesticidas são aplicados anualmente nas terras de agricultura (QUACKENBUSH *et al.*, 2006).

Estes compostos são utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário; na construção de estradas; tratamento de madeiras para construção; armazenamento de grãos e sementes; produção de flores; como domissanitários no combate às endemias e epidemias etc. Enfim, os usos dos pesticidas excedem em muito aquilo que comumente se reconhece (SILVA *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), a utilização dos pesticidas na agricultura iniciou na década de 20, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a segunda guerra mundial foram

utilizados como arma química, tendo seu uso expandido desde então, chegando a produção industrial a atingir dois milhões de toneladas por ano (OPAS, 1997).

No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, sendo empregados mais intensivamente na agricultura a partir de 1960 (OPAS, 1997; WAICHMAN *et al.*, 2007). Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento, investiu mais de 200 milhões de dólares para implementar a indústria dos pesticidas, abrindo o comércio destes agentes no país, condicionando o agricultor a comprá-los com recursos do crédito rural, instituindo a inclusão de uma cota definida para cada financiamento requerido.

O cenário silencioso da ditadura militar e a falta de informações sobre os efeitos da então “maravilha química”, contribuíram para a ampliação de sua venda, sem qualquer debate público sobre os seus perigos e riscos para a saúde das populações expostas e para o ambiente (OPAS, 1997; CAMAROTTO *et al.*, 2004).

Em 1989, o governo brasileiro promulgou a lei 7.802, para restringir os riscos associados com os pesticidas, instituindo várias condições e critérios para uso, venda, transporte, importação, propaganda e rotulagem destes compostos. Além disso, os agricultores foram forçados a obter a prescrição para adquirirem legalmente os pesticidas. Embora fosse um passo positivo, esta ferramenta foi ineficaz por causa da fraca aplicação e monitoramento, especialmente nas áreas mais remotas do país, onde muitos agricultores dependem principalmente do rótulo dos produtos para obter informações sobre dosagens, danos, toxicidade e cuidados na manipulação (WAICHMAN *et al.*, 2007).

Apesar dos risco, os gastos mundiais com pesticidas crescem continuamente, passaram de US\$ 20 bilhões em 1983 para US\$ 34,1 bilhões ao longo dos anos 90 (SILVA *et al.*, 2006). No Brasil, este mercado triplicou nos últimos anos. Em 2006, o comércio totalizou 3,920 bilhões de dólares, de acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG).

A comercialização de fungicidas movimentou em 2006, US\$133,9 milhões apenas em São Paulo, o que correspondeu a 12.875 toneladas de produto comercial e 7.051 toneladas de ingrediente ativo. As principais culturas agrícolas que empregaram fungicidas foram: café, soja, batata-inglesa, trigo, feijão e tomate. A previsão do setor para 2007 era de aumento das vendas em torno de 10%, sendo que já no primeiro trimestre, houve um incremento na comercialização de herbicidas, inseticidas e fungicidas (SINDAG, 2007).

Atualmente, o Brasil está em quarto lugar a nível mundial em utilização de pesticidas, com mais de 300 milhões de toneladas de produtos em formulações, estando em oitavo lugar no uso por ha. Em âmbito nacional, o emprego de pesticidas nos Estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins representa atualmente 70% do total utilizado no país (DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2007).

2.1.1 Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos (DTC) são compostos orgânicos sulfurados derivados do ácido bisditiocarbâmico. Seus sais vêm a ser o 1,2-bisditiocarbamatos, dependendo do nome químico comum do fungicida, do grupo químico (metil, etil, etc.) e do metal envolvido (FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, 2001). A maioria dos DTC, entre eles mancozebe, tiram, manebe, ferbam, ziram e zinebe, foram desenvolvidos no início da década de 1930 e 1940, e até os dias atuais são largamente empregados tanto sozinhos quanto combinados com outros fungicidas nas formulações (WARE, 1994).

São os fungicidas mais utilizados em todo o mundo, com ação contra aproximadamente 400 patógenos. Também são os mais frequentemente detectados em programas de monitoramento mundial (BLASCO *et al.*, 2004). De acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) no Brasil, em 2005, 21,6% das amostras analisadas continham níveis de resíduos detectáveis dos DTC, com 13,1% de amostras positivas (CALDAS *et al.*, 2006).

Seu emprego é permitido para mais de 70 culturas nos EUA (ZHOU *et al.*, 2004) e em todos os países membros da União Européia (BLASCO *et al.*, 2004; GARCINIÑO *et al.*, 2004b). No Brasil, cinco compostos (mancozebe, manebe, metiram, propinebe e tiram) estão registrados para uso em 39 culturas de consumo humano (CALDAS *et al.*, 2004; SZOLAR, 2007).

São empregados na indústria como aceleradores e anti-oxidantes na produção da borracha e açúcar; como antifúngicos nos sistemas de refrigeração de águas. Apesar dos efeitos tóxicos, alguns DTC possuem atividade farmacológica, sendo efetivos no tratamento contra o alcoolismo, como o dissulfiram, e na terapia de quelação, nas intoxicações com metais. Outros DTC estão sendo testados em triagens clínicas para várias indicações, incluindo no tratamento do câncer e no tratamento do HIV (SZOLAR, 2007; ATASANOV *et al.*, 2003).

A metodologia analítica aplicada em muitos laboratórios para se analisar ditiocarbamatos em alimentos não discrimina entre os compostos empregados nas culturas. Os resultados são então expressos em termos de dissulfeto de carbono (CS_2), que é derivado de qualquer DTC presente (SZOLAR, 2007). Embora todos os ditiocarbamatos produzam CS_2 *in vivo*, apenas o ziram (não registrado no Brasil) e o tiram demonstraram agir por um mecanismo comum de toxicidade de patologias via CS_2 (CALDAS *et al.*, 2006).

2.1.2 Etileno-bis-ditiocarbamatos

Os EBDC, principal subgrupo dos ditiocarbamatos, são empregados na agricultura há mais de quarenta anos como fungicidas não-sistêmicos, controlando grande espectro de fungos, principalmente em regiões quentes e úmidas. São indicados para uso em ampla variedade de cereais, frutas, verduras e legumes. Sua aplicação mundial extensiva pode ser atribuída a sua baixa toxicidade aguda e sua curta permanência no ambiente (CORSINI *et al.*, 2005; GARCÍÑUNO *et al.*, 2004a).

Entretanto, os efeitos adversos deste grupo de fungicidas sobre a saúde humana são preocupantes, especialmente aqueles relacionados à mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade (GRISOLIA, 1995; GARCÍÑUNO *et al.*, 2004a). Manebe, mancozebe, zinebe e metiram pertencem ao grupo dos EBDC (CALDAS *et al.*, 2006; CORSINI *et al.*, 2005; WHITE & OPPIN, 2004).

Todos os EBDC possuem um esqueleto orgânico comum: $C_4H_6N_2S_4$, é a adição de um íon metálico que define o composto. Além das estruturas químicas semelhantes; possuem função similar, podem gerar dissulfeto de carbono, ser metabolizados à ETU e quelar íons metálicos fisiológicos, como o cobre.

As estruturas químicas dos etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas, estão representadas na Tabela 1 (CALDAS *et al.*, 2004; ATASANOV *et al.*, 2003). As demais propriedades físico-químicas destes compostos, encontram-se no Anexo 1. Para o zinebe, composto não registrado no Brasil, suas características e estrutura química encontram-se no anexo 2.

Tabela 1 – Etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas e suas respectivas estruturas químicas.

Etileno-bis-ditiocarbamato	Fórmula Estrutural
Mancozebe	$\left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{---S---C---N---CH}_2\text{CH}_2\text{---N---C---S---Mn}^{++} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \quad \text{S} \end{array} \right]_x (\text{Zn})_y$
Manebe	$\left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{---S---C---N---CH}_2\text{CH}_2\text{---N---C---S---Mn}^{++} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \quad \text{S} \end{array} \right]_x$
Metiram	$\left[\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---NH---C---S---} \\ \quad \quad \quad \text{S} \\ \text{CH}_2\text{---NH---C---S---Zn} \\ \quad \quad \quad \text{S} \quad \uparrow \\ \text{NH}_3 \end{array} \right]_3 \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---NH---C---S---} \\ \quad \quad \quad \text{S} \\ \text{CH}_2\text{---NH---C---S---} \\ \quad \quad \quad \text{S} \end{array} \right]_x$

O manebe é um composto orgânico que contém um íon Mn, é rapidamente degradado a ETU na presença de água e oxigênio (DOMICO *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2004). O mancozebe é estruturalmente semelhante ao manebe, mas contém ambos Zn e Mn. Entre os fungicidas é o que detém registro para praticamente todas as frutas e hortaliças, sendo empregado para proteger frutas, vegetais e árvores ornamentais, contra doenças fúngicas (CALVIELLO *et al.*, 2006). A estimativa mais recente é que 1.360,8 toneladas de manebe e 3.764,8 toneladas de mancozebe são aplicadas anualmente nos EUA (DOMICO *et al.*, 2006).

O zinebe é amplamente empregado como fungicida foliar e é registrado para uso em grande número de frutas, vegetais e várias culturas; também para plantas ornamentais e no tratamento de sementes; como moldes controles nas fábricas de couro, linho, pinturas superficiais; papéis e superfícies para serem pintadas; superfície de plásticos e madeiras. É estruturalmente semelhante ao manebe, contendo o zinco no lugar de manganês (GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Seu uso foi

proibido nos EUA em 1991, mas ainda é amplamente utilizado a nível mundial (FITSANAKIS *et al.*, 2002).

Estes fungicidas são classificados pela Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) como carcinogênicos do tipo B2, isto é, comprovadamente carcinogênicos para animais de laboratório e suspeitos para o homem. Os testes de carcinogênese experimental em roedores apresentaram resultados positivos para a tireóide, mas em nível de epidemiologia os dados ainda são inconclusivos (GRISOLIA, 1995; FUSTIONE *et al.*, 2005).

O EPA tem evidências suficientes, por estudos realizados com animais de laboratório, de prováveis efeitos cancerígenos em humanos causados pelo manebe, zinebe e mancozebe (FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, 2001).

2.1.3 Etilenotiouréia

A etilenotiouréia (Figura 1) é o principal produto de degradação dos EBDC (FAO, 1993). Sua absorção ocorre pela pele, pelo trato gastrointestinal e mais provavelmente pelo trato respiratório, acumulando-se na glândula tireóide, sendo mais de 90% excretada na urina, com pequenas quantidades nas fezes e pela exalação.

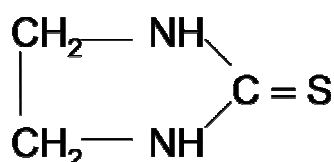
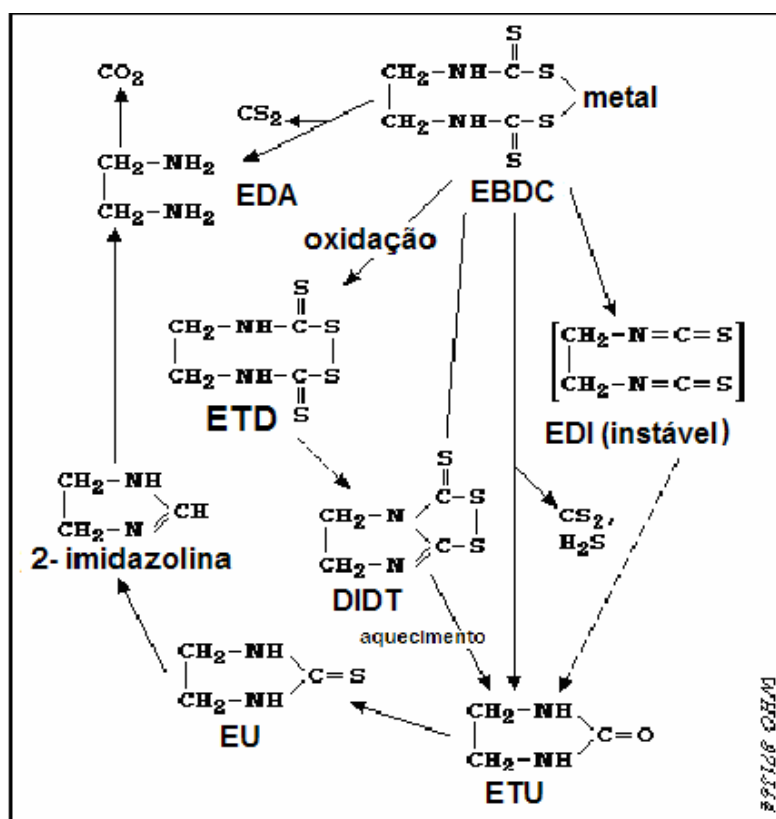


Figura 1: Fórmula estrutural da etilenotiouréia (ETU)

Em mamíferos, nas plantas e no ambiente, a ETU é metabolizada em etilenodiamino (EDA), uréia, dióxido de carbono, ácido oxálico, ou é transformada em derivados imidazóis (WHO, 1988). Pode ser estar presente em quantidades traços em todas as formulações comerciais dos EBDC (COLOSIO *et al.*, 2002), podendo ser formada a partir dos EBDC depositados nas superfícies das culturas tratadas com estes fungicidas, sendo este processo bastante acelerado na presença de água, chegando a atingir níveis de 20% (FAO 1993; GRISOLIA, 1995).

Outro modo de formação da ETU é durante o processamento de sucos, purê, polpas, massas etc, utilizando frutas e hortaliças que são produzidas empregando-se os EBDC. As diferentes rotas de decomposição dos EBDC para a formação da ETU estão demonstradas na Figura 2 e suas demais características encontram-se listadas no anexo 3.



FONTE: WHO, 1988.

Figura 2 – Decomposição dos etileno-bis-ditiocarbamatos e suas prováveis rotas para a formação de Etilenotiouréia (ETU).

A importância da qualidade da formulação aplicada às culturas levou vários países a impor limites para a ETU permitida nas formulações comerciais dos EBDC. Os limites máximos residuais (LMR) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*), até 1993 era de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para as culturas de cenoura, alface, batata e aipo, mas a nova recomendação é a retirada de todos os limites residuais para ETU (FAO, 1993), não havendo limites estabelecidos para a exposição ocupacional, na Holanda, EUA, Alemanha, Inglaterra e em outros países (APREA *et al.*, 2002; DECOS, 1999).

2.2 Contaminação ambiental

Pode-se dizer que dentre todos os problemas advindos com o modelo agrícola ora dominante, a utilização de pesticidas apresenta maior relevância pelos graves problemas de saúde e ambiental que eles provocam (CAMAROTTO *et al.*, 2004). Desde a introdução do uso do DDT, bilhões de kg de ingredientes ativos de pesticidas são distribuídos em todo o mundo, sendo estes os produtos químicos mais freqüentemente liberados no ambiente (CLEMENTI *et al.*, 2007).

A maioria dos pesticidas é importada dos países industrializados, onde estão sob severas regulamentações de uso. Neste contexto, pode-se verificar a grande preocupação da comunidade científica internacional com os efeitos destes compostos químicos sobre o patrimônio genético das populações, em nível de epidemiologia do câncer e das malformações congênitas (GRISOLIA, 1995).

Em vista desses problemas, a utilização de pesticidas é alvo de inúmeras críticas direcionadas à política adotada pelos países que mantêm a liberação dos mesmos, sem um controle rígido, que não investem em pesquisas ou não implementam técnicas alternativas voltadas para a agricultura, que sejam menos danosas à saúde e ao meio ambiente (CAMAROTTO *et al.*, 2004).

2.3 Exposição humana aos pesticidas

Apesar de estarem em conformidade com os níveis máximos de resíduos permitidos, os alimentos são considerados uma constante fonte de exposição. Apenas 60% de todas as frutas e vegetais consumidos pelos cidadãos europeus são livres de resíduos de pesticidas, 36% apresentam resíduos abaixo dos LMR, e 4% estão contaminados acima dos limites permitidos (RIVAS *et al.*, 2007). Todas as pessoas são inevitavelmente expostas aos pesticidas, seja através do consumo de alimentos oriundos da produção agropecuária ou de forma indireta, pela contaminação ambiental (SAIEVA *et al.*, 2004).

A exposição ocupacional de forma direta ocorre em todos os estágios de formulação, manipulação e aplicação dos pesticidas, envolvendo exposição a misturas complexas de produtos químicos, ingredientes ativos e produtos presentes nas formulações técnicas, como impurezas, solventes e outros compostos produzidos durante o procedimento de estocagem (OPAS, 1997; ANVISA 2007).

Relativo à exposição ocupacional, as principais medidas de prevenção recomendadas, estão reduzidas à utilização dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI), pouco aceitos pelos trabalhadores rurais, devido ao desconforto e incômodos que causam, além de seu alto custo, o que dificulta a aquisição.

De acordo com os estudos com animais de laboratório, no mínimo 50 produtos de pesticidas empregados globalmente podem causar câncer (STOPPELLI & CRESTANA, 2005). Segundo a organização mundial de saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) (1990), ocorre aproximadamente 1 milhão de envenenamento involuntário em todo o mundo, e dois milhões de pessoas são hospitalizadas por ingestão involuntária de pesticidas por ano. Além disso, estima-se que 1% dos casos de câncer em humanos nos EUA é devido à exposição aos pesticidas (STOPPELLI & CRESTANA, 2005).

Portanto, este fato constitui-se em um grave problema de saúde pública, demandando intervenção em diversas esferas, inclusive a implantação de um sistema de vigilância de saúde de populações expostas (OPAS, 1997). As ações governamentais, como educação e programas de prevenção, uma regulamentação mais forte e um sistema de informação mais eficiente são essenciais à prevenção de intoxicações pelos pesticidas (RECENA *et al.*, 2006b).

2.3.1 Dados de exposição ocupacional e epidemiológico no Brasil

Estudos realizados no Brasil mostram que os agricultores estão expostos a altos níveis de pesticidas. Um estudo na região de Mato Grosso do Sul relatou altos índices de intoxicações na população rural, entre 1992 e 2002 (RECENA *et al.*, 2006a), outro estudo realizado em distintos estados do Brasil detectou a presença de agrotóxicos no leite materno, assim como apontou a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao uso de pesticidas (OPAS, 1997).

