



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**



---

**“Otimização, validação e aplicação de método para  
análise de diuron e seus metabólitos em urina de ratos  
utilizando SPE e HPLC-DAD”**

**ARARAQUARA**

**2009**

STEPHANE FRANCO

“Otimização, validação e aplicação de método para análise de diuron e seus metabólitos em urina de ratos utilizando SPE e HPLC-DAD”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Rosa Rodrigues de Marchi

**Co- orientador:** Prof. Dr. Wagner Vilegas

ARARAQUARA

2009

## *Agradecimento*

Primeiramente à Deus, por ter me dado a vida, e me guiado por bons caminhos.

Aos meus pais, Celso e Maria de Lourdes, e ao meu irmão Fernando, por me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos de alegrias e aflições.

À CNPq, por dois anos de apoio financeiro.

À Prof.<sup>a</sup> Mary Rosa, pela amizade, orientação, colaborando para o meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos integrantes do grupo GRESCO, em especial Guilherme Zocolo, por ter disponibilizado tempo para que todas as minhas dúvidas fossem resolvidas, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos, em especial Fernanda e Iolanda, pelos momentos inesquecíveis vividos.

À todos os professores que tiveram grande importância para meu crescimento acadêmico.

# RESUMO

---

As culturas com maior potencial de contaminação do ambiente por pesticidas, são as que, ou são cultivadas em grandes áreas como a soja, o milho e a cana-de-açúcar, ou as que utilizam grandes quantidades de pesticidas por área cultivada, como é o caso do tomate e da batata. O diuron é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil, principalmente na cultura de cana-de-açúcar que cobre mais de 70% do estado de São Paulo, sendo também utilizado na cultura de tomate e frutas. Estudos constataram que o diuron é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal em ratos, sendo excretado na forma original ou metabolizado principalmente pela urina. O metabolito predominante do diuron em urina é a 3,4-diclorofenil-uréia (DCPU), que posteriormente é degradado a 3,4-dicloroanilina (DCA), mais estável. Ocorrem ainda mais dois metabólitos minoritários, a 3,4- diclorofenil-metil uréia (DCPMU) e o N,N'-Bis(p-clorofenil)uréia (4,4'-diclorocarbanilida). Este trabalho teve como finalidade otimizar e validar um método para determinação de diuron, DCA, DCPU, DCPMU e 4,4'-diclorocarbanilida em urina de ratos, aplicando o método validado à análise de amostras de urina de animais incluídos no estudo temático que investiga o mecanismo de carcinogenicidade do diuron (sub-projeto: “Estudo do modo de ação (MOA) cancerígeno do Diuron sobre o urotélio de ratos Wistar machos”). O método otimizado e validado neste trabalho permite a análise de diuron e metabólitos em 1 ml de urina, utilizando SPE no preparo da amostra para análise e HPLC/UV ( $\lambda = 250$  nm) na separação e quantificação dos analitos. A seletividade do método permite a análise de diuron, DCA, DCPU e 4-4 diclorocarbanilida em urina de ratos Wistar. Para o DCPMU existem há co-eluição de outros constituintes da amostra com este pico, por isso a análise para esta molécula demanda a confirmação pela pureza do pico. O limite de quantificação do método foi  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  para diuron e DCA. A exatidão do método, avaliada pela recuperação dos analitos de amostras enriquecidas esteve entre 68 e 124 % (CV < 1 %). O método otimizado foi aplicado a amostras de urina de animais incluídos no projeto temático mencionado, sendo possível a identificação de DCPMU para animais alimentados com ração contendo 60, 125, 500, 1250, 2500 mg kg<sup>-1</sup> de diuron, enquanto que DCA pode ser identificado nos grupos alimentados com ração contendo 1250, 2500 mg kg<sup>-1</sup> de diuron. Em todos os casos as concentrações estavam aquém dos limites de quantificação do método.

**Palavras chaves:** diuron, metabólitos, urina, HPLC

# ABSTRACT

---

The crops with the greatest potential for environmental contamination by pesticides, are cultivated in large areas such as soybean, corn and sugar cane, or those that use large quantities of pesticides by cultivated area, as tomatoes and potatoes. The herbicide diuron is one of the most used in Brazil, mainly for sugar cane which, that covers more than 70% of the São Paulo State and is also used in the cultivation of tomatoes and other fruits. Studies found that diuron is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract in rats and is excreted in its original form or metabolized mainly by the urine. The predominant metabolite of diuron in urine is 3,4-dichlorophenyl-urea (DCPU), which is subsequently degraded to 3,4-dichloroaniline (DCA), more stable. Occur further two minor metabolites, the 3,4 - dichlorophenyl-methyl urea (DCPMU) and N,N'-Bis (p-chlorophenyl) urea (4,4-dichlorocarbanilide). This work aimed to optimize and validate a method for analysis of diuron, DCA, DCPU, DCPMU and 4,4-dichlorocarbanilide in urine of rats, using the validated method to application to urine samples from animals included in a thematic study that investigates the diuron mechanism of carcinogenicity (sub-project: " Estudo do modo de ação (MOA) cancerígeno do Diuron sobre o urotélio de ratos Wistar machos"). The method optimized and validated in this study allows the analysis of diuron and metabolites in 1 ml of urine using SPE for sample preparation and HPLC/UV analysis ( $\lambda = 250$  nm). The selectivity of the method allows the analysis of diuron, DCA, DCPU and 4-4 dichlorocarbanilide in urine of Wistar rats. DCPMU co-elutes with some other sample constituents, so the analysis for this molecule demand confirmation by the purity of the peak. Method quantification limit was  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  for diuron and DCA. The accuracy of the method, evaluated by analytes recoveries from spiked samples, were between 68 and 124% (CV <1%). The optimized method was applied to samples of urine from animals included in the thematic project, it was possible to identify DCPMU in samples from animals that fed diets containing 60, 125, 500, 1250, 2500  $\text{mg kg}^{-1}$  of diuron, while DCA may be identified in the groups fed 1250, 2500  $\text{mg kg}^{-1}$  of diuron. In all cases the concentrations were below the limit of quantification of the method.

**Key words:** diuron, metabolites, urine, HPLC

# Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Estruturas químicas do diuron e dos seus principais produtos de degradação.....	16
<b>Figura 2.</b> Gaiolas metabólicas utilizadas no estudo toxicológico experimental.....	36
<b>Figura 3:</b> Fluxograma do tratamento da amostra.....	38
<b>Figura 4:</b> Espectros UV, obtidos no sistema HPLC/DAD Varian ProStar, utilizando soluções $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada substância em acetonitrila.....	42
<b>Figura 5:</b> Cromatogramas HPLC/UV, obtidos a $250 \text{ nm}$ e $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ , para algumas das condições cromatográficas detalhadas na Tabela 5 (1) DCPMU; (2) diuron; (3) DCA; (4) 4,4' diclocarbanilida; (5) DCPU .....	44
<b>Figura 6:</b> Cromatogramas HPLC/UV .Solução padrão dos analitos ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila. (1) DCPMU; (2) diuron; (3) DCA; (4) 4,4' diclocarbanilida; (5) DCPU .....	45
<b>Figura 7:</b> Cromatograma HPLC/UV dos padrões dos analitos em estudo com concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ na melhor condição de eluição (condição descrita na Tabela 5).....	46
<b>Figura 8:</b> Curva de linearidade do Diuron.....	47
<b>Figura 9:</b> Curva de linearidade do DCA.....	48
<b>Figura 10:</b> Curva de linearidade do DCPU.....	48
<b>Figura 11:</b> Curva de linearidade da 4,4'-diclorocarbanilida.....	49
<b>Figura 12:</b> Curva de Linearidade do DCPMU.....	49
<b>Figura 13:</b> Curva analítica do diuron.....	50
<b>Figura 14:</b> Curva Analítica do DCA.....	50
<b>Figura 15:</b> Curva Analítica do DCPU.....	51
<b>Figura 16:</b> Curva analítica da 4,4'-diclorocarbanilida.....	51
<b>Figura 17:</b> Curva Analítica do DCPMU.....	52
<b>Figura 18:</b> Cromatograma (HPLC/UV) da solução padrão dos analitos ( $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila, nas condições otimizadas (Tabela 5) (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida.....	53

<b>Figura 19:</b> Cromatograma (HPLC/UV) da solução dos analitos ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila, nas condições otimizadas (Tabela 5) (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU .....	54
<b>Figura 20:</b> Estrutura química do sorvente Strata X.....	55
<b>Figura 21:</b> Cromatograma do padrão de DCPMU a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , da amostra testemunha utilizando o cartucho Strata X, e do branco do solvente utilizando o cartucho Strata X.....	56
<b>Figura 22:</b> Cromatogramas da reotimização do método utilizando uma amostra de urina fortificada com concentração final de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU.....	57
<b>Figura 23:</b> Cromatogramas (HPLC/UV) da amostra testemunha, e da amostra fortificada com os padrões em acetonitrila com concentração igual à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU.....	58
<b>Figura 24:</b> Cromatogramas (HPLC/UV) da amostra testemunha, da amostra fortificada e dos padrões em acetonitrila com concentração igual à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , na mesma condição isocrática otimizada para as curvas analíticas. (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU.....	59
<b>Figura 25:</b> Cromatogramas HPLC/UV para: (a) solução padrão de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila eluída do cartucho Strata-X com 5 ml e seca com nitrogênio, (b) solução padrão de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ eluída com 5 mL, (c) solução padrão de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e eluída com 1 mL, (d) solução padrão de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ sem passar pelo cartucho. (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU.....	61
<b>Figura 26:</b> Cromatogramas HPLC/UV para: (A) Animais controle, tratados com ração sem adição do diuron, (B) Animais tratados com ração com 60 ppm de diuron, (C) Animais tratados com 125 ppm de diuron, (D) Animais tratados com 500 ppm de diuron, (E) Animais tratados com 1250 ppm de diuron, (F) Animais tratados com 2500 ppm de diuron . (1) DCPMU.....	64
<b>Figura 27:</b> Espectros UV. (A) padrão de DCA, (B) padrão de DCPU, (C) DCA na amostra com tratamento de $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , (D) substância desconhecida.....	66
<b>Figura 28:</b> Cromatograma HPLC/UV para amostra de urina com tratamento com $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de diuron (1) DCPMU, (2) DCA, (3) substância desconhecida.....	66
<b>Figura 29:</b> Cromatogramas HPLC/UV para: (a) amostra de urina tratada com $2500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , (b) amostra enriquecida com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (c) solução padrão de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU.....	68

# Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1:</b> Constantes físicas e químicas do diuron e seus metabólitos.....	15
<b>Tabela 2:</b> Alguns métodos para determinação cromatográfica de diuron, DCA e DCPU em diversas matrizes.....	21
<b>Tabela 3:</b> Condições de condicionamento e extração da amostra.....	39
<b>Tabela 4:</b> Condições avaliadas para a otimização cromatográfica.....	43
<b>Tabela 5:</b> Condições cromatográficas otimizadas.....	45
<b>Tabela 6:</b> Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlação linear para o sistema HPLC-UV-DAD, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ e detecção a 250 nm, nas condições cromatográficas otimizadas (Tabela 5).....	53
<b>Tabela 7:</b> Valores de recuperação para amostras fortificadas com $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)..	59
<b>Tabela 8:</b> Valores de recuperação dos testes <b>com e sem secagem sob fluxo de <math>\text{N}_2</math></b> .....	61
<b>Tabela 9:</b> Valores das recuperações para as amostras enriquecidas, suprimindo-se a etapa de secagem com nitrogênio. (n =3).....	62
<b>Tabela 10:</b> Valores das recuperações do diuron e seus metabólitos.....	69

# Sumário

---

<b>1.Revisão da literatura.....</b>	<b>11</b>
Pesticidas no ambiente.....	11
Efeitos do diuron e seus produtos de degradação sobre os organismos vivos.....	17
Métodos analíticos para análise de diuron.....	20
Validação.....	22
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>32</b>
3.1.Materiais e Reagentes.....	32
3.2.Otimização das condições cromatográficas (HPLC/UV) para análise e avaliação do desempenho do sistema cromatográfico.....	33
Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV .....	33
Seleção no modo de eluição e solventes.....	33
Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico.....	34
3.3.Otimização e validação do método incluindo o tratamento da amostra.....	34
Obtenção das amostras controle e fortificação das mesmas para o estudo de recuperação.....	34
3.4. Aplicação do método validado às amostras do estudo toxicológico .....	39
<b>4. Resultados e Discussões.....</b>	<b>41</b>
4.1. Otimização das condições cromatográficas (HPLC/UV) para análise e avaliação do desempenho do sistema cromatográfico.....	41
Escolha do comprimento de onda .....	41
Otimização das condições cromatográficas.....	42
Estudo da linearidade e construção da curva analítica.....	47
Obtenção dos limites de detecção e de quantificação do sistema Analítico.....	52
4.2. Estudo de recuperação do método.....	54
4.3. Aplicação do método a amostras de urina provenientes do estudo toxicológico.....	63
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>72</b>
<b>Referências.....</b>	<b>73</b>

# 1. REVISÃO DA LITERATURA

---

## **Pesticidas no ambiente**

De acordo com a EPA (Environmental Protection Agency, 2008), os pesticidas ou praguicidas, são todas as substâncias ou misturas que tem como objetivos impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Um pesticida pode ser uma substância química ou um agente biológico (tal como um vírus ou bactéria) que é lançada de encontro com as pragas que estiverem destruindo uma plantação, disseminando doenças, incomodando pessoas, etc. É utilizada em diversas formas de seres vivos, tais como: insetos, ervas daninhas, moluscos, pássaros, mamíferos, peixes, nematelmintos e micróbios.

Muitos pesticidas usados na agricultura têm efeitos tóxicos para o meio ambiente e para organismos vivos quando aplicados imprópriamente ou excessivamente (Melo, 2005).

Pesticidas são usados na agricultura, contribuindo para o aumento da quantidade e qualidade dos produtos agrícolas, no entanto, o uso de pesticidas pode conduzir à poluição de águas superficiais e subterrâneas com os próprios princípios ativos e/ou seus metabólitos (Boti, 2007a).

A utilização dos pesticidas é quase tão antiga quanto a agricultura. A três mil anos atrás, as antigas civilizações grega, romana e chinesa já conheciam a capacidade do pó de enxofre de controlar insetos e do sal de matar ervas daninhas. Também há o registro de materiais usados, com resultados questionáveis, como

extratos de pimenta, água com sabão, cal, vinagre etc. O primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos foi a descoberta no século XIX, do “Verde de Paris” (acetoarsenito de cobre) para combater o escaravelho da batata (Santos, 2008).

A partir de 1930 iniciou-se a busca por pesticidas sintéticos, inicialmente em um processo aleatório empregando estudos casuais. O DDT, na realidade, foi sintetizado pela primeira vez em 1874 pelo químico alemão Zeidler, permaneceu guardado num frasco durante 65 anos, até suas propriedades inseticidas serem conhecidas em 1939. Suas propriedades continuaram ativas por ser um composto muito estável. Sendo atualmente um pesticida banido devido aos seus devastadores efeitos ambientais, o DDT salvou milhões de italianos da febre tifóide e é o responsável pela erradicação da malária na Europa e América do Norte. Estes fatos valeram ao suíço Paul Herman Müller a atribuição, em 1948, o Premio Nobel de Medicina. (Santos, 2008).

A descoberta das propriedades inseticidas do DDT influenciou as pesquisas realizadas a partir de 1940. Depois disso, novos pesticidas clorados foram colocados no mercado, tais como: metoxiclor, HCH (hexaclociclohexanos) e ciclodienos clorados. Ao final desta década os organoclorados já apresentavam obsolescência tecnológica, pois havia insetos resistentes aos mesmos. (Martins, 2000)

No esforço de produzir armas químicas poderosas durante a Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945), surgiram duas das grandes classes de inseticidas utilizados hoje em dia: os carbamatos e os organofosfatos. Os carbamatos foram desenvolvidos por cientistas aliados, enquanto que na Alemanha o cientista Gerhard

Schrader desenvolveu, em 1943, uma das mais poderosas armas químicas da época, os organofosfatos ou “gás dos nervos” que teve efeitos devastadores nas tropas. Com a introdução maciça no mercado dos inseticidas organofosfatos e carbamatos começaram a surgir os primeiros sinais de preocupação quanto à toxicidade destes pesticidas. (Santos, 2008).

