VAGNER GONÇALVES JÚNIOR

**Desenvolvimento e validação de um método analítico para
detecção de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes
biológicas com finalidade forense**

São Paulo

2015

VAGNER GONÇALVES JÚNIOR

Desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3225
FMVZ

Gonçalves Júnior, Vagner

Desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense / Vagner Gonçalves Júnior. -- 2015.

93 p. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. Agrotóxico. 2. HPLC. 3. Análise toxicológica. 4. Amostra biológica. 5. Validação analítica.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de carboclorano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense", protocolado sob o CEUA nº 16532/0114, sob a responsabilidade de **Helenice De Souza Spinosa** e equipe: Vagner Gonçalves Júnior; André Rinaldi Fukushima - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.898, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUAFMVZ) em reunião de 25/02/2015.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 0 Others species (), protocol number CEUA 16532/0114, under the responsibility of **Helenice De Souza Spinosa** and team: Vagner Gonçalves Júnior; André Rinaldi Fukushima - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6898, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUAFMVZ) in the meeting of 02/25/2015.

Vigência da Proposta: de 03/2014 a 02/2016

Área: Patologia

Procedência: Amostras biológicas de animais oriundos do Serviço de Patologia Animal - VPT

Espécie: Outra espécie

Gênero: Machos

Idade: não se aplica

N: não se

Linhagem: não se aplica

Peso: não se aplica

Procedência: Amostras biológicas de animais oriundos do Serviço de Patologia Animal - VPT

Espécie: Outra espécie

Gênero: Fêmeas

Idade: não se aplica

N: não se

Linhagem: não se aplica

Peso: não se aplica

São Paulo, 05 de outubro de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GONÇALVES JR., V.

Título: Desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. ____--_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

À minha esposa, pela paciência, compreensão, incentivo, carinho e amor.

Aos meus familiares, pelo amor e por acreditarem e investirem nos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Sinto-me extremamente abençoado por minha equipe de trabalho (Herculano, Nicolle, Jorge, Cris e Helenice). O presente estudo não seria possível se não tivesse o apoio de vocês. Muito obrigado.

Agradeço pelo apoio e incentivo da Adriana.

Aos colegas da pós-graduação (Rafa, Tiago, Everton, André, Marcelo, Thaisa, Natália, Paulinha, Júlia, Adriana, Mariana, Atílio, Fernanda e Daniel).

Aos colegas de trabalho do VPT.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração.

O que realmente importa na vida é o percurso, não apenas a chegada. O fim é apenas a consequência do caminho que trilhamos. Obrigado a todos que direta ou indiretamente fizeram parte do meu percurso.

“Os que desprezam os pequenos acontecimentos nunca farão grandes descobertas. Pequenos momentos mudam grandes rotas.”

Augusto Cury

RESUMO

GONÇALVES JR., V. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense.** [Development and validation of analytical methodology for detection of carbofuran and 3- hydroxycarbofuran in biological matrices with forensic purposes]. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os praguicidas podem ser responsáveis por intoxicações exógenas intencionais ou não intencionais, tanto em seres humanos como em animais, em virtude de sua ampla toxicidade e fácil obtenção do produto, nem sempre por vias legais. O carbofurano é um praguicida carbamato amplamente utilizado no Brasil, como inseticida e nematicida, para o controle de pragas agrícolas; é comercializado na forma de grânulos, vulgarmente conhecido como “chumbinho”. Esse praguicida em animais superiores inibe a enzima acetilcolinesterase, promovendo efeitos tóxicos que podem levar a óbito. Considerando que o carbofurano poderia estar implicado com quadros intoxicações exógenas de animais, no presente estudo se propôs desenvolver e validar um método analítico para detectar e/ou quantificar esse praguicida e seu metabólito, 3-hidroxicarbofurano, em matrizes biológicas de diferentes espécies animais por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), a fim de utilizá-lo no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Para desenvolver esse método foram utilizadas amostras biológicas proveniente de fragmentos de, no mínimo, seis animais diferentes, de espécies distintas (cão, gato, porco, boi, rato, camundongo e ave), isentas de suspeita de intoxicação. Realizou-se a fortificação dessas amostras biológicas, previamente homogeneizadas, com soluções contendo o praguicida e seu metabólito, 3-hidroxicarbofurano, em 6 níveis de fortificação que variaram de 6,25 a 100 µg/mL. Avaliaram-se os seguintes parâmetros para validação do método: seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, curva de calibração e efeito residual, limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ). Para estabelecer a seletividade do método, verificou-se as respostas de picos interferentes próximo

ao tempo de retenção dos analitos, as quais foram inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ. Quanto ao efeito matriz, não houve interferência relevante entre as matrizes analisadas. Em relação a precisão e exatidão do método, foi possível observar que o coeficiente de variação (CV) e o erro padrão relativo (EPR) não excederam ao limite máximo de 15%. Considerando a curva de calibração, o coeficiente de correlação (r^2) apresentou valores iguais ou superiores que 0,99 nas diferentes matrizes para o carbofurano, enquanto para o 3-hidroxicarbofurano duas matrizes (fígado e conteúdo estomacal) apresentaram o valor de 0,98 e as demais superior a 0,99. A extração líquido-líquido forneceu valores de recuperação entre 74,29 a 100,1% para o carbofurano e entre 64,72 a 100,61% para o 3-hidroxicarbofurano, sendo o LIQ de 6,25 µg/mL. Conclui-se que o método se mostrou adequado para identificar e quantificar o carbofurano e seu metabólito em amostras biológicas, apresentando sensibilidade e seletividade adequadas, e os parâmetros de validação encontram-se de acordo com os limites sugeridos para validação de métodos bioanalíticos, sendo, assim, implantado no LADTOX.

Palavras-chave: Agrotóxico. HPLC. Análise toxicológica. Amostra biológica.

Validação analítica.

ABSTRACT

GONÇALVES JR., V. **Development and validation of analytical methodology to detect carbofuran and 3- hydroxy- carbofuran in biological matrices for forensic purposes.** [Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para detecção de carbofurano e 3-hidroxi-carbofurano em matrizes biológicas com finalidade forense]. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pesticides are responsible for intentional or unintentional exogenous poisoning, in both humans and animals, because of their broad toxicity and prompt availability, not always legally. Carbofuran is a carbamate pesticide widely used in Brazil as an insecticide and nematocide for the control of agricultural pests. It is marketed in the form of beads, commonly known as "pellet". This pesticide inhibits acetylcholinesterase enzyme on higher animals, promoting toxic effects, which can lead to death. Considering that carbofuran could be implicated in cases of exogenous poisoning of animals, in the present study we aimed to develop and validate an analytical method for detecting and/or quantifying this pesticide and its metabolite, 3-hiroxicarbofuran, in biological matrices of different animal species by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) in order to use it in the Toxicology Diagnostics Laboratory (LADTOX) of the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), University of São Paulo (USP). To develop this method biological samples obtained from fragments of at least six different animals of different species (dog, cat, pig, ox, rat, mouse and bird), free from suspicion of poisoning. Biological samples were fortified with previously homogenized solutions containing the pesticide and its metabolite, 3-hidroxicarbofurano, in 6 fortification levels ranging from 6.25 to 100 µg/mL We evaluated the following parameters for method validation: selectivity, matrix effects, precision, accuracy, calibration curve and residual effect, limit of detection (LOD) and lower limit of quantitation (LLQ). To establish selectivity of the method, we verified the responses of interfering peaks near the retention times of analytes, which were less than 20% of the analyte response in LLQ samples. As to matrix effects, there was no significant interference between the matrices analyzed. Regarding the precision and accuracy of the method, it was observed that the coefficient of variation (CV) and

the relative standard error (RSE) did not exceed the ceiling of 15%. In regard to the calibration curve, the correlation coefficient (r^2) presented values that equal or exceed 0.99 in different arrays to carbofuran, while for the 3-hidroxicarbofuran two arrays - liver and stomach contents - had a value of 0.98 while the remaining matrices 0,99. The liquid-liquid extraction recovery values varied between 74.29 to 100.1% for carbofuran and between 64.72 to 100.61% for 3-hidroxicarbofuran, and LOQ of 6.25 $\mu\text{g/ml}$. We concluded that the method was adequate to identify and quantify carbofuran and its metabolite in biological samples, with adequate sensitivity and selectivity, and the validation parameters are in accordance to the suggested limits for validation of bioanalytical methods, and, thus implanted in LADTOX.