Apesar dos resultados de estudos em laboratório (*in vitro e in vivo*) indicarem o desenvolvimento de danos toxicológicos para vários grupos de substâncias químicas utilizadas, os resultados em humanos são contraditórios. A maioria dos estudos epidemiológicos, se não todos, possuem baixa estimativa da exposição aos pesticidas, confiando na classificação somente pela categoria de exposição a “qualquer pesticida”, e as evidências são limitadas ou inadequadas para apoiar a casualidade para todas as associações examinadas (CLEMENTI *et al.*, 2007).

Atualmente no país, existe o Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX), criado em 1980 pelo Ministério da Saúde, tendo como sede a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), cuja principal atividade é coordenar o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação humana registrados no país. Anualmente, são relatados oficialmente, mais de 500 casos de intoxicações envolvendo os pesticidas empregados na agricultura.

Em 2003, foram notificados 14.064 casos de intoxicações por pesticidas agrícolas, domésticos e raticidas (SINITOX, 2007). Não dispomos de dados que reflitam a realidade de intoxicações e mortes por pesticidas, porém é fácil supor que o problema não é pequeno. O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais e, muitas vezes, requisitos básicos de segurança para a aplicação, armazenamento e a disposição final dos mesmos não são cumpridos.

Segundo dados fornecidos pelo SINITOX, observa-se que ocorreu um aumento gradual dos casos de intoxicações por agrotóxicos, a partir do ano 1999, o que pode ser comprovado pela análise da Tabela 2.

Tabela 2 – Números de casos de intoxicação humana por agrotóxicos de uso agrícola, registrados de 1996 a 2003, em todas as regiões brasileiras.

Região/UF	Nº de Intoxicações Humanas							
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Norte	1	2	70	84	29	25	30	35
Nordeste	656	616	705	348	489	386	465	920
Sul	1535	1648	1557	1508	1496	1880	2047	1657
Sudeste	2356	2904	2596	2463	2788	2811	2760	2978
Centro-Oeste	276	304	340	271	325	282	2289	355
Total	4824	5474	5268	4674	5127	5384	5591	5945

Fonte: SINITOX, 2007.

Apesar das limitações, os Centros de Controle de Intoxicações que compõem o SINITOX são os únicos a formarem um banco de dados no Brasil sobre o registro de intoxicações e envenenamentos em seres humanos (SILVA *et al.*, 2006).

2.4 Toxicocinética e metabolismo dos pesticidas

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

2.4.1 Absorção dos pesticidas no organismo

A absorção de uma substância depende da via pela qual ele penetra no organismo, tais como: a) respiratória, envolve a aspiração de partículas, gases ou vapores; b) dérmica (através da pele) e c) gastrointestinal, após ingestão de alimentos ou água contaminada.

2.4.1.1 Absorção respiratória

A absorção dos pesticidas no organismo humano pela via respiratória ocorre devido ao fato destes encontrarem-se na atmosfera na forma de partículas sub-micrométricas, que facilitam seu acesso por esta via. O contato do sistema respiratório com a atmosfera externa 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 (POZZEBON, 2002).

2.4.1.2 Absorção dérmica

A absorção através desta via é a mais importante, podendo ser mais intensa quando se utiliza formulação oleosa e depende 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: 1) a formação de uma barreira efetiva pela pele, pelo filme lipídico ou pelo suor; 2) uma irritação primária causada pela reação da substância tóxica com a superfície da pele;

3) uma irritação produzida pela combinação da substância tóxica no folículo sebáceo ingressando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, agindo de modo sistêmico (LARINI, 1997; OGA, 1996).

2.4.1.3 Absorção gastrointestinal

Várias características dos pesticidas influenciam na absorção gastrointestinal, destacando-se a constante de dissociação, o grau de lipossolubilidade da forma não ionizada, a solubilidade no pH do estômago ou do intestino, a massa molar e a estabilidade (OGA, 1996).

2.4.2 Distribuição no organismo

Os pesticidas são transportados através do sangue e sua passagem através das membranas celulares depende dos seguintes fatores: Solubilidade, que é 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 com os compostos com baixa lipossolubilidade ocorre o contrário. Grau de ionização: compostos tóxicos, na sua grande 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 (LARINI, 1997).

2.4.3 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.

Essas substâncias possuem graus variados de lipossolubilidade, desde pouco solúveis em lipídios, bastante polares, até pouco polares. As mais polares atravessam as membranas biológicas e são excretadas pelos rins, sendo biotransformadas podendo formar produtos com menor ou sem atividade tóxica.

As menos polares atravessam as membranas biológicas com mais dificuldade. Essas substâncias devem passar por um processo de biotransformação podendo ou não produzir outros compostos mais polares, desprovidos de atividade tóxica que são excretados pelos rins, bile, ar expirado, suor e saliva. Este processo é responsável pela duração da ação e pela concentração destas substâncias no sangue e nos tecidos (LARINI, 1997; OGA, 1996).

2.5 Efeitos tóxicos dos pesticidas sobre a saúde

No final do século 20, o interesse do meio médico e do público em geral aumentou em grande número os estudos experimentais e epidemiológicos relacionados a efeitos adversos desenvolvidos devido à exposição aos pesticidas, incluindo morte fetal, mal-formação intra-uterina e mal-formação congênita (CLEMENTI *et al.*, 2007; BOLOGNESI, 2003).

O diagnóstico das intoxicações por agentes químicos é difícil de ser realizado porque, geralmente, as pessoas estão expostas a vários agentes simultaneamente e o quadro clínico é de difícil caracterização e não faz parte da rotina dos profissionais de saúde (ECKERMAN *et al.*, 2007), requerendo uma avaliação minuciosa a fim de certificar que os achados anormais observados são decorrentes de uma patologia neurológica, podendo ser atribuídos somente à exposição.

Os pesticidas podem causar três tipos de intoxicação: aguda, subaguda e crônica. Na intoxicação aguda os sintomas surgem rapidamente, algumas horas após a exposição por curto período de tempo, a produtos altamente tóxicos. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade do agente tóxico absorvido, com sinais e sintomas nítidos e objetivos (AGROTÓXICO, 2007).

A intoxicação subaguda ocorre por exposição moderada à produtos altamente ou medianamente tóxicos com aparecimento mais lento. Os sintomas são subjetivos e vagos, tais como dor de cabeça, fraqueza, mal-estar, dor de estômago e sonolência. Já a intoxicação crônica caracteriza-se por surgimento tardio, após meses ou anos de exposição pequena ou moderada, a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, acarretando danos irreversíveis, como paralisias e neoplasias.

Vários fatores participam de sua determinação, dentre eles os relativos às características químicas e toxicológicas do produto (forma de apresentação, estabilidade, solubilidade, presença de contaminantes e solventes), fatores relativos

ao indivíduo exposto (sexo, idade, peso, estado nutricional), condições de exposição ou condições gerais do trabalho (frequência, dose, formas de exposição).

As características clínicas das intoxicações por agrotóxicos dependem também do fato de ter ocorrido exposição a um único tipo de produto ou a vários deles. Nas intoxicações agudas decorrentes do contato/exposição a apenas um produto, os sinais e sintomas clínico-laboratoriais são bem conhecidos, o diagnóstico é claro e o tratamento definido, o mesmo não pode ser dito em relação às intoxicações crônicas onde o quadro clínico é indefinido (ECKERMAN *et al.*, 2007).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, do inglês *The International Agency for Research on Cancer*) revisou o potencial carcinogênico de vários inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros compostos similares; deste estudo, 56 pesticidas foram classificados como carcinogênicos para animais de laboratório.

A cada ano, ocorre no mundo, três milhões de casos de intoxicação por pesticidas, próximo a 220.000 casos fatais, a maioria em países desenvolvidos (BOLOGNESI, 2003). A WHO estima que haja 50 casos de intoxicações para cada caso relatado e publicado, ou entre 1 a 5 milhões de trabalhadores na agricultura por ano (DASGUPTA *et al.*, 2007).

A classificação toxicológica dos pesticidas no Brasil está a cargo do Ministério da Saúde. A legislação federal regulamenta que os rótulos dos pesticidas devem possuir uma faixa colorida indicativa de seu grupo. Esta classificação é fundamental para o conhecimento da toxicidade do produto e instituição de tratamento específico. Além desta classificação, podem se classificar também, de acordo com seu poder agudo de toxicidade, em relação a Dose Letal (DL_{50}), que é a dose necessária para matar 50% de uma população de estudo em um período de 14 dias.

A Tabela 3 apresenta os dados de dose letal, segundo a classificação toxicológica e as cores presentes nos rótulos dos frascos de formulações de pesticidas, de acordo com a legislação brasileira (CAMAROTTO *et al.*, 2004; OPAS, 1997).

Tabela 3 – Classificação toxicológica, cor da faixa presente nos rótulos dos frascos de pesticidas e a Dose Letal (DL₅₀) segundo a classificação toxicológica.

Toxicidade	Classificação	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Dose letal para uma pessoa adulta
Extremamente tóxicos	Classe I – Faixa vermelha	< 5	1 pitada a algumas gotas
Altamente tóxicos	Classe II – Faixa amarela	6 - 50	Algumas gotas a 1 colher de chá
Mediamente tóxicos	Classe III – faixa azul	51 - 500	1 colher de chá a 2 colheres de sopa
Pouco tóxicos	Classe IV – Faixa verde	501 - 5000	2 colheres de sopa a um copo
Muito pouco tóxicos		> 5000	1 copo

Geralmente, os produtos de degradação dos pesticidas têm uma toxicidade menor do que seus produtos de origem. Entretanto, em alguns casos, estes produtos são mais tóxicos, representando um grande risco para o homem e para o ambiente. Como resultado, existe uma necessidade de considerá-los durante o processo de avaliação dos riscos ambientais.

A diretiva 91/414-EEC da União Européia e suas subseqüentes emendas, estabelecem que antes de um novo pesticida ser colocado no mercado, os dados ambientais devem ser providenciados para todas as quantidades de metabólitos, e produtos de reação e degradação (ANDREU & PICÓ, 2004). Também todas as taxas de riscos para efeitos na saúde e no ambiente, incluindo a definição de LMR em alimentos e produtos alimentícios (OTERO *et al.*, 2004).

2.5.1 Toxicidade dos etileno-bis-ditiocarbamatos

Os EBDC ligados a metais agem através de diferentes mecanismos. Relativo ao mecanismo envolvido na toxicidade crônica destes compostos, a maioria dos estudos estão focados nos efeitos adversos à saúde, causados pela ETU, responsável por efeitos teratogênicos, carcinogênicos e goitrogênicos (WHO, 1988).

A ação tóxica do mancozebe e manebe é avaliada pela porção orgânica e pelo metal componente. As intoxicações por esses compostos frequentemente ocorrem pelas vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos por via cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite (ECKERMAN *et al.*, 2007).

Diferentes estudos toxicológicos e epidemiológicos desenvolvidos *in vitro*, em células neuronais dopaminérgicas (ZHOU *et al.*, 2004) ou *in vivo*, em camundongos tratados com manebe (THRIRUCHELVEM *et al.*, 2000) implicaram exposição crônica aos EBDC ligados a metais, como manebe e mancozebe, na patogênese da doença de Parkinson (CALVIELLO *et al.*, 2006). Estudos realizados por CORSINI *et al.* (2005), em um grupo de trabalhadores engajados na produção do mancozebe, apontaram um aumento na proliferação da resposta das células T (células de defesa humana), sugerindo um efeito imuno-estimulador sob exposição ocupacional prolongada, observaram também um aumento no soro de IgG, IgE e α -macroglobulina (células de defesa humana).

GEORGIAN *et al.* (1983) estudaram os efeitos do mancozebe sobre as células de medula óssea de ratos Wistar e sobre os linfócitos humanos em cultura temporária (*in vitro*). Seus dados indicaram que o mancozebe induziu aumento na frequência de aberrações cromossômicas de modo dose-dependente, tanto nos ratos como nos linfócitos humanos. Em 1990, SHUKLA *et al.* relataram que o mancozebe promoveu tumores na pele em camundongos e tumores pancreáticos em ratos, e em 2002, BELPOGGI *et al.* consideraram o mancozebe um potente carcinogênico por induzir uma variedade de tumores de diferentes origens em ratos.

O zinebe é considerado responsável pelo aparecimento de hiperplasia de tireóide em cães, de tumores pulmonares, sarcomas no retículo endotelial e anomalias congênitas em ratos e camundongos. Ainda, a exemplo do manebe, provoca leucopenia, danos hepáticos e nas gônadas, podendo causar também alteração no sistema cardiovascular (GONZALES *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstraram a toxicidade e efeitos teratogênicos, neurotóxicos, disfunção renal, hepática e no sistema reprodutor em animais expostos ao tiram (SILVA, 2005).

2.5.2 Efeitos tóxicos da etilenotiouréia

A patogênese da tireóide induzida por ETU é característica, típica de agentes goitrogênicos cuja administração crônica rompe o ligamento hipófise – tireóide. A ETU inibe a tireóide peroxidase causando um decréscimo nos níveis de hormônios da tireóide circulantes e um aumento compensatório do hormônio estimulante da tireóide (TSH). A estimulação crônica da glândula tireóide pelo TSH, inicialmente causa proliferação de células foliculares e posteriormente, direciona para uma neoplasia das mesmas (COLOSIO *et al.*, 2006; DECOS, 1995; OSABA *et al.*, 2002).

Em um estudo com teste crônico em ratos, os quais foram tratados na dieta com ETU, nas concentrações de 0; 60; 125 e 750 mg kg⁻¹ por dois anos, os efeitos tumorais foram observados na forma de adenoma e carcinoma de células foliculares da tireóide, na concentração mais alta (GRISOLIA, 1995).

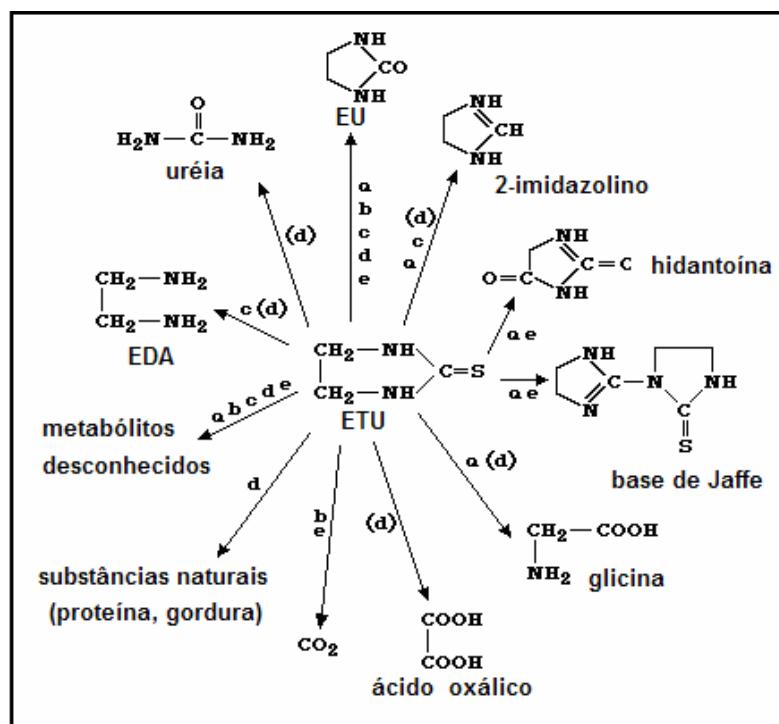
OHTA *et al.* (1998), publicaram um estudo *in vitro*, onde retiraram ovos de *Daphnia magna*, na fase da embriogênese, e os cultivaram em dois recipientes separados, um na presença de ETU e outro, sem o composto, por 3 dias. No final do estudo, observaram que nos ovos cultivados na presença de ETU, ocorreu a indução de anormalidades morfológicas na carapaça dos animais aquáticos, os quais não sobreviveram na água por 3 dias.

FREAKES (1988) relatou que a ETU também pode sofrer lixiviação, atingindo o lençol freático. Segundo o autor, na análise de 24 poços no Estado do Maine (EUA), três deles apresentaram contaminação com ETU em níveis acima dos LMR.

Segundo KHAN *et al.* (2005), a ETU pode sofrer nitrosação na presença de nitrito de sódio, tornando-se um agente mutagênico em salmonela, micronúcleos e camundongos. Tal reação de nitrosação é passível de ocorrer no estômago dos mamíferos.

Muitos resultados negativos dos estudos de efeitos mutagênicos da ETU são devidos a vícios de metodologia empregada, afirmando que a ETU possui fraco potencial mutagênico. Em 2001, a IARC incluiu a ETU no grupo 3 de toxicologia (classificado como não cancerígeno em humanos) (COLOSIO *et al.*, 2002; FUSTIONI *et al.*, 2005). Quanto à teratogenicidade, verifica-se que a ETU produz hidrocefalia, malformações no esqueleto, no trato digestivo e no sistema urogenital em ratos, após exposição materna a 30 mg kg⁻¹, a qual é 18 vezes menor que a DL₅₀, (KHAN *et al.*, 2005; DECOS, 1999).

Na Figura 3, se encontra os diferentes produtos de degradação da ETU em meios biológicos e não biológicos (WHO, 1988).



a – fotodecomposição, b – oxidação química, c – plantas, d- animais, e – solos, (d) – possíveis rotas

Figura 3 – Produtos de degradação da ETU em meios biológicos e não biológicos.

A exposição à ETU pode ser biologicamente monitorada pela determinação da quantidade do composto na urina (COLOSIO *et al.*, 2006; DECOS, 1999). Seus resíduos nos alimentos devem ser regulados em virtude de altas doses poderem causar câncer de tireóide, o órgão alvo da ETU, e no fígado, em animais de laboratório (ELIA *et al.*, 1995). Sua toxicidade genética é uma questão importante, dado que vários estudos mostraram que esta pode ser oncogênica e teratogênica, quando administrada a ratos e camundongos (DECOS, 1999).

2.6 Monitoramento de resíduos de pesticidas

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é freqüente a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos e, em muitos casos, em concentrações acima dos LMR permitidos, além dos não autorizados. Diversos

países como Estados Unidos, Holanda, Suécia e Inglaterra já estabeleceram programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos com análises contínuas.