A década de 60 é um marco dos movimentos ambientalistas, que começam a denunciar os problemas relativos à resistência adquirida por algumas espécies de insetos e os efeitos da bioacumulação dos pesticidas. Apesar disto, também nos anos 60, este setor industrial ampliou-se e consolidou-se o número de inovações no segmento de fungicidas. Os produtos deste grupo também começam a apresentar problemas de resistência nos organismos. Foram lançados os inseticidas *piretróides* sintéticos, menos tóxicos e mais eficazes. Quanto aos herbicidas, houve uma intensificação em termos de inovações com o lançamento dos herbicidas pós-emergentes, que são aqueles que interferem na ação fotossintética das ervas daninhas (Martins, 2000).

O diuron é um herbicida da classe denominada uréia-substituída e tem sido usado desde 1950 (Gatidou, 2005) para controlar uma extensa variedade de ervas daninhas tanto em áreas agrícolas ou sem cultivo implantado. Este pesticida é usado em muitas culturas como frutas, algodão, cana de açúcar, alfafa e trigo. Sua persistência no solo é considerada de moderada a alta, sendo que os resíduos persistem em geral de 1 mês a 1 ano, embora existam relatos de persistência por 3 anos após a aplicação (Iyer, 2002). No Brasil, o diuron está registrado para uso em frutas (abacaxi, banana, cacau, café, citrus, uva) além de cana-de-açúcar, soja, trigo,

milho, algodão, alfafa e outras culturas. Estão registrados algumas dezenas de produtos para comercialização no país, que contém diuron sozinho ou em mistura com outros pesticidas, principalmente do grupo das triazinas (Brasil, 2008).

Diuron é um sólido branco, cristalino e sem odor, muito solúvel em água e muito estável no solo, no qual os processos de degradação são transformações bióticas, enquanto na água a hidrólise ou fotólise são as rotas de degradação majoritárias (Bacigalupo, 2007). Além da persistência, estudos de campo tem demonstrado que é altamente propenso à lixiviação, pois a literatura tem apresentado trabalhos que relatam a presença de diversas classes de pesticidas em águas subterrâneas (Ribeiro, 2007).

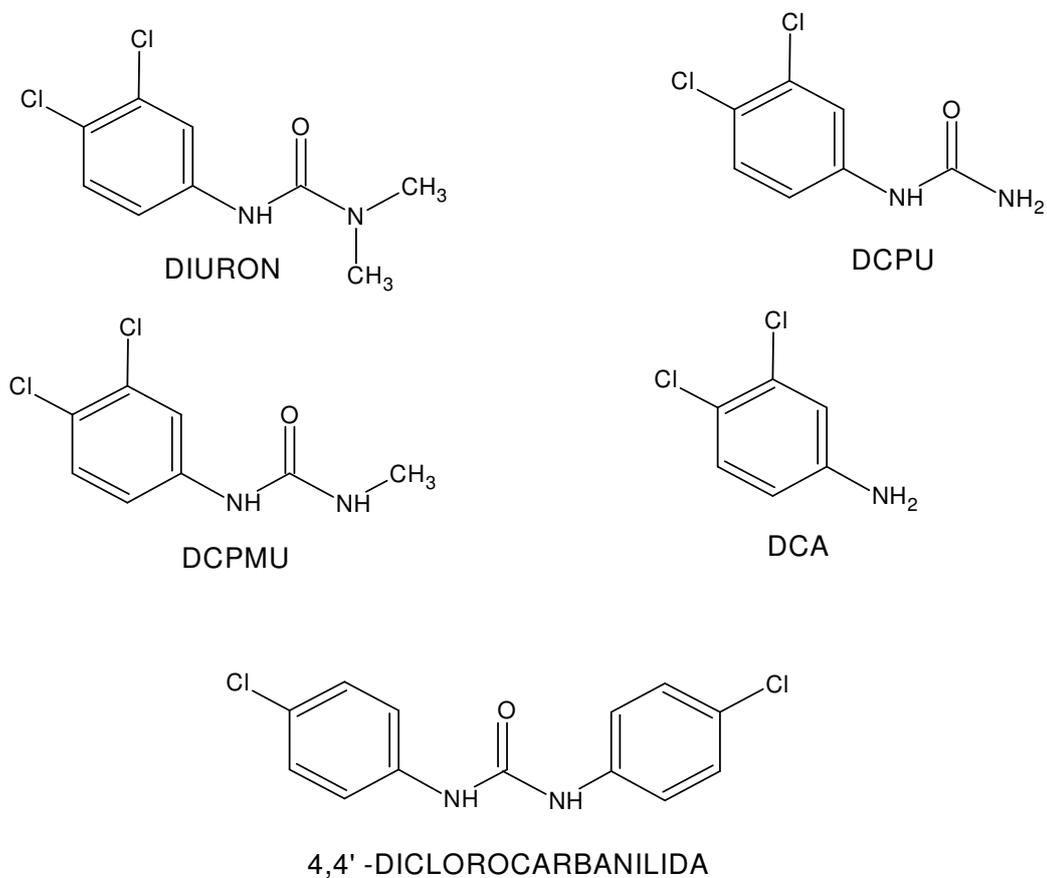
A degradação microbiana do diuron no ambiente é geralmente muito lenta e segue uma cinética de primeira ordem (Cederlund, 2007). O diuron é degradado por N-desmetização, sob condições aeróbicas, aos metabólitos 3,4- diclorofenil-metil uréia (DCPMU) 3,4-diclorofenil-uréia (DCPU), 3,4-dicloroanilina (DCA) e como produto secundário, o N,N'-Bis(p-clorofenil)uréia (4,4'-diclorocarbanilida) (Field, 1997). A degradação do diuron é lenta a baixas temperaturas e sob condições anaeróbicas. Dependência com o pH não é observada na adsorção no solo para diuron, DCPU e DCPMU. A hidrólise do diuron se mostra altamente dependente do pH, sendo relativamente rápida em pH ácido e estável em pH alcalino. Contaminação secundária não é considerada relevante para esses compostos, pois o potencial de bioacumulação é baixo (European food safety authority, 2005).

Na Tabela 1 estão algumas constantes físicas e químicas das moléculas estudadas neste trabalho, enquanto que a Figura 1 apresenta as estruturas do diuron e seus metabolitos.

**Tabela 1:** Constantes físicas e químicas do diuron e seus metabolitos

Substância	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	PE (Cº)	PF (Cº)	Densidade (g cm <sup>-3</sup> ) (20º C)	Pressão de vapor (Torr) (25º C)	Entalpia de vaporização (kJ mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água 20 ºC (mg L <sup>-1</sup> )
Diuron	233,09	385,2 ± 42	186,7 ± 27,9	1,369 ± 0,06	3,88.10 <sup>-6</sup>	63,39 ± 3,0	42
DCA	162,02	271,8 ± 20	118,2 ± 21,8	1,401 ± 0,06	6,30.10 <sup>-3</sup>	51,01 ± 3,0	92
DCPU	205,04	302,2 ± 32	136,5 ± 25,1	1,534 ± 0,06	1,01.10 <sup>-3</sup>	54,24 ± 3,0	224,9
DCPMU	219,07	295,3 ± 40	132,4 ± 27,3	1,411 ± 0,06	1,54.10 <sup>-3</sup>	53,50 ± 3,0	107,4
4,4'-diclorocarbamilida	281,14	318,3 ± 27	146,3 ± 23,7	1,450 ± 0,06	3,64.10 <sup>-4</sup>	55,98 ± 3,0	3,7 / 25°C

Fonte: banco de dados do Scifinder , Bouras, 2007



**Figura 1.** Estruturas químicas do diuron e dos seus principais produtos de degradação.

Devido o diuron não ser volátil, análises por cromatografia gasosa requerem que seja derivado por acilação ou metilação, hidrólise ou pirólise. Condições de baixa temperatura associada com HPLC minimizam a decomposição térmica do diuron e seus metabólitos e por isso preserva a forma que o diuron se encontra nas amostras ambientais, se aplicando também para amostras biológicas (Field, 1997).

Embora o diuron não estivesse dentre os 10 pesticidas com alto potencial de impacto para a saúde humana ou riscos para organismos aquáticos, foi classificado como o terceiro mais perigoso pesticida para reservas de águas subterrâneas pela

EPA. De acordo com a EPA, o limite de diuron em água potável é de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Field, 1997).

### **Efeitos do diuron e seus produtos de degradação sobre os organismos vivos**

Em alguns estudos o diuron tem sido identificado como possível alterador endócrino. Um alterador endócrino é um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no organismo, e que são responsáveis por manter a homeostase e pelos processos de desenvolvimento (Fernandes, 2007).

Exemplos da fauna selvagem mostram a ocorrência de distúrbios na reprodução e desenvolvimento em moluscos, peixes e mamíferos marinhos, quando expostos a esses alteradores endócrinos. Efeitos na saúde humana são ainda controversos (Boti, 2007a). Vários autores sugerem possível envolvimento dos alteradores endócrinos na diminuição do número de espermatozóides observada nas últimas décadas, puberdade precoce e disfunções na tireóide (Boti, 2007a). A lista das substâncias com potencial para causar disfunção endócrina é bastante diversificada, incluindo befenilas policloradas (PCBs), dioxinas, furanos, alquilfenóis, esteróides sintéticos e substâncias de ocorrência natural bem como uma grande variedade de pesticidas (Boti, 2007a) .

Existem evidências de que o DCA pode alterar o sistema endócrino em peixes. Para diuron e os metabólitos DCPU e DCPMU, não existe dados experimentais válidos atestando que esses compostos possuam propriedades de

alteradores endócrinos. Por outro lado, pela similaridade estrutural entre diuron e DCA é esperado que apresentem atuação como alteradores endócrinos (Boti, 2007a).

O diuron inibe a fotossíntese bloqueando o transporte de elétrons, em decorrência o CO<sub>2</sub> não se fixar, limitando a produção da adenosina trifosfato (ATP). A redução da concentração de oxigênio dissolvido pelo diuron propicia a decomposição de microorganismos fotossintéticos e modificação da flora do meio ambiente aquático (Bacigalupo, 2007 ).

Esta molécula é, ainda, altamente tóxica para invertebrados aquáticos e afeta a reprodução de algas unicelulares, além de limitar indiretamente a liberação de substâncias orgânicas dissolvidas pelo fitoplâncton (Bacigalupo, 2007).

O risco está associado com o tempo de exposição à esses contaminantes. É necessário avaliar a exposição ao diuron em uma população, especialmente a exposição ocupacional e aos que residem em lugares contaminados (Bacigalupo, 2007). Os grupos mais expostos a pesticidas são os trabalhadores agrícolas.

A exposição da população em geral também é importante, principalmente pelo consumo de vegetais e outros alimentos (derivados de vegetais ou lácteos) contaminados com resíduos destas substâncias. Observou-se que mesmo para vacas que se alimentam com dietas que apresentam baixas doses de diuron existem resíduos do pesticida no leite (Iyer, 2002). O Diuron é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal em ratos e cães, sendo excretado nas fezes e na urina, tendo o DCPU como metabólito predominante do diuron na urina (Iyer, 2002). Em mamíferos, o diuron é metabolizado por dealquilação dos grupos metil-uréia,

hidrólise a 3,4-dicloroanilina, oxidação a 3,4- diclofenol e hidroxilação no carbono 2 e/ou 6 do anel benzênico também são observadas (Iyer, 2002). O diuron é metabolizado no fígado, produzindo alguns metabólitos, incluindo o DCA (Lewalter, 1999).

Além de alterador endócrino, o diuron apresenta leve atividade mutagênica. Os resultados com respeito ao potencial genotóxico do diuron são considerados controversos por alguns autores, embora estudos indicaram que o diuron é carcinogênico para roedores (Nascimento, 2006).

De acordo com a EPA (*Environmental Protection Agency*) , o diuron é levemente tóxico para mamíferos com LD<sub>50</sub> (dose letal para 50% dos animais expostos) oral em ratos é 3400 mg kg<sup>-1</sup>. Em coelhos, o LD<sub>50</sub> dérmico é maior que 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Para altos níveis de exposição a diuron são notados sintomas de depressão no sistema nervoso central e alterações no baço e medula. Outros efeitos crônicos atribuídos a doses moderadas ou altas incluem aumento da mortalidade, retardo no crescimento e anemia em crianças (Iyer, 2002).

Em um estudo, animais expostos 28 e 90 dias ao diuron por via oral (adicionado a ração), nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, apresentaram maior peso relativo do baço e dos rins nas três concentrações de Diuron aos 28 dias, e apenas em 2500 ppm, aos 90 dias. O peso relativo do fígado foi maior em 1250 e 2500 ppm aos 28 dias e apenas em 2500 ppm aos 90 dias. (Domingues, 2007)

Em outro estudo observou-se que o diuron tem baixa toxicidade aguda pela rota dérmica e inalatória, não sendo irritante para a pele ou para os olhos (European food safety authority, 2005).

Muitos artigos alegam que a rota metabólica dessas substâncias ainda é desconhecida ou com muitas controvérsias. O mesmo ocorre para o mecanismo de carcinogenicidade, embora já conhecido seu poder de atuação, não se sabe ao certo como esse processo ocorre (European food safety authority, 2005).

### **Métodos analíticos para análise de diuron**

A análise dos resíduos de pesticidas é geralmente difícil, pois estão presentes em baixos níveis de concentração, apresentam-se em misturas de diversas moléculas que podem diferir entre si quanto às propriedades físicas e químicas e em matrizes que podem apresentar alta concentração de interferentes (Brondi, 2005).

São muito poucos os trabalhos existentes na literatura que abordam a determinação simultânea de diuron, DCA, DCPMU, DCPU e 4,4'-diclorocarbanilida em urina, ou mesmo em água. Um método rápido, fácil, efetivo e validado para determinação do diuron e seus metabólitos de degradação em fluidos biológicos é necessário para a verificação de quais substâncias derivadas do diuron são excretadas. Muitas classes de pesticidas são metabolizados ou degradados em uréias ou anilinas. A urina, uma mistura muito complexa e com multicomponentes, é um dos fluidos biológicos de maior interesse. Muitos compostos ingeridos ou formados no organismo são excretados na urina, mas poucos são os trabalhos sobre a 4,4'-diclorocarbanilida e os que analisam diuron e seus metabólitos de degradação em urina de ratos (Pozzebon, 2003). A Tabela 2 sumariza as condições de análise de alguns trabalhos selecionados.

**Tabela 2:** Alguns métodos para determinação cromatográfica de diuron, DCA e DCPU em diversas matrizes

Referência	Matriz/ analitos	Tratamento da amostra	Técnica analítica
Wittke et al, 2001	Urina/ pesticidas e seus metabolitos utilizando cloroanilinas (3,4-DCA e 3,5-DCA) como marcadores	1)hidrólise básica 2)destilação por arraste a vapor 3)extração líquido-líquido 4)derivação com HFBA	GC/MS GC/MS/MS GC/ECD (após derivação)
Field et al. 1997	Água superficial e subterrânea/ diuron DCPMU, DCPU e DCA	1)SPE-Disco Empore C18 2)Disco extraído diretamente no vial de 2 mL, com metanol:ACN (50:50), 2,4 h	HPLC/UV a 252 nm Coluna Supelcosil LC-18 DB Gradiente: ACN:água
Landry et al., 2006	Lixiviado de solo agrícola/ oryzalin, diuron, DCPMU, DPCU e DCA	1)SPE-cartucho C18 2) eluição com ACN (baixa recuperação de DCA)	HPLC/UV-DAD Coluna C-18 Gradiente: ACN:água
Pozzebon et al., 2003	Urina/ diuron e linuron	1) alcalinização – pH 9 2) + 4 mL CAN 3) centrifugação 4) SPE com fase preparada pelos autores	HPLC/UV a 254 nm Coluna preparada pelos autores
Weiss & Angerer, 2002	Urina/aminas aromáticas e metabolitos de nitro-compostos, incluindo 3,4-DCA	1)hidrólise ácida 2)neutralização pH~6 3)extração líquido-líquido com hexano 4)derivação com anidrido pentafluorpropiónico (PFBA)	GC/MS (Single Íon Monitoring)
SOP-Method 65, 1993	Solo e produtos agrícolas/ diuron, linuron e seus metabolitos	1) hidrólise básica 2) destilação por arraste a vapor, com recolhimento em solução ácida 3) neutralização 4) extração líquido-líquido com hexano	GC/ECD ou GC/TSD
Thomas et al, 2003	Sedimento marinho / diuron e metabolitos	Extração com DCM:acetato de etila (50:50)	LC/APCI-MS
Goody et al., 2003	Solo e solução do solo/diuron e metabolitos	Extração com metanol, ultrassom	HPLC/UV 254 nm
Caracciolo et al., 2005	Solo / diuron, DCA e outros pesticidas	Extração com acetona, shaker	HPLC/UV 254 nm
Gatidou et al., 2005	Água do mar/diuron e metabolitos	SPE- C18 e poliméricos Eluição com metanol	HPLC/DAD

## VALIDAÇÃO

Segundo Ribani *et al* (2004) para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e adequadas ao fim a que se destina o estudo em desenvolvimento, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (Ribani,2004).