Keywords: Pesticides. HPLC. Toxicological analysis. Biological sample. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hidroxilação do carbofurano, gerando 3-hidroxicarbofurano	26
Figura 2	Modelo de curva de regressão linear utilizado para construção de curva analítica através do método de padronização interna.....	38
Figura 3	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,296 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,454 min) na concentração 31,25 µg/mL em cérebro processado com o padrão interno (TR=26,522 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR=26,589 min).....	49
Figura 4	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,242 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,417 min) na concentração 31,25 µg/mL em conteúdo estomacal processado com o padrão interno (TR=26,490 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR =26,605 min).....	50
Figura 5	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,282 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,447 min) na concentração 31,25 µg/mL em coração processado com o padrão interno (TR=26,472 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR =26,438 min).....	51
Figura 6	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,410 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,537 min) na concentração 31,25 µg/mL em fígado processado com o padrão interno (TR=26,728 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR=26,770 min).....	52

Figura 7	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,255 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,425 min) na concentração 31,25 µg/mL em humor vítreo processado com o padrão interno (TR=26,424 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR=26,737 min).....	53
Figura 8	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,360 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,488 min) na concentração 31,25 µg/mL em pulmão processado com o padrão interno (TR=26,757 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR=26,737 min).....	54
Figura 9	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,404 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,526 min) na concentração 31,25 µg/mL em rim processado com o padrão interno (TR=26,755 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (Tempo=26,791 min).....	55
Figura 10	Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,335 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,477 min) na concentração 31,25 µg/mL em sangue processado com o padrão interno (TR=26,788 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (TR=26,614 min).....	56
Figura 11	Linearidade do carbofurano nas concentrações: 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL, em cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, pulmão, rim e sangue.....	59
Figura 12	Linearidade do 3-hidroxicarbofurano nas concentrações: 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL, em cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, pulmão, rim e sangue.....	60

- Figura 13** Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (LIQ=6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=15,687 min), carbofurano (TR=18,195 min) e padrão interno (TR=24,085 min); e cromatograma (B) da amostra branco em conteúdo estomacal 62
- Figura 14** Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (LIQ=12,5 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=15,306 min), carbofurano (TR=18,934 min) e padrão interno (TR=24,544 min); e cromatograma (B) da amostra branco em fígado 63
- Figura 15** Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (LIQ=6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=11,977 min), carbofurano (TR=19,122 min) e padrão interno (TR=23,927 min); e cromatograma (B) da amostra branco em humor vítreo 64
- Figura 16** Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (LIQ=6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=17,094 min), carbofurano (TR=24,058 min) e padrão interno (TR=29,147 min); e cromatograma (B) da amostra branco em sangue 65
- Figura 17** Cromatograma do limite superior de quantificação (LSQ=100 µg/mL) do (A) carbofurano (TR=22,332 min), (B) 3-hidroxicarbofurano (TR=16,440 min) e (C) padrão interno (TR=26,390 min); em acetonitrila, injetados antes e depois da amostra branco de sangue 67
- Figura 18** Curva de calibração do carbofurano na faixa de 6,25 a 100 µg/mL, em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue 69
- Figura 19** Curva de calibração do 3-hidroxicarbofurano na faixa de 6,25 a 100 µg/mL, em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue 70

Figura 20 Resultado dos exames toxicológicos realizados em conteúdo estomacal e/ou fígado de animais com suspeita de intoxicação, encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de janeiro de 2014 a setembro de 2015. São apresentados o número total de animais recebidos e o número de animais com pelo menos uma amostra positiva para o carbofurano75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Programação do gradiente de eluição da coluna cromatográfica para análise de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	47
Tabela 2	Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em quintuplicata) do carbofurano obtidos para cada matriz biológica	57
Tabela 3	Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em quintuplicata) do 3-hidroxicarbofurano obtidos para cada matriz biológica	58
Tabela 4	Coeficiente de variação (CV) e fator de matriz normalizada (FMN) para avaliar a interferência das matrizes na análise da carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano.....	68
Tabela 5	Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em triplicata) do carbofurano obtidos para cada matriz biológica	71
Tabela 6	Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em triplicata) do 3-hidroxicarbofurano obtidos para cada matriz biológica.....	71
Tabela 7	Exatidão (erro padrão relativo – em %) e precisão (coeficiente de variação – em %) do carbofurano em triplicata nas diferentes matrizes, intracorrida e intercorrida	72
Tabela 8	Exatidão (erro padrão relativo – em %) e precisão (coeficiente de variação – em %) do 3-hidroxicarbofurano em triplicata nas diferentes matrizes, intracorrida e intercorrida.....	73

Tabela 9	Recuperação média (%) em três níveis de concentração (CQB=controle de qualidade baixo, CQM=controle de qualidade médio e CQA=controle de qualidade alto) do carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano em diferentes matrizes biológicas.....	74
-----------------	--	----

Tabela 10	Quantificação de carbofurano em amostras positivas de conteúdo estomacal e/ou fígado de animais com suspeita de intoxicação, encaminhadas aos Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de janeiro a setembro de 2015. O limite de quantificação (LQ) foi de 6,25 µg/mL para o conteúdo estomacal e de 12,5 µg/mL para o fígado. N=número de animais.....	76
------------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	INTOXICAÇÃO POR PRAGUICIDAS.....	22
1.2	CARBOFURANO.....	24
1.3	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	42
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	43
4.2	REAGENTES.....	44
4.3	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	44
4.4	SISTEMA DE CROMATOGRAFIA.....	44
4.5	PROCEDIMENTOS.....	45
4.5.1	Preparação das amostras biológicas.....	45
4.5.2	Extração.....	45
4.5.3	Análise qualitativa e quantitativa.....	46
4.5.4	Curvas analíticas.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA.....	47
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA.....	48
5.2.1	Identificação.....	48
5.2.2	Linearidade.....	57
5.3	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	61
5.3.1	Seletividade.....	61
5.3.2	Efeito residual.....	66
5.3.3	Efeito de matriz.....	68
5.3.4	Curva de calibração.....	68
5.3.5	Precisão e exatidão.....	71
5.3.6	Recuperação.....	74

5.4	EXAME TOXICOLÓGICO (AMOSTRAS REAIS).....	74
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, como um dos maiores produtores de alimento do mundo, faz uso de praguicidas. O termo praguicida é utilizado para descrever uma ampla gama de agentes químicos e biológicos com atividades diversas, designadas para controlar ou eliminar plantas ou animais indesejáveis.

Segundo a *Food and Agriculture Organization (FAO)*, os praguicidas são produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas para a prevenção, destruição ou ao controle de qualquer praga. Também são incluídos os vetores de doenças humanas ou de animais que interferem de qualquer outra forma na produção, elaboração, armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas e produtos de madeira. Eles podem ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

A legislação brasileira prefere empregar o termo agrotóxico ao invés de praguicida. Assim, a Lei Nº 7.802/1989 conceitua agrotóxicos e afins como:

“a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Essa mesma Lei dispõe que os praguicidas só poderão ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de saúde, meio ambiente e agricultura. O Decreto Federal Nº 4074/2002 (BRASIL, 2002) que regulamenta a Lei Federal Nº 7802/1989, dispõe que, parte integrante do registro de qualquer produto novo e para reavaliação dos já existentes no

mercado, o Ministério da Saúde (MS) através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) deverá realizar uma avaliação toxicológica do produto, baseada na Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16/01/1992 (BRASIL, 1992). Outro quesito é a avaliação de risco ambiental dos praguicidas, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental, cabendo ao Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) (Portaria nº 84, 15/10/1996) fazer esta análise (BRASIL, 1996). E então o registro do praguicida é efetuado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O Brasil aparece como o maior consumidor de praguicidas da América Latina, desde 1997, com um consumo estimado de 50% desses produtos se comparado com os demais países da região (GARCIA, 1997). Em 2001 o Brasil já era o sétimo consumidor mais frequente no mundo, onde o consumo foi estimado em 328.413 toneladas de praguicidas (ANVISA, 2002).

O uso dessas substâncias aumentou nas últimas duas décadas, coincidindo com mudanças nas práticas agrícolas e a agricultura cada vez mais intensa (KONSTANTINOU et al., 2006). Os países em desenvolvimento representam aproximadamente 30% do mercado consumidor global de praguicidas. Dentro deste grupo, o Brasil é o país que se destaca, com um número estimado de 6,5 bilhões de dólares por ano gasto com praguicidas. Em 2006, o consumo foi ainda maior em território nacional e tornou-se o segundo maior consumidor de praguicidas do mundo (PERES et al., 2006).

Em 2007, Faria e seus colaboradores verificaram que o Brasil era o maior consumidor mundial de praguicidas devido ao volume comercializado no país e que muitos trabalhadores rurais eram expostos a esses agentes, causando intoxicações agudas com impacto destes produtos na saúde. Esses autores ressaltaram que há carência de dados sobre o número de intoxicações devido à ausência de um sistema de registro eficiente capaz de identificar, especificamente, os praguicidas envolvidos nos casos de intoxicações agudas e crônicas; observaram, ainda, que este é um aspecto que deve ser considerado durante os processos de registro e reavaliação desses produtos (FARIA; FASSA e FACCHINI, 2007).

Sabe-se que no Brasil, geralmente, encontram-se elevadas concentrações de praguicidas em regiões de maior intensidade de monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz (IBGE, 2006; THEISEN, 2012). O Mato Grosso é o maior consumidor de praguicidas, representando 18,9%, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9,0%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%); os demais estados consumiram 10,4% do total nacional (IBGE, 2006; THEISEN, 2012).

Em um seminário sobre praguicidas realizado pela ANVISA em 2012, foi destacado que na última safra, que envolveu o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado brasileiro de venda de praguicidas movimentou 936 mil toneladas desses produtos. Os dados apontaram, ainda, que 90% da produção nacional de praguicidas foram de produtos formulados, ou seja, praguicidas prontos para serem utilizados na agricultura. Os outros 10% corresponderam a produtos técnicos, os quais são os ingredientes utilizados na formulação dos praguicidas (ANVISA; UFPR, 2012).

Dentre os praguicidas, os herbicidas representaram 45% do total desses produtos comercializados, os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e os demais 29% (ANVISA; UFPR, 2012).

Os praguicidas além de ser classificados considerando os seus padrões de uso e no tipo de praga a ser controlada ou destruída (inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas etc.) podem ser agrupados segundo sua origem e forma de uso. Assim, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency – EPA*) agrupa-os como: químicos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e outros), biológicos (microbianos-bactérias, protetores incorporados nas plantas por engenharia genética, bioquímicos-feromônios), e instrumentos/dispositivos para controle de pragas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Devido à resistência das pragas aos produtos químicos, a cada ano grandes quantidades de novos compostos são usadas para proteger as colheitas causando efeitos indesejáveis e aumentando os custos da produção de alimentos.