Ao longo das duas últimas décadas o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil se constituiu por esforços isolados de Órgãos e instituições de pesquisas. Por este motivo a realização de um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos diferentes meios afetados é imprescindível, para se desenvolver ações de vigilância sanitária, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana.

A ANVISA, através do PARA, analisou entre 2001 e 2006, 6.123 amostras de alimentos *in natura*, sendo 1.278 delas em 2001 e 2002, 1.369 em 2003, 1.354 em 2004, 1.199 em 2005 e 923 em 2006. Através dos resultados encontrados, apresentados na Tabela 4, nota-se o alto índice de amostras contaminadas com resíduos de pesticidas, principalmente alface, mamão e morango.

Tabela 4 – Percentual de resultados insatisfatórios obtidos das amostras analisadas pela ANVISA, através do Programa de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos, entre os anos de 2001 a 2006.

Culturas	Percentual de resultados insatisfatórios				
	2001/2002	2003	2004	2005	2006
Alface	8,6	6,7	14	46,5	28,6
Banana	6,5	2,2	3,6	3,1	--
Batata	22,2	8,6	1,8	0	0
Cenoura	0	0	19,5	11,	--
Laranja	1,4	0	5,0	4,7	0
Maçã	4,0	3,7	5,0	3,0	5,3
Mamão	19,5	37,6	2,5	0	--
Morango	46,0	54,5	39,1	--	37,7
Tomate	26,1	0	7,4	4,4	2,0

Resultados insatisfatórios = amostras que apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação ou amostras que apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Após a análise dos resultados finais, a ANVISA concluiu que o maior problema no tocante aos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura*, não está na forma de aplicação do produto na cultura além dos limites permitidos, mas sim no uso indiscriminado de agrotóxicos não autorizados (ANVISA, 2007).

2.6.1 Monitorização biológica

A monitorização biológica é a medida e avaliação dos agentes ou seus metabólitos em secreções, excreções, fluidos biológicos (sangue e urina) ar expirado ou qualquer combinação desses, que combinado com métodos validados, fornecem medidas qualitativas e quantitativas de dose interna, para estimar a exposição integrada, por todas as rotas, e avaliar os riscos da exposição à saúde, comparando com um padrão de referência apropriado (BARR & NEEDMAN, 2002).

Dados toxicocinéticos mostram que o processo de absorção, biotransformação, distribuição e excreção dos pesticidas e o conhecimento de fatores de influência endógena (constituição genética, estado de saúde) e exógena (local de trabalho, ingestão de álcool, fumo) é essencial para desenvolver e selecionar o indicador biológico apropriado, a amostragem e a interpretação dos resultados. A monitorização biológica pode ser dividido em 4 categorias:

1. Medida direta de pesticidas inalterados nos meios biológicos;
2. Medida da atividade química da interação entre a molécula alvo ou não;
3. Quantificações dos efeitos biológicos relatados para a dose interna;
4. Determinação dos metabólitos no sangue ou urina

Um biomarcador de dose interna deve refletir a absorção ocorrida antes da amostragem, ou a quantidade depositada no organismo, e deve também significar a quantidade de compostos químicos abrigados em locais de ação .

A determinação de pesticidas em amostras biológicas e ambientais 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 possam fazer diagnósticos médicos, devido as intoxicações, tornam-se necessárias análises rápidas. Órgãos internacionais de controle exigem métodos analíticos que possam oferecer resultados seguros e de forma rápida, em um tempo inferior a 24 horas.

As determinações experimentais são difíceis, consomem tempo e são caras. Vários fatores experimentais devem ser controlados, tais como: concentração dos compostos, pH, temperatura, períodos de luz, procedimento, tempo de exposição, etc., os quais contribuem para uma considerável variabilidade inter-laboratorial nos valores experimentais relatados (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al.*, 2005).

De acordo com a WHO, os métodos analíticos recomendados para análise de

biomarcadores de pesticidas incluem os metabólitos dos ditiocarbamatos, alquil fosfatos, AChE nos eritrócitos e deltametrina. É evidente que os métodos para biomonitorização da exposição aos pesticidas devem ser rápidos, de baixo custo, sensíveis, seletivos e convenientes para uso nos campos desejáveis (HE, 1999).

2.7 Limitações de pesquisas com pesticidas

A associação dos riscos com o uso de pesticidas é difícil porque as evidências disponíveis são escassas, e muitas pesquisas são limitadas metodologicamente. As triagens aleatórias de controle, nas quais se relaciona causa e efeitos, não podem ser desenvolvidas com substâncias químicas nocivas, por razões éticas. Portanto, o impacto dos pesticidas na saúde é estimado com base em estudos experimentais com animais de laboratório e estudos epidemiológicos em humanos. Um nível de exposição seguro é frequentemente determinado considerando o nível da dose na qual foi observado efeito adverso em testes com animais, extrapolando estes dados para humanos. Os estudos epidemiológicos frequentemente empregam indivíduos que recebem múltiplas exposições a pesticidas, outras toxinas e carcinógenos.

Em estudos com humanos, existem vários obstáculos para medidas das variáveis independentes (exposição) e das dependentes (efeitos na saúde), assim como a ligação entre elas. Os obstáculos incluem a falta de conhecimento das pessoas; mudança das formulações químicas; o tempo decorrido entre a exposição e os efeitos de saúde, e as diferenças individuais, que tornam algumas pessoas mais vulneráveis que outras para exposições equivalentes aos mesmos pesticidas (QUACKENBUSH *et al.*, 2006).

2.8 Análise de urina

2.8.1 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, eles eram capazes de realizar o diagnóstico a partir de observações básicas, como cor, turvação, odor, volume e

viscosidade da urina. As características urinárias ainda são relacionadas pelos laboratórios hoje em dia, contudo, os métodos modernos de análise urinária ampliaram seu campo de ação, abrangendo não só o exame físico, mas também o químico (STRASINGER, 1998).

2.8.2 Formação e Composição

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. Constitui-se 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 (GRAFF, 1983; JAFFEE *et al.*, 2007).

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 dissolvidos na urina. Entre as substâncias orgânicas, estão a creatinina e o ácido úrico e outros elementos que não fazem parte do filtrado plasmático, como células, cristais, muco e bactérias, que em níveis elevados podem ser indício de doença. 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 podem servir como identificação da urina (STRASINGER, 1998).

2.8.3 Volume, coleta e manipulação

O volume de urina depende da 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 no volume de urina são: perda de líquido por fontes não-renais, ingestão de líquidos, variações na secreção do hormônio antidiurético e necessidade de excretar grandes quantidades de solutos, como glicose ou sais. Embora o volume urinário diário médio seja de 1200 a 1500 mL, considera-se normais os limites de 600 a 2000 mL.

A urina é um material biologicamente perigoso, o que exige certas precauções na coleta e manipulação. Por ser de fácil obtenção, podem ocorrer certos descuidos no tratamento após a coleta, causando a decomposição da urina, portanto, é necessário o emprego de técnicas corretas no manuseio da amostra, vários são os cuidados que se deve ter com a amostra (STRASINGER, 1998), tais como:

- Coleta em recipiente limpo e seco. Recomenda-se o uso de recipientes descartáveis, eliminando a contaminação decorrente de lavagem incorreta. As tampas de rosca tendem a produzir menos vazamentos do que as de encaixe.
- O recipiente da amostra deve ser devidamente etiquetado.
- Caso as amostras não possam ser analisadas de imediato devem ser refrigeradas ou se adiciona conservante químico como, timol, ácido bórico, e fenol.

2.8.4 Estocagem e Descarte

O método de estocagem mais usado é o da refrigeração, que é capaz de evitar a decomposição bacteriana da urina, a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes da análise química, a amostra deve voltar à temperatura ambiente. Quando a amostra precisar ser transportada a grandes distâncias e não for possível a refrigeração, devem-se acrescentar conservantes químicos. O conservante ideal deve ser bactericida e inibir a urease para que não venham a interferir nas análises químicas (GRAFF, 1983). 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.

2.8.5 Tipos de Amostras

Para que a amostra de urina seja representativa do estado metabólico do indivíduo, 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 apenas acusar sua presença ou ausência (STRASINGER, 1998; JAFFEE *et al.*, 2007).

2.9 Exigências atuais dos métodos analíticos para amostras biológicas

Dentre as áreas que tem interesse em análises de compostos encontrados em amostras biológicas encontram-se a ambiental, análises clínicas, farmacêutica, medicina legal, etc. A análise cromatográfica de compostos presentes em matrizes biológicas 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 analisados, a nível de traços (QUEIROZ, 2001).

Para que haja investigação e desenvolvimento de novos métodos para análises de pesticidas, os seguintes objetivos devem ser destacados: simplificar e automatizar os procedimentos de tratamento das amostras; reduzir o consumo de solventes orgânicos, eliminando os que são tóxicos; miniaturizar os procedimentos de partição líquido-líquido ou substituir por outros procedimentos; minimizar o número de etapas de bancada; potencializar a utilização da HPLC para as análises de pesticidas que não possam ser separados por GC sem derivatização prévia e aplicar os novos métodos de análises em amostras reais (SMITH, 2003).

Para isto são necessários procedimentos analíticos, que podem ser divididos em três etapas: (i) amostragem (ii) preparo da amostra, (iii) análise para identificação e/ou quantificação dos compostos e de eventuais produtos de biotransformação.

2.9.1 Amostragem

A amostragem se refere à 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 item 2.9.3. 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 se degradar durante a coleta, processamento, estocagem,

preparo e análise. Um tempo de estocagem longo aumenta a probabilidade de degradação de certos pesticidas em amostras biológicas (PENG, 1990).

2.9.2 Preparo da Amostra

Em muitos laboratórios, a etapa de preparo da amostra ainda é negligenciada, e tem recebido menos atenção por muitos anos nos estágios de separações cromatográficas, em pesquisas científicas. Entretanto, realizar uma etapa correta de preparo da amostra pode ser economicamente válido, bem como, analiticamente importante. Uma técnica incompleta ou ineficiente pode representar um contraste considerável no andamento de qualquer método e envolve mais trabalho por etapas.

Dentre as várias etapas envolvidas no preparo de amostras complexas, destacam-se a extração do analito da matriz, a remoção de impurezas (*clean-up*), o ajuste de condições (ex. pH), o ajuste de volume e a pré-concentração. A etapa de *clean-up* é importante para eliminar compostos oriundos da matriz que podem interferir no método analítico. Em análises cromatográficas, a remoção de interferentes preserva a vida das colunas analíticas e evita a eluição de interferentes com o analito de interesse. Este trabalho baseou-se em amostra líquida, portanto, será descrita a técnica utilizada para a extração, a extração líquido-líquido.

2.9.3 Extração líquido-líquido (ELL)

A técnica de extração líquido-líquido (ELL) é clássica no preparo de amostras complexas, particularmente de compostos orgânicos de matrizes aquosas. Nesta técnica, o analito é distribuído entre dois líquidos imiscíveis, com uma relação definida entre a miscibilidade do analito nas duas fases em equilíbrio, a uma dada temperatura e pressão (HENNION *et al.*, 1999). 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 o grau de 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. O analito pode estar presente dissociado, ou complexado com qualquer outro

componente da amostra, bem como pode interagir com um dos solventes. Extrações sucessivas e afinidade do soluto pelo tipo de solvente extrator aumentam a eficiência e seletividade da extração (RIDGWAY, *et al.*, 2007).

A ELL possui suas vantagens por ser de baixo custo (utiliza tubos de centrifuga ou funil de separação), pode-se 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. Além disso, pode ocorrer a desnaturação das proteínas, evitando a contaminação da coluna cromatográfica (BARCELÓ, 1991).

Como desvantagens da ELL podem-se citar: difícil automação; as impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra; pode ocorrer formação de emulsões; amostras que possuem alta afinidade pela água não são totalmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito. Também pode ocorrer adsorção do analito na vidraria; decomposição de compostos instáveis termicamente; e a susceptibilidade a erros (RIDGWAY, *et al.*, 2007).

2.10 Métodos cromatográficos para a análise de pesticidas

Os métodos de análises devem ser sensíveis o suficiente para cobrir não somente os limites permitidos pela legislação, mas também a detecção de substâncias já proibidas, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos (RIDGWAY, *et al.*, 2007).

A praticidade tem grande importância na seleção de métodos analíticos em monitorização biológica de exposição aos pesticidas, pois a dificuldade da preservação e transporte das amostras, a complexidade técnica e o alto custo das medidas laboratoriais frequentemente limitam a aplicação de biomarcadores disponíveis (HE, 1999). Neste contexto, as separações cromatográficas tornaram-se um instrumento fundamental para análises de amostras ambientais e biológicas contendo pesticidas (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al.*, 2005).

Na década de 60, a GC utilizando colunas recheadas foi adotada devido a sua capacidade de análise multirresíduo de pesticidas. Através do desenvolvimento de colunas capilares e detectores mais seletivos e mais sensíveis, aumentou-se o número de pesticidas detectados em uma única análise (POZZEBON, 2002). Devido

a estas características a GC é a técnica mais amplamente empregada para análises de resíduos de pesticidas (TADEO *et al.*, 2000)

Entretanto, com o aumento do emprego de substâncias solúveis em água, e portanto, mais polares, a HPLC tornou-se uma técnica mais apropriada na determinação destes compostos. Além disso, vários destes químicos empregados atualmente são termicamente instáveis, ou não voláteis, necessitando de etapas de derivatização para serem analisados por GC (OTERO *et al.*, 2004; GARCÍÑUNO *et al.*, 2004), o que eleva o custo e o tempo de análise podendo resultar em recuperações insatisfatórias (WITTLE *et al.*, 2001; BLASCO *et al.*, 2002).

Como a ETU é um metabólito específico dos EBDC, sua concentração urinária é considerada como um biomarcador para monitorização biológica de exposição ocupacional e ambiental a estes compostos (COLOSIO *et al.*, 2006), mas sua determinação por GC é pouco relatada, pois sua análise é complexa, pela dificuldade de transferir o composto para a fase orgânica e pela necessidade de derivatização, que não é quantitativa e consome tempo (KURTTIO *et al.*, 1988).

A HPLC acoplada a detectores adequados é a técnica de escolha nas análises de extratos de urina purificados, para medida dos riscos da exposição ocupacional e não-ocupacional (APREA *et al.*, 2002) por ser eficiente nas análises de traços de compostos orgânicos presentes em fluidos biológicos e tecidos.

Em 1981, LAWRENCE *et al.* empregaram HPLC com fase reversa (RP) e detecção polarográfica e no UV, para determinação de ETU e outros compostos sulfurados em urina. Alcançaram LOD de 2 ng no UV e 1 ng por polarografia com recuperações maiores que 90%.

MATISOVÁ *et al.* (1984) desenvolveram um método empregando GC com coluna capilar para determinar ETU em uvas e vinho. Para análise em GC, a ETU foi derivatizada a S-butil-ETU, S-benzil-ETU e ETU trifluoracetilada. As recuperações foram maiores que 90% e os limites de detecção entre 0,1 e 0,5 mg L⁻¹.

No ano seguinte, PRINCE determinou ETU em urina empregando uma coluna Gas-Chrom S (terra diatomácea) para *clean-up* e separação, seguindo a análise por HPLC com fase reversa e detecção eletroquímica. O LOD foi de 0,025 mg L⁻¹, usando 10 g de amostra de urina, e as recuperações foram maiores que 90%.

KURTTIO *et al.* (1988) determinaram ETU em urina e em filtros de ar, utilizando HPLC-UV. A amostra (10 mL de urina) foi extraída com diclorometano (DCM) e purificada com sílica gel e alumina. O LOD do método foi 0,1 ng. As

recuperações dos filtros fortificados (7 µg ETU por filtro) variaram de 79 a 94%. O método foi sensível o suficiente para ser aplicado em trabalhadores expostos ocupacionalmente.

No mesmo ano, WANG *et al.* empregaram HPLC com fase estacionária C18 e detector amperométrico com eletrodo de cobre, para determinar ETU em vinho, cerveja e sucos, sem pré-tratamento da amostra. O LOD obtido foi de 20 µg L⁻¹.

Em 1991, DOERGE & YEE desenvolveram um novo método empregando detecção amperométrica pulsada com um eletrodo de trabalho, de ouro, para medidas de ETU em banana e mamão. Os valores dos LOD foram de 5,0 e 10 µg L⁻¹, respectivamente. No trabalho foi utilizado 10 g da fruta homogeneizada com purificação em coluna Gas-Chrom S, e eluição com cloreto de metileno.

Um novo método por GC-FID e confirmação por MS foi desenvolvido em 1993, por van der POLL *et al.*, para determinar ETU em água. O método baseia-se na extração com DCM na presença de tiouréia e L-ascorbato de sódio. Os valores do LOD foram menores que 0,1 µg L⁻¹ e a recuperação média de 70%. Mais de 100 amostras de águas de rios foram analisadas por um período de 2 anos.

Ainda neste ano, BOLZONI *et al.* determinaram ETU e PTU em derivados de tomate (polpa, purê, pasta tomates sem pele) e purê de frutas (apricó, pêra pêssigo e maçã). Os resíduos foram extraídos com DCM em coluna Extrelut e o *clean-up* foi realizado com cartuchos C18 antes da injeção em HPLC com detector eletroquímico. Foram analisadas 100 amostras comerciais, confirmando o resultado por GC-FPD. A sensibilidade do método foi de 3,0 µg L⁻¹ para os produtos de tomate.

No ano de 1994, MEIRING & JONG compararam HPLC-UV e GC-MS para determinar ETU, formando três derivados. O LOD para o método foi de 0,05 µg L⁻¹, com recuperação entre 60 a 110%. Os autores encontraram uma boa correlação entre ambos os métodos.

Em 1996, APREA *et al.* avaliaram a excreção urinária de ETU na população de 4 regiões da Itália. Os resultados foram comparados com um outro estudo realizado em Rovescala (Itália), local onde se aplica EBDC pulverizando-se com auxílio de avião agrícola. O método de extração empregou coluna extrelut e DCM, purificação por SPE e análise por HPLC-DAD. Foram encontrados valores de ETU acima do LOD (1,0 µg L⁻¹) em 24% das amostras analisadas.

