

OTIMIZAÇÃO “in house” DA DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIOUREIA NA URINA POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Júlia Garbin Navarro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Deborah Thais Palma Scanferla, Camila Marchioni, Jéssica Cristina Zoratto Romoli (Coorientadora), Miguel Machinski Junior (Orientador) e-mail: mmjunior@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

Farmácia (40300005) e Análise Toxicológica (40303004)

Palavras-chave: fungicidas, exposição ocupacional, DPX

Resumo:

Após a exposição aos fungicidas etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), ocorre a formação de um produto de biotransformação denominado etilenotiourea (ETU), o qual é excretado na urina. Metodologias que visem a extração e quantificação da ETU podem auxiliar no monitoramento dos trabalhadores expostos a essa classe de fungicidas. Considerando isto, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) para extração e quantificação da ETU em urina. Para tanto, realizou-se a análise univariável dos fatores de extração, envolvendo os seguintes parâmetros: volume da amostra, volume e tipos de solvente de limpeza e eluição e aspiração do ar durante a eluição. A extração se mostrou mais eficiente quando se seguiu as condições a seguir: volume da amostra de 350 µL, 400 µL da solução água Milli-Q:metanol (90:10, v/v) contendo 0,1% de ácido acético como solvente de limpeza, 200 µL de acetona como solvente de eluição e aspiração de ar durante a eluição. Foi possível concluir que a técnica por DPX e análise em CG-EM mostrou-se eficiente para extração e quantificação da ETU urinária. No entanto, estudos complementares são necessários para assegurar a reprodutibilidade e confiabilidade dos testes.

Introdução

Os etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) são uma classe de fungicidas amplamente empregados na agricultura. Apesar dos benefícios econômicos que promovem, podem ser absorvidos pelo organismo e biotransformados em um composto denominado etilenotiourea (ETU), o qual é conhecido principalmente por sua capacidade em causar alterações funcionais na glândula tireoide. A ETU é excretada majoritariamente pela urina, assim,

pode servir como biomarcador de exposição. Dessa forma, metodologias que sejam capazes de extrair e quantificar este metabólito podem ser utilizadas para o monitoramento biológico da exposição de trabalhadores aos EBDCs. Uma das técnicas que vem sendo empregada para diferentes análises em fluidos biológicos consiste na extração por ponteiras descartáveis (DPX - *disposable pipette extraction*). Esta técnica é uma modificação da extração em fase sólida, em que se utiliza ponteiras de 1 a 5 mL, nas quais a fase sortiva é inserida e permanece livre entre dois filtros. Esta técnica, associada a métodos de detecção como a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), tem proporcionado alta seletividade e detectabilidade para diversos tipos de analitos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho consistiu em empregar a técnica de DPX para extração da ETU em urina, avaliando parâmetros para que a extração fosse aprimorada e passível de quantificação por meio do CG-EM.

Materiais e métodos

As amostras foram preparadas com urina enriquecida em uma concentração final de 100 ng/mL e para os brancos, utilizou-se somente urina. Para o preparo das ponteiras de DPX, foram utilizadas ponteiras de 1 mL, nas quais foram adicionadas 20 mg de celite P.A. como fase sortiva, inserida entre dois filtros. Em todos os testes o condicionamento foi realizado utilizando-se água Milli-Q. A fim de se obter o melhor desempenho da extração e um melhor perfil cromatográfico foi realizada uma análise univariável em triplicata, modificando-se a cada extração os seguintes parâmetros:

- Volume da amostra (A): 100 e 350 μ L.
- Solvente de limpeza (SL): água Milli-Q:metanol (90:10, v/v) contendo 0,1% de ácido acético (SL1), água Milli-Q:etanol (90:10, v/v) contendo 0,1% de ácido acético (SL2) e clorofórmio contendo 0,1% de ácido acético (SL3).
- Volume da solução de limpeza: 100, 200, 300 e 400 μ L.
- Solvente de eluição (SE): acetona (SE1), acetona:metanol (50:50, v/v) (SE2), acetona:metanol (70:30, v/v) (SE3) e diclorometano (SE4).
- Volume do solvente de eluição: 200, 300 e 400 μ L.
- Técnica de eluição: aspiração ou não do ar durante a eluição.

Resultados e Discussão

A análise do padrão de ETU por CG-EM demonstrou que os íons 159 e 231 são os quantificadores da ETU. Assim, a variação dos parâmetros para otimização da extração ocorreu observando-se o perfil cromatográfico destes íons. As médias das áreas obtidas conforme modificação dos principais parâmetros estão apresentadas na Figura 1.