O uso de praguicidas permanece como prática comum, especialmente em regiões tropicais (CARVALHO, 2006). Essas substâncias são intencionalmente dispersadas no ambiente que, além de controlar pragas, também atuam sobre outras espécies causando sérios efeitos paralelos em espécies não-alvos, pois os resíduos podem persistir em solos, águas e alimentos, contaminando humanos e animais (CARVALHO, 2006).

Vale destacar que além da geração de empregos, as regiões agrícolas do Brasil obtiveram maior crescimento do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) quando comparadas às regiões não-agrícolas (GLOBO RURAL, 2014), evidenciando a importância do setor para o desenvolvimento nacional.

Por outro lado, os praguicidas podem ser responsáveis por intoxicações exógenas intencionais ou não intencionais, tanto em seres humanos como em animais, em virtude de sua ampla toxicidade e fácil obtenção do produto, nem sempre por vias legais. O Ministério da Saúde, por meio da Portaria GM/MS nº 2.938, de 20 de dezembro de 2012 autorizou o repasse do Fundo Nacional de Saúde aos Fundos Estaduais de Saúde e do Distrito Federal para o fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos.

Com o intuito de acompanhar e monitorar as estratégias estaduais para a implementação de vigilância, o Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador (DSAST), por meio da Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM), elaborou Relatórios Técnicos de Acompanhamento das Ações de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos para conhecimento e recomendação de estratégias no território nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.1 INTOXICAÇÃO POR PRAGUICIDAS

O ambiente de trabalho e o fácil acesso favorecem a maior prevalência das intoxicações por praguicidas nos países em desenvolvimento onde a economia é direcionada para a agricultura (OLIVEIRA; MENEZES, 2003).

O IV Informe Unificado das Informações sobre Agrotóxicos Existentes no Sistema Único de Saúde (SUS) do MS notificou, através de Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 5914 casos de intoxicação por praguicidas em seres humanos no Brasil, em 2009, com maior prevalência na região sudeste, a qual representa 40% dos casos, seguida por 28% da região sul, 17% do nordeste, 11% do centro-oeste e 4% da região norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A circunstância com maior incidência foi a tentativa de suicídio (56%), seguida pela exposição acidental (30%), uso habitual (7%), ambiental (4%) e por outras (3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), que no último relatório divulgado, referente ao ano de 2012, mostrou a ocorrência de 102.854 de casos registrados intoxicações envolvendo seres humanos e animais, sendo que desse total, 99.035 (96,29%) em seres humanos e 1.199 (1,17%) intoxicações foram relatadas em animais (FIO CRUZ, 2015). No município de São Paulo foram relatados 8.261 casos de intoxicação, sendo que desse total, 185 (2,24%) casos ocorreram em animais (FIO CRUZ, 2015).

Deve ser ressaltado, que é cada vez mais comum os crimes cometidos contra animais (FERNÁNDEZ et al., 2006; LORGUE et al., 2002) e, em particular, fazendo uso de praguicidas (SIQUEIRA et al., 2015), tornando-se necessário estabelecer uma rotina de análise toxicológica.

Spinosa e Flório, em 1993, num estudo realizado no período de 1989 a 1992 constataram a ocorrência de 202 casos de intoxicações, sendo 48 casos no primeiro ano, 69 no segundo, 45 no terceiro e 44 no quarto ano, no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os agentes tóxicos mais

encontrados foram praguicidas organofosforados e carbamatos (42%), seguidos dos raticidas (26%), estricnina (14%), organoclorados (12%) e metais (6%).

Estudo semelhante foi realizado por Frazier e colaboradores (1999) nos Estados Unidos, no Estado da Geórgia, num período de 10 anos (1988-98), sendo constatados 291 casos de intoxicação diagnosticados no Laboratório de Investigação e Diagnóstico Veterinário. Os praguicidas mais encontrados foram aqueles do grupo dos anticolinesterásicos, sendo eles: aldicarbe (55,7%), carbofurano (14,4%), forato (11,0%), malationa (6,9%), parationa (4,1%), metomil (4,1%) e toxafeno (3,8%).

Berny et al. (2015) relataram que, devido à preocupação com as mortes de aves necrófagas, decorrentes de intoxicações, um programa de vigilância foi criado para monitorar essas populações no Pireneu Francês. Foram realizadas necropsia completa, raio X, exames parasitológicos e análises toxicológicas (inibidores da colinesterase, raticidas anticoagulantes, organoclorado, inseticidas, chumbo e cádmio) de todas as aves que foram encontradas mortas. Eventos de mortalidade eram frequentemente multifatoriais, mas a intoxicação foi a maior causa de morte (24,1%) nestas aves. O carbofurano foi o praguicida mais comumente encontrado (18 casos), seguido do aldicarbe (3 casos).

Os praguicidas aldicarbe e carbofurano são praguicidas carbamatos que são comercializados na forma de grânulos e, por isso, conhecidos popularmente como "chumbinho". O primeiro tem sido associado a vários casos de intoxicações exógenas e isso pode ser atribuído a sua alta toxicidade, mostrada pela sua relativamente baixa dose letal 50% (DL50), que, em camundongos, por via oral, varia entre de 0,38 a 1,5 mg/kg (BARON, 1991). A DL50 do carbofurano para camundongo, por via oral, varia de 2,0 a 14,4 mg/kg (JMPR, 1996; CHAUHAN et al., 2000).

O aldicarbe teve seu registro suspenso no Brasil em outubro de 2012, sendo que o único produto a base de aldicarbe que possuía autorização de uso, no país, era o Temik 150, da empresa Bayer S/A (ANVISA, 2012). Esse produto comercial era classificado como extremamente tóxico, que tinha aprovação para uso exclusivamente agrícola, como inseticida, acaricida e nematicida, para aplicação nas culturas de batata, café, citros e cana-de-açúcar (ANVISA, 2012).

1.2 CARBOFURANO

O carbofurano é um inseticida e nematicida sistêmico do grupo químico dos carbamatos conhecido pelo nome químico de 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7- metilcarbamato e número CAS (*Chemical Abstract Service*) 1563-66-2. Foi descoberto e desenvolvido pela Divisão de Niagara da *FMC Corporation*, tornando-se disponível para uso agrícola em 1968 (TOBIN, 1970; SPENCER, 1981; HICKOX, 2000).

No início da década de 1990, as formulações granulares de carbofurano aplicadas no solo foram responsáveis por inúmeros casos de intoxicações de aves que vieram à óbito e, como resultado, essas formulações foram restringidas nos Estados Unidos (EUA), em setembro de 1994, na sequência de uma revisão especial (EPA, 1991).

A ficha técnica do carbofurano junto a ANVISA (2015), informa que o carbofurano é largamente empregado em diversas culturas tais como: café, algodão, arroz irrigado, repolho, amendoim, trigo, cana de açúcar, milho, alface, batata, tomate, tabaco, uva, trigo e milho no controle de diversas pragas. O Quadro 1 mostra os produtos comerciais contendo como ingrediente ativo o carbofurano.

Quadro 1 - Produtos comerciais disponíveis no Brasil contendo carbofurano (ANDREI, 2009).

Nome comercial	Empresa	Concentração	Formulação	Classe toxicológica	Periculosidade ambiental
Furadan 50 GR	FMC Química do Brasil Ltda.	50 g/kg	granulado	III - medianamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Furadan 100 GR	FMC Química do Brasil Ltda.	100 g/kg	granulado	III - medianamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Furadan 350 FS	FMC Química do Brasil Ltda.	350 g/L	suspensão para tratamento de sementes	I - extremamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Furadan 350 SC	FMC Química do Brasil Ltda.	350 g/L	suspensão	I - extremamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Furazin 310 FS	FMC Química do Brasil Ltda.	310 g/L	suspensão para tratamento de sementes	I - extremamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Carboran Fersol 350 SC	Fersol Indústria e Comércio S.A.	350 g/L	suspensão	I - extremamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Ralzer 50 GR	Fersol Indústria e Comércio S.A.	50 g/kg	granulado	I - extremamente tóxico	II - muito perigoso ao meio ambiente
Ralzer 350 TS	Fersol Indústria e Comércio S.A.	350 g/L	suspensão	I - extremamente tóxico	não indicado

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

O carbofurano é um praguicida amplamente utilizado no Brasil para o controle de pragas agrícolas, como inseticida e nematicida, que age por contato e ingestão. É pouco persistente e tende a se degradar rapidamente sob condições de solo inundado. Jury e Ghodrati (1989), citados por Trabue (1997), verificaram

espécies-alvo. Os dois tipos básicos de receptores da acetilcolina no sistema nervoso e em junções neuromusculares são: receptores de acetilcolina muscarínicos e nicotínicos. Os receptores de acetilcolina também são encontrados em várias células, incluindo células endoteliais e do sistema imune (WESSLER; KIRKPATRICK, 2008).

Colinesterase é uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de acetilcolina em colina e acetato, um processo essencial para permitir o restabelecimento do neurônio colinérgico (BAJGAR, 2004).

Em contraste com os organofosforados, os carbamatos não formam ligações irreversíveis com moléculas inibidoras de acetilcolina. Devido à taxa de dissociação relativamente rápida da ligação carbamato-acetilcolina, por isso, métodos convencionais de preparação de amostras de tecido para ensaios de detecção da acetilcolina podem subestimar o grau de inibição. Isto é porque tais ensaios utilizam tempos de incubação prolongados e grandes diluições em tampão, o que favorece a dissociação e consequente reativação da enzima. Esforços têm sido feitos ao longo da última década para desenvolver técnicas de ensaio de acetilcolina que levem em conta o problema dissociação do carbamato (PADILLA; HOOPER, 1992; NOSTRANDT et al., 1993).