No ano seguinte, DUBEY *et al.* determinaram ETU em maçã, tomate, pêra e alimento infantil, empregando GC-ECD-NPD e confirmação por GC-MS. A ETU foi

analisada após dois passos de derivatização. Os autores obtiveram recuperações médias de 82-92% e LOD menor que $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, abaixo do LMR permitido para ETU, pela União europeia até então, que era de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. O método foi aplicado para monitoramento de resíduos de ditiocarbamatos em amostras comerciais, 4 de 20 amostras analisadas foram positivas para os resíduos, e 3 das amostras continham resíduos de etilenotouréia acima do LMR.

Neste mesmo ano, APREA *et al.* monitoraram por 8 dias, a excreção urinária de ETU em um grupo de 5 homens não fumantes, refletindo a ingestão controlada de vinho, frutas e vegetais. A concentração de ETU nos alimentos consumidos pelo grupo estudado estava abaixo do LOD do método, enquanto no vinho foi detectado ETU na concentração de $8,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Durante os 8 dias de estudo, uma média de 48% de ETU ingerida em vinho foi excretada inalterada pelos rins.

Ainda em 1997, JACOBSEN & BOSSI publicaram um trabalho onde estudaram a degradação de ETU em aquíferos arenosos, pelo fato dos EBDC se degradarem rapidamente na presença de oxigênio, liberando seus resíduos. A decomposição abiótica de ETU foi 5% menor do que sob condições bióticas. O estudo também apontou que ETU foi estável por mais de 150 dias, a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em banhos de água e em solos esterilizado com NaN_3 .

Em 2001, ABU-QARE & ABOU-DONIA otimizaram um método por SPE-HPLC-RP, para a quantificação de herbicidas e seus metabólitos em urina e plasma de ratos. A amostra foi extraída com acetonitrila (ACN) e purificada em cartucho C18. Os valores dos LOD foram entre 20 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ e os valores dos LOQ entre 150 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$, com recuperações entre 72 e 83%.

No mesmo ano, KONTOU *et al.* avaliaram os procedimentos de *clean-up* e determinaram ETU em tomate e produtos relacionados, por HPLC-PDA. Os autores realizaram extração líquido-líquido com adição de sal, o que conferiu alta precisão e separações mais seletivas do analito. As amostras foram extraídas com metanol e água (3:1) e o *clean-up* foi realizado em coluna Extrelut. As recuperações, com valores maiores que 70%, e precisão com $\text{RSD} < 10\%$ foram satisfatórias.

Para investigar a exposição ocupacional e não-ocupacional ao mancozebe e à ETU, COLOSIO *et al.* (2002) realizaram um estudo com 13 trabalhadores em vinhedos e 13 pessoas sem exposição ocupacional, monitorando os níveis de ETU na urina. Para a extração, empregou-se 18 mL de urina saturada com KF e percolada em uma coluna Chem Elut CE120. A amostra foi eluída com 100 mL de

DCM. O extrato final foi analisado por RP-HPLC-DAD. O LOQ obtido foi de 0,5 mg L⁻¹ e as recuperações foram maiores que 72%. A concentração encontrada de ETU foi menor que o LOD, para todos do grupo controle e para 10 trabalhadores.

GARCINUÑO *et al.* (2004a) desenvolveram um método com dispersão da matriz em fase sólida e subsequente *clean-up* para determinar metabólitos de EBDC em amostras de amêndoas. A amostra (0,2 g) foi extraída e purificada com ACN, o que foi suficiente para remover interferentes, inclusive gorduras. A análise cromatográfica foi realizada por HPLC-DAD. Para ETU, as recuperações do analito ficaram entre 76 e 85% com RSD de 3 a 12% e LOQ de 0,05 mg L⁻¹.

No mesmo ano, GARCINUÑO (b) *et al.* publicaram outro trabalho, no qual relataram a determinação simultânea de maneb e seus principais metabólitos em tomate, por HPLC-DAD e confirmação por MS. Os analitos foram extraídos 3 vezes com 3 mL de acetonitrila:diclorometano:clorofórmio (1:1:1) sob agitação por 2 min e separados em uma coluna C18. Os valores dos LOD foram de 0,35 a 0,45 mg L⁻¹.

Ainda em 2004, SAIEVA *et al.* publicaram os resultados de um estudo, no qual determinaram metabólitos de vários pesticidas, entre eles, ETU, na excreção urinária de 24 h. Neste estudo, avaliou-se a exposição não ocupacional e ocupacional na população geral em Florença e em Ragusa (Itália). Resíduos de ETU foram encontrados em 21,7% das amostras analisadas (total de 69). Os autores concluíram que as pessoas mais expostas foram as das áreas urbanas, livres da exposição ocupacional, sugerindo contaminação pelos alimentos ou pelo ambiente.

Em 2005, BALKHI *et al.* otimizaram um método para determinarem ETU em urina, empregando SPE-HPLC-DAD. Os valor do LOQ foi de 1 mg L⁻¹. Após a validação, o método foi aplicado para amostras reais de urina (272), de trabalhadores expostos aos EBDC em diferentes regiões da França.

No mesmo ano, FUSTINONI *et al.* aplicaram GC-MS para a determinação de ETU, monitorando a urina de trabalhadores de vinhedos expostos aos EBDC. Neste método, empregou-se extração líquido-líquido e coluna de terra diatomácea para purificação da ETU, com derivatização antes da análise cromatográfica. O método foi altamente específico, com LOQ de 2 µg L⁻¹ e recuperações maiores que 90%. Os autores também estudaram a estabilidade da solução de ETU, que estocadas em frascos âmbar a – 20 °C é estável por no mínimo 6 meses.

Ainda em 2005, KAWAMOTO *et al.* desenvolveram um método analítico com alta sensibilidade para determinar policarbamatos por GC-MS incorporando

programa de temperatura e injeção on-column. Este método possibilitou a quantificação destes compostos em água ao nível de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$, o que é 1/100 dos valores residuais no Japão, que é de $30 \mu\text{g L}^{-1}$.

No ano seguinte, COLOSIO *et al.* empregaram GC-MS com derivatização da ETU para definir valores de referência de ETU na urina da população do Norte da Itália e identificar as fontes de exposição. Das amostras analisadas (95), 39 apresentaram níveis de ETU menores que o LOD ($0,4 \mu\text{g L}^{-1}$) e a concentração nas outras amostras variou de 0,5 a $11,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Os autores estimaram a ingestão diária de EBDC, e também valores de referência para a população em estudo de 0,6–0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, podendo ser aplicados em monitorização biológica dos EBDC.

Em 2007, KAZOS *et al.* relataram um método simples, rápido e sensível por GC-MS, para a determinação de propinebe e melhoraram o procedimento por HPLC-UV para determinar os seus principais metabólitos em filtros de ar. Os autores analisaram o CS_2 (gerado do propinebe e seus metabólitos), extraído com isooctano em meio ácido. As recuperações ficaram entre 98 e 102%. Os valores de LOD obtidos foram de 36 e 49 ng m^{-3} .

Ainda em 2007, HAYAMA *et al.* simplificaram um método para determinação de EBDC em água, empregando SPE e LC-MS/MS. O método foi validado em 3 níveis de concentração para águas de rios e água potável, com exatidão de 94 a 109% e recuperações de 62,6 a 73,5% com valores de LOD e LOQ de 0,032 a 0,061 e 0,11 a $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

2.11 Validação de métodos cromatográficos

A validação da metodologia analítica na área de resíduos de pesticidas é realizada para garantir que a mesma seja exata, específica e reprodutível. Este procedimento envolve a interação entre o princípio ativo e a matriz dentro de uma marcha analítica que resulta na quantificação por métodos instrumentais. Assegurando a credibilidade, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer (VIEIRA & LICHTIG, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

Geralmente, a validação do método envolve a execução e a interpretação de experimentos planejados para se avaliar as características do método. Assim, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, incluindo aquelas atribuídas

aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (RIBANI *et al.*, 2004).

Dados analíticos validados são essenciais para mostrar que o método pretendido para o motivo selecionado, é capaz de fornecer especificidade adequada, exatidão e precisão, nas concentrações relevantes do analito e em matrizes apropriadas (HILL & REYNOLDS, 1999).

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios, tais como: curva analítica, linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, resistência e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.1 Curva Analítica e Linearidade

A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado, que consiste na determinação da resposta de determinado instrumento à várias concentrações da substância em estudo. Para se obter a curva analítica são necessárias soluções analíticas de concentrações definidas obtidas através de padrões de referência. A ANVISA, recomenda no mínimo cinco níveis de concentração a serem analisadas em ordem crescente (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância dentro de uma determinada variação. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão e é determinada através da curva analítica do princípio ativo, obtida da resposta do detector versus a concentração, através da equação linear (1):

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde, y é a resposta dada em termos de área do pico, ou altura do pico se ele for simétrico, x é a concentração da solução analítica, a é o coeficiente angular (inclinação) e b o coeficiente linear (intersecção). O coeficiente angular deve ser reprodutível e o linear não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve apresentar um coeficiente de determinação (r) maior que 0,99, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimental e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.2 Especificidade

A especificidade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação numa mistura complexa (FAO, 1998). Correspondem ao grau de interferência de espécies, como outro princípio ativo, reagentes, impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção.

Para verificar a especificidade de um método, deve-se primeiramente verificar se os reagentes empregados na análise não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. É necessário também analisar uma amostra branco, para verificar a presença de interferentes da matriz (VIEIRA & LICHTIG, 2004).

2.11.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. É expressa como o percentual de resposta obtida pela fortificação de uma amostra branco. A fortificação consiste na adição de uma solução analítica de pesticida (s) de concentração conhecida, em uma amostra branco, e através da análise desta amostra pode-se verificar se a marcha analítica determina o princípio ativo quantitativamente.

A ANVISA (2008) sugere recuperações de 80 a 120% para análise de resíduos de pesticidas com precisão de até $\pm 15\%$. A exatidão de métodos de análise de amostras de origem biológica, é expressa em porcentagem de erro sistemático e pode ser representada pela equação 2 (ICH, 2008):

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{Valor real}} \times 100 \quad (2)$$

2.11.4 Precisão

A precisão expressa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado mais de uma vez em uma mesma

amostra homogênea, em idênticas condições de análise (VIEIRA & LICHTIG, 2004). Normalmente, é determinada para circunstâncias específicas de medição e podem ser expressas por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

♦ Repetitividade (RSD_r): representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo.

♦ Precisão intermediária (RSD_{pi}): refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definido exatamente quais condições a variar, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa de variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para se usar (VIEIRA & LICHTIG, 2004).

A precisão expressa a repetitividade do tempo de retenção/área do analito, sendo considerado um excelente resultado quando o RSD para o instrumento é menor que 5% (SILVA, 2005), sendo aceitos RSD de até $\pm 15\%$. O valor numérico usado para avaliar a precisão, em termos de RSD, para o método, pode ser calculado através da Equação 3.

$$RSD \% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

2.11.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental, sendo expresso como uma concentração em uma determinada relação sinal/ruído,

usualmente 3:1. O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) representa a mais baixa concentração do analito que pode ser quantificado com certa confiabilidade nas condições experimentais. O LOQ engloba uma relação entre a concentração, precisão e exatidão, sendo determinado em relação sinal/ruído, usualmente 10:1. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (VIEIRA & LICHTIG, 2004; ANVISA, 2008).

A Figura 4 demonstra de forma representativa como é obtida a relação entre o sinal cromatográfico e o ruído da linha de base, e conseqüentemente o LOD e o LOQ.

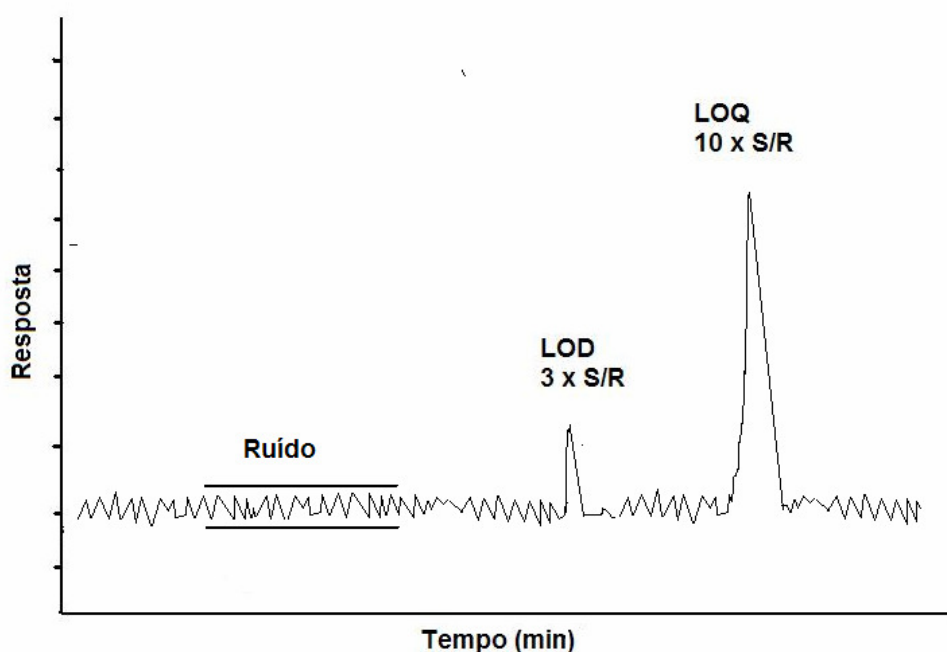


Figura 4 – Diagrama demonstrando o ruído da linha base e o sinal para LOD e LOQ para o método cromatográfico.

Entende-se por ruído, nos métodos cromatográficos, a flutuação da linha base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada a nenhum composto detectado (SILVA, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

A seguir, serão descritos os instrumentos empregados para o desenvolvimento do método:

- Cromatógrafo à líquido Kratos Analytical (Holanda); bomba Merck Hitachi (Japão), modelo L-6000A, com sistema de eluição isocrática equipada com detector por absorção no UV, modelo Spectroflow 783; sistema de aquisição de dados Varian, Star Workstation; coluna analítica C18 Synergi fusion RP 80 (250 x 4,6 mm; 4 µm) e pré-coluna de mesmo material C18 (4 x 3 mm), ambas da marca Phenomenex (EUA);
- Banho de Ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Alemanha);
- Balança Analítica com precisão de 4 casas decimais, marca Sartorius (Alemanha);
- Micropipetadores automáticos de várias capacidades, marca Brand, (Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3, resistividade de 18,2 MΩ (EUA);
- Banho de água Temostatizado sem agitação, marca Thermo Haake, (Alemanha);
- Centrífuga modelo Jouan G4-12 (França).

3.2 Reagentes e solventes

Neste estudo, foram empregados os seguintes reagentes e solventes:

- Água purificada em sistema Milli-Q;
- Metanol grau HPLC marca Mallinckrodt (EUA);
- Acetonitrila grau HPLC marca Mallinckrodt (EUA);
- Diclorometano marca Mallinckrodt (EUA);
- Sulfato de magnésio anidro;
- Água destilada e deionizada;
- Extran alcalino marca Merck (Brasil);
- Álcool etílico hidratado 92,8 GL (Brasil).

3.3 Composto selecionado para estudo

O composto selecionado para este estudo foi a ETU, por ser um metabólito genotóxico, mutagênico e cancerígeno, sendo o xenobiótico alvo em monitorizações de exposição aos EBDC. O padrão sólido foi obtido comercialmente através do fornecedor Sigma–Aldrich, com grau de pureza de 99,9%.

3.4 Preparo das soluções

3.4.1 Solução analítica estoque de ETU

A solução estoque de ETU foi preparada em Acetonitrila, na concentração de 1000 mg L⁻¹, em um volume de 10 mL. Esta solução foi preparada através da dissolução do padrão sólido de referência, no solvente mencionado e armazenada em frasco âmbar, em freezer, à -18 °C.

3.4.2 Soluções analíticas intermediárias

Preparou-se uma solução analítica na concentração de 100 mg L⁻¹ a partir da solução estoque de 1000 mg L⁻¹, também em acetonitrila, e a partir desta, preparou-se uma solução analítica de 10 mg L⁻¹, a partir da qual foram realizadas as diluições para a obtenção das soluções utilizadas para a confecção da curva analítica, nas concentrações de 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. O solvente empregado para o preparo das soluções de trabalho foi água purificada em sistema Milli-Q.

3.5 Otimização das condições do sistema HPLC–UV

Para a otimização das condições cromatográficas, foram injetadas as soluções analíticas do composto selecionado neste estudo, preparadas conforme o item 3.4.2, observando-se o tempo de retenção do mesmo. A solução 1,0 mg L⁻¹ foi injetada em um sistema HPLC-DAD para se obter o espectro molecular de absorção do composto. Foram ainda avaliados vários outros parâmetros, tais como: composição e vazão da fase móvel, comprimento de onda de maior absorção e volume de injeção.

3.5.1 Escolha da fase móvel e da vazão

Para a escolha da fase móvel, testaram-se as seguintes composições: ACN:H₂O nas proporções de 25:75, 40:60, 55:45 (v/v) e MeOH: H₂O nas proporções de 65:35, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 e 5:95 (v/v).

A escolha da vazão da fase móvel baseou-se na separação cromatográfica das soluções analíticas, testando-se as vazões de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 e 1,0 mL min⁻¹.

3.5.2 Preparo da fase móvel e ajuste de pH

Para o preparo da fase móvel, mediram-se separadamente determinados volumes de metanol e de água purificada. Após a mistura dos solventes, a solução foi deixada em banho de ultra-som por 20 min à temperatura ambiente, para desaeração. Neste estudo, testou-se a acidificação da fase móvel com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1), obtendo-se pH em torno de 3,0. Este estudo não forneceu resultado relevante para a ETU pelo fato deste composto ser estável em uma faixa de pH de 5,0 a 9,0 (KONTOU *et al.*, 2001). Como o pH da fase móvel se encontrava previamente dentro da faixa sugerida, não foi necessário o seu ajuste.

3.5.3 Escolha do comprimento de onda

Para a escolha do maior comprimento de onda (λ), injetou-se uma solução de 1,0 mg L⁻¹ em sistema HPLC–DAD, obtendo-se desta forma, o espectro de absorção molecular do composto, entre 200 e 400 nm, podendo-se observar o comprimento de onda de maior absorção pelo composto, determinando desta forma, o comprimento de onda empregado no estudo que foi de 233nm.