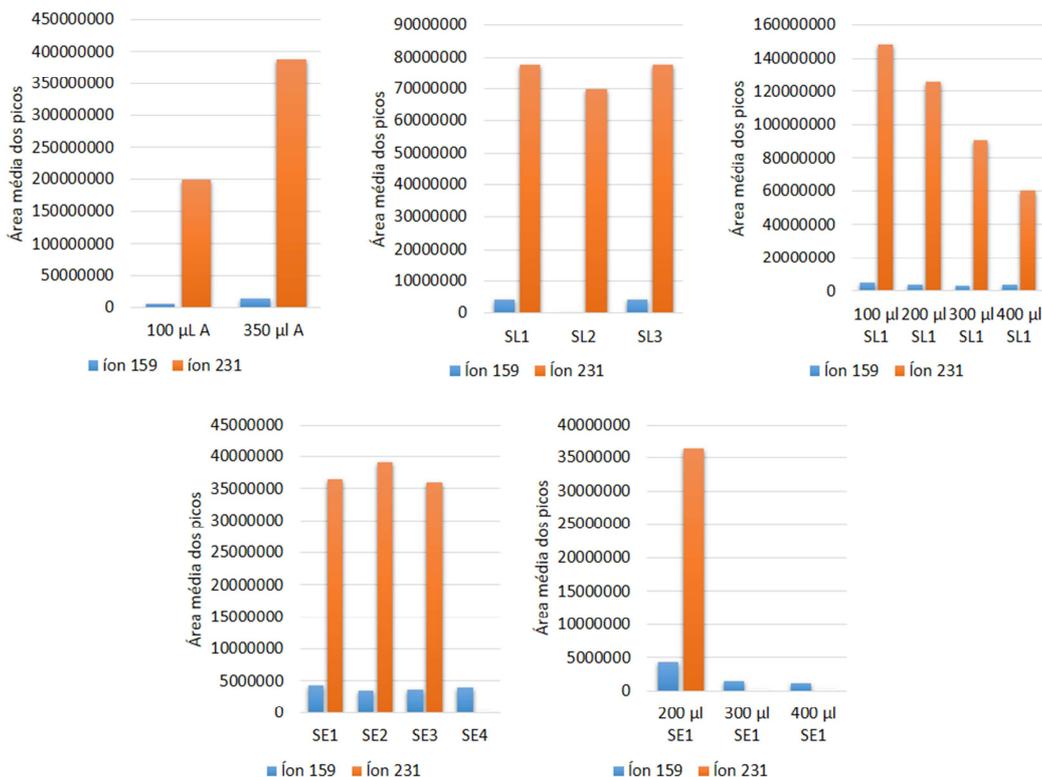


Figura 1. Gráficos referentes as médias das áreas dos íons 159 e 231, obtidas conforme variações dos principais parâmetros: (A) amostra; (SL) solvente de limpeza; (SE) solvente de eluição.

O volume de 350 μL de amostra proporcionou uma área aproximadamente duas vezes maior para ambos os íons, quando comparado a 100 μL . Assim, para os demais testes adotou-se este volume. Ao analisar o solvente de limpeza, observou-se uma área média superior para o uso de clorofórmio contendo 0,1% de ácido acético (SL3) e para o volume de 100 μL . No entanto, estes testes apresentaram alto coeficiente de variação e nos dois casos o aumento da área foi também observado nos brancos, assim, concluiu-se que o uso desta solução e deste volume não foram eficientes para eliminar os interferentes da matriz, que provocaram uma adição no sinal cromatográfico no tempo de retenção dos analitos, levando ao aumento da área observada. Dessa forma, optou-se por prosseguir com o uso água Milli-Q:metanol (90:10, v/v) contendo 0,1% de ácido acético (SL1) no volume de 400 μL . A acetona como solvente de eluição (SE1) levou à maior média de área para o íon 159 e um menor valor de coeficiente de variação em relação à mistura acetona:metanol (50:50, v/v) (SE2). Observou-se que o aumento do volume do solvente não ocasionava melhoras na área média, dessa forma, seguindo-se o princípio da química verde de minimização de resíduos, o uso de 200 μL foi considerado o mais adequado. A aspiração do ar durante a eluição promoveu aumento da área em mais de 90 vezes para o íon 159 e em cerca de 4 vezes para o íon 231, comparada com as amostras em que não houve aspiração do ar. Isso acontece porque a entrada do ar

favorece a mistura da amostra com o celite, levando a formação de uma suspensão, o que auxilia no processo de extração (PINTO, QUEIROZ, 2015). A utilização da DPX como técnica de preparo de amostra juntamente com a análise por CG-EM foi também estudado por Oenning et al. (2018) que, similarmente, analisou a presença de praguicidas em amostras de urina. Os autores relataram que a técnica proporcionou limites de detecção e quantificação mais baixos do que aqueles descritos na literatura em análises semelhantes. Este método tem se mostrado eficiente, apresentando altas taxas de recuperação (BORDIN et al., 2016). Além disso, o uso da DPX apresenta como vantagens a redução no tempo de extração e a necessidade de um menor volume de amostra e de solvente orgânico, sendo assim, considerada uma técnica promissora (BORDIN et al., 2016; PINTO, QUEIROZ, 2015).

Conclusões

A utilização da DPX para extração da ETU urinária, juntamente com a quantificação do produto de biotransformação por CG-EM configura em uma técnica eficiente e promissora, que futuramente pode ser aprimorada e empregada para auxiliar no monitoramento biológico da exposição aos EBDCs. No entanto, estudos complementares são necessários, a fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos testes. Assim, futuramente será avaliado: pH da amostra, adição de sal e tempo de equilíbrio. Por fim, o método será validado de acordo com os guias vigentes.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Referências

BORDIN, D. C. M.; Alves, M. N. R.; Campos, E. G.; Martinis, B. S. Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 39, n. 6, p. 1168-1172, 2016.

OENNING, A. L.; MERIB, J.; CARASEK, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1092, p. 459-465, 2018.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. Costa. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 2, n. 7, p. 101-108, 2015.