Em experimentos realizados por Arnold, 1997, para avaliar a inibição da colinesterase no sangue de homens após exposição dérmica ao Furadan 4F em um período de 24 horas, foi possível observar que o limite máximo de inibição foi de 4 horas para todas as doses estudadas: 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/kg.

Devido à inativação temporária da acetilcolinesterase, ocorre a acumulação transitória do neurotransmissor acetilcolina nas terminações nervosas pós-ganglionares parassimpáticas, ganglionares simpáticas e parassimpáticas e junção neuromuscular (OOM et al., 1998). Esses compostos são rapidamente distribuídos no organismo e sofrem o processo de metabolização hepática, tornando-se menos tóxicos e mais polares para serem excretados com maior facilidade pela urina e fezes, sendo que 80 a 90% da dose absorvida é excretada em 48 horas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Geralmente as manifestações clínicas são de rápida duração. Os carbamatos não atravessam eficientemente a barreira hematoencefálica e não provocam sintomatologia com origem no sistema nervoso central como os organosfosforados. (OOM et al., 1998). A inibição promovida pelo carbofurano é reversível, e os efeitos não são cumulativos, não ocorrendo depressão crônica da colinesterase resultante de exposições repetitivas ao produto (FURADAN, 2010).

Os metilcarbamatos produzem neurotoxicidade aguda por inibição da acetilcolinesterase (ChE) nos terminais nervosos colinérgicos, produzindo um perfil de toxicidade que inclui náusea, suores, miose, estimulação gastrointestinal, lacrimação, salivação, tiques, tremores e convulsões (ECOBICHON, 2001).

A administração oral de carbofurano pode causar lesão neuronal por geração excessiva de espécies reativas de oxigênio levando a peroxidação lipídica (KAMBOJ et al., 2006; AGRAWAL; SHARMA, 2010). Tem sido relatado que a administração intraperitoneal de carbofurano na concentração sub-aguda pode induzir estresse oxidativo em ratos Wistar (RAI et al., 2011) e também induzem efeitos genotóxicos, em células epiteliais, no intestino de rato (GERA et al., 2011). Uma abordagem espectroscópica de danos de cromossomo mostrou que o carbofurano induziu efeitos citogenéticos em células do meristema da raiz de *Allium cepa* e *Allium sativum* (SAXENA et al., 2010).

O tratamento e disposição deste praguicida em mamíferos foram analisados por via intravenosa, cutânea ou inalação oral aguda para detalhar a hidroxilação e reações de hidrólise, junto com as conjugações polares adequadas que compreendem as grandes transformações metabólicas do carbofurano, criando ésteres ou produtos éster de clivagem (JMPR, 1996). O metabolismo e excreção do carbofurano pode ser avaliado utilizando marcação do carbono, o qual permite a análise do destino do grupo carbamato após hidrólise, ou no anel benzofuranilo, que permite a análise do destino da parte do anel. Em ratos, os dados usando carbonil-¹⁴C-carbofurano indicam uma rápida absorção por via oral, seguido por hidrólise do carbamato e excreção através dos pulmões (¹⁴CO₂) ou através da urina e fezes. Os dados usando anel-¹⁴C-carbofuran indicam rápida excreção, predominantemente na urina. Deste modo, a atividade inibidora da colinesterase é mantida no sangue após o desaparecimento da molécula original.

O carbofurano N-nitroso, um derivado mutagênico e citotóxico, também pode ser formado no estômago (TEJADA et al., 1988).

Estudos sugerem que o carbofurano possui efeitos carcinogênicos, teratogênicos, genotóxicos e atravessa a barreira placentária, produzindo graves efeitos sobre a unidade materno - fetal (GUPTA, 1994).

Outros autores também identificaram a intoxicação por carbofurano em diversas circunstâncias. Norberg-King et al. (1991) afirmam que carbofurano é um inseticida tóxico para a fauna aquática. STINSON e seus colaboradores (1994) relataram a morte dos animais florestais que virou notícia no Estado de Virginia. Gupta (1994) observou que carbofurano é tóxico para micro crustáceos e vertebrados da mesma cadeia alimentar. De acordo com Crepeau e Kuivila (2000), a presença contínua de carbofurano em canais de água e rios pode causar graves danos sub-letais ou crônicos para organismos aquáticos.

Tennakoon e seus colaboradores analisaram sangue e conteúdo estomacal recebido durante 2010 e 2011 no laboratório de toxicologia do Departamento de Análise do Governo de Colombo, Sri Lanka, onde foi identificado carbofurano em oito indivíduos que vieram à óbito após intoxicação. Dos oito casos, foram dois homicídios, um com suspeita de homicídio e cinco suicídios (TENNAKOON et al., 2013).

Para os dados de DL50, Gupta (1994) cita provas que 9 e 18 mg/kg são letais em ovinos e bovinos, respectivamente. Outros dados indicam que carbofurano é um agente tóxico por inalação para ratos, com concentração letal de 50% (CL50) entre 0,075 e 0,11 mg/L, em um período de 4 horas; os estudos de toxicidade cutânea com ratos e coelhos não foram inteiramente consistentes, pois a variação de DL50 variou entre 120 – 500 mg/kg e 885 - 4402 mg/kg, respectivamente (GUPTA, 1994). Provavelmente essa disparidade está relacionada com variações na penetração cutânea oferecidas por diferentes solventes, que nem sempre foram relatados no estudo.

Em aves, os valores de DL50, encontrados em diferentes espécies, foi de 0,24 a 38,9 mg/kg (HILL; CAMARDESE, 1984; MINEAU 1993, 2001; MINEAU et

al. 1999; HOPKINS; SCHOLZ 2006; MARTÍNEZ-HARO et al., 2008) e, para cobaias, 9,18 a 9,20 mg/kg (SPENCER, 1981; JMPR. 1996).

Para avaliar a DL50 oral do cabofurano, em cães, na Bulgária, Binev e seus colaboradores, realizaram estudos clínicos onde puderam observar que estes são tolerantes para a dose de 0,525 mg/kg e que alguns sinais clínicos apareceram após de uma hora do tratamento com as doses de 1,05 e 2,1 mg/kg. Já os animais tratados com a dose de 3,5 mg/kg apresentaram sinais de intoxicação logo nos primeiros quinze minutos após a administração do praguicida. Os cães tratados com 5,25 mg/kg apresentaram sinais clínicos de toxicidade em cinco minutos e 33% dos animais morreram em uma hora após a exposição. Todos os animais tratados com 10,5 mg/kg, que representa DL50 para ratos albinos, morreram entre trinta e quarenta e cinco minutos após a administração do carbofurano (BINEV et al., 2014).

Considerando a toxicidade deste praguicida, os exames toxicológicos desempenham um papel importante para auxiliar no diagnóstico de morte por intoxicação intencional ou acidental (POKLIS, 1997,2008). Algumas substâncias não produzem lesões patológicas típicas e podem dificultar o diagnóstico na ausência de um exame toxicológico confirmatório através de métodos analíticos devidamente validados para esta finalidade (POKLIS, 1997, 2008; SKOPP, 2010). Esses resultados analíticos constituem uma prova legal em tribunal (POKLIS, 1997; RANGEL, 2003/2004; MCEWEN, 2012) e também devem ser requisitados em casos de morte súbita (OLIVEIRA et al, 2002).

Após constatação do óbito do animal, amostras biológicas devem ser coletadas para posterior análise toxicológica. Essa análise permite a detecção de possíveis substâncias químicas e seus metabólitos envolvidos e a relação causa-efeito entre os valores encontrados e os dados clínicos. A possibilidade de morte súbita também deve ser considerada, devido a outros fatores.

1.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A finalidade da validação analítica é demonstrar que o método é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados em legislação específica para este fim. Trata-se de um estudo experimental, com várias etapas e documentação de todos os dados. A validação visa garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam legislação específica para a realização dos processos de validação analítica. A Resolução que está em vigor para ensaios que utilizam amostras biológicas é a Resolução da ANVISA RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) N.º 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), que “dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos” e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, revisão 04 de julho de 2011 (BRASIL, 2011) referente a “orientação para validação de métodos analíticos”.

Vale ressaltar que resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas, e guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (KRULL; SWARTZ, 1998).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Devido às divergências entre algumas definições entre as diversas organizações, tornou-se necessário uma harmonização para minimizar os riscos de possíveis equívocos, em particular, nas aplicações farmacêuticas. Com esse propósito, a ICH (*International Conference on Harmonization*) reuniu-se com representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão para definir parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (ICH, 1995).

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela *International Organization for Standardization* (ISO, que significa “igual”). A norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, no item 5.4.5, apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação (ISO, 1999). O US-FDA (*United States Food and Drug Administration*) também tem proposto guias sobre validação de métodos (FDA, 1994; 2001).

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica do laboratório (FDA, 1994; ICH, 1995; FDA, 2001; THOMPSON et.al., 2002; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Como estes órgãos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes.

É fundamental que os estudos de validação analítica sejam representativos e conduzidos de maneira que a variação da faixa de concentração

e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um determinado composto requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado pelo laboratório de análise também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário para atender suas necessidades.