3.5.4 Volume da alça de injeção

Os volumes da alça de injeção avaliados foram de 20, 50 e 100 μ L, baseado nos dados da literatura, adaptando-se às condições de análise. Neste estudo, foram observados os volumes que fornecessem melhor sensibilidade, mas que ao mesmo tempo, não causasse o alargamento do pico do composto.

3.6 Otimização do tratamento da amostra

3.6.1 Escolha do volume e do solvente de extração

O solvente de extração deve extrair de forma eficiente e seletiva os analitos de interesse, de forma que os compostos interferentes presentes na matriz, permaneçam retidos na mesma. Esta escolha depende da polaridade do solvente e da sua capacidade de remover os analitos da matriz, sem remover os interferentes, por isso é importante conhecer as características químicas do analito e informações suficientes no que diz respeito à estrutura, solubilidade, polaridade entre outros. Foram testados vários solventes para ELL, uma vez que a amostra é líquida (aquosa), podendo ser considerada como uma das fases líquidas.

Os solventes testados foram acetonitrila, diclorometano, metanol e uma mistura de metanol:acetonitrila (1:1, v/v). Após escolhido o melhor solvente extrator, testou-se o solvente nas extrações, nos seguintes volumes: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mL, efetuando-se as extrações em triplicata, após fortificação das amostras a nível de 1,0 mg L⁻¹.

3.6.2 Adição de sal na extração líquido-líquido

A ELL é baseada na distribuição do composto em duas fases líquidas imiscíveis, mas quando se trabalha com compostos muito polares, pode ocorrer do composto não ser totalmente retirado da fase aquosa, obtendo-se resultados insatisfatórios de recuperação. Para melhorar a distribuição dos compostos polares, pode-se efetuar uma etapa de adição de sal neutro durante a extração, para melhorar a partição do analito entre a fase orgânica e a fase aquosa.

Neste estudo, testaram-se três diferentes sais inorgânicos para melhorar a extração de etilenotiuréia da urina, sendo eles, sulfato de magnésio, sulfato de sódio e cloreto de sódio.

3.6.3 Avaliação da estabilidade da ETU em diclorometano, quando submetida à evaporação em banho de água e sob fluxo de nitrogênio

Para avaliar a perda de ETU durante o procedimento de evaporação, realizaram-se dois testes, onde se testaram duas técnicas de evaporação, evaporando-se sob fluxo aleatório de nitrogênio, um volume de 1 mL de solução com concentração conhecida de ETU, em diclorometano, em três diferentes níveis de concentração (0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) com 6 réplicas para cada nível, e a outra técnica, onde se submeteu as mesmas soluções para evaporação em banho de água (44 °C). Desta forma pôde-se avaliar qual o melhor procedimento para evaporação da solução contendo ETU após extração, minimizando as perdas neste processo.

3.7 Procedimento de coleta das amostras “branco” de urina

Para coletar uma amostra “branco” de urina (aquela que não contém ETU), é necessário um controle do horário da coleta, do recipiente utilizado, do transporte e da conservação. Os cuidados na coleta e armazenamento das amostras “branco” são imprescindíveis para evitar contaminação das mesmas e, conseqüentemente, possíveis alterações nos valores de recuperação do analito.

As amostras “branco” para este estudo, foram coletadas na primeira hora da manhã, de um doador não exposto ocupacionalmente aos pesticidas, e a quantidade correspondeu à necessária para o desenvolvimento do método, com posterior nova coleta para a etapa de validação. A conservação das amostras foi realizada sem conservantes químicos, apenas sob refrigeração à -20 °C, efetuando-se o resfriamento à temperatura ambiente anteriormente às análises.

3.8 Análise dos solventes e reagentes

Para verificar a pureza dos solventes e reagentes empregados, com relação a possíveis contaminantes, realizou-se a análise dos mesmos através do procedimento de extração, descritos no item 3.10, sem adicionar o analito. Dessa forma, pôde-se certificar de que os solventes e reagentes eram apropriados para serem empregados no desenvolvimento do método proposto.

3.9 Análise da amostra “branco”

As amostras de urina empregadas como amostras “branco”, foram submetidas ao mesmo procedimento de extração, conforme o item 3.10, com exceção da etapa de adição do analito (fortificação), para certificar de que estas amostras não continham o composto em estudo, ou outro interferente no mesmo tempo de retenção do composto.

3.10 Procedimento de fortificação e extração das amostras

Para o procedimento experimental do método, centrifugou-se a amostra de urina, a qual foi adicionada de 5 gotas de solução aquosa de ácido tricloro-acético 20% para cada 15 mL de urina (para a desnaturação das proteínas). Mediu-se 1,0 mL do sobrenadante, em tubo cônico de centrífuga com capacidade de 15 mL e tampa rosqueável. Efetuou-se as fortificações, adicionando-se 50 μL da solução 10 mg L^{-1} de ETU (para o nível de 0,5 mg L^{-1}); 50 e 100 μL da solução 1,0 mg L^{-1} de ETU (para os níveis de 0,05 e 0,1 mg L^{-1} respectivamente), agitando-se a amostra para melhor homogeneização com o analito.

Na seqüência do procedimento, adicionou-se 6 mL de diclorometano com auxílio de dispenser. Nesta etapa, é necessário agitação vigorosa (neste caso, manual), por um tempo cronometrado de 1,0 min. Após a agitação, os frascos são abertos lentamente, pois ocorre a formação de pressão pelo diclorometano.

A seguir, adicionou-se $0,8 \pm 0,02$ g de sulfato de magnésio (MgSO_4), para melhorar a distribuição da ETU, de forma a ocorrer maior transferência desta para a fase orgânica. Os frascos foram fechados e agitados, novamente com tempo cronometrado, de 1,0 min e 15 s. É importante salientar que a agitação por igual de todos os tubos é um passo muito importante, pois nesta etapa ocorre a passagem da ETU da fase aquosa para a orgânica, e se o procedimento não for bem realizado para todas as amostras, os resultados serão desiguais.

Após agitação vigorosa, centrifugou-se a amostra por 4 min a 3600 rpm, para que ocorresse a separação total das fases, esta etapa pode ser considerada a etapa de *clean-up*, pois as células e outros compostos endógenos presentes na urina permanecem na fase aquosa (fase inferior no tubo de centrífuga), minimizando os

interferentes. Na parte superior do tubo, permanecem o diclorometano, com o analito e interferentes co-extraídos da matriz.

Após centrifugação, retirou-se uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante e colocou-se em tubo cônico de vidro próprio para evaporação, em banho de água à 44 °C, até completa secura. É importante não ultrapassar esta temperatura, pois temperaturas mais altas podem acarretar a degradação da ETU, causando perdas na recuperação do analito.

Após evaporação, ressuspendeu-se o resíduo em 500 µL de água purificada (para o nível de fortificação de 0,05 mg L⁻¹), em 400 µL (para o nível de fortificação de 0,1 mg L⁻¹) e em 1,0 mL (para o nível de 0,5 mg L⁻¹), analisou-se os extratos por HPLC-UV. Os resíduos foram concentrados após a etapa de evaporação, devido à ocorrência de junção do pico do composto na menor concentração fortificada, com um pico de um composto existente na matriz, não sendo possível assim, total separação destes picos na análise cromatográfica, não ocorrendo este problema nas maiores concentrações. O procedimento de extração foi realizado em 6 réplicas, tanto para o “branco”, quanto para cada nível de fortificação, e encontra-se demonstrado na figura 5.

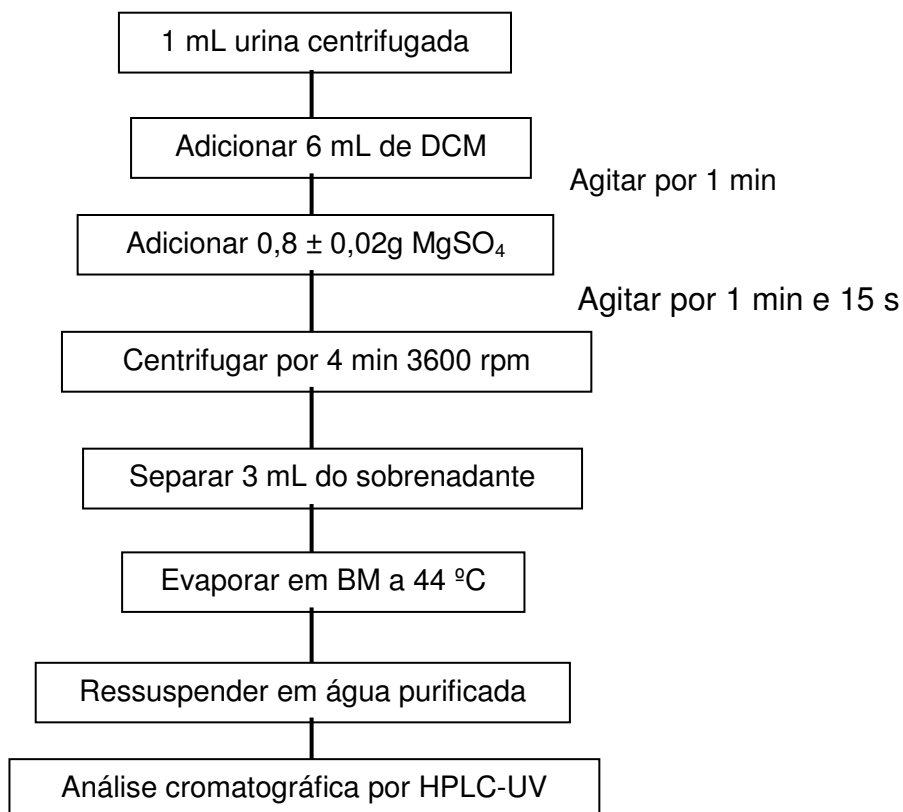


Figura 5 –Esquema do processo de extração das amostras de urina.

3.11 Limpeza da vidraria utilizada

Após serem utilizadas no procedimento de extração, toda a vidraria foi deixada em descanso, em uma solução de Extran neutro 5% (v/v), para remoção de qualquer resíduo do analito. A vidraria foi lavada, enxaguada em água corrente, com água deionizada e álcool etílico comercial. Foram então deixadas secar à temperatura ambiente e armazenadas em armário fechado.

3.12 Validação do método cromatográfico para determinação de ETU em urina

Para o método desenvolvido, a ETU foi determinada utilizando-se o método da padronização externa, empregando-se HPLC-UV, nas condições otimizadas citadas no item 4.1. A seguir, serão descritas as informações referentes aos itens avaliados na validação do método.

3.12.1 Curva analítica e linearidade

Para a obtenção das curvas analíticas, foram preparadas soluções analíticas, no solvente e no extrato da matriz, em diferentes concentrações, : 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, conforme o item 3.4.2, e injetou-se no sistema de HPLC 50 µL de cada solução analítica em ordem crescente (6 x), intercalando-se cada set de injeções das soluções analíticas com a injeção da fase móvel, para limpar a coluna cromatográfica (n=6), obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado, com o auxílio do software Star Workstation.

Para tanto, os valores das concentrações foram colocados no eixo das abscissas e as áreas obtidas, no eixo das ordenadas, através do programa Excel 2002, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas. Através dos dados obtidos verificou-se a linearidade do método cromatográfico.

3.12.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para a determinação do LOD e do LOQ do instrumento, foram realizadas injeções em ordem decrescente de concentração (1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02 mg

ETU L⁻¹), injetando-se a fase móvel entre as soluções analíticas, até que o pico atingisse uma altura referente a três vezes o ruído da linha base, nas proximidades do tempo de retenção do pico de interesse. Para a determinação do LOQ, adotou-se a altura do pico dez vezes superior ao ruído da linha base.

3.12.3 Repetitividade e precisão intermediária

A precisão, em termos de repetitividade da resposta do instrumento (RSD_{ri}), empregada no método cromatográfico, foi avaliada efetuando-se 6 injeções de cada solução analítica, em ordem crescente nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ (6 x), intercalando-se cada set de injeções das soluções analíticas com a injeção da fase móvel, para limpar a coluna cromatográfica (n=6).

A repetitividade do método foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras “branco” fortificadas, em três níveis de concentração, com n = 6, conforme descrito no item 3.10. Cada um dos três níveis foi extraído 6 vezes, sendo os extratos injetados uma vez, conforme descrito acima.

Para avaliar a precisão intermediária dos instrumentos, optou-se por utilizar um intervalo de 10 dias entre as análises, alternando-se também o operador.

3.12.4 Recuperação

Os testes de recuperação do analito podem ser realizados pela análise de amostras adicionadas de quantidades conhecidas do mesmo. O analito pode ser adicionado na amostra em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permitida e em uma concentração próxima à da faixa de uso do método.

Para os estudos de recuperação, efetuou-se a adição do componente de interesse à matriz em três diferentes concentrações, 0,05; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹, seguido da extração, pelo método que está sendo avaliado. Após a extração, o extrato foi analisado por HPLC-UV para a separação e quantificação do composto em estudo.

Os resultados obtidos após extração e análise foram denominados valor obtido, e o valor da fortificação da amostra foi o valor real. Os valores de recuperação foram obtidos empregando-se a Equação 3. (item 2.11.3)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas otimizadas

Para a otimização da separação e identificação do composto selecionado para este estudo, preparou-se soluções analíticas contendo o princípio ativo da etilenotiouréia, as quais foram injetadas separadamente no sistema HPLC-UV obtendo-se o tempo de retenção do composto. Desta forma, foram estabelecidas as melhores condições cromatográficas para a separação e quantificação da ETU, as quais estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições cromatográficas otimizadas para a separação e quantificação de etilenotiouréia em urina.

Parâmetros Testados	Parâmetros Otimizados
Coluna Analítica	Synergi fusion C18 (250 x 4,6 mm; 4 µm)
Fase Móvel	Metanol:Água – 10:90 (v/v)
Vazão da Fase Móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume da Alça de Injeção	50 µL
Detector	Absorção no UV
Comprimento de onda	233 nm

De acordo com a revisão da literatura, a melhor vazão para determinação de ETU é de 0,8 a 1,0 mL min⁻¹. No desenvolvimento do método proposto, foram testadas as vazões de 0,5 a 1,0 mL min⁻¹, concluindo-se que a melhor vazão a ser utilizada é a de 1,0 mL min⁻¹, pois permitiu realizar a separação do composto com pressão abaixo de 260 atm, e um tempo total de análise de 12 min.

A fase móvel escolhida para este estudo foi metanol:água (10:90, v/v), pois estes solventes, nestas proporções, permitiram uma melhor separação do composto de interesse, e ainda eliminou alguns interferentes da matriz. Para o volume de injeção, optou-se por um volume de 50 µL, devido ao fato da ETU apresentar uma

melhor absorção na luz UV com este volume de injeção, tendo-se o cuidado de não causar o alargamento do pico do composto no cromatograma.

Para a escolha do λ , consideraram-se os valores descritos na literatura e também o espectro de absorção molecular da ETU, apresentado na Figura 6, onde se observa a máxima absorção pelo composto. O comprimento de onda empregado no estudo foi de 233 nm. Abaixo deste valor pode ocorrer absorção pelos compostos presentes na matriz. Próximo a 233 nm observou-se que a ETU é menos susceptível a interferências.

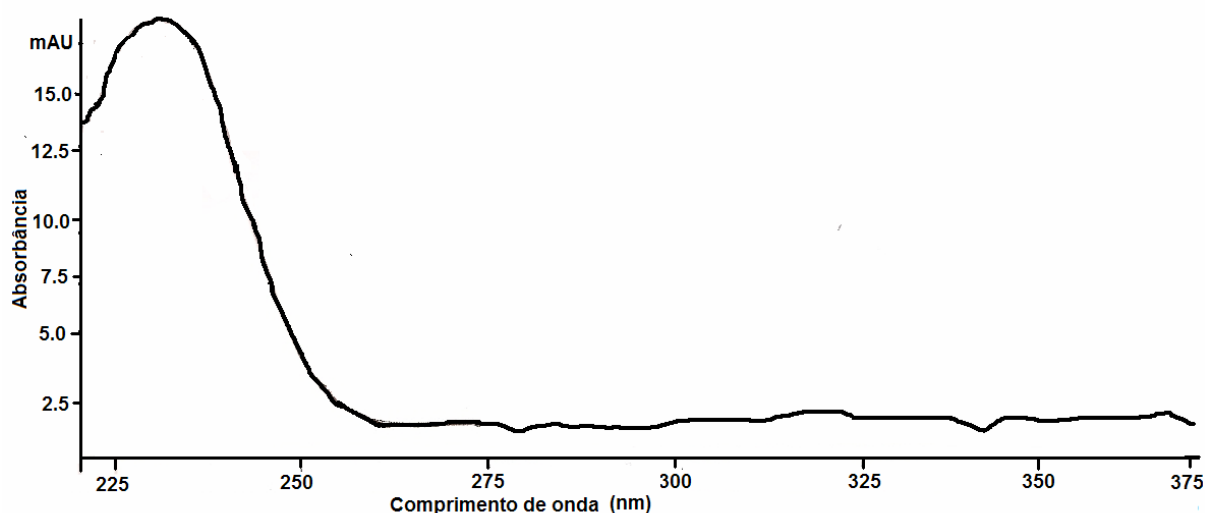


Figura 6 – Espectro de Absorção molecular da etilenotiouréia em solução (água purificada) na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Após a obtenção de todos estes parâmetros, injetou-se no sistema já com as condições otimizadas, soluções analíticas de ETU em água purificada, na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para se obter o perfil de um cromatograma de separação deste composto e também o tempo de retenção, que foi de $4,5 \pm 0,03 \text{ min}$, demonstrado na Figura 7.