De acordo com Valentini (2007) o primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação encontra-se nas *Good Manufacturing Products* - GMPs, as quais foram publicadas pela *Food and Drug Administration* – FDA (1978), porém, somente em 1980, recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado”. Portanto, o objetivo principal é assegurar que determinado procedimento analítico dê resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (Valentini, 2007).

A representatividade é essencial. Ou seja, os estudos devem, tanto quanto possível, serem conduzidos para estabelecer um quadro realista, verificando se há algum tipo de interferente e também deve cobrir as faixas de concentração em que a substância se encontra na amostra (Ellison, 2002).

Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. A validação da metodologia analítica na área de resíduos de pesticidas é realizada

para garantir que a mesma seja exata, específica e reprodutível. A validação envolve a interação entre o princípio ativo e a matriz que resulta na quantificação por métodos instrumentais. Este processo assegura a credibilidade do método durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer. Os parâmetros (ou figuras de mérito) mais utilizados nos processo de validação analítica incluem os limites de detecção e quantificação, a seletividade, a linearidade ou faixa de trabalho, a precisão e a exatidão (Vieira, 2004).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (Ribani, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem co-eluir com a substância de interesse (Ribani, 2004).

A seletividade pode ser obtida comparando-se a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (Ribani, 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 da substância (Vieira, 2004).

Na construção da curva de linearidade, usa-se o procedimento chamado de Teste de Huber, onde há a rejeição dos dados anômalos. Para isso, é necessário estabelecer um valor central e, acima e abaixo dela, intervalos de confiança, que definem quais os dados aceitáveis – isto é, os que pertencem ao intervalo de confiança. É necessário um critério para estabelecer o valor central de forma que ele não dependa dos dados anômalos (dados que descaracterizam o significado da média por serem muito discrepantes). Isto é feito obtendo-se a mediana (md) dos dados, onde ordenam-se os dados (área/ concentração). A seguir é obtido o chamado desvio absoluto da mediana (mad), ou seja, a mediana da diferença absoluta entre A/C e md. Os limites superiores e inferiores são calculados pela fórmula  $IC_{S,I} = md \pm k \cdot md$ , onde  $k$  é um fator que pode variar de 2 a 8. Os pontos que estiverem fora do intervalo compreendido pelos limites superiores e inferiores são descartados na construção da curva analítica (Valente *et al.*, 2005).

Para obter-se a curva analítica são necessárias soluções padrões de concentrações definidas obtidas através de padrões de referência. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as curvas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam a origem (ponto 0,0) (Vieira, 2004).

A estimativa dos coeficientes linear ( $a$ ) e angular ( $b$ ) de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação  $r$ . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani, 2004).

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, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária pode ser expressada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD ou CV) (Ribani, 2004).

O desvio padrão absoluto (s) se expressa por:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{x}$  = média das determinações

$x_i$  = valor individual de uma medição

$n$  = número de medições

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV):

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

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.) (Ribani, 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (Ribani, 2004).

O limite de detecção (LD) representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental (Vieira, 2004).

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani, 2004).

O método visual é utilizado empregando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável).

O método da relação sinal-ruído pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que apresentem o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (Ribani, 2004).

O método que se baseia em parâmetros da curva analítica pode ser expresso como:

$$LD = 3,3 x \frac{s}{S}$$

*s = desvio padrão*

*S = coeficiente angular da equação da curva analítica*

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (Brito, 2003) .

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. A determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre os coeficientes da equação da reta da curva analítica a partir da equação: (Ribani, 2004)

$$LQ = 10x \frac{s}{S}$$

*s = desvio padrão*

*S = coeficiente angular da equação da curva analítica*

Para Thier (1987), o limite de quantificação (LQ) tem que satisfazer três condições:

- (i) o LQ deve ser maior ou igual ao LD,
- (ii) a porcentagem de recuperação para o LQ deve ser igual ou maior do que 70%
- (iii) o coeficiente de variação do LQ deve ser igual ou menor do que 20%.

Brito (2001) enfatiza a importância do LD ser determinado em termos do desvio padrão de medidas da amostra controle. Esse procedimento reproduz as mesmas condições que o analito estará sujeito durante a análise.

Segundo Thier (1987), teoricamente, nenhum sinal deveria ser obtido para a amostra controle. Entretanto, sinais de “resíduos aparentes” podem ocorrer e são chamados sinais do branco. Eles podem ser devido a algumas causas que podem simular a presença dos resíduos como por exemplo:

- co-extrativos não removidos;
- impurezas de solventes ou reagentes ou
- ruídos do instrumento.

O LD pode ser estimado a partir dos resultados de um estudo de recuperação, utilizando a equação apresentada abaixo:

$$LD = \frac{2 \times t_{f,95} \times \sigma_{com}}{S} \qquad \sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

sendo:

$\sigma_A$  - desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.

$\sigma_B$  - desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle.

m - número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação.

n - número de repetições da aplicação do método à amostra controle.

f - número de graus de liberdade, estimado por  $m + n - 2$ .

S - sensibilidade do método analítico, estimado pela média das concentrações obtidas no estudo de recuperação e pelo menor nível de fortificação.

## 2. Objetivos

---

Considerando-se que:

- o diuron é um dos princípios ativos mais utilizados no Brasil em formulações de pesticidas, registrados principalmente para o uso em culturas de frutas, o que pode pressupor a exposição humana aos resíduos desta substância;
- os dados sobre o comportamento carcinogênico do diuron em mamíferos, principalmente sobre o epitélio urinário ainda não são conclusivos e que por isso está em desenvolvimento um estudo de toxicologia experimental com animais expostos na dieta a diferentes doses de diuron;
- a necessidade de método analítico validado para a análise de diuron e metabolitos em urina.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- otimizar e validar método para análise de pequenos volumes de urina (até 1 mL) para determinação de diuron e seus metabólitos;
- aplicar o método validado a amostras de urina provenientes de animais (ratos Wistar) incluídos no estudo de toxicologia experimental da FM-Botucatu.

## 3. Parte experimental

---

### 3.1. Materiais e Reagentes

Foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Diuron, pureza  $\geq 97,0\%$  – Sigma Aldrich;
- 3,4-dicloroanilina (DCA) , pureza 99,5% - ChemService
- 3,4-diclorofenil-uréia (DCPU), pureza 99,0% - ChemService
- 3,4- diclorofenil-metil uréia (DCPMU), pureza 99% - ChemService
- N,N'-Bis(p-clorofenil)uréia (4,4'-diclorocarbanilida) , pureza 99,0% - ChemService
- Coluna para HPLC Phenomenex C<sub>18</sub> (250mm x 4,6 mm x 5 $\mu$ m);
- Cromatógrafo líquido Varian Pro Star, com detector UV com arranjo de diodos (LC/UV-DAD)
- Micropipeta de 100 $\mu$ L
- Balança analítica
- Balões volumétricos
- Pipetas
- Solventes: água Mili-Q (Millipore) e acetonitrila, com grau de pureza HPLC da marca J.T.Baker.
- Cartuchos para SPE: Phenomenex, Strata-X 33  $\mu$ m 200mg / 6 mL
- Manifold –SPE- 20 pontos - Waters

## **3.2. Otimização das condições cromatográficas (HPLC/UV) para análise e avaliação do desempenho do sistema cromatográfico**

### **Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV**

Obtiveram-se os espectros de absorção correspondentes ao diuron e seus metabólitos em estudo, utilizando-se varredura de 200 a 400 nm no Cromatógrafo líquido Varian Pro Star, com detector de arranjo de diodos. Nesta etapa foram utilizadas soluções  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada um dos analitos em acetonitrila.

### **Seleção do modo de eluição e solventes**

A fase móvel mais utilizada para análise por cromatografia líquida desses compostos, citada na literatura, é acetonitrila com água (Boti, 2007b; Field et al. 1997; Landry et al., 2006).

Partindo-se de condições de eluição apresentadas na literatura (Field, 1997; Landry *et al*, 2006; Goody *et al*, 2003, Gatidou, *et al*, 2005) as condições foram otimizadas de modo a obter a melhor resolução possível entre os analitos, no menor tempo de análise.

Nesta etapa inicialmente trabalhou-se com soluções padrão contendo os 5 analitos na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ao iniciar os estudos de recuperação do método observou-se que a amostra (urina de rato) apresentava um pico muito intenso no início do cromatograma, sendo então, necessária a modificação das condições de eluição cromatográfica para permitir a análise do DCPMU.

### **Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico**

Para a construção das curvas de linearidade e analíticas foram preparadas soluções padrão mistas, ou seja, contendo todos os analitos, em diversas concentrações, em acetonitrila. As injeções no sistema HPLC/UV foram efetuadas em triplicata para cada concentração ( 0,2 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,5 ; 4,0 ; 5,0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ).

As concentrações foram selecionadas de acordo com a sensibilidade do método para cada analito. Como há muitas controvérsias em relação ao metabolismo dos pesticidas em organismos vivos, não seria possível aquilatar a concentração relativa de cada um dos metabolitos nas amostras de urina, sendo disponível cerca de 1 mL de urina por animal incluído no estudo experimental toxicológico.

### **3.3. Otimização e validação do método incluindo o tratamento da amostra**

#### **Obtenção das amostras controle e fortificação das mesmas para o estudo de recuperação**

Será aqui relatado como é feita a condução do experimento com os animais do estudo toxicológico, que está sendo efetuado no Biotério do Departamento de Patologia da FM-Botucatu. Esta parte do trabalho é integralmente desenvolvida pela equipe daquela unidade. A urina utilizada para o estudo de recuperação foi oriunda dos animais não expostos (grupo controle) do experimento.

Ratos de quatro semanas de idade, da linhagem Wistar, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp, Campinas, SP, Brasil foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, onde passaram por período de aclimação de duas semanas. Durante o período de aclimação, a água e a ração foram fornecidas *ad libitum*, ou seja, água e ração à vontade. Os animais passaram por inspeção de viabilidade diária (quando todo dia uma pessoa vai até o biotério e confere se os ratos não apresentam nenhum aspecto físico ou comportamental alterado, diarreia, etc.) e por avaliação clínica semanal (observa-se cada animal, buscando-se a identificação de alterações como nódulos, queda de pelo, alteração de pigmentação ou textura da pele/mucosas, etc, ou seja, é uma avaliação de saúde mais detalhada).

Durante todo o experimento foram controladas as condições ambientais da sala de experimentação: temperatura ( $21 \pm 3$  °C), umidade relativa do ar ( $50 \pm 20$  %), quatro ciclos de exaustão de ar diário e período de 12/12 horas claro/escuro.

Ratos Wistar machos adultos foram escolhidos ao acaso e tiveram a urina coletada individualmente. Os ratos foram colocados em gaiolas individuais. No fundo da gaiola existe um forro vazado, onde as fezes e os restos de comida ficam retidos, e passa a urina, que escorre para um funil. Na ponta desse funil há uma outra “malha” interna, para filtrar os possíveis resíduos e na ponta desse funil, antes de sair para os potinhos de coleta, há mais uma malha mais fina (Figura 2).



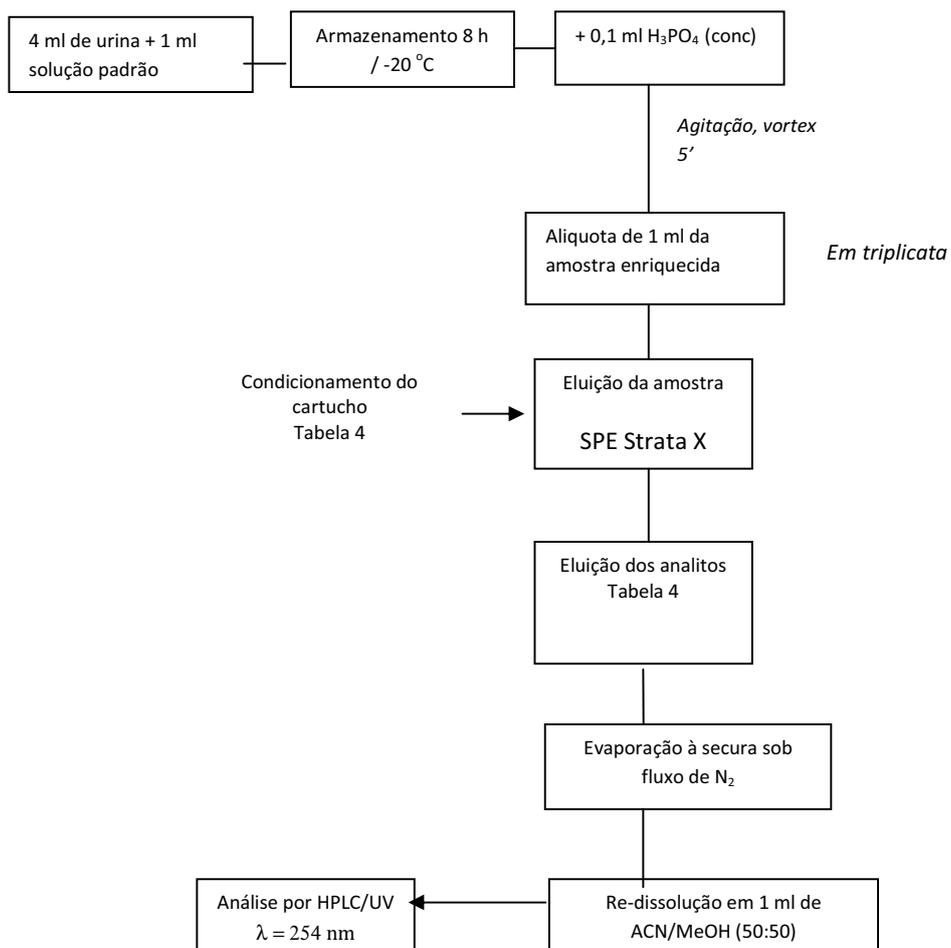
**Figura 2.** Gaiolas metabólicas utilizadas no estudo toxicológico experimental

A coleta de urina foi feita durante 24 horas em tubos plásticos de 50 ml acoplados a um funil na base da gaiola. A urina obtida foi imediatamente congelada em freezer à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do transporte. Os tubos foram retirados do freezer e colocados em caixa isotérmica mantidos em temperatura de refrigeração

com gelo re-utilizável no transporte até o Instituto de Química de Araraquara (cerca de 2 horas). No laboratório do IQ/UNESP as amostras foram transferidas da caixa isotérmica para freezer e mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Após a ambientação à temperatura ambiente, do volume total de urina recebido, tomou-se 4 ml para o estudo de recuperação. A este volume de urina adicionou-se 1 mL da solução dos padrões em acetonitrila de concentração de  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo-se uma amostra fortificada na concentração de  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta concentração foi escolhida devido a elevada concentração do pesticida existente na ração (aproximadamente  $2500\text{ mg. kg}^{-1}$ ). Pozzebon (2003) analisou diuron em urina humana obtendo os seguintes valores: LD =  $0,014\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e LQ =  $0,04\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que a exposição humana ao pesticida é muito menor do que a concentração utilizada no trabalho toxicológico da FM-Botucatu. Nenhum artigo foi encontrado cujo tema de estudo seria a análise do diuron em urina de ratos.

Após a fortificação (enriquecimento da amostra com padrão) foi esperado um tempo de 8 horas para ser realizada a extração das amostras de urina dos ratos. A amostra enriquecida foi mantida no freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$ , em recipiente tampado de vidro. Após o enriquecimento da amostra adicionou-se 0,1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  para a retirada das proteínas; no fluxograma na Figura 3 está detalhado o procedimento de fortificação e de extração por SPE.