Vale aqui apresentar algumas definições que estão contidas na RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) que “Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos”; são elas:

- **Amostra branco:** amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno;
- **Amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA):** amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 85% (oitenta e cinco por cento) da maior concentração da curva de calibração;
- **Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB):** amostra de matriz adicionada do analito em concentração até 3 (três) vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);
- **Amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM):** amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;
- **Amostra em estudo:** amostra biológica que é objeto de análise;
- **Amostra processada:** amostra pronta para análise instrumental;
- **Amostra zero:** amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno (PI);
- **Amostras de fontes distintas:** amostras biológicas originadas de diferentes indivíduos ou de diferentes lotes de mistura de amostras;
- **Analito:** composto químico específico a ser mensurado em uma matriz;
- **Corrida analítica das amostras em estudo:** análise de um conjunto de amostras processadas sob as mesmas condições, com quantificação por meio da mesma curva de calibração e validada pelas mesmas amostras de CQs;

- **Curva de calibração:** relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito;
- **Efeito matriz:** efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica;
- **Efeito residual (carryover):** efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente;
- **Exatidão:** concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência;
- **Limite inferior de quantificação (LIQ):** menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;
- **Limite superior de quantificação (LSQ):** maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;
- **Matriz biológica:** meio de origem biológica no qual os analitos em estudo serão quantificados;
- **Métodos bioanalíticos:** métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas;
- **Métodos cromatográficos:** métodos que empregam cromatografia para separar o analito de outros componentes da amostra e quantificá-lo;
- **Padrão interno (PI):** substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo;
- **Precisão:** proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz;
- **Seletividade:** capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra;
- **Solução primária:** solução preparada a partir de substância química de referência;
- **Solução de trabalho:** solução preparada a partir da diluição da solução primária;
- **Validação:** confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos;

A validação no laboratório (*in house validation*) é feita diversas etapas, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está adequado para atender as necessidades da rotina laboratorial. Esse tipo de validação é utilizado nas etapas preliminares do desenvolvimento de um método e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação do método, porém sem a necessidade de verificar a reprodutibilidade (THOMPSON et al., 2002).

Em análises qualitativas, determina-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO, 2001; ICH, 1996; CURRIE, 1999; LONG, 1983).

Para desenvolver novos métodos, torna-se necessário definir **Limites de Detecção** (LD) em termos do desvio-padrão de medidas do branco. O LD pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. O LD pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. Pode-se optar em utilizar a menor concentração detectável pelo equipamento através da metodologia utilizada.

Há parâmetros que devem ser avaliados para a validação de um método bioanalítico e, geralmente, existe uma concordância que estes parâmetros analíticos devam incluir, além do LD, a seletividade, a curva de calibração (linearidade), a precisão, a exatidão, o limite de quantificação, a recuperação (eficiência de extração), a integridade da diluição, a estabilidade e a robustez (BANSAL; DESTEFANO, 2007; BRESSOLLE et al., 1996; DADGAR et al., 1995;; HARTMANN et al., 1998; PETERS; MAURER, 2002; PETERS et al., 2007; SHAH, 2007).

A RDC Nº 27 estabelece os seguintes requisitos mínimos de validação de métodos bioanalíticos: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão e exatidão.

A **seletividade** refere-se à capacidade de detecção de substâncias (BRESSOLLE et al; 1996; ICH; 1995; BRITO; 2001). Estudo de Dadgar e Burnett

em 1995 mostram que a presença de interferentes não é aceita quando esta afeta a exatidão das concentrações próximas ao LIQ, levando a resultados errôneos. Quando os critérios de precisão e exatidão do LIQ não forem atingidos, devem-se ajustar os valores de LIQ para valores acima dos interferentes esperados. No entanto, este procedimento pode comprometer a sensibilidade e a seletividade do método, e só deve ser considerado se os valores de LIQ encontrados forem maiores que as concentrações esperadas nas amostras desconhecidas. Caso a seletividade não seja assegurada por determinada validação, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas. A RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012, estabelece margem de aceitação de até 20% do LIQ, para os métodos cromatográficos e as respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (PI) devem ser inferiores a 5 %. Preconiza-se a análise de, no mínimo, seis amostras distintas, isentas do analito e do padrão interno para analisar os possíveis interferentes. Caso eles persistam, novas análises devem ser realizadas com outras seis matrizes e se os interferentes continuarem, a metodologia deverá ser modificada.

A RDC Nº 27 ainda preconiza a verificação de possível **efeito residual** na corrida cromatográfica. Para tal, deve-se fazer a injeção da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas após injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ. Os resultados devem ser enquadrados nos critérios de seletividade. Caso o efeito residual seja detectado, devem-se fazer ajustes na metodologia. Muitas vezes esse problema desaparece quando o tempo de lavagem é aumentado da coluna entre as corridas cromatográficas.

Para verificar se a presença de interferentes poderá resultar em uma falsa quantificação ou identificação devido ao mascaramento do analito, o *Official Journal of the European Communities* (OJEC) recomenda que um número superior de amostras branco ($n \geq 20$) seja avaliado e que uma concentração relevante de substâncias que normalmente interferem na identificação e/ou quantificação do analito de interesse seja adicionada às amostras branco (EU COMMISSION, 2002).

Substâncias presentes na matriz biológica podem coeluir com os compostos de interesse e prejudicar a análise, gerando resultados errôneos ou

equivocados. Por este motivo, é de fundamental importância uma análise visual minuciosa desses interferentes nas corridas cromatográficas e a utilização de modelos matemáticos para determinar se o **efeito de matriz** reprovava a análise.

Segundo a RDC Nº 27, o efeito de matriz pode ser calculado a partir do fator de matriz normalizado por PI (FMN), calculado a partir de seis amostras de uma mesma matriz biológica de diferentes procedências, através do seguinte modelo matemático:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

Viswanathan et al. (2007) propuseram que o valor de FMN não é o fator determinante para estabelecer a confiabilidade do método bioanalítico. Quando o valor de FMN é igual a 1, indica que não existe interferência expressiva na matriz analisada e quando esse fator for menor que 1, sugere supressão de ionização. Se o resultado de FMN for maior que 1, sugere aumento de ionização. Devem-se considerar também as variáveis causadas pela falta de precisão da análise.

A RDC Nº 27 estabelece que o FMN deve apresentar coeficiente de variação menor que 15%.

Quanto à **curva de calibração**, é necessário elaborar uma curva para cada analito de interesse e para cada corrida analítica nas diferentes matrizes biológicas (FDA, 2001; ANVISA, 2012). O procedimento é escolhido e/ou adaptado de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra. O método de padronização estabelecido deve proporcionar a melhor exatidão possível, além de elevada precisão (RIBANI et al., 2004).

A curva de calibração com padronização interna consiste na adição de diferentes concentrações do analito na matriz biológica de interesse com a adição de uma concentração fixa do PI. O PI ideal deve apresentar características físico-químicas similares ao analito em estudo e não interferir no tempo de retenção (TR). Esse

método possibilita avaliar possíveis variações da resposta em função de manipulações da amostra, sendo o método de escolha para análises nesse tipo de matriz. O modelo de regressão e o gráfico da curva de calibração são elaborados pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do PI), conforme ilustrado pela figura 2

Figura 2 - Modelo de curva de regressão linear utilizado para construção de curva analítica através do método de padronização interna.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015)

Segundo a RDC Nº 27, devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, seis amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI, submetendo-as aos mesmos métodos de extração em que a amostras biológicas.

Os padrões de calibração são considerados aprovados quando o desvio padrão (DP) for menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do limite inferior de quantificação (LIQ) e menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A curva de calibração deve apresentar no mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados e no mínimo seis padrões de calibração de concentrações

diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, conforme os critérios anteriores, para ser aprovada.

Para realizar a quantificação de um determinado analito, é necessário conhecer a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real, obedecendo a equação seguinte da reta:

$$y = ax + b$$

onde:

x = a concentração adicionada

y = razão entre as áreas do analito e do padrão interno

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

Na regressão linear, o parâmetro "a" é indicativo da sensibilidade do método para avaliação da correlação entre métodos. Já o parâmetro "b" aponta a proporcionalidade da função analítica, elucidando a passagem da reta pela origem e qualquer desvio ou erro aleatório.

A partir da equação da reta, calcula-se o coeficiente de regressão linear (r^2), determinante do ajuste ao modelo de linearidade (QUATTROCCHI et al., 1992). Julga-se fortíssima correlação quando o coeficiente de correlação linear estiver entre 0,91 e 0,99 (CURRIE; SVEHLA, 1994).

A **precisão** de um método é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea (ANVISA, 2012; FDA, 2001). Ela deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e, no

mínimo, três corridas diferentes (precisão intercorridas), sendo que em cada corrida devem ser realizadas, no mínimo, cinco replicatas em, pelo menos, 5 concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Este ensaio intercorridas deve abranger corridas em dias distintos (ANVISA, 2012).

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%):

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

Não se admite valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2012).

Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método bioanalítico. Ela deve ser analisada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método analítico (US-FDA, 2001).

A **exatidão** é um parâmetro que ajuda na avaliação de resultados, pois as amostras padrão são obtidas pela adição do analito na amostra branco e, desta forma, a exatidão é determinada para cada nível de concentração dos controles de qualidade através da concordância das concentrações medidas experimentalmente e nominais do analito (CAUSON, 1997).

A exatidão é expressa pelo erro padrão relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal, segundo a fórmula (ANVISA, 2012):

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

Para realizar o estudo de **recuperação** pode-se fazer uma fortificação (*spike*) da amostra com concentração conhecida da solução padrão dos compostos estudados. Usualmente é feito em três níveis diferentes, próximo ao CQB, CQA e CQM. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003). O cálculo da recuperação pode ser realizado de acordo com a seguinte equação:

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde:

C1 = a concentração determinada em solução com adição de padrão;

C2 = a concentração determinada em matriz;

C3 = a concentração do padrão adicionado.