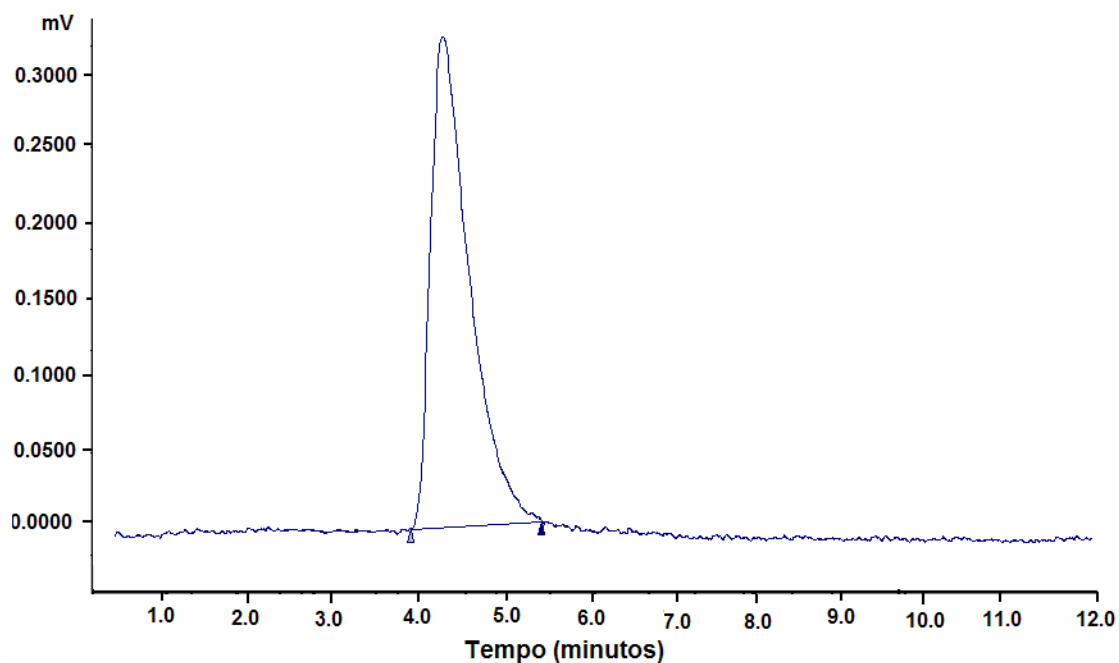


Figura 7 – Cromatograma obtido por HPLC-UV, através da injeção de solução analítica $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de etilenotiuréia em água purificada, nas condições cromatográficas otimizadas (item 4.1), com tempo de retenção de $4,5 \pm 0,03 \text{ min}$.

Todos os parâmetros testados para a otimização da metodologia para a extração de ETU da amostra de urina estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições metodológicas otimizadas para a extração de etilenotiuréia em urina.

Parâmetros Testados	Parâmetros Otimizados
Método de extração	Líquido-líquido com adição de sal
Solvente de extração	Diclorometano
Volume do solvente de extração	6,0 mL
Sal adicionado	Sulfato de magnésio anidro
Técnica de evaporação da solução de ETU em DCM	Banho de água à $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2 Extração líquido-líquido

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 o analito de interesse, com um mínimo de interferentes, que venham a gerar resultados errôneos na identificação e na quantificação do composto de interesse.

Ao se empregar ELL, qualquer pH pode ser utilizado, porém, deve-se considerar a estabilidade e o caráter ácido-básico do analito. Para que se obtenha sucesso na extração, o analito deve encontrar-se na forma não ionizada, para se obter a partição com a fase orgânica. Por esta razão, o valor do pH da fase aquosa pode necessitar de ajuste, o que não foi necessário neste estudo, conforme discutido no item 3.5.2.

4.2.1 Adição de sal na extração líquido-líquido

Para melhorar a distribuição da ETU (polar) no solvente orgânico, optou-se por realizar uma etapa de adição de sal para diminuir o volume de diclorometano necessário para a extração. O sal escolhido para este estudo, foi o sulfato de magnésio, na quantidade de $0,8 \pm 0,02$ g, para 1,0 mL de urina, o qual forneceu os melhores resultados de recuperação. Os demais sais foram inadequados para o método em estudo, pois na extração com o sulfato de sódio ocorreu a formação de uma pedra de sal, não permitindo a separação e extração dos compostos da urina. O cloreto de sódio também não foi eficiente, pois quando se empregou este sal, a fase orgânica permaneceu na parte inferior do tubo cônico de extração, não sendo possível a retirada de nenhuma alíquota da amostra de urina.

4.2.2 Escolha do volume e do solvente de extração

O solvente de extração que melhor se adequou às condições de extração do método desenvolvido foi o diclorometano, que devido ao fato de sendo este imiscível com a urina, ser capaz de extrair o composto de interesse, com ótimos percentuais de recuperação. Ainda apresenta a vantagem de ser facilmente evaporado em banho de água, a uma temperatura baixa ($44\text{ }^{\circ}\text{C}$), o que diminui as perdas do analito evitando a sua degradação, também extraiu menos compostos interferentes da

matriz, quando comparado com a acetonitrila e metanol. Apesar de ser um solvente tóxico, o volume empregado que apresentou os melhores percentuais de recuperação, 6 mL, é um volume pequeno, gerando poucos resíduos, quando comparado com outros métodos de extração. Os estudos realizados empregando 7,0 mL de DCM não forneceram resultados satisfatórios, mesmo comparado com os resultados quando se empregou 6,0 mL. Pelos dados disponíveis, não se sabe a razão do porque das baixas recuperações com este volume. Na Tabela 7, estão demonstrados os resultados obtidos no teste para escolha do volume de diclorometano para o procedimento de extração.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos testes de fortificação e recuperação, na concentração de 1,0 mg L⁻¹, empregando-se diferentes volumes de diclorometano (3,0 a 7,0 mL), para a extração de etilenotiouréia da urina.

Volume de diclorometano (mL)	Área	Área Média	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	SD (%)	RSD%
3,0	124099		35			
	130378	124037	36	35	1,8	5,1
	117634		33			
4,0	135029		38			
	150260	132758	42	37	5,2	14,1
	112984		32			
5,0	165324		46			
	151806	161566	42	45	2,4	5,3
	167568		47			
6,0	331580		93			
	330281	328007	92	92	1,4	1,6
	322161		90			
7,0	120355		34			
	121098	123493	34	34	1,3	3,9
	129027		36			

4.3 Avaliação da estabilidade da ETU em diclorometano, quando submetida à evaporação em banho de água e sob nitrogênio

Nos testes realizados para avaliar a estabilidade da solução de ETU em diclorometano, quando esta solução era evaporada em banho de água e também sob nitrogênio, observaram-se os melhores resultados quando a solução contendo ETU foi evaporada em banho de água à 44 °C, demonstrado na Tabela 8. A Tabela completa, incluindo as áreas obtidas, encontra-se no Apêndice 2.

Tabela 8 – Resultados dos testes de recuperação, empregando-se fluxo de nitrogênio e banho de água, a 44 °C, para evaporação da etilenotiouréia em solução de diclorometano.

Nível de fortificação	Banho de água			Fluxo de Nitrogênio		
	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação Média (%)	SD (%)	RSD%	Recuperação Média (%)	SD (%)
0,1	92	7,3	7,9	63	20,0	31,9
0,5	85	6,6	7,8	58	20,6	35,5
1,0	95	5,6	5,9	62	16,3	26,3

A maior recuperação nos testes com banho de água foi de 95%, enquanto nos testes empregando-se evaporação sob nitrogênio, a maior recuperação alcançada foi de 63%, ocorrendo perda média de 40% do analito adicionado. Portanto, com base nestes dados, o método adotado para a evaporação de ETU em diclorometano foi a evaporação em banho de água.

4.4 Análise dos solventes e reagentes

A análise dos solventes e reagentes foi realizada conforme o item 3.8. No cromatograma obtido desta análise, pode-se observar um cromatograma limpo, onde não há a presença de picos de outros compostos, em nenhum tempo de retenção, o que é demonstrado na Figura 8, sendo portanto, apropriados para serem utilizados no desenvolvimento do método.

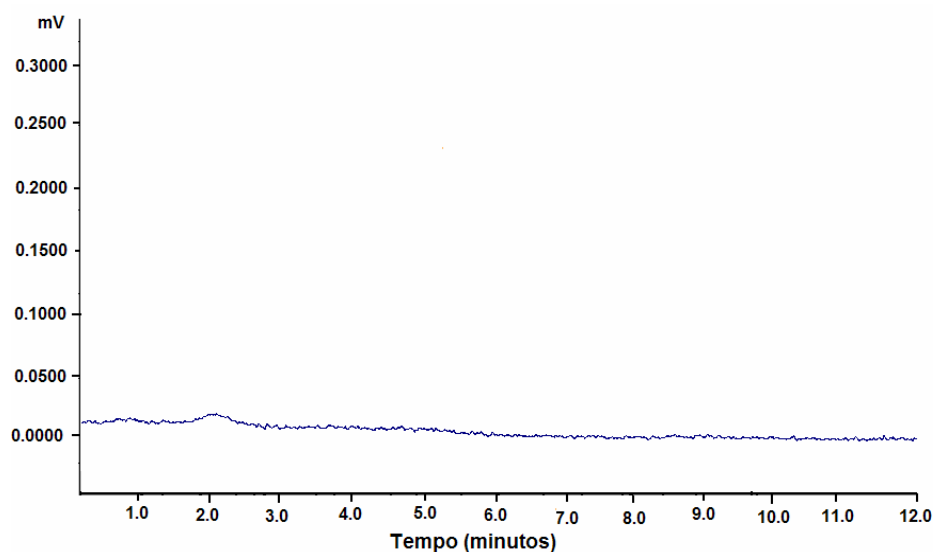


Figura 8 – Cromatograma obtido por HPLC-UV na análise do branco dos solventes e reagentes, nas condições cromatográficas otimizadas (item 4.1).

4.5 Avaliação da amostra “branco”

As amostras de urina foram avaliadas para uso como amostras “branco”, conforme descrito no item 3.9. O cromatograma da amostra “branco”, obtido no sistema HPLC-UV está representado na Figura 9.

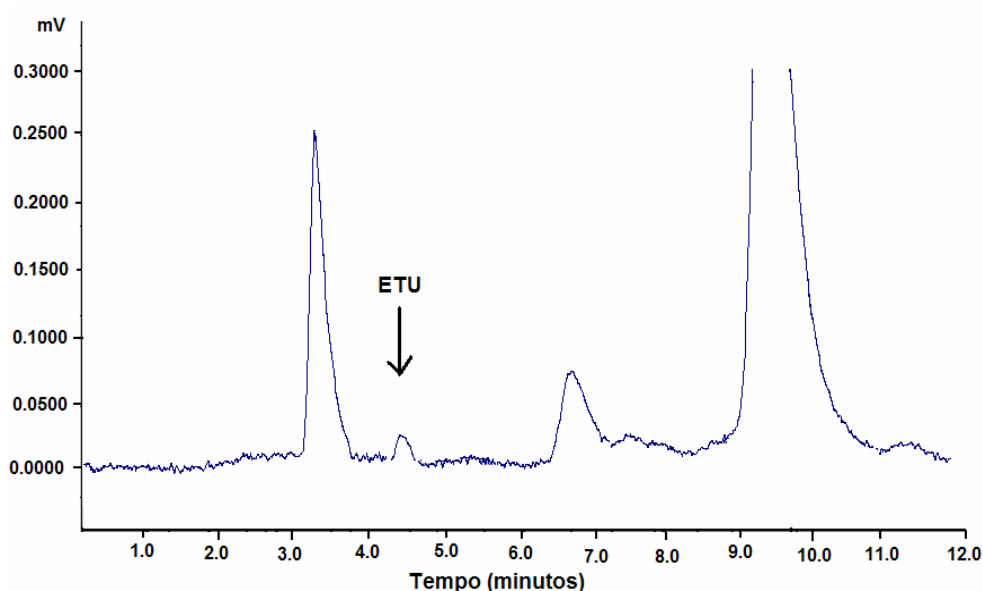


Figura 9 – Cromatograma obtido por HPLC-UV na análise da amostra “branco” de urina, conforme as condições cromatográficas otimizadas, descritas no item 4.1.

Pela análise do cromatograma, observou-se a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do composto etilenotiouréia. Dessa forma, nos estudos de fortificação e recuperação do analito, foi necessário subtrair o valor da área obtida na análise da amostra como branco, obtendo-se a área real do analito.

4.6 Validação de métodos cromatográficos

A validação do método cromatográfico é um processo dinâmico e constante, que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, material e pessoal, e continua na fase de experimentos e transferência do método. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido. Após definidas as melhores condições cromatográficas para a separação e quantificação de etilenotiouréia em urina, realizou-se a validação do método analítico.

4.6.1 Curva analítica e linearidade

Na Figura 10 encontram-se demonstradas as curvas analíticas para o composto em estudo, tanto em água purificada (solvente) quanto no extrato da matriz, com as respectivas equações das retas e os coeficientes de determinação (r^2). As soluções analíticas foram empregadas na obtenção das curvas analíticas nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹.

Analisando-se as equações das curvas obtidas, observa-se que o modelo sugerido é linear e adequado, já que o coeficiente de determinação é maior que 0,998, o que segundo a literatura, é satisfatório, tanto para as curvas obtidas empregando-se o extrato da matriz, tanto para aquela preparada em água purificada (solvente). . As curvas analíticas para a ETU, com todos os dados em solvente e em extrato da matriz, estão representadas no Apêndice 3.

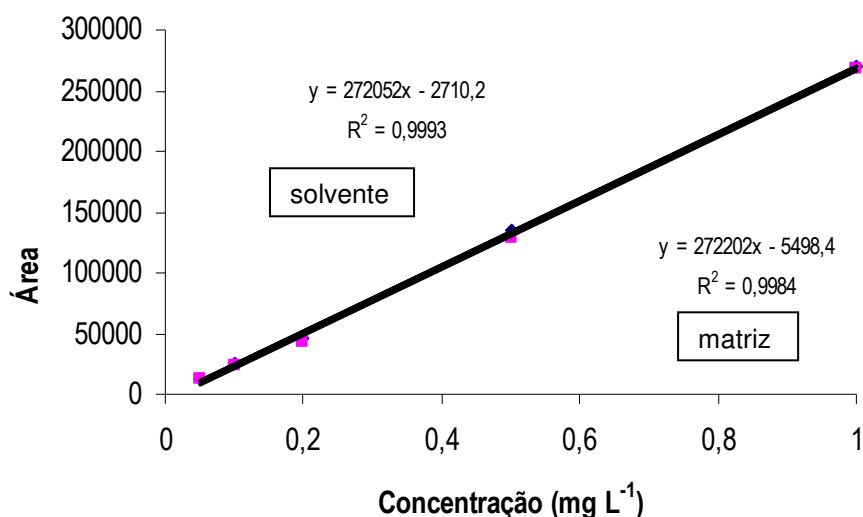


Figura 10 – Curvas analíticas em água purificada e no extrato da matriz para etilenotiouréia, nas concentrações de 0,05 a 1,0 mg ETU L⁻¹, com as respectivas equações de retas e coeficientes de determinação.

Para finalizar o estudo do efeito matriz, efetuaram-se os cálculos através da equação 4, obtendo-se o valor exato do efeito matriz causado pela amostra de urina, que deve ser ± 15 para se considerar que não ocorre efeito matriz em uma determinada amostra. Os resultados estão descritos na Tabela 9.

$$\text{Efeito Matriz} = \frac{\text{Área matriz} - \text{Área solvente}}{\text{Área solvente}} \quad (4)$$

Tabela 9 – Resultados dos cálculos de efeito matriz obtidos no estudo da linearidade, na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mg ETU L⁻¹, conforme condições cromatográficas descritas no item 4.1 (n=6).

Concentração (mg L ⁻¹)	Área (média) água purificada	Área (média) Extrato da matriz	Efeito matriz
0,05	12650	12423	-2,0
0,1	26181	23929	-8,3
0,2	47132	42540	-8,9
0,5	137215	12881	-4,7
1,0	263806	268508	-0,3

A análise dos resultados nos permite concluir que a matriz não interfere na extração e quantificação de ETU da urina, podendo-se utilizar as soluções preparadas em solvente, para os procedimentos de validação do método

4.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados de LOD e LOQ do instrumento e do método para ETU, obtidos segundo o procedimento descrito no item 3.12.2. estão listados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de LOD e LOQ para a ETU, do instrumento e do método, obtidos no sistema HPLC-UV, nas condições cromatográficas descritas no item 4.1.

Instrumental (mg L ⁻¹)		Método (mg L ⁻¹)	
LOD	LOQ	LOD	LOQ
0,05	0,2	0,05	0,2

Os valores de LOD e LOQ instrumentais foram considerados satisfatórios. Em virtude do método não apresentar nenhuma etapa de *clean-up*, e considerando-se o sistema empregado, que não possuía sensibilidade suficiente para diminuir os valores obtidos, o LOD e LOQ do método também foram satisfatórios, levando-se em conta a complexidade da matriz analisada. Os cromatogramas obtidos para o LOD e LOQ encontram-se ilustrados na Figura 11.

Uma vez que não há limites residuais permitidos para a ETU em alimentos e derivados, nas legislações européia e americana, onde se observa a tendência da tolerância zero, isto é, cada vez mais, estão restringindo os limites residuais de pesticidas em alimentos, qualquer valor encontrado torna-se de grande importância, inclusive pela legislação brasileira.

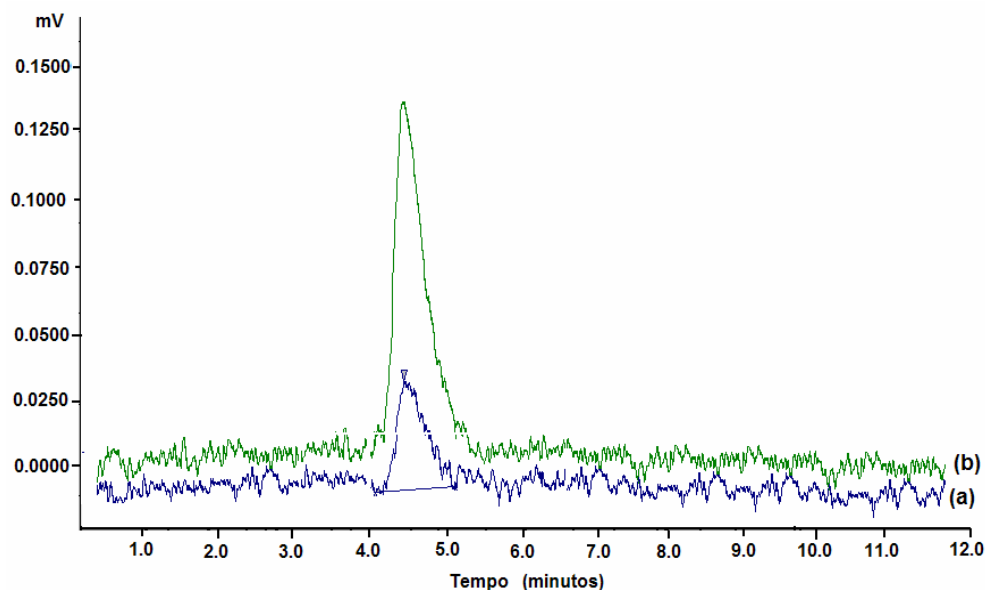


Figura 11 – Cromatograma obtido por HPLC-UV nas análises das soluções analíticas de ETU, correspondentes ao LOD (a) e ao LOQ (b) do instrumento, nas condições cromatográficas otimizadas (item 4.1).