**Figura 3:** Fluxograma do tratamento da amostra

Após a eluição os extratos foram concentrados à secura através de fluxo de  $N_2$  e retomados em 1 mL de ACN:MeOH (50:50) (v/v). As análises no sistema HPLC/UV-DAD foram efetuadas em triplicata para cada amostra, sempre acompanhadas de análise do padrão adicionado a amostra.

Também foram analisadas alíquotas das amostras de urina sem a adição dos padrões (amostras controle ou testemunha). As condições utilizadas para o condicionamento e eluição para os cartuchos com fases poliméricas Strata X (200

mg/6ml, Phenomenex), seguiram as sugestões dos fornecedores destes cartuchos e encontram-se sumarizadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Condições de condicionamento e extração da amostra

	<b>Strata X</b>
Condicionamento	3 mL MeOH
Equilíbrio	3 mL H <sub>2</sub> O Mili-Q
Aplicação da amostra	1 mL
Limpeza	3 mL MeOH/ H <sub>2</sub> O (10:90) (v/v)
Secagem a vácuo	2 min
Eluição	8 mL ACN/ MeOH (50:50) (v/v)

Uma vez estabelecidas as melhores condições para a SPE, foram empregadas amostras de urina de ratos não expostos a diuron, enriquecidas com diuron e DCA em alguns níveis de concentração: 5, 20, 50, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Devido a alguns interferentes da própria urina, e sendo o Diuron e o DCA as moléculas de maior interesse neste estudo por apresentarem comprovadamente potencial carcinogênico, as demais moléculas não foram incluídas neste estudo de recuperação. Cada amostra enriquecida foi extraída e analisada em triplicata, sendo obtidos resultados para cada nível de enriquecimento.

A partir destes ensaios foram estabelecidos os limites de quantificação do método para cada um dos analitos, diuron e DCA.

### **3.4. Aplicação do método validado às amostras do estudo toxicológico**

O estudo toxicológico desenvolvido exclusivamente pela equipe da Faculdade de Medicina-Unesp de Botucatu objetiva registrar eventual efeito dose-resposta do Diuron no urotélio de ratos Wistar machos, identificar vias moleculares envolvidas no processo de carcinogênese urotelial e, se possível, estabelecer o NOAEL (*No*

*Observable Adverse Effect Level*) para os efeitos adversos do herbicida. Os animais foram separados em 6 grupos experimentais, recebendo Diuron nas concentrações 0, 60, 125, 500, 1250 e 2500 ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na ração durante 20 semanas. Após o sacrifício, serão realizadas histologia da mucosa vesical, determinação dos índices de proliferação celular por imunohistoquímica, análise de citotoxicidade e de sedimento urinário por microscopia eletrônica por varredura e dosagem do Diuron e de seus metabólitos na urina por cromatografia líquida (HPLC/UV). A pesquisa das vias moleculares envolvidas na carcinogênese urotelial será realizada por cDNA *microarray* em três momentos experimentais (1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semanas).

As amostras de urina dos animais expostos foram coletadas, armazenadas e transportadas até o IQ/UNESP da mesma maneira descrita para as amostras controle.

No tratamento das amostras foram introduzidas algumas modificações devido a perdas do DCA, o que será discutido no próximo capítulo.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

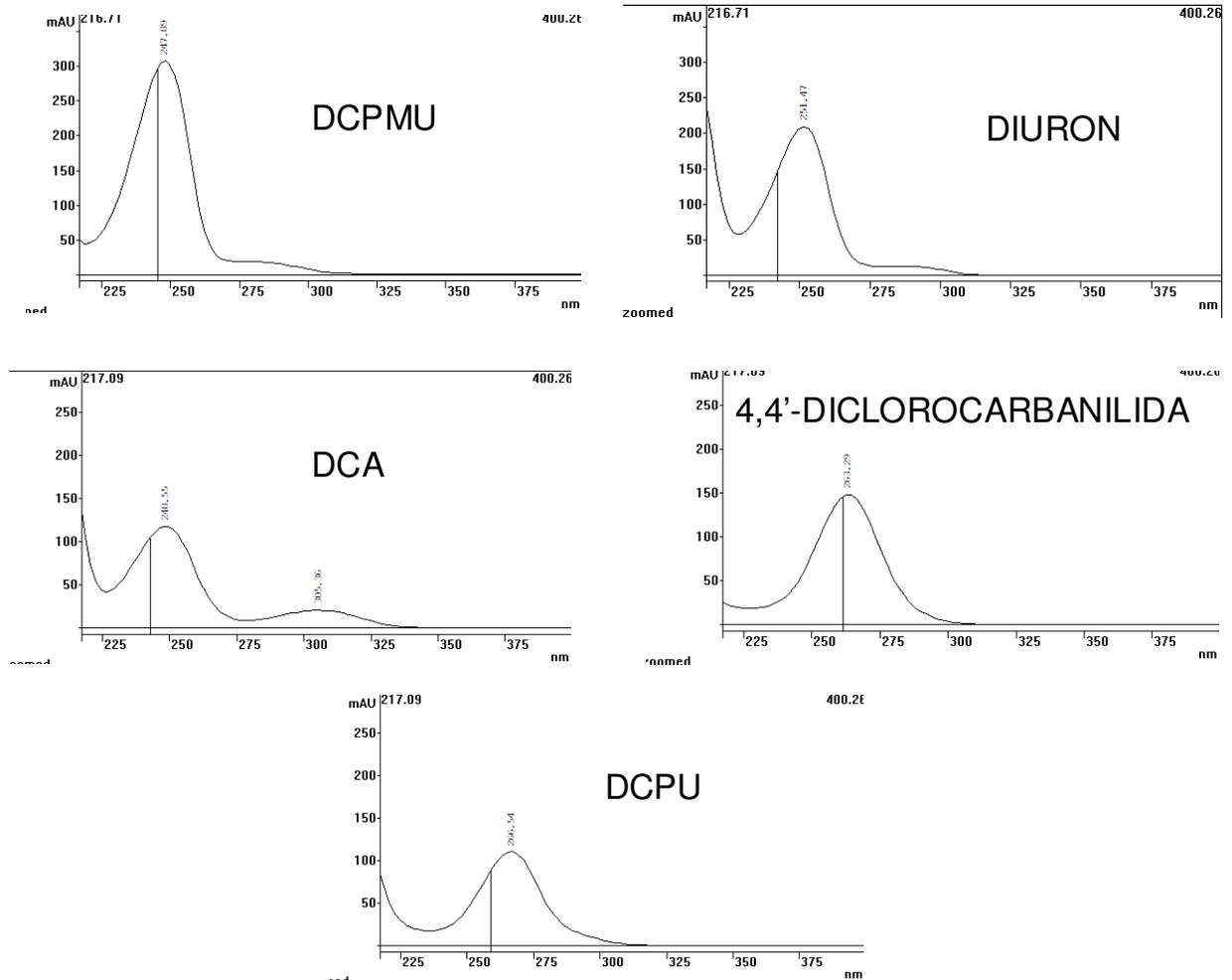
### 4.1. Otimização das condições cromatográficas (HPLC/UV) para análise e avaliação do desempenho do sistema cromatográfico

#### Escolha do comprimento de onda

Os espectros de absorção UV obtidos estão apresentados na Figura 4. Considerando-se que os máximos de absorção para as 5 substâncias situam-se entre 248 e 263 nm, optou-se por utilizar um comprimento de onda próximo à média destes valores, ou seja, 250 nm. Embora este comprimento de onda não seja o mais apropriado para o DCPU e a 4,4' diclocarbanilida, manteve-se esta opção, pois ambos são metabolitos de menor expressão para o estudo em desenvolvimento. O ideal seria a utilização de uma programação de comprimento de onda com o tempo para que estes metabolitos pudessem ser avaliados com comprimentos de onda mais próximos de seus máximos, porém, o equipamento não permitia que isso fosse realizado. É importante salientar que a varredura de comprimento de onda repercute em perda de detectabilidade, quando comparado ao comprimento de onda fixo. Isso é particularmente importante em um estudo de análise de concentrações traço como este.

No comprimento de onda escolhido, 250 nm, o DCA e o Diuron foram detectados em seus máximos de absorção, e portanto nas condições de detectabilidade máxima, o que é compatível com o objetivo do estudo toxicológico que busca elucidar o mecanismo de carcinogênese do diuron, sabendo-se que o DCA é o

metabolito com maior potencial de alterar o sistema endócrino e de carcinogenicidade (Fernandes *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Espectros UV, obtidos no sistema HPLC/DAD Varian ProStar, utilizando soluções  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada substância em acetonitrila.

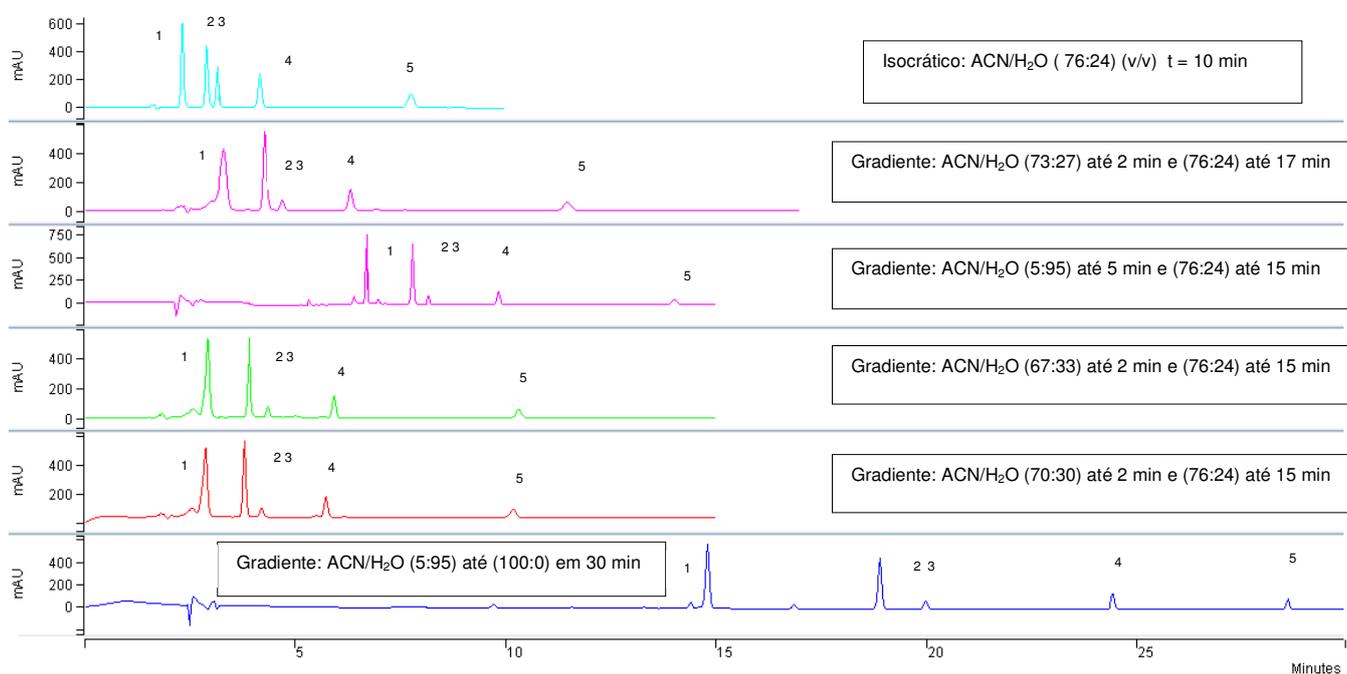
### Otimização das condições cromatográficas

Na Tabela 4 pode-se observar as condições dos vários testes que foram realizados para a otimização da separação cromatográfica do diuron e de seus metabólitos de degradação; todos com volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$  e comprimento

de onda de 250 nm. Na Figura 5 são apresentados alguns cromatogramas das condições testadas.

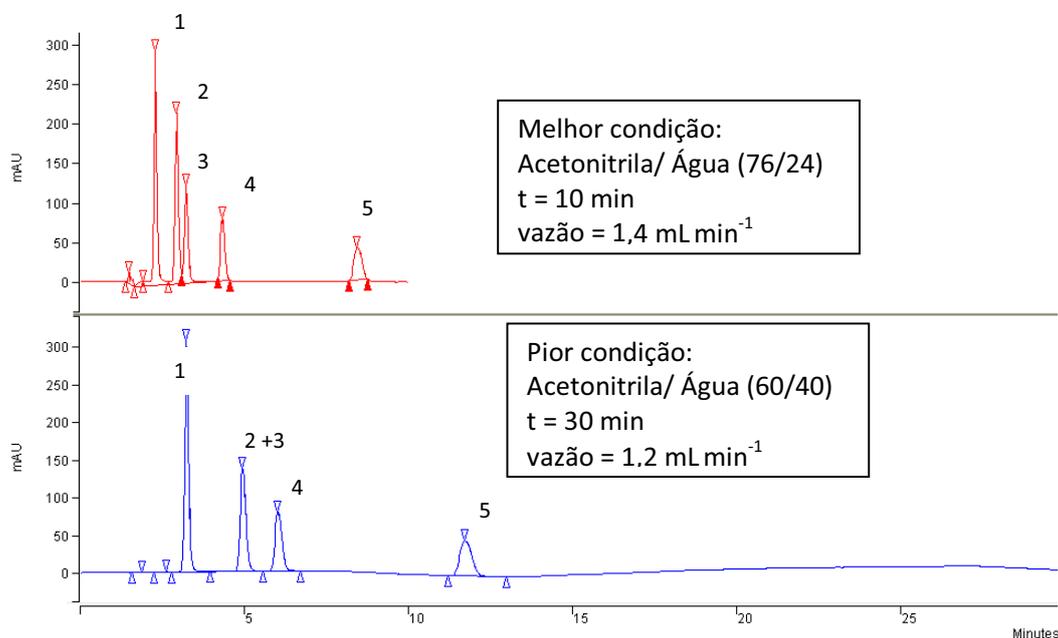
**Tabela 4:** Condições avaliadas para a otimização cromatográfica

10-70% ACN/H <sub>2</sub> O em 20 min 70-100% ACN/ H <sub>2</sub> O por 2 min 100-10% ACN/ H <sub>2</sub> O em 3 min vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 25 min	5-100% ACN/ H <sub>2</sub> O vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 40 min
5-70% ACN/ H <sub>2</sub> O em 5 min ACN/ H <sub>2</sub> O (70:30) (v/v) por 10 min 70-5% ACN/ H <sub>2</sub> O em 5 min vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 20 min	isocrática ACN/ H <sub>2</sub> O ( 65:35) (v/v) vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 40 min
5-70% ACN/ H <sub>2</sub> O em 10 min ACN/ H <sub>2</sub> O (70:30) (v/v) por 10 min 70-5% ACN/ H <sub>2</sub> O em 5 min vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 25 min	5-100% ACN/ H <sub>2</sub> O em 40 min 100-5% ACN/ H <sub>2</sub> O em 10 min vazão = 1 mL min <sup>-1</sup> t = 50 min
isocrática ACN/ H <sub>2</sub> O (70:30) (v/v) vazão = 1,2 mL min <sup>-1</sup> t = 30 min	isocrática ACN/ H <sub>2</sub> O (60:40) (v/v) vazão = 1,2 mL min <sup>-1</sup> t = 30 min
ACN/ H <sub>2</sub> O (70:30) (v/v) até 10 min 70-100% ACN/ H <sub>2</sub> O em 20 min vazão = 1,2 mL min <sup>-1</sup> t = 20 min	ACN/ H <sub>2</sub> O (68:32) (v/v) até 8 min 68-100% ACN/ H <sub>2</sub> O até 15 min vazão = 1,2 mL min <sup>-1</sup> t = 15 min
isocrática ACN/ H <sub>2</sub> O ( 75:25) (v/v) vazão = 1,5 mL min <sup>-1</sup> t = 20 min	isocrática ACN/ H <sub>2</sub> O ( 73:27) (v/v) vazão = 1,3 mL min <sup>-1</sup> t = 20 min



**Figura 5:** Cromatogramas HPLC/UV, obtidos a 250 nm e  $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ , para algumas das condições cromatográficas detalhadas na Tabela 4 (1) DCPMU; (2) diuron; (3) DCA; (4) 4,4' diclorobanilida; (5) DCPU

Na Figura 6 são apresentados dois cromatogramas que ilustram a pior e a melhor condição para a resolução cromatográfica, enquanto que na Tabela 5 estão as condições otimizadas. Pode-se observar na Figura 6 que há a co-eluição dos picos do diuron e do DCA aos 5 min na pior condição obtida.