Na maioria dos procedimentos de validação analítica são aceitas recuperações dentro da faixa 70% a 120% (LANÇAS, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) realiza exames toxicológicos para a detecção do aldicarbe em fígado e conteúdo estomacal de animais. Com a suspensão da comercialização desse praguicida, levantou-se a suspeita de que outro praguicida de aspecto semelhante ao “chumbinho” poderia estar implicado com quadros intoxicações exógenas de animais. Assim, no presente estudo se propôs a inclusão da análise de carbofurano e seu metabólito em matrizes biológicas oriundas de animais com suspeita de intoxicação, nos quais encontrou-se grânulos no conteúdo estomacal no rol dos métodos analíticos empregados no LADTOX. Além disso, outras matrizes biológicas de interesse em toxicologia forense foram selecionadas para o estudo, a fim de contribuir para a elucidação dos quadros de intoxicação por praguicidas encaminhados ao LADTOX.

3 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método analítico para detectar e/ou quantificar o praguicida carbofurano e seu metabólito, 3-hiroxicarbofurano, em matrizes biológicas de diferentes espécies animais por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Otimizar técnica de extração de carbofurano e seu metabólito para fígado, cérebro, conteúdo estomacal, coração, humor vítreo, pulmão, rim e sangue;

- Realizar análise qualitativa da presença de carbofurano e seu metabólito em fígado, cérebro, conteúdo estomacal, coração, humor vítreo, pulmão, rim e sangue;
- Realizar análise quantitativa da presença de carbofurano e seu metabólito em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue;
- Avaliar a presença de carbofurano e seu metabólito em amostras reais de animais com suspeita de intoxicação exógena;
- Disponibilizar o método analítico na rotina do LADTOX.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A etapa experimental desse trabalho foi realizada no LADTOX do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

O protocolo de experimentação foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, tendo sido aprovado (Número 1653270114).

4.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As matrizes biológicas selecionadas para o estudo foram cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, rim, pulmão e sangue, todas oriundas do Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

Para a padronização do método utilizou-se amostras biológicas proveniente de fragmentos de, no mínimo, seis animais diferentes, de espécies distintas (cão, gato, porco, boi, rato, camundongo e ave), isentas de suspeita de intoxicação.

Para o exame toxicológico foram empregadas amostras de fígado e de conteúdo estomacal de animais com suspeita de intoxicação (amostras reais) encaminhadas ao LADTOX, durante o período de janeiro de 2014 a setembro de

2015. Quando a amostra chegava ao LADTOX, realizava-se o registro, identificação e armazenamento em freezer -20°C para posterior análise.

4.2 REAGENTES

Foram empregados os padrões de carbofurano, 3-hidroxicarbofurano e terbutilazina de alta pureza, com certificação do próprio fabricante (Sigma Aldrich).

Para a fase móvel, foi utilizado acetonitrila grau analítico HPLC (Sigma Aldrich) e a água ultrapura tipo I (MilliQ).

O éter e o clorofórmio foram grau técnico (Synth).

4.3 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Uma balança analítica (Ohaus Explorer) com precisão de medida de pesagem de $\pm 0,0001$ grama foi usada para a pesagem dos padrões dos analitos.

Foram empregados também um agitador orbital Cole-Parmer, modelo 7637 e uma centrífuga Eppendorf 5804R.

4.4 SISTEMA DE CROMATOGRAFIA

As confirmações e quantificações do carbofurano e seu metabólito foram realizadas empregando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) Shimadzu, com degaseificador DGU 20A, bomba LC 20AD, injetor automático SIL 20AC HT, integrador CBM 20A, detector de arranjos diodos SPD M20A e forno STD 20A.

As amostras foram injetadas em coluna Shimpack CLD-ODS com dimensões de 15 cm x 4,6 mm x 5 μL , sob fluxo de fase móvel de 1.000 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A temperatura do forno foi constante em 30°C e o comprimento de onda foi ajustado em 254 nm para obter melhor resolução do pico cromatográfico.

4.5 PROCEDIMENTOS

A seguir, são descritos os procedimentos realizados.

4.5.1 Preparação das amostras biológicas

Após as coletas, todas as amostras biológicas foram fragmentadas, homogeneizadas e armazenadas em freezer -20°C, até a realização da extração. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras reais.

4.5.2 Extração

O procedimento de extração foi escolhido com o objetivo de obter uma técnica única que atendesse satisfatoriamente as diversas matrizes analisadas. A extração líquido-líquido modificada mostrou-se adequada para o presente trabalho. Consiste em uma extração líquido-líquido com éter:clorofórmio (1:1), seguida da concentração dos analitos por evaporação e posterior utilização da acetonitrila com a finalidade de precipitar as proteínas provenientes da extração líquido-líquido. Utilizou-se solução estoque de terbutilazina 1,0 mg/mL como padrão interno (PI).

Para obtenção de cada amostra biológica processada, adicionou-se, em um tubo com capacidade de 15 mL, um grama da amostra, 10 mL de éter-clorofórmio (1:1), 1,0 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) pH = 12,00 e 100 µL da solução estoque do PI, exceto para as amostras isentas desse padrão (amostra branco). Os tubos foram vigorosamente agitados (agitador orbital), por

50 minutos, e centrifugados, por 5 minutos, a 3.000 rpm. Retirou-se a fase orgânica e transferiu-se para outro tubo. Este tubo permaneceu em capela de exaustão de gases para evaporação e concentração dos analitos. A seguir, adicionou-se 1,0 mL de acetonitrila e procedeu-se a filtração (filtro de porosidade 0,45 µm). Dessa amostra biológica processada foi injetado 20 µL no equipamento CLAE-DAD.

4.5.3 Análise qualitativa e quantitativa

Para a análise qualitativa, verificou-se a presença do carbofurano e de 3-hidroxicarbofurano em amostras de cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, pulmão, rim e sangue. Foi estabelecida a concentração de 31,25 µg/mL (valor próximo ao CQM) para cada analito, as quais foram comparadas com a resposta cromatográfica da amostra branco de cada matriz analisada. Ainda, verificou-se a linearidade da curva nas amostras biológicas processadas.

Para a quantificação em amostras de conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue, optou-se pela padronização interna, utilizando a terbutilazina em concentração fixa em 100 µg/mL para a construção das curvas analíticas.

4.5.4 Curvas analíticas

As soluções padrões estoque, em acetonitrila, para construção das curvas analíticas foram preparadas individualmente em balões volumétricos obtendo-se a concentração de 1.000 µg/mL, sendo estocadas a -20°C. A solução de trabalho foi preparada através de diluição da solução estoque, obtendo-se concentrações que variaram de 6,25 a 1.000 µg/mL.

Foram realizadas triplicatas de seis níveis distintos de concentração, tanto para o carbofurano, como para o seu metabólito, em cada matriz biológica. Foi, então, construído o gráfico da curva analítica, o qual foi examinado visualmente, e

a regressão linear foi calculada pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

5 - RESULTADOS

Os resultados são apresentados a seguir.

5.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA

Optou-se pelo emprego de um gradiente de eluição da fase móvel (água ultrapura e acetonitrila) a um fluxo constante de 1.000 $\mu\text{L}/\text{min}$, durante a corrida cromatográfica, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Programação do gradiente de eluição da coluna cromatográfica para análise de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	100	0
40	20	80
45	0	100
50	100	0

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA

Essas análises foram realizadas com a finalidade de identificar o carbofurano e/ou o 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas.

5.2.1 Identificação

As figuras 3 - 10 ilustram a identificação do carbofurano e seu metabólito em amostras biológicas processadas com o PI. Considerando a margem de interferência de até 20% no tempo de retenção (TR) para cada analito, nota-se que não houve interferente significativo na região do carbofurano e seu metabólito em nenhuma das matrizes analisadas.

Figura 3 - Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,296 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,454 min) na concentração 31,25 µg/mL em **cérebro** processado com o padrão interno (TR=26,522 min) e cromatograma (B) da amostra zero de cérebro com o padrão interno (Tempo=26,589 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015)

Figura 4 - Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,242 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,417min) na concentração 31,25 µg/mL em **conteúdo estomacal** processado com o padrão interno (TR=26,490 min); e cromatograma (B) da amostra zero de conteúdo estomacal com o PI (TR=26,605 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 5. Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,282 min), 3-hidroxicarbofurano (TR=16,447 min) na concentração 31,25 µg/mL em **coração** processado com o padrão interno (TR=26,472 min) e cromatograma (B) da amostra zero de coração com o PI (TR=26,438 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 6. Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,410 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,537 min) na concentração 31,25 µg/mL em **fígado** processado com o padrão interno (TR=26,728 min) e cromatograma (B) da amostra zero de fígado com o PI (TR=26,770 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 7. Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,255 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,425 min) na concentração 31,25 µg/mL em **humor vítreo** processado com o padrão interno (TR=26,424 min) e cromatograma (B) da amostra zero de fígado com o PI (TR=26,737 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 8. Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,360 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,488 min) na concentração 31,25 µg/mL em **pulmão** processado com o padrão interno (TR=26,757 min) e cromatograma (B) da amostra zero de pulmão com o PI (TR=26,748 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 9. Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,404 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,526 min) na concentração 31,25 µg/mL em rim processado com o padrão interno (TR=26,755 min) e cromatograma (B) da amostra zero de rim com o PI (TR=26,791 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 10 - Cromatograma (A) do carbofurano (TR=22,335 min) e 3-hidroxicarbofurano (TR=16,477 min) na concentração 31,25 µg/mL em **sangue** processado com o padrão interno (TR=26,788 min) e cromatograma (B) da amostra zero de sangue com o PI (TR=26,614 min).