4.6.3 Repetitividade e precisão intermediária

Os resultados dos estudos de precisão, em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária (RSD_{pii}), estão descritos na Tabela 11, para a resposta em termos de área, das soluções analíticas de ETU nas concentrações de 0,05; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹. O teste de precisão intermediária foi realizado empregando-se analista e dias diferentes dos dias utilizados para o estudo da repetitividade.

Tabela 11 – Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e de precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração, conforme as condições do item 4.1.

Nível de fortificação (mg ETU L ⁻¹)	Concentração do extrato final (mg L ⁻¹)	Repetitividade RSD_{ri} (%)	Precisão intermediária RSD_{pii} (%)
0,05	0,2	2,1	2,6
0,1	0,5	1,5	1,6
0,5	1,0	1,8	2,1

Os resultados, em termos de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para o instrumento (Tabela 11) e para o método (Tabela 12 e 13) são aceitáveis, uma vez que estes se encontram dentro dos limites aceitos nos processos de validação de métodos cromatográficos, de acordo com RIBANI *et al.* (2004) onde a precisão aceitável para valores de área deve ser $\leq 20\%$.

4.6.4 Recuperação

A Tabela 12 apresenta os valores de recuperação, com o respectivo $RSD_{rm}\%$, para os estudos de fortificação em três diferentes níveis de concentração. Os resultados de recuperação para a ETU, foram calculados através da curva analítica preparada em extrato da matriz, demonstrada na Figura 12.

Tabela 12 – Valores médios de recuperação e $RSD_{rm}\%$, em três níveis de concentração, nos ensaios de repetitividade após análise por HPLC-UV, seguindo as condições otimizadas, conforme o item 4.1.

Nível de fortificação (mg ETU L⁻¹)	Concentração do extrato final (mg L⁻¹)	Recuperação Média (%)	RSD_{rm} (%)
0,05	0,2	85,6	1,7
0,1	0,5	95,4	2,7
0,5	1,0	87,8	1,8

Os resíduos foram concentrados após a etapa de evaporação, devido à ocorrência de junção do pico do composto na menor concentração fortificada, com um pico de um composto existente na matriz, não sendo possível assim, total separação destes picos na análise cromatográfica, não ocorrendo este problema nas maiores concentrações.

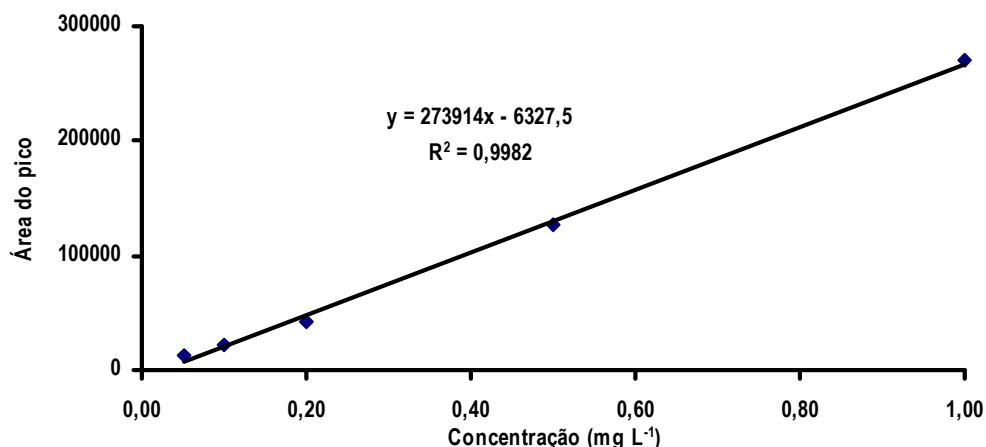


Figura 12 – Curva analítica preparada em extrato da matriz utilizada nos ensaios de fortificação e recuperação, nas concentrações de 0,05 a 1,0 mg ETU L⁻¹.

Os resultados encontrados para os ensaios de fortificação e recuperação da ETU foram excelentes para os três níveis de concentração, pois todos se encontraram dentro dos limites recomendados pela literatura, os quais devem estar entre 80 e 120%, com valores de RSD de até $\pm 15\%$ (ANVISA, 2008). De igual forma, os resultados encontrados nos testes de recuperação para a precisão intermediária, o que pode ser comprovado pelos dados descritos na Tabela 13. A tabela completa, com todas as replicatas e suas áreas, encontra-se no apêndice 3.

Tabela 13 – Valores médios de recuperação e RSD_{pim}%, em três níveis de concentração, no estudo de precisão intermediária, nas análises por HPLC-UV, seguindo as condições cromatográficas otimizadas, conforme o item 4.1.

Nível de fortificação (mg ETU L ⁻¹)	Concentração do extrato final (mg L ⁻¹)	Recuperação Média (%)	RSD _{pim} (%)
0,05	0,2	81,2	2,6
0,1	0,5	93,5	1,6
0,5	1,0	84,0	2,1

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, desenvolveu-se e validou-se um método para determinação de etilenotiuréia em urina, a qual é um metabólito genotóxico, mutagênico e teratogênico dos fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos, amplamente empregados para diversas culturas em todo o mundo.

As condições cromatográficas que foram otimizadas neste estudo, como a composição da fase móvel (metanol:água 10:90, v/v), sem a necessidade de ajuste de pH, com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $50 \mu\text{L}$, no comprimento de onda de 233 nm, empregando-se coluna Synergi C18 (250 x 4,6 mm d.i.) com pré-coluna de mesma fase estacionária, permitiram a separação e quantificação com sensibilidade satisfatória.

Foram avaliados também, o solvente e o volume do solvente de extração, onde o diclorometano foi encontrado como sendo o melhor solvente extrator, em um volume de 6 mL, para extração de ETU presente em 1 mL de urina. O diclorometano é considerado um solvente tóxico, mas no método empregado utilizou-se um volume pequeno, comparado com os métodos descritos na literatura, onde se utilizam até 100 mL de diclorometano para a extração da ETU (COLOSIO *et al.*, 2002).

Para minimizar as perdas do analito durante a etapa de evaporação do extrato, foram testadas duas técnicas de evaporação. A melhor técnica para o composto em estudo, foi a submissão do extrato em banho de água, com temperatura de $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pois acima desta temperatura, pode ocorrer a degradação da ETU. Quando se submeteu o extrato para evaporação sob fluxo de nitrogênio, ocorreu uma perda média do analito de 40%, não sendo este método apropriado para evaporação do composto em estudo.

Os parâmetros avaliados durante o procedimento de validação do método cromatográfico, apresentaram resultados satisfatórios, como por exemplo, curva analítica com coeficiente de determinação maior que 0,998, estando dentro dos valores sugeridos pela literatura específica para a análise de resíduos de pesticidas, com linearidade entre 0,05 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$,

O método mostrou também ser exato, analisando-se os percentuais de recuperação obtidos nos ensaios de fortificação (na faixa de 85,6 a 95,4%) e preciso, considerando-se os estudos de repetitividade e precisão intermediária (RSD

inferior a 3%), em comparação com os valores sugeridos pela literatura, sendo aceitáveis recuperações de 70 a 120% e precisão em termos de RSD \leq 15%.

O LOD e o LOQ alcançados para o método foram 0,05 e 0,2 mg L⁻¹, respectivamente, os quais também foram satisfatórios para este estudo. O emprego de um sistema mais sensível, tal como LC-MS, poderia permitir a quantificação de níveis mais baixos, pois o método demonstrou ser robusto e reprodutível frente às condições avaliadas.

O emprego do detector por absorção no UV/Vis apresenta vantagens na análise de pesticidas conhecidos de 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, quando comparado com outros sistemas cromatográficos como a cromatografia gasosa. Entretanto, apresenta deficiência na análise das amostras, principalmente por não possibilitar a confirmação dos picos dos compostos.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o método cromatográfico desenvolvido é eficiente, rápido e simples, alcançando sensibilidade adequada para o sistema cromatográfico empregado, HPLC-UV. O método de extração mostrou-se eficiente para a determinação de ETU, com ótimos resultados de recuperação, fornecendo resultados aceitáveis de exatidão e precisão, sendo ainda prático, uma vez que os instrumentos necessários para a aplicação do método, como centrífuga, banho de água e balança analítica, estão normalmente disponíveis nos laboratórios.

Após a validação deste método proposto, conclui-se que ele pode ser empregado como um método auxiliar nas análises de urina de pessoas expostas ocupacionalmente ou não aos fungicidas EBDC, podendo contribuir na monitorização e na aplicações de medidas terapêuticas no controle dos sintomas causados pela exposição prolongada ao composto estudado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar o método desenvolvido na determinação de etilenotiouréia em amostras reais, realizando monitorização de trabalhadores expostos ocupacionalmente aos fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos;
- Validar o método desenvolvido para a determinação de etilenotiouréia em águas ambientais, com posterior aplicação em amostras reais, avaliando-se dessa forma, o grau de contaminação ambiental;
- Validar o método para culturas, como morango e uva, que são frutos muito consumidos pela população no Rio Grande do Sul, nos quais são aplicados fungicidas EBDC; e realizar monitoramento desses frutos em supermercados e feiras-livres;
- Aplicar o método de extração, utilizando-se um sistema cromatográfico mais sensível, ou que permita a confirmação dos picos, como HPLC-DAD e LC-MS/MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B., Development of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide and their metabolites in rat plasma and urine, **Journal of Chromatography B**, v. 754, p. 533-538, 2001.

AGROTÓXICO, 2007. **Agrotóxico. Cuidado: VENENO**, Disponível em <http://br.geocities.com/zuritageo/agrotoxico.htm> , acessado em 27 de junho de 2007.

ANDREU, V.; PICÓ, Y., Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 772-789, 2004.

ANVISA, 2006. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Monografias de Produtos Agrotóxicos. Disponível em www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/monografias.pdf.>. Acessado em 20 de dezembro de 2006.

ANVISA, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Relatório de Atividade de 2001-2006**, Gerência Geral de Toxicologia, 2007.

ANVISA, 2008. Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Disponível em www.e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132%word Acessado em 11 de março de 2008.

APREA, C.; BETTA, A.; CATENACCI, G.; et al., Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study), **The Science of the Total Environment**, v. 192, p. 83-93, 1996.

APREA, C.; BETTA, A.; CATENACCI, G.; et al., Urinary excretion in five volunteers on a controlled diet (multicentric study), **The Science of the Total Environment**, v. 203, p. 167-179, 1997.

APREA, C.; COLOSIO, C.; MAMMONE, T.; et al., Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods, **Journal of chromatography B**, v. 769, p. 191-219, 2002.

ATASANOV, A. G.; TAM, S.; ROCKEN, J. M.; *et al.*, Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by dithiocarbamate, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 257-262, 2003.

BALKHI, S. E.; SANDOUK, P.; GALLIOT-GUILLEY, M., Determination of ethylenethiourea by HPLC-DAD, **Journal of Analytical toxicology**, v. 29, p. 229-233, 2005.

BANTHI, M.; TANEJA, A., Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern Indian, **Chemosphere**, v. 69, p. 63-68, 2007.

BARCELÓ, D., Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment, **Analyst**, v. 116, p. 681, 1991.

BARR, D. B.; NEEDHAM, L. L., Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review, **Journal of Chromatography B**, v. 778, p. 5-29, 2002.

BELPOGGI, F.; SOFFRITTI, M.; GUARINO, M.; et al., Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate in rats, **Analytical New York Academy Science**, v. 982, p. 123-136, 2002.

BERMÚDEZ-SALDAÑA, J. M.; ESCUDER-GILABERT, L.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J., et al., Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides, **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 115-125, 2005.

BLASCO, C.; PICÓ, Y.; MAÑES, J.; et al., Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 227-235, 2002.

BOLOGNESI, C., Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, **Reviews in Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BOLZONI, L.; SANNINO, A.; BANDINI, M., Determination of ethylenethiourea and propylenethiourea in tomato products and in fruit purees, **Food Chemistry**, v. 47, p. 299-302, 1993.

CALDAS, E. D.; MIRANDA, M. C. C.; CONCEIÇÃO, M. H., et al., Dithiocarbamate residues in Brazilian food and the potential risk for consumers, **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1877-1883, 2004.

CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E., Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticide – A probabilistic approach, **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1562-1571, 2006.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A. L.; et al., DNA damage and apoptosis induction by the pesticides mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 87-96, 2006.

CAMAROTTO, J. A.; CORDEBELLO, D. M.; BRASIL, F.; et al., Riscos no setor, Alimentação e trabalho rural: **A saúde do trabalhador rural e o risco invisível dos agrotóxicos**. UFSCAR, Engenharia de Produção Química, 2004.

CLEMENTI, M.; CAUSIN, R.; MARZOCCHI, C.; et al., A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in northeast Italy, **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 1-8, 2007.

COLOSIO, C.; FUSTIONI, S.; BIRINDELLI, S.; et al., Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers, **Toxicology Letters**, v. 134, p. 133-140, 2002.

COLOSIO, C.; VISENTIN, S.; BIRINDELLI, S.; et al., Reference values for ethylenethiourea in urine in Northern Italy: Results of a pilot study, **Toxicology Letters**, v. 162, p. 153-157, 2006.

CORSINI, E.; BIRINDELLI, S.; FUSTIONI, S.; et al., Immunomodulatory effects of the fungicides Mancozeb in agricultural workers, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 208, p. 178-185, 2005.

DASGUPTA, S.; MEISNER, C.; WHEELER, D.; et al., Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 121-132, 2007.

DECOS: Dutch Expert Committee on Occupational Standards, **Ethylenethiourea**. The Hague: Health Council of the Netherlands, 1999.

DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: Expectativa de aumento da demanda em 2007, **Análises e indicadores do Agronegócio**, v. 2, 2007.

DOERGE, D. R.; YEE, A. B. K., Liquid chromatography determination of ethylenethiourea using pulsed amperometric detection, **Journal of Chromatography**, v. 586, p. 158-160, 1991.

DOMICO, L. M.; ZEEVALK, G. D.; BERNARD, L. P.; et al., Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction, **Neurotoxicology**, v. 27, p. 816-825, 2006.

DRZEWICZ, P.; NALECZ-JAWECKI, G.; GRYZ, M., et al., Monitoring of toxicity during degradation of selected pesticides using ionizing radiation, **Chemosphere**, v. 57, p. 135-145, 2004.

DUBEY, J. K.; HEBERER, T.; STAN, H. J., Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 31-38, 1997.

ECKERMAN, D. A.; GIMENES, L. S.; SOUZA, R. C., Age related effects of pesticide exposure on neurobehavioral performance of adolescent farm workers in Brazil, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 29, p. 164-175, 2007.

ELIA, M. C.; ARCE, G.; HURT, S. S.; et al., The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemical's genotoxic potential, **Genetic Toxicology**, v. 341, p. 141-149, 1995.

EPA, Environmental Protection Agency from EUA, **National Pesticide Program, Annual Report**, Capping a Successful Decade, 2006.

ETHYLENETHIOUREA, 1977. International Union of Pure and Applied Chemistry: Ethylenethiourea, Applied Chemistry division Commission on Terminal pesticides Residues, **Pure & Applied Chemistry**, v. 49, p. 575-689, 1977.

FAO. Food and Agriculture Organization, **Validation of analytical methods for food control**. A report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation. Rome: FAO, 1998. 18p.

FAO/WHO. *Codex Alimentarius*. V. 2A, **Pesticide residues in food**. 2. ed. Rome:FAO, 2000. PtI: Methods of analysis and sampling, p. 39-47.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Ethylenethiourea, ETU (108)**, 1993.

FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, E. N., **Fungicidas: Historia, Presente y Futuro de los Fungicidas Utilizados para el control del Tizón**, Universidad Nacional Agrária, La Molina, Apdo 456, Lima, Peru, 2001.

FITSANAKIS, V. A.; AMARNATH, V.; MOORE, J. T.; et al., Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 1714-1723, 2002.

FREAKES, R. A., Drinking water guideline for thiourea, a metabolite of ethylene-bis-dithiocarbamate fungicides, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 207-218, 1988.

FUSTIONI, S.; CAMPO, L.; COLOSIO, C., Application of gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary ethylenethiourea in humans, **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 251-258, 2005.

GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C., Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples, **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 35-41, 2004 a.

GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C., Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection, **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 225-229, 2004 b.

GEORGIAN, L.; MORAU, I.; DRAGHICESCU, T.; et al., Genotoxic effects of alachor and mancozeb. **Mutation Research**, v. 116, p. 341-348, 1983.

GILL, Y.; SINFORT, C., Emission of pesticide to the air during sprayer application: A bibliographic review, **Atmospheric Environment**, v. 39, p. 5183-5193, 2005.

GONZÁLEZ, M.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M. A.; *et al.*, Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro IV. DNA damage and repair kinetics asessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovaru (CHO) cells, **Mutation Research**, v. 534, p. 145-154, 2003.

GRAFF, S. L., **Análisis de orina – Atlas Color**, Buenos Aires, Editora Médica Panamericana S.S., 1983, 222p.

GRISOLIA, C. K., Fungicidas Etileno-bis-Ditiocarbamatos: Aspectos de Genotoxicidade, Carcinogenicidade e Teratogenicidade, **Pesticidas**, v. 5, p. 19-32, 1995.