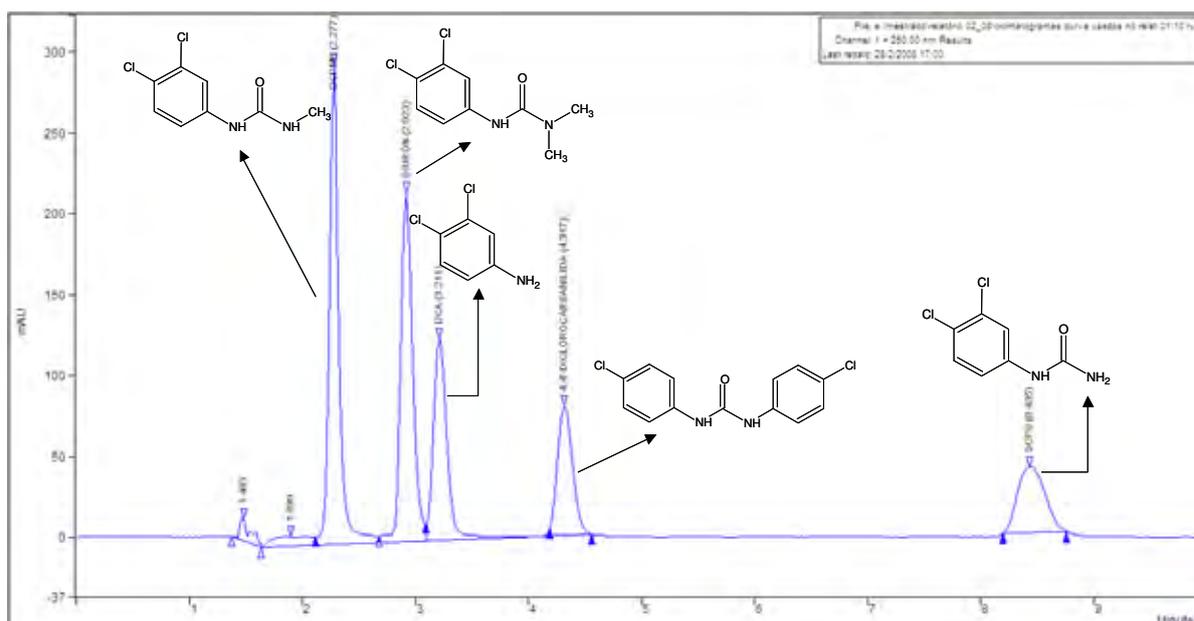
**Figura 6:** Cromatogramas HPLC/UV .Solução padrão dos analitos ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila. (1) DCPMU; (2) diuron; (3) DCA; (4) 4,4' diclocarbanilida; (5) DCPU

**Tabela 5:** Condições cromatográficas otimizadas

<b>Equipamento</b>	Cromatógrafo líquido Varian Pro Star, com detector de arranjo de diodos
<b>Coluna</b>	C18 (Phenomenex, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de $5\mu\text{m}$ )
<b>Fase Móvel</b>	Acetonitrila/ Água (76:24 %) modo isocrático, vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$
<b>Volume de injeção</b>	$20\mu\text{L}$ (injeção automática)
<b>Deteção</b>	250 nm

Considerando-se as estruturas das substâncias (Figura 7) pode-se notar que a ordem de eluição ocorre a partir de dois mecanismos distintos. O primeiro seria um

mecanismo de partição, no qual moléculas mais polares eluem primeiro que moléculas apolares, como no caso o DCPMU em relação ao diuron. Num segundo mecanismo há a influencia dos pares de elétrons dos grupos amina e carbamina, que interagem com os silanóis residuais da coluna cromatográfica formando pontes de hidrogênio. O DCA elui antes do 4,4'-diclorocarbanilida por possuir apenas um grupo amínico, sendo que o 4,4'-diclorocarbanilida possui dois. O fato de o DCPMU ter o maior tempo de retenção está relacionado ao fato de que o par de elétrons de um dos grupos carbamínicos possui um menor impedimento estérico do que o do 4,4'-diclorocarbanilida.



**Figura 7:** Cromatograma HPLC/UV dos padrões dos analitos em estudo com concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  na melhor condição de eluição (condição descrita na Tabela 5)

### Estudo da linearidade e construção da curva analítica

As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 apresentam as curvas de linearidade do diuron, DCA, DCPU, 4,4'-diclorocarbanilida e DCPMU, respectivamente. Estas curvas foram construídas de acordo com Valente (2006).

As Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam as curvas analíticas para cada uma das substâncias.

Para todas as curvas de linearidade:

md = mediana dos valores obtidos para cada concentração

A/C = Área/Concentração

ICi = Intervalo de confiança inferior

ICs = intervalo de confiança superior

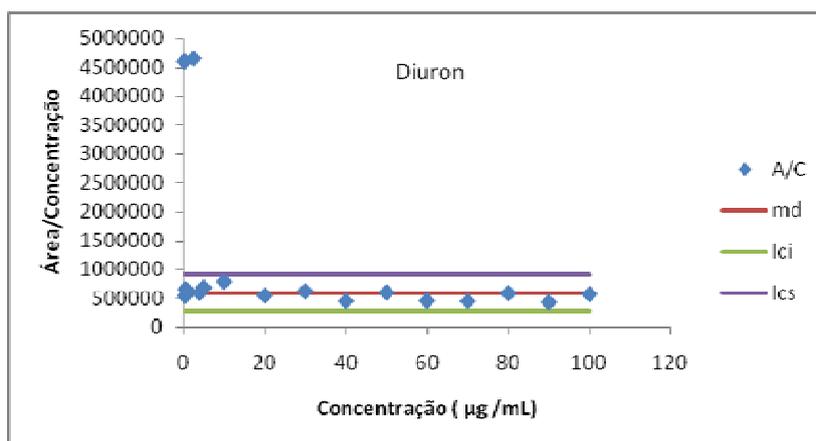
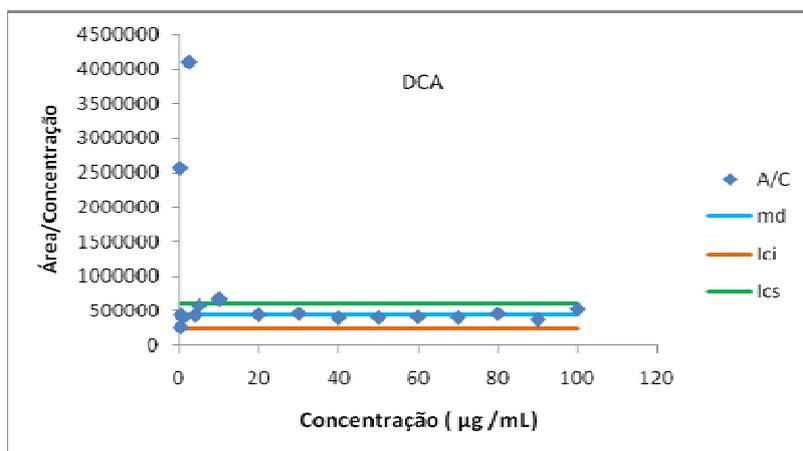
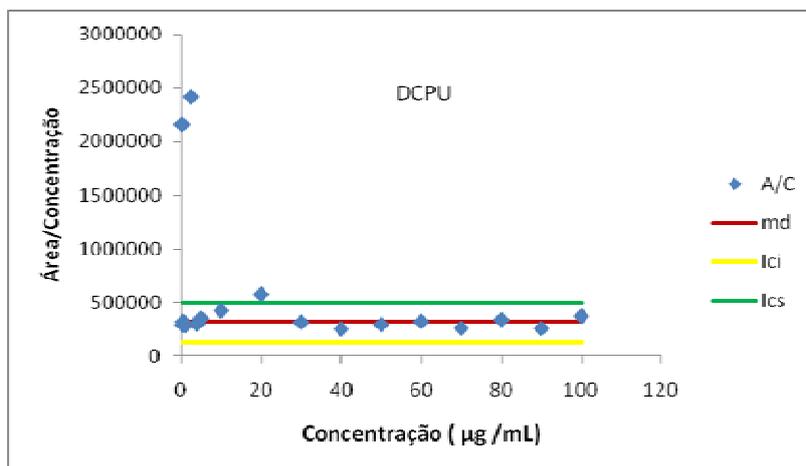


Figura 8: Curva de linearidade do Diuron



**Figura 9:** Curva de linearidade do DCA



**Figura 10:** Curva de linearidade do DCPU

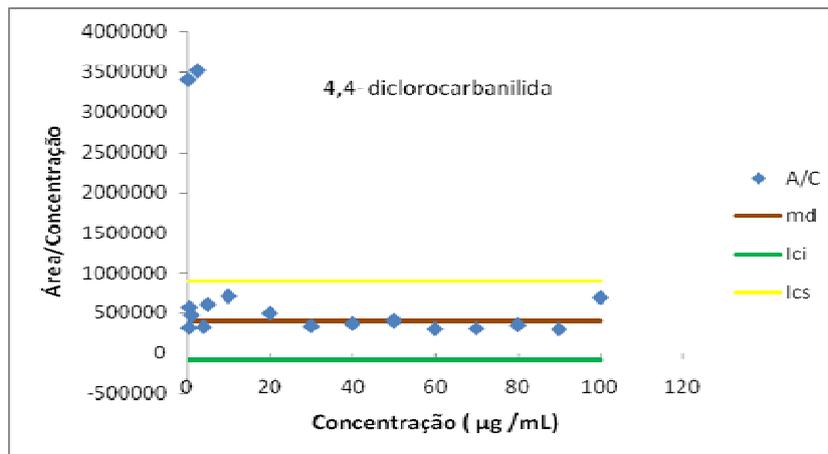


Figura 11: Curva de linearidade da 4,4'-diclorocarbanilida

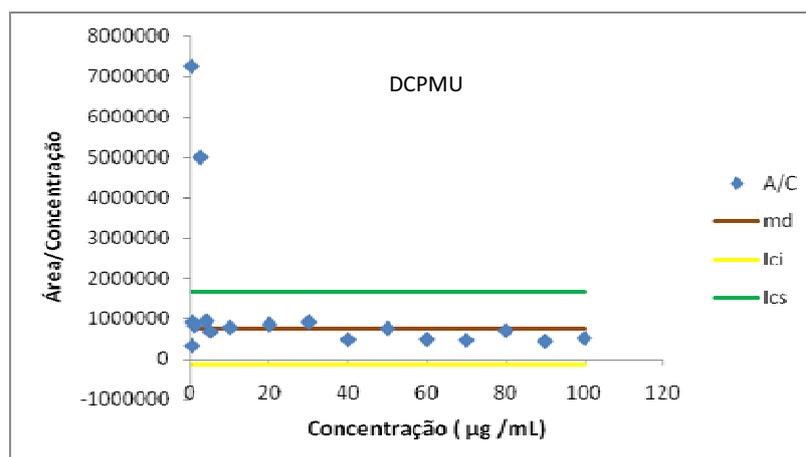
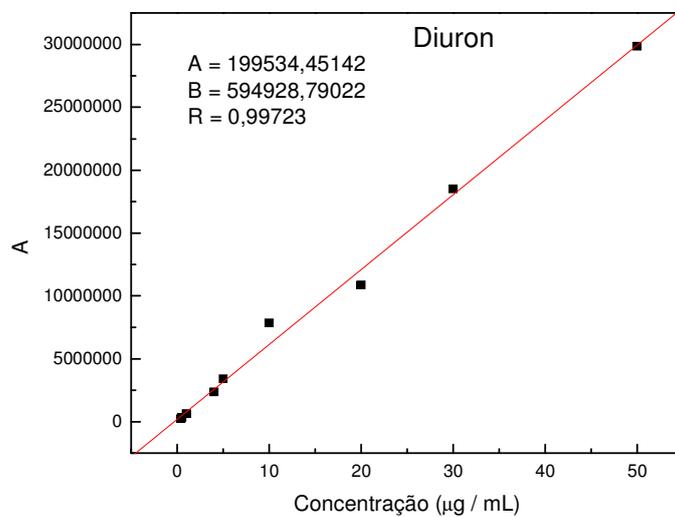
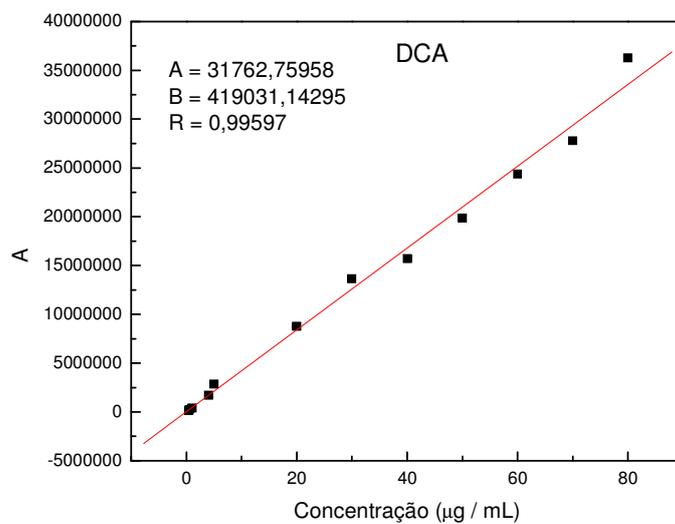


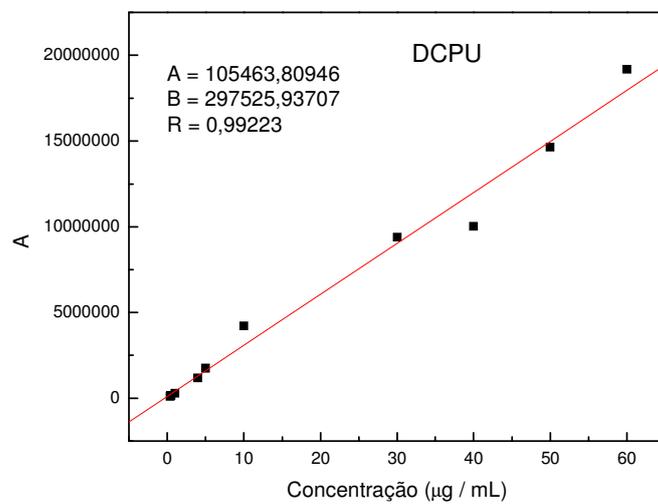
Figura 12: Curva de Linearidade do DCPMU



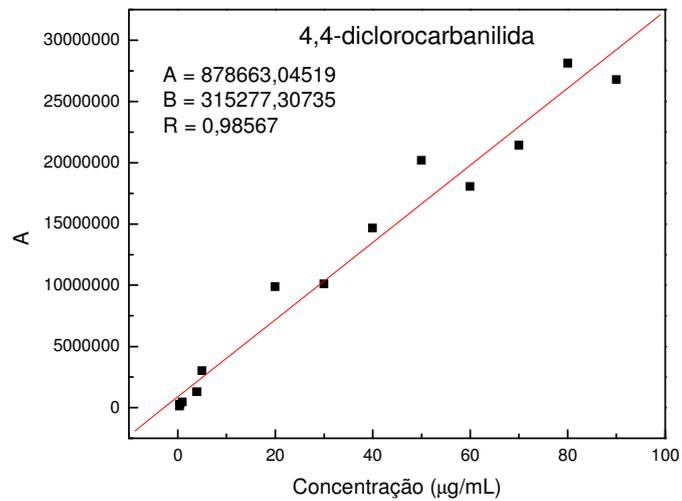
**Figura 13:** Curva analítica do diuron



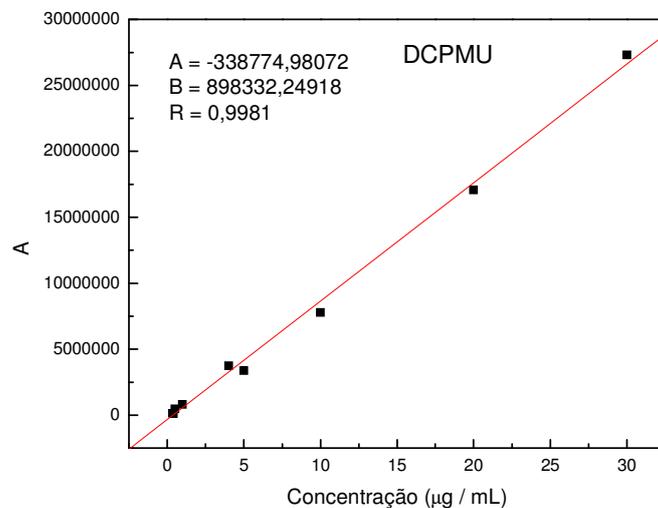
**Figura 14:** Curva Analítica do DCA



**Figura 15:** Curva Analítica do DCPU



**Figura 16:** Curva analítica da 4,4'-diclorocarbanilida



**Figura 17:** Curva Analítica do DCPMU

Os resultados apontaram para o fato de que os pontos referentes as concentrações de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  situaram-se fora do intervalo de linearidade para todas as substâncias, e, portanto, foram excluídos das curvas analíticas.