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.2.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, construiu-se três curvas de calibração com concentrações diferentes dos padrões de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano nas matrizes biológicas. A faixa de concentração estabelecida para as curvas analíticas dos diferentes analitos foram: 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. As tabelas 2 e 3 mostram a equação da reta e o coeficiente de correlação (r^2) da curva analítica (em quintuplicata) do carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano, respectivamente, obtidas para cada matriz biológica. As Figuras 11 e 12 mostram as curvas analíticas em cada matriz biológica para o carbofurano e para o 3-hidroxicarbofurano, respectivamente.

Tabela 2. Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em quintuplicata) do carbofurano obtidos para cada matriz biológica.

MATRIZ	CARBOFURANO	
	Equação	r^2
Cérebro	$Y = 0,000425 \cdot X - 0,00405$	0,997
Conteúdo estomacal	$Y = 0,00352 \cdot X + 0,00365$	0,993
Coração	$Y = 0,000277 \cdot X + 0,0107$	0,989
Fígado	$Y = 0,000307 \cdot X - 0,00839$	0,990
Humor vítreo	$Y = 0,000284 \cdot X - 0,000514$	0,998
Pulmão	$Y = 0,000275 \cdot X + 0,00236$	0,994
Rim	$Y = 0,000289 \cdot X + 0,00310$	0,998
Sangue	$Y = 0,000357 \cdot X - 0,00640$	0,987

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Tabela 3 - Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em quintuplicata) do 3-hidroxicarbofurano obtidos para cada matriz biológica.

MATRIZ	3-HIDROXICARBOFURANO	
	Equação	r ²
Cérebro	$Y = 0,000272 \cdot X + 0,00794$	0,994
Conteúdo estomacal	$Y = 0,000271 \cdot X + 0,00600$	0,998
Coração	$Y = 0,000217 \cdot X + 0,00380$	0,997
Fígado	$Y = 0,000248 \cdot X - 0,00581$	0,993
Humor vítreo	$Y = 0,000224 \cdot X + 0,00331$	0,996
Pulmão	$Y = 0,000215 \cdot X + 0,00635$	0,990
Rim	$Y = 0,000213 \cdot X + 0,00548$	0,994
Sangue	$Y = 0,000277 \cdot X - 0,00266$	0,994

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 11 - Linearidade do carbofurano nas concentrações: 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, em cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, pulmão, rim e sangue.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 12. Linearidade do 3-hidroxicarbofurano nas concentrações: 31, 62, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, em cérebro, conteúdo estomacal, coração, fígado, humor vítreo, pulmão, rim e sangue.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

A validação analítica para a quantificação dos analitos foi feita nas seguintes matrizes biológicas: conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue.

5.3.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, adotou-se o intervalo de confiança para o TR de 20% para o carbofurano e seu metabólito nas matrizes biológicas. O intervalo de confiança estabelecido para o PI foi de 5% nas mesmas matrizes.

O LIQ em conteúdo estomacal, humor vítreo e sangue foi de 6,25 µg/mL para o carbofurano e para o 3-hidroxycarbofurano. O fígado foi a única matriz que apresentou o LIQ de 12,5 µg/mL de carbofurano. A concentração do PI foi mantida constante em 100 µg/mL. As figuras 13 a 16 ilustram o cromatograma do LIQ e da amostra branco em cada matriz.

Figura 13 – Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (LIQ - 6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (tempo de retenção - TR=15,687 min), carbofurano (TR=18,195 min) e padrão interno (TR=24,085 min) e cromatograma (B) da amostra branco em **conteúdo estomacal**.

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 14 Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (12,5 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=15,306 min), carbofurano (TR=18,934 min) e padrão interno (TR=24,544 min) e cromatograma (B) da amostra branco em **figado**.

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 15 - Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=11,977 min), carbofurano (TR=19,122 min) e padrão interno (TR=23,927 min) e cromatograma (B) da amostra branco em **humor vítreo**.

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 16. Cromatograma (A) do limite inferior de quantificação (6,25 µg/mL) de 3-hidroxicarbofurano (TR=17,094min), carbofurano (TR=24,058 min) e padrão interno (TR=29,147 min) e cromatograma (B) da amostra branco em **sangue**.

(A)

(B)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3.2 Efeito residual

A figura 17 mostra os cromatogramas do LSQ do carbofurano, 3-hidroxicarbofurano e PI, 100 µg/mL (LSQ), injetados antes e depois da amostra branco de sangue; nota-se que não houve efeito residual nessa matriz. Para as demais matrizes foram obtidos cromatogramas semelhante, indicando a ausência de efeito residual em todas elas.

Figura 17 - Cromatograma do limite superior de quantificação (LSQ – 100 µg/mL) do (A) carbofurano (TR=22,332 min), (B) 3-hidroxicarbofurano (TR=16,440 min) e (C) padrão interno (PI – TR=26,390 min), em acetonitrila, injetados antes e depois da amostra branco de **sangue**.

(A)

(B)

(C)

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3.3 Efeito de matriz

A Tabela 3 apresenta o CV e o FMN do carbofurano e de seu metabólito, em diferentes matrizes. Assim, considerando-se o CV, nota-se que nenhum deles foi superior a 15%, tanto para o carbofurano, como para o seu metabólito. Em relação ao FMN, nota-se que para o carbofurano este fator variou entre 0,57 e 0,83, enquanto para o metabólito variou de 0,88 a 0,90.

Tabela 4 - Coeficiente de variação (CV) e fator de matriz normalizada (FMN) para avaliar a interferência das matrizes na análise do carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano.

MATRIZ	CARBOFURANO		3-HIDROXICARBOFURANO	
	CV %	FMN	CV %	FMN
Conteúdo estomacal	8,55	0,83	8,36	0,89
Fígado	11,77	0,57	9,69	0,89
Humor vítreo	13,08	0,60	5,32	0,90
Sangue	6,17	0,73	10,25	0,88

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida a partir de três curvas, contendo diferentes concentrações (6,25 a 100,0 µg/mL) do padrão de carbofurano e de 3-hidroxicarbofurano, para cada matriz biológica (conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue). As Figuras 18 e 19 mostram as curvas de calibração para o carbofurano e para o 3-hidroxicarbofurano, respectivamente, em cada matriz biológica.

Figura 18 - Curvas de calibração do carbofurano na faixa de 6,25 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$, em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Figura 19 - Curvas de calibração (em triplicata) do 3-hidroxicarbofurano na faixa de 6,25 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$, em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

As tabelas 5 e 6 mostram a linearidade através das equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (r^2) para o carbofurano e 3-hidroxicarbofurano, respectivamente.

Tabela 5. Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração (em triplicata) do carbofurano obtidos para cada matriz biológica.

MATRIZ	CARBOFURANO	
	Equação	r^2
Conteúdo estomacal	$Y = 0,003259 \cdot X + 0,02470$	0,9943
Fígado	$Y = 0,003171 \cdot X + 0,004378$	0,9937
Humor vítreo	$Y = 0,003469 \cdot X - 0,01723$	0,9981
Sangue	$Y = 0,004032 \cdot X - 0,003467$	0,9992

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Tabela 6. Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração do 3-hidroxicarbofurano (em triplicata) obtidos para cada matriz biológica.

Matriz	3-HIDROXICARBOFURANO	
	Equação	r^2
Conteúdo estomacal	$Y = 0,003644 \cdot X + 0,04917$	0,9840
Fígado	$Y = 0,002043 \cdot X + 0,01182$	0,9811
Humor vítreo	$Y = 0,004215 \cdot X - 0,01336$	0,9979
Sangue	$Y = 0,006389 \cdot X - 0,01601$	0,9992

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3.5 Precisão e exatidão

As tabelas 7 e 8 mostram a precisão (CV – em %) e a exatidão (EPR – em %) do método nas matrizes biológicas processadas (conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue) em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas em dias diferentes (intercorrídas), empregando os padrões de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano.

Tabela 7 - Exatidão (erro padrão relativo - em %) e precisão (coeficiente de variação - em %) do carbofurano em triplicata nas diferentes matrizes, intracorrida e intercorrida.

Matriz	Carbofurano (µg/mL)	Intracorrida			Intercorrida		
		Média experimental (µg/mL)	Exatidão	Precisão	Média experimental (µg/mL)	Exatidão	Precisão
Conteúdo estomacal	100	100,96	0,96	0,49	100,97	0,97	0,01
	75	76,25	1,67	0,72	76,13	1,51	0,27
	50	44,82	10,37	1,75	44,76	10,49	0,54
	25	27,57	10,27	4,42	28,31	13,24	1,79
	12,5	12,43	0,57	9,37	12,13	2,94	4,78
	6,25	6,68	6,81	15,82	6,43	2,94	8,43
Fígado	100	97,03	2,97	1,73	97,60	2,40	0,01
	75	77,10	2,80	2,35	76,05	1,40	1,38
	50	55,04	10,08	4,16	52,65	5,31	2,99
	25	21,94	12,26	5,15	24,59	1,63	1,91
	20	17,04	14,81	5,06	18,90	5,48	1,80
	12,5	14,36	14,85	5,85	11,14	10,87	4,24
Humor vítreo	100	96,27	3,73	0,37	100,73	0,73	0,02
	75	69,49	7,34	8,60	74,39	0,82	0,36
	50	47,17	5,66	1,05	49,56	0,88	0,24
	25	24,04	3,85	2,01	24,66	1,35	0,56
	12,5	11,90	4,80	12,09	12,53	0,25	0,76
	6,25	6,35	1,63	0,81	6,89	10,29	0,51
Sangue	100	100,64	0,64	0,62	100,55	0,55	0,26
	50	48,92	2,16	1,00	48,80	2,39	0,18
	25	23,17	7,33	1,11	24,19	3,25	0,40
	20	20,69	3,47	1,34	20,60	2,99	0,62
	12,5	14,50	16,02	1,55	13,61	8,92	0,31
	6,25	5,84	6,62	4,32	5,98	4,30	1,84

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

Tabela 8- Exatidão (erro padrão relativo - em %) e precisão (coeficiente de variação - em %) do 3-hidroxycarbofurano em triplicata nas diferentes matrizes, intracorrida e intercorrida.