HAYAMA, T.; YADA, K.; ONIMARU, S.; et al., Simplified method for determination of polycarbamate fungicide in water samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry following derivatization with dimethyl sulfate, **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 251-258, 2007.

HE, F., Biological monitoring on exposure to pesticides: current issues, **Toxicology Letters**, v. 108, p. 277-283, 1999.

HENNION, M. C., Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.

HILL, A. R. C.; REYNOLDS S. L., Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

ICH Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, Geneva, disponível em www.pharmacontract.ch/support/pdf_support/Q2a.pdf, acessado em 11 de março de 2008.

JACOBSEN, O. S.; BOSSI, R., et al., Degradation of ethylenethiourea (ETU) in oxic and anoxic sandy aquifers, **Microbiology Reviews**, v. 20, p. 539-544, 1997.

JAFFEE, W. B.; TRUCCO, E.; LEVY, S.; et al., Is the urine really negative? A systematic review of tampering methods in urine drug screening and testing, **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 33, p. 33-42, 2007.

KAUSHIK, P.; KAUSHIK, G., An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides, **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 102-111, 2007.

KAWAMOTO, T.; YANO, M.; MAKIHATA, N., Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection, **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 155-161, 2005.

KAZOS, E. A.; STALIKAS, C. D.; NANOS, C. G.; et al., Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples, **Chemosphere**, v. 68, p. 2104-2110, 2007.

KHAN, S. M.; SOBTI, R. C.; KATARIA, L.; Pesticide-Induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract, **Clinica Chimica Acta**, v. 358, p. 131-138, 2005.

KONTOU, S.; TSIPI, D.; OREOPOULOU, V.; et al., Determination of ETU in Tomato Product by HPLC-PDA. Evaluation of Cleanup Procedures, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 1090-1097, 2001.

KURTTIO, P.; VARTIAINEN, T.; SAVOLAINEN, K., A high performance liquid chromatographic method for determination of ethylenethiourea in urine and on filters, **Analytica Chimica Acta**, v. 212, p. 297-301, 1988.

LARINI, L., **Toxicologia**, 3^a ed. São Paulo, Ed. Manole, 1997, 301p a.

LARINI, L., **Toxicologia dos praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999, 230 p b.

LAWRENCE, J. F.; IVERSON, F., Liquid chromatography with UV absorbance and polarography detection of ethylenethiourea and related sulfur compounds, **Journal of Chromatography**, v. 212, p. 245-250, 1981.

LEBLANC, G.; A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples, **LC-GC**, v. 19, p. 1120, 2001.

MATSOVÁ, E.; CHOVANCOVÁ, J.; BUZINKAIOVÁ, T., Capillary gas chromatography of ethylenethiourea, a degradation product of ethylene-bis-dithiocarbamates, **Journal of Chromatography**, v. 286, p. 331-337, 1984.

MEIRING, H. D.; JONG, A. P. J. M., Determination of ethylenethiourea in water by single-step extractive derivatization and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 683, p. 157-165, 1994.

OGA, S., **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo, Atheneu, 1996, 515p.

OHTA, T.; TOKISHITA, S.I.; SHIGA, Y.; et al., An Assay System for Detection Environmental Toxicants with Cultured Cladoceran Eggs *in vitro*: Malformations Induced by Ethylenethiourea, **Environmental Research**, v. 77, p. 43-48, 1998.

OPAS/OMS: Organização Pan-Americana de Saúde, **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**, organização Mundial da Saúde, Representação do Brasil, 1997.

OSABA, L.; REY, M. J.; AGUIRRE, A.; et al., Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation, **Mutation Research**, v. 518, p. 95-106, 2002.

OTERO, R. R.; GRNADE, C. B.; GÁNDARA, J. S., Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection, **Journal of Chromatography A**, v. 992, p. 121-131, 2003.

PENG, G. W., Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies, **Journal Chromatography**, v. 531, 1990.

POZZEBON, J. M., **Desenvolvimento de Métodos de Extração, Separação e Quantificação de Herbicidas em Fluido Biológico**, 2002, 182p. Tese (Doutorado em Química) – UNICAMP, Campinas, SP.

PRINCE, J. L., Analysis of ethylenethiourea in urine by high-performance liquid chromatography, **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 33, p. 93-94, 1985.

QUACKENBUSH, R.; HACKLEY, B.; DIXON, J., Screening for Pesticide Exposure: A Case Study, **Journal of Midwifery & Women's Health**, p. 3-11, 2005.

QUEIROZ, S. C.C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, **Química Nova**, v. 24, p. 68, 2001.

RAMOS, A.; SILVA FILHO, J. F., et al., Exposição a pesticidas, atividade laborativa e agravos à saúde, **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, p. 41-45, 2004.

RECENA, M. C. P.; CALDAS, E. D.; PIRES, D. X.; et al., Pesticide exposure in Culturama, Brazil – Knowledge, attitudes, and practices, **Environment Research**, v. 102, p. 230-236, 2006 a.

RECENA, M. C. P.; PIRES, D. X.; CALDAS, E. D., Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, **Science of the Total Environment**, v. 357, p. 88-95, 2006 b.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H., et al., Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M., Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.

RIVAS, A.; CERRILHO, I.; GRANADA, A.; et al., Pesticide exposure of two age groups of women and its relationship with their diet, **Science of the Total Environment**, v. 382, p. 14-21, 2007.

SAIEVA, C.; APREA, C.; TUMINO, R.; et al., Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticides metabolites in health adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa), **Science of the Total environment**, v. 332, p. 71-80, 2004.

SHUKLA, Y.; ANTONY, M; KUMAR, S.; et al., Carcinogenic activity of a carbamate fungicide, Mancozeb, on mouse skin, **Cancer Letters**, v. 53, p. 191-195, 1990.

SILVA, R. C., **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**, 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; et al., Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada: **Efeitos à saúde provocados pela exposição aos agrotóxicos**, Ministério da Saúde, 2006.

SINDAG, 2007. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, **Defensivos Agrícolas**, Disponível em <<http://www.sindag.com.br/new/setor/interna>. Acessado em 20 de outubro de 2007.

SINITOX, 2007. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Estatística anual de casos de intoxicações e envenenamento; 2007**, disponível em www.fiocruz.br/sinitox , acessado em 19 de outubro de 2007.

SMITH, R. M., Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques, **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

STOPPELLI, I. M. B.; CRESTANA, S., Pesticide exposure and cancer among rural workers from Bariri, São Paulo State, Brazil, **Environment International**, v. 31, p. 731-738, 2005.

STRASINGER, S. K., **Uroanálise e fluidos biológicos**, 3ª ed., São Paulo, Ed. Premier, 1998. 213p.

SZOLAR, O. H. J., Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates, **Analytica Chimica Acta**, v. 582, p. 191-200, 2007.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; et al., Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables, **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175-191, 2000.

THRIRUCHELVAM, M.; BROCKEL, B. J.; RICHFIELD, E. K.; et al., Potentiated and preferential effects of combined paraquat and mancozeb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?, **Brain Research**, v. 873, p. 225-234, 2000.

TOMLIN, C. D. S., **The e-Pesticide Manual**, The British Crop protection Council, versão eletrônica 3,0, 2004

WANG, H.; PACAKOVÁ, V.; STULÍK, K., Determination of ethylenethiourea in beverages without sample pre-treatment using high-performance liquid chromatography and amperometric detection on a copper electrode, **Journal of Chromatography**, v. 457, p. 398-402, 1988.

WAICHMAN, A. V.; EVE, E.; NINA, N. C. S., Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian, **Crop Protection**, v. 26, p. 576-583, 2007.

WARE, G. W., **The Pesticide Book**, Califórnia: Thomson Publications, 1994, 384 p.

WITTKÉ, K.; HAJIMIRAGHA, H.; DUNEMANN, L.; et al., Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure, **Journal of Chromatography B**, v. 755, p. 215-228. 2001.

WHITE, K. E.; HOPPIN, J. A., Seed treatment and its implication for fungicide exposure assessment, **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 14, p. 195-203, 2004.

WHO, World Health Organization, **Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and prophylenethiourea: a general introduction**, Geneva, 1988, 140 p.

WHO, World Health Organization, 1990. **Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture**, Geneva, Switzerland.

van der POLL, J. M.; HAAN-VERSLUIS, G.G.; WILDE, O., Determination of ethylenethiourea in water samples by gas chromatography with alkali flame ionization detection and mass spectrometric confirmation, **Journal of Chromatography**, v. 643, p. 163-168, 1993.

VIEIRA, E. e LICHTIG, J., Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas, **Instituto Biológico de São Paulo**, v. 71, p. 698-700, 2004.

XU, S., Environmental fate of Ethylenethiourea, **Environmental Monitoring & Pest Management**, Department of Pesticide Regulation, 2000.

ZHOU, Y.; SHIE, F. S.; PICCARDO, P.; et al., Proteasomal Inhibition Induced by Manganese Ethylene-bis-dithiocarbamate: Relevance to Parkinson's Disease **Neuroscience**, v. 128, p. 281-291, p. 1-9, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Avaliação da estabilidade da etilenotiuréia em diclorometano, quando submetida à evaporação sob fluxo de nitrogênio e em banho de água, a 44 °C.

Resultados dos testes de recuperação, empregando-se **fluxo de nitrogênio** para evaporação da solução de etilenotiuréia em diclorometano.

Concentração (mg L ⁻¹)	Área	Média	Recuperação (%)	Média (%)	SD	RSD%
0,1	26927	21239	79	63	20,0	31,9
	24313		72			
	14573		43			
	10810		32			
	25528		75			
	25282		75			
0,5	110401	80417	62	58	20,5	35,5
	66572		37			
	99568		56			
	56474		32			
	149854		84			
	134507		76			
1,0	155948	215719	45	62	16,3	26,6
	166120		48			
	204887		59			
	245666		71			
	310467		89			
	211228		61			

Resultados dos testes de recuperação, empregando-se **banho de água, a 44 °C**, para evaporação da solução de etilenotriuréia em diclorometano

Concentração (mg L⁻¹)	Área	Média	Recuperação (%)	Média (%)	SD	RSD%
0,1	32243	31335	95	92	7,3	7,9
	33550		99			
	31661		93			
	32652		96			
	31370		92			
	26531		78			
0,5	134061	151692	75	85	6,6	7,8
	143008		81			
	154688		87			
	153318		86			
	167958		95			
	157119		88			
1,0	292273	329153	84	95	5,6	5,9
	326405		94			
	330966		95			
	343844		99			
	346238		100			
	335192		96			

APÊNDICE 2

Parâmetros das curvas analíticas obtidas nos estudos de linearidade, na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mg ETU L⁻¹.

Curva analítica em (solvente)

Concentração (mg L ⁻¹)	Área						Média
	1	2	3	4	5	6	
0,05	12562	12889	13418	13375	11905	11880	12672
0,1	25958	25771	26405	24728	26221	27459	26090
0,2	44187	46927	49847	44673	48343	46117	46682
0,5	124258	135309	129260	132419	167736	121570	135092
1,0	276309	289117	264077	265379	254646	265722	269208

Curva analítica no extrato da matriz

Concentração (mg L ⁻¹)	Área						Média
	1	2	3	4	5	6	
0,05	13483	11942	12099	11983	12617	12413	12423
0,1	23692	22288	22975	28253	23144	23224	23929
0,2	46537	45733	42968	40252	39444	40305	42540
0,5	139575	120941	119187	126187	129309	136888	128681
1,0	267643	276521	254365	271580	270420	270520	268508

APÊNDICE 3

Valores médios de recuperação e $RSD_{rm}\%$, em três níveis de concentração, nos ensaios de fortificação e recuperação e posterior análise por HPLC-UV.

Fortificação (mg L ⁻¹)	Conc. Final Extrato (mg L ⁻¹)	Área	Recup. (%)	Média (%)	SD (%)	RSD%
0,05	0,2	41446	87,2	85,6	1,5	1,7
		40030	84,6			
		40011	84,6			
		41769	87,8			
		39868	84,3			
		40352	85,2			
0,1	0,5	119487	91,9	95,4	2,6	2,7
		128852	98,7			
		121619	93,4			
		123603	94,9			
		124761	95,7			
		127856	98,0			
0,5	1,0	231568	86,9	87,8	1,6	1,8
		229561	86,1			
		241507	90,5			
		234111	87,8			
		231461	86,8			
		236719	88,7			

ANEXOS

ANEXO 1

Características dos princípios ativos pertencentes à classe dos fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, dispostos em ordem alfabética.

Mancozebe	
Nome químico (IUPAC).....	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex zinc salt
Sinonímia.....	Manzeb
Nº CAS.....	8018-01-7
Fórmula molecular.....	$[C_4H_6MnN_2S_4]_xZn_y$
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida, acaricida
Classificação toxicológica.....	III - medicamente tóxico
Massa molecular ($g\ mol^{-1}$).....	271,2
Ponto de fusão ($^{\circ}C$).....	137,8
Densidade a 22 $^{\circ}C$ ($g\ cm^{-3}$).....	1,92
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 $^{\circ}C$)...	6,2 $mg\ L^{-1}$
Solubilidade em solventes orgânicos....	Insolúvel na maioria dos solventes orgânicos; dissolve-se em solução com agentes quelantes
Estabilidade.....	Instável em ambientes úmidos
Formulações comerciais.....	Dithane M-45 (Dow AgroSciences); Manconex (Griffin); Sancozeb (Dow AgroSciences);
Persistência ambiental.....	Rápida degradação no meio ambiente por hidrólise, oxidação e fotólise

FONTES: TOMLIN (2004), ANVISA (2006)

Manebe

Nome químico (IUPAC).....	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric)
Nº CAS.....	12427-38-2
Fórmula molecular.....	C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	IV – pouco tóxico
Massa molecular (g mol ⁻¹).....	265,3
Densidade a 22 °C (g cm ⁻³).....	1,92
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	Insolúvel
Solubilidade em solventes orgânicos....	Insolúvel
Estabilidade.....	Estável à luz; instável a umidade e ar
Formulações comerciais.....	Dithane M-22 (Dow AgroSciences), Manzate (DuPont), Agroneb (AgroSan)
Persistência ambiental.....	Rapidamente degradado por hidrólise, oxidação e fotólise

FONTES: TOMLIN (2004), ANVISA (2006)

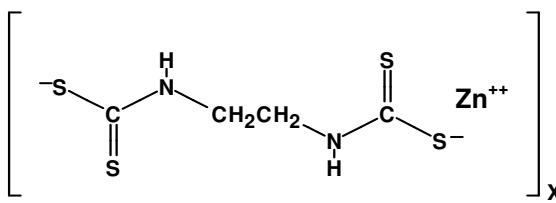
Metiram

Nome químico (IUPAC).....	Polymeric zinc propylenebis (dithiocarbamate)
Sinonímia.....	Metirame zinc
Nº CAS.....	9006-42-2
Fórmula molecular.....	[C ₁₆ H ₃₃ N ₁₁ S ₁₆ Zn ₃] _x
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	III – mediamente tóxico
Massa molecular (g mol ⁻¹).....	1088,7
Ponto de fusão (°C).....	Não inflamável
Densidade a 22 °C (g cm ⁻³).....	1,860
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	Insolúvel
Solubilidade em solventes orgânicos....	Praticamente insolúvel em solventes orgânicos; solúvel em piridina, mas com decomposição
Estabilidade.....	a 30 °C (decomposição pela luz)
Formulações comerciais.....	Polyram DF (BASF)
Persistência ambiental.....	DT ₅₀ no solo de 2,7 dias

FONTES: TOMLIN (2004), ANVISA (2006)

ANEXO 2

Características do Zinebe, fungicida etileno-bis-ditiocarbamato proibido nos EUA, não registrado no Brasil, mas que continua sendo empregado em várias partes do mundo.

Zinebe	
Nome químico (IUPAC).....	Ethylene bis(dithiocarbamate)zinco
Nº CAS.....	12122-67
Fórmula molecular.....	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Dimetilditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	II - Altamente tóxico
Massa molecular (g mol ⁻¹).....	275,8
Ponto de fusão (°C).....	Não inflamável
Estrutura Química.....	 <p style="text-align: center;"> $\left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{S} \end{array} \text{N} \text{H} \text{---} \text{CH}_2\text{CH}_2 \text{---} \text{N} \text{H} \begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{S}^- \end{array} \text{Zn}^{++} \right]_x$ </p>
Formulações comerciais.....	Pestanal [®] , Azurro (70% de zinebe)
Persistência ambiental.....	Degradação e incorporação dos constituintes naturalmente pelas plantas

FONTES: TOMLIN (2004); GONZÁLEZ *et al.*, 2003

ANEXO 3

Características físico-químicas, nomes químicos, sinonímias e nomes comerciais da etilenotiouréia.

Etilenotiouréia (ETU)	
Nomes químicos.....	2-Imidazolidinethione e Imidazolino-2-tiol
Sinonímia.....	Etilenotiouréia, N,N' etilenotiouréia, 2-mercaptoimidazolidino, ETU,
Nº CAS.....	2-imidazolino-2-tiol, 1,3-etilenotiouréia 96-45-7
Fórmula molecular.....	C ₃ H ₆ N ₂ S
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etileno-bis-ditiocarbamato
Classe.....	Metabólito dos fungicidas EBDC
Massa molecular (g mol ⁻¹).....	102,15
Ponto de fusão (°C).....	203 – 204
Densidade relativa (água=1).....	1,4
Solubilidade em água g/100 mL.....	a 30 °C: 2,0 a 60 °C: 9,0 a 90 °C: 44
Solubilidade em solventes orgânicos a 18 °C.....	DMSO - ≥100.000 ppm 95% etanol – 1.000 – 5.000 ppm Dimetilformamida – 5.0 – 10.0 ppm
Coefficiente de partição octanol/água.....	Log P _{ow} = - 0,7
Pressão de vapor.....	< 1 mmHg a 20 °C
Formulações comerciais.....	NA-22 [®] , NA-22-D [®] , Pennac CRA [®] , Robac-22 [®] , Sancellor-22 [®] , soxinol- 22 [®] , Occeler-22 [®] e Rodanin S-62 [®]

FONTES: XU, 2000; ETHYLENETHIOUREA, 1977.