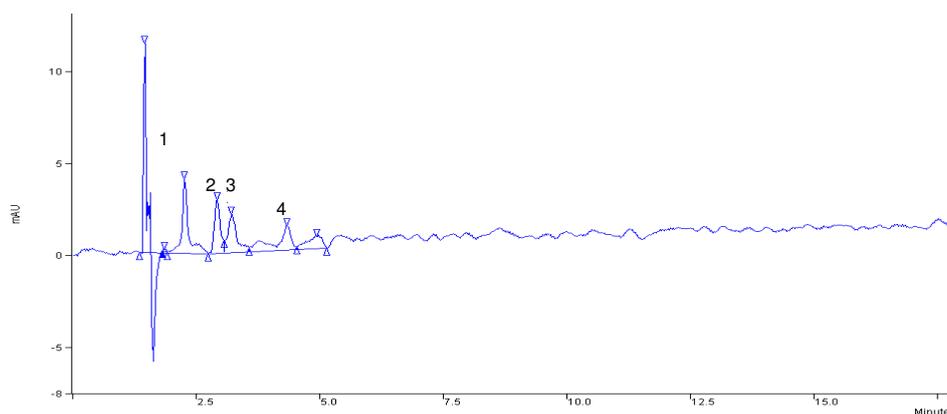
#### **Obtenção dos limites de detecção e de quantificação do sistema analítico**

Os limites de detecção (LD) foram obtidos através do método visual sinal ruído e os limites de quantificação (LQ) como sendo o primeiro nível de concentração da curva analítica (Paschoal et al., 2008), sendo mostrados na Tabela 6.

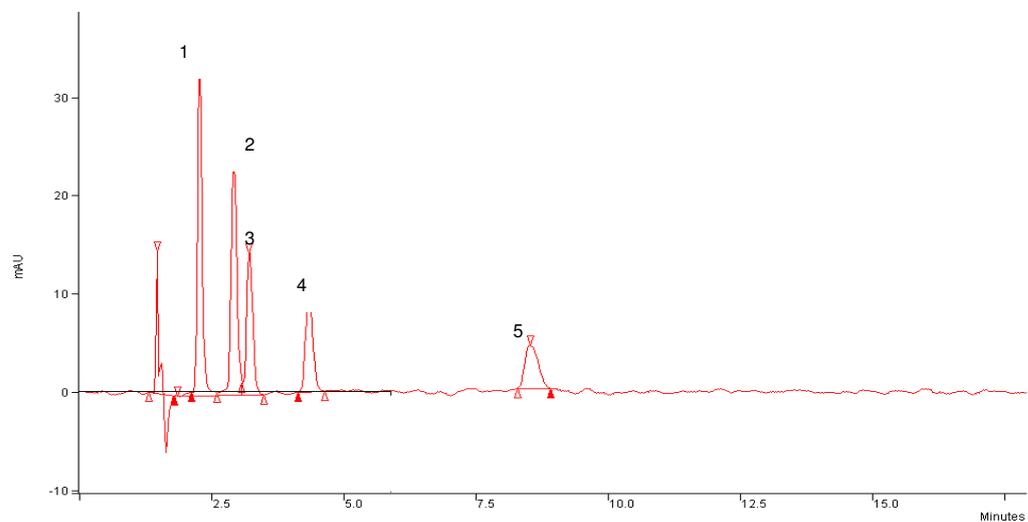
**Tabela 6:** Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlação linear para o sistema HPLC-UV-DAD,  $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$  e detecção a 250 nm, nas condições cromatográficas otimizadas (Tabela 5)

Substâncias	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$
Diuron	0,125	0,4	0,99723
DCA	0,125	0,4	0,99597
4,4-diclorocarbanilida	0,125	0,4	0,98567
DCPU	0,25	0,4	0,99223
DCPMU	0,125	0,4	0,9981

Analisando os cromatogramas apresentados nas Figuras 18 e 19 observa-se que apenas para o DCPU esses valores diferem, pois a partir da concentração igual a  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  é que esta substância é detectada. Estes limites de detecção e quantificação mais elevados do que para os demais analitos pode ser justificado pelo fato de estar sendo utilizada uma condição de detecção que não corresponde ao máximo de absorção para o DCPU.



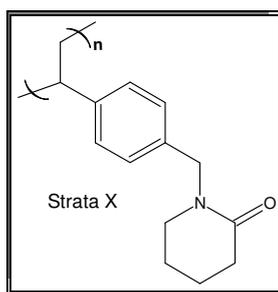
**Figura 18:** Cromatograma (HPLC/UV) da solução padrão dos analitos ( $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila, nas condições otimizadas (Tabela 5) (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida.



**Figura 19:** Cromatograma (HPLC/UV) da solução dos analitos ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetonitrila, nas condições otimizadas (Tabela 5) (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

## 4.2. Estudo de recuperação do método

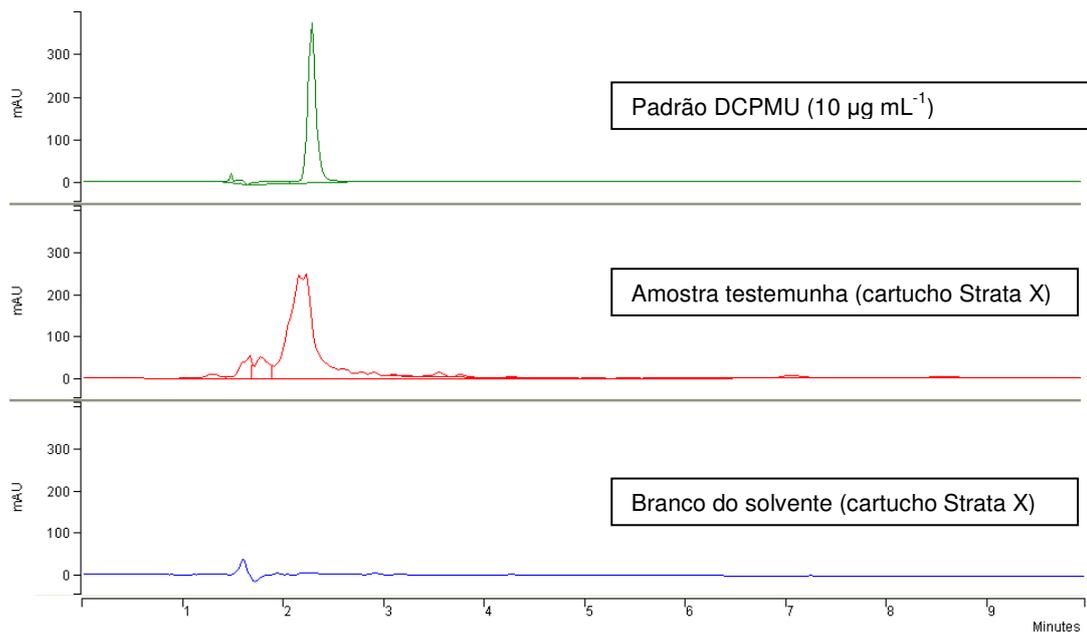
De acordo com o fabricante, os mecanismos de retenção do Strata-X (Figura 20) consistem de interações  $\pi$ - $\pi$  e ligação de hidrogênio resultam num sorvente que tem eficiente seletividade para substâncias polares e aromáticas. Além disso, os mecanismos de retenção do Strata-X permitem a lavagem com solvente orgânico (de 5 a 30% de metanol), sem perda dos analitos alvo o que é extremamente útil para eliminar contaminantes que podem interferir na análise.



**Figura 20:** Estrutura química do sorvente Strata X

O efeito do pH das amostras também possui grande relevância, pois o meio ácido, evita a ionização das fenil-uréias o que soluciona um relevante problema, pois as moléculas em estado não iônico (protonadas) possuem caráter mais apolar o que facilita a retenção dos analitos nos sorventes.

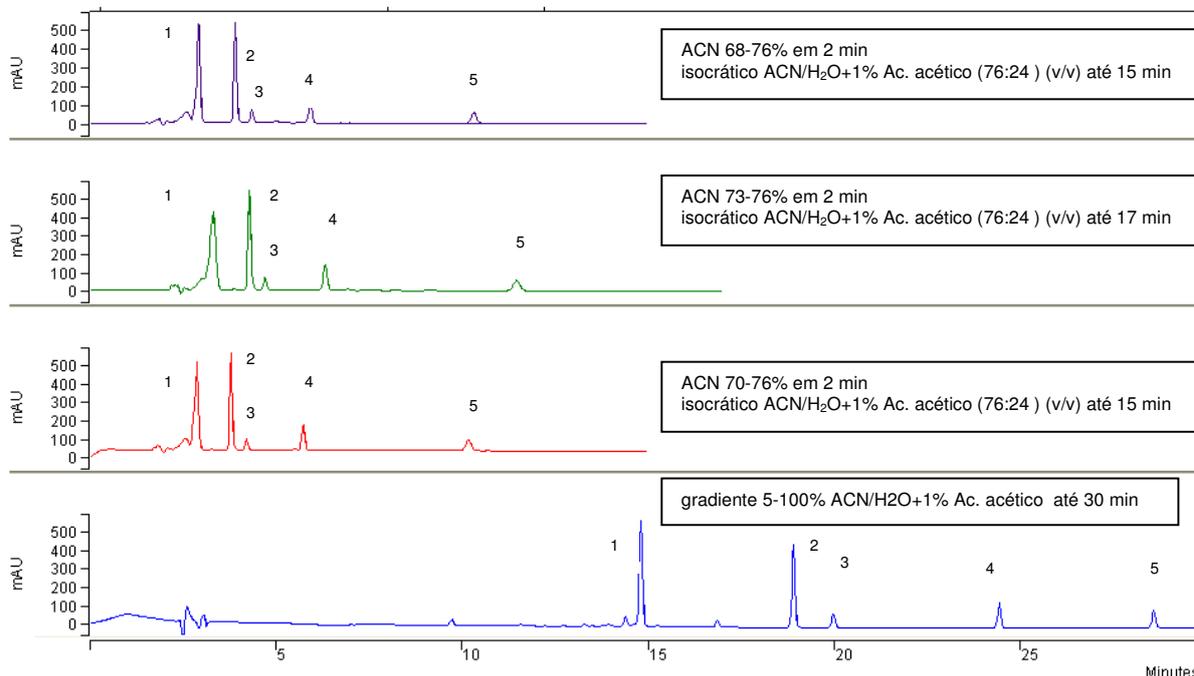
Um dado de relevância que deve ser descrito trata-se de que além das amostras fortificadas também foram analisadas as amostras testemunhas de urina e o branco do solvente, com o método já otimizado e descrito anteriormente, sendo que a testemunha da urina apresentou um interferente na região referente ao tempo de retenção do DCPMU, como mostrado na Figura 21:



**Figura 21:** Cromatograma do padrão de DCPMU a 10 µg mL<sup>-1</sup>, da amostra testemunha utilizando o cartucho Strata X, e do branco do solvente utilizando o cartucho Strata X.

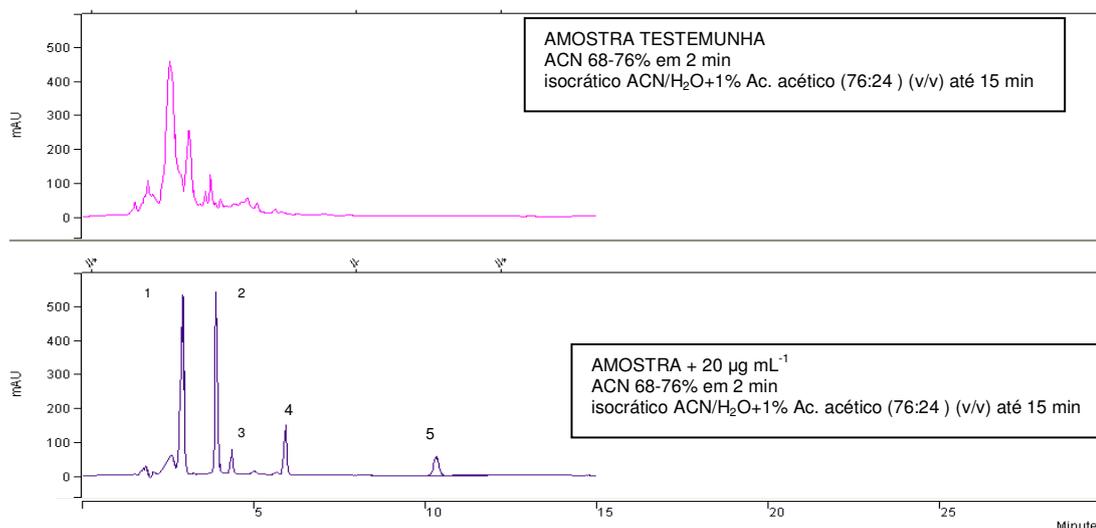
Algumas tentativas de reotimização do método para que ocorresse a separação do interferente do branco da amostra com o pico do DCPMU foram realizadas com amostras fortificadas com concentração final igual a 20µg mL<sup>-1</sup> eluídas no cartucho Strata X, sendo destacadas na Figura 22.

Essas tentativas foram realizadas com a adição de ácido acético na água da fase móvel, pois as moléculas em estado não iônico (protonadas) possuem caráter mais apolar, alterando assim as interações entre os analitos e a fase estacionária da coluna.



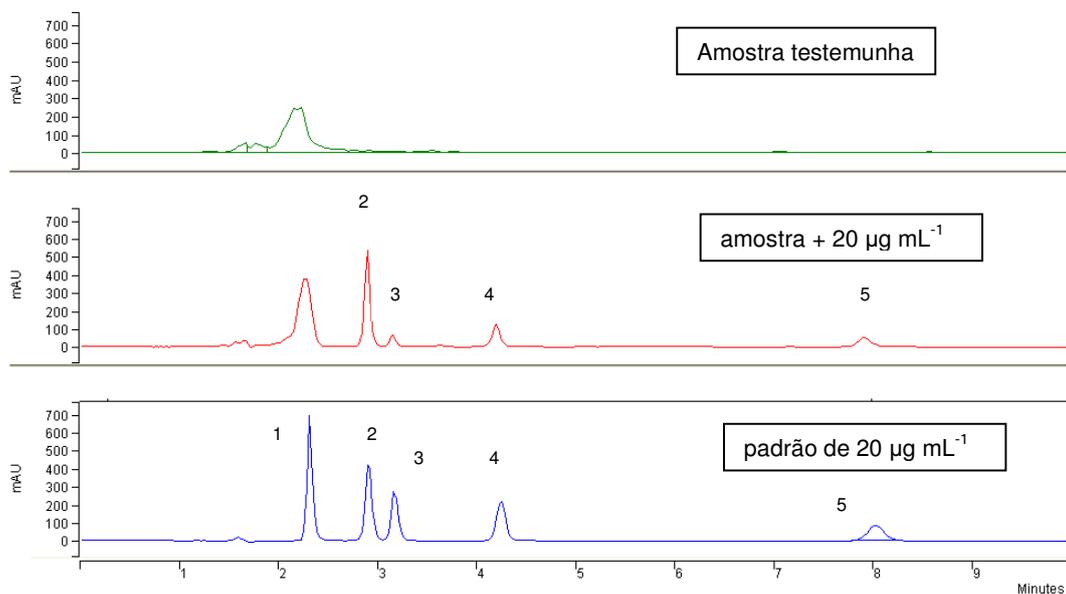
**Figura 22:** Cromatogramas da reotimização do método utilizando uma amostra de urina fortificada com concentração final de  $20\mu\text{g mL}^{-1}$  (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

Observou-se que com essas condições não foi possível a separação das substâncias contidas no branco da amostra com os 5 analitos de interesse. Também foi analisado o branco utilizando um método gradiente, onde pode-se observar na Figura 23 a separação de algumas substâncias da própria amostra de urina.



**Figura 23:** Cromatogramas (HPLC/UV) da amostra testemunha, e da amostra fortificada com os padrões em acetonitrila com concentração igual à  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

Apesar das substâncias contidas na urina interferirem no primeiro pico de interesse neste estudo, onde não se pode dizer que o primeiro pico é totalmente do DCPMU enriquecido, foi possível realizar as análises de recuperação para as outras substâncias, utilizando as condições já otimizadas para a curva analítica, conforme se observa na Figura 24:



**Figura 24:** Cromatogramas (HPLC/UV) da amostra testemunha, da amostra fortificada e dos padrões em acetonitrila com concentração igual à  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , na mesma condição isocrática otimizada para as curvas analíticas. (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

Devido ao interferente que consta na própria urina, o DCPMU não pode ser analisado, somente as outras substâncias de estudo, na Tabela 7. São apresentadas as recuperações obtidas.

**Tabela 7:** Valores de recuperação para amostras fortificadas com  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (n=3)

	<b>Rec (%)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Diuron</b>	101,0	0,3
<b>DCA</b>	30,0	0,8
<b>4,4-diclorocarbanilida</b>	60,1	0,4
<b>DCPU</b>	63,3	0,4

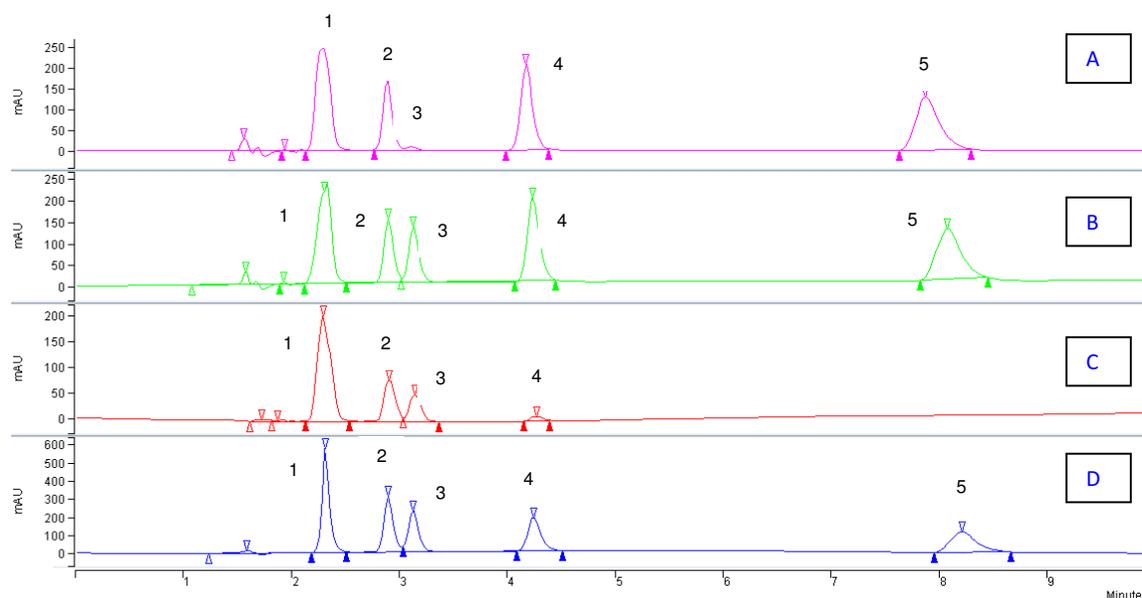
Considerando-se que os intervalos aceitáveis para uma recuperação estão entre 70% e 120%, mas dependendo da complexidade da amostra ou analítica, este valor pode ser de 50 a 120% (Ribani, 2004), para as amostras fortificadas com  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$

dos analitos as recuperações seriam aceitáveis para todos os analitos, exceto para DCA.

Os resultados indicam que o DCA possui alto potencial de perda por evaporação, por apresentar alta pressão de vapor ( $6,30 \cdot 10^{-3}$  Torr à 25° C) (banco de dados do Scifinder). Alguns trabalhos indicam como uma possível fonte de perda a secagem com nitrogênio durante a etapa de extração em fase sólida (SPE); as interações com o material adsorvente do cartucho de extração, e com matéria orgânica no caso de amostras de sedimento e água do mar (Gatidou ,2005 e Boti, 2007b) .

Para avaliar a perda de DCA na etapa de secagem foram feitos alguns experimentos variando a quantidade de solvente de eluição e secando ou não o extrato com fluxo de nitrogênio. Os cromatogramas obtidos nestes testes podem ser vistos na Figura 25.

Pode-se observar que quando uma solução padrão com concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  é eluída do cartucho com 5 mL ACN/MeOH (50:50) e seca com fluxo de nitrogênio, ocorre a perda da DCA (Figura 25-A). Quando o volume utilizado para a eluição é de 1 mL, a DCA não é eluída do cartucho e a maior parte da 4,4'-diclorocarbanilida também fica retida (Figura 25-C). Ao se eluir uma solução de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  com 5 mL e não secar com nitrogênio (Figura 25-B), percebe-se uma boa recuperação para todas as substâncias, como mostrado na Tabela 8.



**Figura 25:** Cromatogramas HPLC/UV para: (a) solução padrão de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila eluída do cartucho Strata-X com 5 ml e seca com nitrogênio, (b) solução padrão de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  eluída com 5 mL, (c) solução padrão de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e eluída com 1 mL, (d) solução padrão de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  sem passar pelo cartucho. (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

**Tabela 8:** Valores de recuperação dos testes **com e sem secagem sob fluxo de  $\text{N}_2$**

Substâncias	Rec $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1 mL (%)	Rec $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 5 mL (%)	Rec $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 5 mL sec. (%)
Diuron	29,9	53,8	59,0
DCA	21,8	59,4	0
DCPU	0	108,3	103,1
DCPMU	62,6	74,7	86,3
4,4- diclorocarbanilida	3,1	120,8	89,3

Portanto, o melhor volume de eluição do cartucho com Acetonitrila/ Metanol (50:50) é de 5 mL sem realizar a etapa de secagem com nitrogênio. Com essas condições otimizadas fez-se o estudo de recuperação para concentrações altas e baixas da curva analítica.

As amostras foram fortificadas com padrões, de maneira que as concentrações de Diuron e DCA nas amostras enriquecidas fossem 5, 20, 50, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A escolha de se realizar apenas os testes de recuperação no Diuron e no DCA se baseou na comprovada ação carcinogênica e mutagênica do DCA e suspeita do Diuron (Iyer, 2002). Os valores das recuperações estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Valores das recuperações para as amostras enriquecidas, suprimindo-se a etapa de secagem com nitrogênio. (n =3)

Substância Conc ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperações (%) / CV (%)				
	5	20	50	100	1000
Diuron	25/ 32	98 /8	68 /5	87 /13	91 /3
DCA	41 /49	124/27	80 /7	80 /14	79 /70

De acordo com os dados da Tabela 9, foram obtidas recuperações aceitáveis para amostras enriquecidas com concentrações entre 20 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para diuron, enquanto que para DCA as recuperações foram aceitáveis entre 20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Por esta tabela também se estabelece que o limite de quantificação do método é 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , uma vez que para os objetivos do projeto em que este trabalho está inserido, a recuperação para a DCA de 124 % com CV de 27 %, e para o diuron de 98% e CV igual a 8% foram aceitável.

Considerando-se que os animais incluídos no estudo toxicológico ao qual será aplicado este método, estão sendo alimentados com ração contendo entre 60 a 2500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de diuron e que ingerem em média 20-25g de ração por dia e excretam 10-

15mL de urina/dia, os limites encontrados para o método são adequados à aplicação neste estudo.

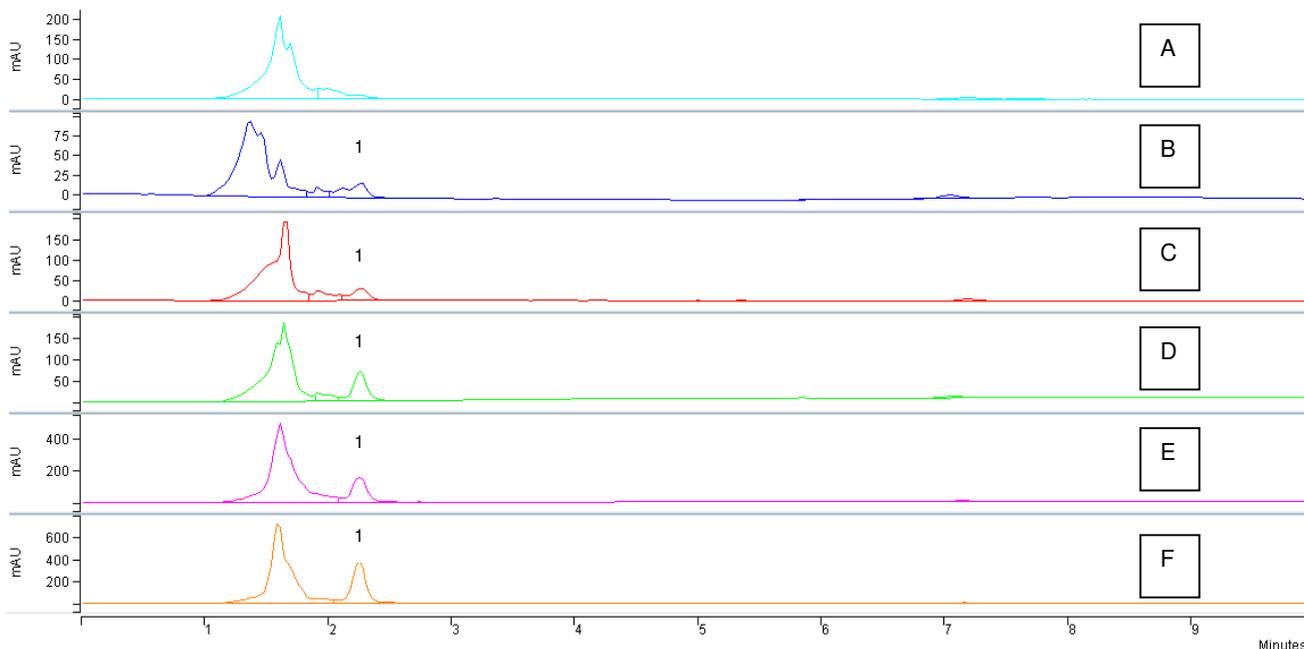
### **4.3. Aplicação do método a amostras de urina provenientes do estudo toxicológico.**

Os ensaios que foram realizados pela equipe da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu com os animais deste estudo estão descritos a seguir.

Na 10<sup>a</sup> semana do experimento a urina foi coletada individualmente de seis animais por grupo escolhidos aleatoriamente de todos os grupos estudados em gaiolas metabólicas. Os animais foram mantidos em jejum para evitar contaminação da urina por componentes da ração e a água foi fornecida *ad libitum*. A coleta foi feita durante 12 horas em coletores plásticos de 50 mL acoplados a um funil na base da gaiola. A urina obtida permaneceu a -20°C até o momento da análise quantitativa do Diuron e metabólitos pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/UV.

As amostras foram tratadas de acordo com o método otimizado e validado. Cada uma das amostras representa uma amostra composta por urina de 5 animais, submetidos às mesmas condições de dieta.

Neste estudo os animais foram alimentados com ração enriquecida com 60, 125, 500, 1250 e 2500 mg . kg<sup>-1</sup> de diuron e o grupo controle (ração sem adição do pesticida). Os cromatogramas obtidos das amostras podem ser observados na figura 26.



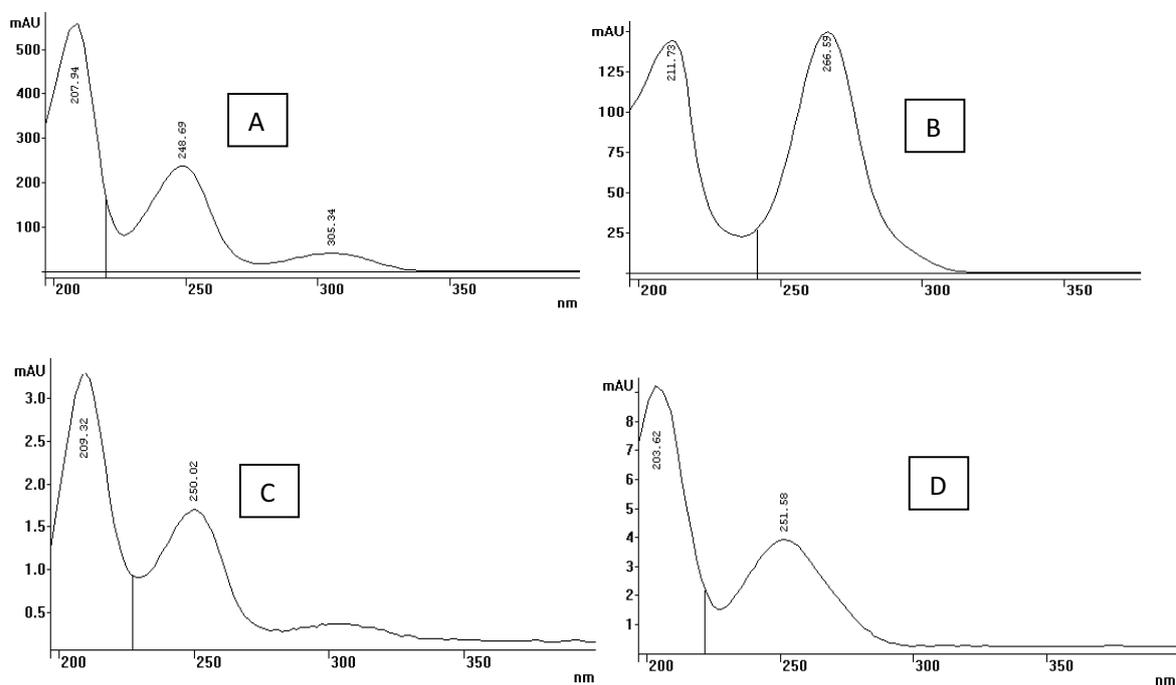
**Figura 26:** Cromatogramas HPLC/UV para: (A) Animais controle, tratados com ração sem adição do diuron, (B) Animais tratados com ração com  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron, (C) Animais tratados com  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron, (D) Animais tratados com  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron, (E) Animais tratados com  $1250 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron, (F) Animais tratados com  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron. (1) DCPMU

Através dos cromatogramas da figura 26 observou-se que com o aumento da dose do pesticida na ração o pico do DCPMU torna-se mais intenso. Os poucos artigos da literatura mostram que o metabólito majoritário na urina é a DCPU (Iyer, 2002; European Food Safety Authority, 2005), mas nas amostras apenas a DCPMU se mostra presente e a DCA aparece no Grupo de  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$ , no qual os animais foram tratados com a maior dose de diuron (Figura 28).

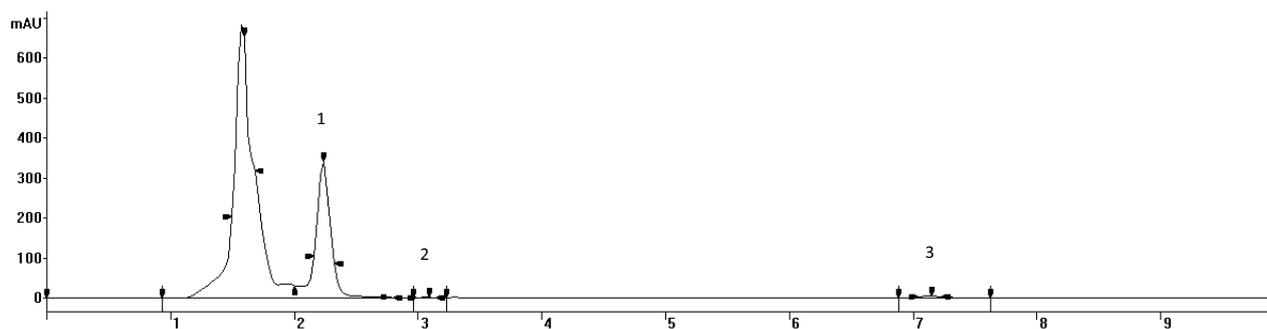
Em um dos cromatogramas do Grupo de  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$ , tomado como exemplo porque as substâncias aparecem em maior intensidade, é comprovado através dos espectros de UV (Figura 27) e observado pelo cromatograma da Figura 28 que a DCA está presente, pois os máximos de absorção estão muito próximos ( $248,49 \text{ nm}$

para o padrão de DCA e na amostras 250,02 nm). Essa diferença nos máximos de absorção pode ocorrer pois os espectros de absorção foram obtidos em meios ligeiramente diferentes, sendo apenas solvente para o padrão e o extrato da amostra no outro caso.

Embora ocorra um pico no mesmo tempo de retenção da DCPU, esta substância não está presente, pois um dos máximos de absorção do padrão da DCPU é igual a 266,59 nm e a substância presente na amostra possui máximo de absorção igual a 251,58 nm. Essa verificação foi realizada para todos os cromatogramas de todos os grupos, onde apenas no Grupo de 2500 mg kg<sup>-1</sup> pode-se observar a DCA (Figura 28). O pico da substância desconhecida presente na amostra com o tempo de retenção próximo da DCPU, com máximo de absorção igual a 251,58nm, aparece no Grupo de 1250 mg kg<sup>-1</sup> e no Grupo 2500 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 27:** Espectros UV. (A) padrão de DCA em acetonitrila, (B) padrão de DCPU em acetonitrila, (C) DCA no cromatograma da figura 28, (D) substância desconhecida (cromatograma da Figura 28)

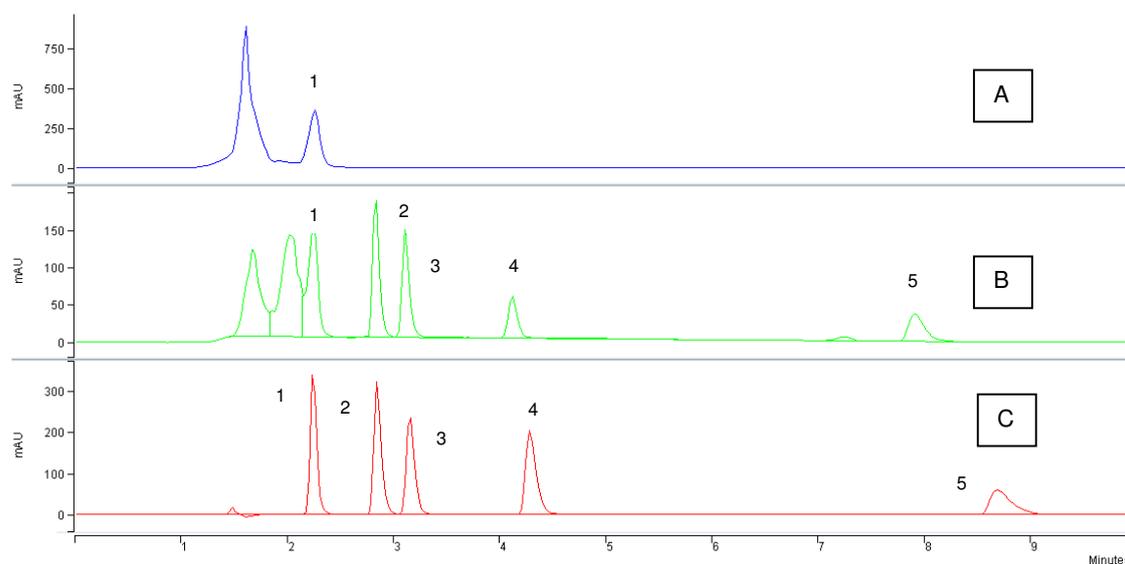


**Figura 28:** Cromatograma HPLC/UV para extrato de urina de animais alimentados com ração contendo  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron (1) DCPMU, (2) DCA, (3) substância desconhecida

Na literatura não há dados sobre como ocorre o metabolismo do diuron em mamíferos, existindo, entretanto uma única referência que menciona que o DCPU é o metabólito mais abundante de diuron para ratos (não é mencionada a espécie) e ovelhas. No ambiente a degradação aeróbica do diuron inclui os 4 metabolitos, sendo que o DCA é o mais estável deles tendo uma meia vida maior no ambiente. Nada é mencionado na literatura a respeito da degradação anaeróbica do diuron. Pode ser viável a hipótese de que a partir da ingestão de  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron através da ração o organismo comece a excretar a DCA pela urina, sendo esta já comprovadamente cancerígena (Iyer, 2002).

Através dos cromatogramas da Figura 29 verifica-se que há menos interferentes na amostra de urina dos animais alimentados com ração contendo  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron do que na amostra de urina dos animais controle enriquecida com  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 29) . Com isso seria possível a quantificação da DCPMU nas amostras. Contudo, o enfoque deste trabalho foi direcionado para as moléculas do diuron e da DCA, pois não se tendo base literária sobre este metabolismo optou-se em apenas estudar a resposta das recuperações em alguns níveis de fortificação do pesticida diuron inserido na alimentação dos ratos e do metabólito comprovadamente cancerígeno, DCA. A literatura não aponta os metabólitos DCPU, DCPMU e 4,4-diclorocarbanilida como possíveis alteradores endócrinos ou com algum poder cancerígeno. Devido a essa falta de informações essas substâncias não foram o enfoque do trabalho, apesar de ter sido otimizado um método cromatográfico no qual, em determinadas concentrações, todas estas substâncias podem ser identificadas e quantificadas simultaneamente.

Pode-se observar, ainda, na Figura 29 que os picos 4 e 5 (4,4-diclorocarbanilida e DCPU, respectivamente) do cromatograma *B* se deslocaram um pouco para a esquerda em relação aos do cromatograma dos padrões (C). Isso pode ter ocorrido devido a utilização de solventes de outra marca que constituem a fase móvel, da alteração da temperatura da sala do cromatógrafo ou de alguma substância que permaneceu na coluna interagindo assim com os analitos de interesse.



**Figura 29:** Cromatogramas HPLC/UV para: (a) extrato de urina de animais tratados com ração contendo  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de diuron, (b) extrato de amostra de urina (animais controle) enriquecida com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (c) solução padrão de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1) DCPMU, (2) Diuron, (3) DCA, (4) 4,4'-diclorocarbanilida, (5) DCPU

Como já mostrado anteriormente, no teste com a amostra de urina enriquecida com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e eluída do cartucho com 5 mL de ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (50:50) (v/v), verificou-se uma boa recuperação para a DCPMU, como mostrado na Tabela 10.

**Tabela 10:** Valores das recuperações do diuron e seus metabólitos para amostra de urina enriquecida com os analitos

<b>Substância</b>	<b>Rec <math>100 \mu\text{g mL}^{-1}</math> 5 mL (%)</b>
<b>Diuron</b>	53,8
<b>DCA</b>	59,4
<b>DCPU</b>	108,3
<b>DCPMU</b>	74,7
<b>4,4-diclorocarbanilida</b>	120,8

Com isso, não foi possível a quantificação da DCPMU nas amostras do estudo temático, pois todas as concentrações obtidas ficaram abaixo desta concentração ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ou seja, ficaram abaixo do limite de quantificação do método para a DCPMU. Pode-se apenas identificar a DCPMU nos extratos de urina proveniente de animais tratados com ração contendo 60, 125, 500, 1250 e 2500  $\text{mg kg}^{-1}$ . DCA pode ser identificada apenas para o grupo alimentado com maior dose de diuron.

Na literatura foram encontrados apenas dois trabalhos similares ao que foi desenvolvido nesta dissertação e que trazem informações de validação que podem ser utilizadas na discussão dos dados obtidos.

Em um dos trabalhos analisou-se diuron, DCA, DCPU e DCPMU simultaneamente em água do mar, empregando SPE C18, metanol para eluição dos analitos e HPLC/DAD ( $\lambda = 234 \text{ nm}$ ) para análise (Gatidou, 2005). O volume de amostra utilizado foi de 500 mL de água do mar e o volume final do extrato foi de 1 mL. Os três níveis de concentração estudados na recuperação foram 0,1; 0,2 e 1  $\mu\text{g}$

L<sup>-1</sup>. As recuperações obtidas variaram entre 82 e 106% para diuron, DCPMU e DCPU, Para DCA as recuperações para todos os níveis foram menores do que 30%.

No outro trabalho encontrado na literatura, desenvolveu-se método para análise de diuron e linuron (outro pesticida da classe das fenil-uréias) em urina humana (Pozzebon, 2003). O método otimizado incluía SPE C18 (cartuchos preparados no próprio laboratório) e análise por HPLC/UV ( $\lambda = 254$  nm). O tratamento da amostra incluía a baseificação (pH 9 com NH<sub>4</sub>OH) de 2 mL de urina; diluição em 4 mL de acetonitrila, centrifugação e a diluição subsequente de uma alíquota de 3 mL do sobrenadante em 20 mL de água. A solução diluída resultante foi submetida a extração por SPE, utilizando diclorometano para eluição dos analitos. Após a eluição o DCM foi evaporado à secura e o resíduo re-solubilizado em 200  $\mu$ L de acetonitrila para análise por HPLC/UV. O limite de quantificação do método foi de 40  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para diuron, com recuperação de 95% (CV < 2%) para esta concentração.

Nesta dissertação o método desenvolvido tinha como objetivo a sua aplicação a amostras de urina provenientes de animais submetidos a dieta contendo ração fortificada com diuron em concentrações variando de 60 a 2500 mg kg<sup>-1</sup>. Considerando-se as elevadas doses e o volume diminuto de urina que estaria disponível. O método foi desenvolvido para a utilização de 1 ml de urina e teve como limites de quantificação 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para diuron e DCA, sendo escolhidas estas substâncias para a validação do método pois eram as que poderiam relacionar-se com os efeitos enfocados no estudo toxicológico: carcinoma de epitélio da bexiga urinária.

Assim sendo, o método desenvolvido e otimizado, traz as seguintes vantagens em relação ao publicados na literatura: possibilita a análise de 1 mL de urina e permite a análise de DCA e diuron com recuperação de 120 e 98%, respectivamente, na concentração de 20  $\mu\text{g mL}$ .

Considerando-se que os animais incluídos no estudo toxicológico ao qual será aplicado este método, estão sendo alimentados com ração contendo entre 60 a 2500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de diuron e que ingerem em média 20-25g de ração por dia. A ingestão diária de diuron estará entre 1200 e 62500  $\mu\text{g}$  de diuron. Consideram-se, ainda que a excreção média dos animais é de 10-15mL de urina/dia, o limite de quantificação do método é adequado ao propósito a que se destina.

## 5 - Conclusões

---

O método otimizado e validado é adequado aos propósitos de sua aplicação, trazendo como principais vantagens sobre os poucos métodos já descritos na literatura para os analitos estudados, a utilização de 1 mL de amostra e a excelente recuperação do DCA (> 80%).

Nas amostras de urina dos animais incluídos no estudo temático, a molécula de DCPMU foi detectada em todas as amostras, o que não seria esperado, pois segundo a literatura o DCPU é o metabólito de diuron predominante na urina. Apesar disto, na literatura, não há registros comprovando que a DCPU ou a DCPMU causem algum efeito cancerígeno ou de alteração endócrina em organismos, o que confirma a adequação da escolha feita neste trabalho para a validação do método para diuron e DCA. DCA foi detectado, porém não quantificado, apenas nas amostras de animais submetidos à maior dose de diuron.

# REFERÊNCIAS

---

BACIGALUPO, M. M. A.; MERONI, G. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, n. 55, p. 3823-3828, 2007.

BOTI, V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples Part I: ultrasonic extraction from diverse sediment matrices. **Journal of Chromatography A**, n. 1146, p. 139-147, Fev. 2007a.

BOTI, V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples Part II: solid-phase extraction from environmental natural waters. **Journal of Chromatography A**, n. 1146, p. 148-156, Fev. 2007b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ingredientes ativos**: diuron. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 02 dez. 2008.

BRITO, N. M. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 12, p. 155-168, jan./dez. 2002.

BRITO, A. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 129-146, jan. 2003.

BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M. Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. **Journal Brazilian of Chemical Society**, v.16, n. 3B, p. 650-653, 2005.

CARACCILO, A. B.; GIULIANO, G.; GRENNI, P.; GUZZELLA, L.; POZZONI, F.; BOTTONI, P.; FAVA, L.; CROBE, A.; ORRU, M.; FUNARI, E. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of northern Italy. **Environmental Pollution**, n. 134, p. 525-534, 2005.

CEDERLUND, H.; BÖRJESSON, E.; ÖNNEBY, K.; STENSTRÖM, J. Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 39, p. 473-484, Sept. 2007.

DOMINGUES, A. **Avaliação do potencial imunotóxico do herbicida diuron**: estudo de toxicidade de 28 dias e 90 dias (doses repetidas). 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em medicina) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Ed.). **Guia EURACHEM**: determinando a incerteza na medição analítica. 2002. Disponível em: <<http://allchemistry.iq.usp.br/pub/metabolizando/Beta021115.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **What is a pesticide?** Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>>. Acesso em : 02 dez. 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diuron. **Scientific Report**, n. 25, p. 1-58, Jan. 2005.

FERDANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F.; KEMPINAS, W. G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, n. 23, p. 106-112, Sept. 2007.

FIELD, J. A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3897-3902, 1997.

GATIDOU, G. G.; KOTRIKLA, A.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, n. 528, p. 89-99, Nov. 2005.

GOODDY, D. C. ; CHILTON, P. J.; HARRISON, I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. **The Science of the Total Environment**, n. 297, p. 67-83, 2003.

IYER, P. **Evidence on the developmental and reproductive toxicity of diuron**. California Environmental Protection Agency. Disponível em: <[http://www.oehha.ca.gov/prop65/hazard\\_ident/pdf\\_zip/ChlorpyrifosHID0908.pdf](http://www.oehha.ca.gov/prop65/hazard_ident/pdf_zip/ChlorpyrifosHID0908.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2002.

LANDRY, D. ; DOUSSET, S.; ANDREUX, F. Leaching of oryzalin and diuron through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. **Chemosphere**, n. 62, p. 1735-1747, 2006.

LEWALTER, J.; LENG, G. Consideration of individual susceptibility in adverse pesticide effects. **Toxicology Letters**, n. 107, p. 131 - 144, 1999.

MARTINS, P.R. **Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: a indústria de agroquímicos/ transgênicos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sociologos.org.br/teses/paulo/indicegeral.asp>>. Acesso em: 10 out. 2000.

MELO, L. F. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. High-performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH<sub>2</sub> and C<sub>18</sub> solid-phase extraction materials. **Journal of Chromatography A**, n.1073, p. 75-81, Out. 2005.

NASCIMENTO, M. G.; OLIVEIRA, M. L. C. S.; LIMA, A. S. L.; CAMARGO, J. L. V. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male wistar rats. **Toxicology**, n. 224, p. 66-73, Abr. 2006.

POZZEBON, J. M.; QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F. C.; KAPOR, M. A.; JARDIM, I. C. S. F. Application of new high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction materials to th analysis of pesticides in human urine. **Journal of Chromatography A**, n. 987, p. 381-387, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos. **Química Nova**, n. 5, p. 771-80, 2004.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, n. 3, v. 30, p. 688-694, 2007.

SANTOS, S. P. **A química dos insecticidas**: parte I. Faculdade de Ciências de Lisboa. Disponível em: <[http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ\\_085\\_043\\_09.pdf](http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_085_043_09.pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2008.

THEIR, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987, p. 433.

THOMAS, K. V.; McHUGH, M.; HILTON, M.; WALDOCK, M. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. **Environmental Pollution**, n. 123, p.153–161, 2003.

VALENTE, A. L. P. ; AUGUSTO, F. ; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: < <http://www.chemkeys.com/artigo/12/0>> . Acesso em : 10 out. 2006.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p.1-749, 2004.

WEISS, T.; ANGERER, J. Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 778, p. 179-192, 2002.

WITTKE, K.; HAJIMIRAGHA, H.; DUNEMANN, L.; BEGEROW, J. Determination of dichloroanilines in human urine by GC–MS, GC–MS–MS, and GC–ECD as markers of low-level pesticide exposure. **Journal of Chromatography B**, n. 755, p. 215-228, 2001.