Matrizes	Carbofurano (µg/mL)	Intracorrida			Intercorrida		
		Média experimental (µg/mL)	Exatidão	Precisão	Média experimental (µg/mL)	Exatidão	Precisão
Conteúdo estomacal	100	94,98	5,02	0,26	94,21	5,79	0,26
	75	83,31	11,08	1,40	78,72	4,97	1,40
	50	47,47	5,05	4,72	48,05	3,91	4,72
	25	25,15	0,59	7,90	24,53	1,87	7,90
	12,5	13,24	5,95	6,67	12,66	1,26	6,67
	6,25	5,20	16,84	7,08	5,05	19,14	7,08
Fígado	100	105,95	5,95	2,04	104,62	4,62	0,81
	75	71,51	4,65	1,19	72,21	3,72	0,15
	50	43,05	13,90	2,00	44,22	11,56	0,71
	25	22,61	9,57	5,95	24,67	1,33	0,24
	12,5	11,92	4,66	8,73	13,96	11,65	10,61
	6,25	5,17	17,31	13,07	7,37	17,97	13,06
Humor vítreo	100	98,37	1,63	1,65	98,26	1,74	0,69
	75	77,59	3,46	1,96	77,84	3,79	1,02
	50	49,35	1,30	1,98	49,23	1,55	0,20
	25	25,20	0,79	2,52	25,28	1,13	0,11
	12,5	12,14	2,92	3,99	12,07	3,44	2,24
	6,25	6,08	2,67	9,71	6,09	2,60	4,45
Sangue	100	100,01	0,01	1,09	100,13	0,13	0,51
	50	49,40	1,19	2,71	49,15	1,69	1,12
	25	26,12	4,48	2,43	25,98	3,93	1,11
	20	20,45	2,23	1,48	20,57	2,84	0,04
	12,5	12,27	1,82	1,31	12,36	1,12	0,20
	6,25	5,51	11,92	3,00	5,56	10,98	0,72

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.3.6 Recuperação

A tabela 9 mostra a recuperação média, em 3 níveis de concentração (CQB, CQM e CQA) para o carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue.

Tabela 9 - Recuperação média (%) em três níveis de concentração (CQB=controle de qualidade baixo, CQM=controle de qualidade médio, CQA=controle de qualidade alto) do carbofurano e do 3-hidroxicarbofurano em diferentes matrizes biológicas.

	Nível de concentração	CARBOFURANO	3-HIDROXICARBOFURANO
Conteúdo estomacal	CQB	96,13	97,71
	CQM	97,03	97,55
	CQA	99,99	99,22
Fígado	CQB	74,29	64,72
	CQM	89,37	91,76
	CQA	99,42	98,66
Humor vítreo	CQB	91,33	99,93
	CQM	97,49	99,66
	CQA	95,54	99,89
Sangue	CQB	97,69	99,06
	CQM	99,52	100,61
	CQA	100,1	99,88

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

5.4 EXAME TOXICOLOGICO (AMOSTRAS REAIS)

A figura 20 mostra o resultado dos 49 exames toxicológicos realizados em conteúdo estomacal e/ou fígado de cão, gato, boi, gambá e aves com suspeita de intoxicação, encaminhados ao LADTOX no período de janeiro de 2014 a setembro de 2015. Nota-se que o maior número de solicitações de exame toxicológico foi de amostra biológicas oriundas de gato, seguida das de cães.

Figura 20. Resultado dos exames toxicológicos realizados em conteúdo estomacal e/ou fígado de animais com suspeita de intoxicação, encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de janeiro de 2014 a setembro de 2015. São apresentados o número total de animais recebidos e o número de animais com pelo menos uma amostra positiva para o carbofurano.

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

A tabela 10 mostra a faixa de concentração de carbofurano em amostras positivas de conteúdo estomacal e/ou fígado de animais com suspeita de intoxicação, encaminhados ao LADTOX, no período de janeiro a setembro de 2015. Assim, observa-se que em cães a concentração de carbofurano no conteúdo estomacal variou de 11 – 190 $\mu\text{g/mL}$; em amostras positivas de fígado a concentração encontrada nestas amostras estava abaixo do LIQ, exceto em amostras oriundas de aves, nas quais uma amostra estava acima do LIQ.

Tabela 10. Quantificação de carbofurano em amostras positivas de conteúdo estomacal e/ou fígado de animais com suspeita de intoxicação, encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de janeiro a setembro de 2015. O limite inferior de quantificação (LIQ) foi de 6,25 µg/mL para o conteúdo estomacal e de 12,5 µg/mL para o fígado. N=número de animais.

ESPÉCIE	N	AMOSTRA BIOLÓGICA	
		Conteúdo estomacal	Fígado
Cão	3	11 a 190 µg/mL	<LQ
Gato	2	6,5 µg/mL	<LQ
Ave	3	Não realizada	<LQ a 19 µg/mL

Fonte: (GONÇALVES JR., 2015).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível desenvolver e validar um método analítico para detectar e quantificar o praguicida carbofurano e seu metabólito, 3-hidroxicarbofurano, em matrizes biológicas oriundas de diferentes espécies animais por CLAE-DAD.

A análise qualitativa mostrou-se adequada para apontar a presença de carbofurano e seu metabólito em amostras oriundas de animais com suspeita de intoxicação, uma vez que houve linearidade das curvas obtidas com coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,987 para o carbofurano e 0,990 para o 3-hidroxicarbofurano.

Quanto a seletividade, avaliada no nível de concentração de 31,25 µg/mL de carbofurano e de seu metabólito, esta se mostrou satisfatória para a análise qualitativa dos analitos em matrizes biológicas processadas, pois não houveram interferentes relevantes próximos aos tempos de retenção desses analitos nessas matrizes.

As matrizes usualmente empregadas em análises toxicológicas são conteúdo estomacal, fígado e sangue; no LADTOX as duas primeiras são as mais utilizadas. No presente estudo, além dessas matrizes biológicas empregou-se também cérebro, coração, humor vítreo, pulmão e rim com a finalidade ampliar a possibilidade de identificação do carbofurano e seu metabólito em outros tecidos, uma vez que nem sempre os materiais colhidos numa necropsia se apresentam em condições adequadas para a análise toxicológica, devido, por exemplo, ao estado de conservação e do período de colheita pós-morte.

Em particular, vale destacar o emprego de humor vítreo em análises toxicológicas forenses mais recentemente. O humor vítreo é uma espécie de gel aquoso localizado na região posterior da cavidade do olho, entre a lente e retina (WHIKEHART, 2004); trata-se de um fluido límpido que contém menos proteína do que a urina, e pode ser prontamente recolhido por sucção direta durante a necropsia (BRUNET; MURA, 2012). Esse fluido propicia um meio relativamente estável para manter e conservar o agente tóxico a ser identificado/quantificado,

seja ele droga de abuso ou medicamento (BRUNET; MURA, 2012) e, ainda, os praguicidas (SIQUEIRA et al., 2015). Essa matriz pode ser útil também quando o sangue pós-morte não está disponível ou é limitado em termos de qualidade ou quantidade, como acontece, por exemplo, em casos de choque hemorrágico, queimaduras, embalsamamento ou processos de decomposição (LEVINE; REBECCA, 2008). As concentrações de analito no humor vítreo são muitas vezes semelhantes às suas concentrações no sangue em circulação (DRUID, 2006).

Os dados aqui obtidos indicam que todas as matrizes empregadas neste estudo (conteúdo estomacal, fígado, sangue, cérebro, coração, humor vítreo, pulmão e rim) podem ser utilizadas em exame toxicológico qualitativo para indicar a presença de carbofurano e seu metabólito, atendendo as necessidades do LADTOX.

Além da análise qualitativa foi feita também a análise quantitativa de carbofurano e seu metabólito em amostras de conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue. Para tanto empregou-se a RDC Nº 27 da ANVISA (BRASIL, 2012) que estabelece os seguintes requisitos mínimos de validação de métodos bioanalíticos: seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, curva de calibração e efeito residual.

Para estabelecer a **seletividade** do método, verificou-se que as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção dos analitos foram inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI foram inferiores a 5 % da resposta do PI. Isto indica que o método atende aos critérios de seletividade estabelecidos pela RDC Nº 27 da ANVISA (BRASIL, 2012).

Quanto ao **efeito matriz**, não houve interferência relevante entre as matrizes analisadas para a quantificação de carbofurano e de 3-hidroxicarbofurano, pois o CV do carbofurano nas diferentes matrizes variou de 6,17 (sangue) a 13,08% (humor vítreo) e a do seu metabólito variou de 5,32 (humor vítreo) a 10,25% (sangue), sendo inferiores a 15%, conforme propõe a RDC Nº27 (BRASIL, 2012).

No presente trabalho avaliou-se também FMN, nas diferentes matrizes, e este variou de 0,57 (fígado) a 0,83 (conteúdo estomacal) para o carbofurano e de 0,88 (sangue) a 0,90 (humor vítreo) para o 3-hidroxicarbofurano. Viswanathan et al. (2007) propuseram que quando o FMN é igual a 1 indica que não existe interferência expressiva na matriz analisada. Deve ser salientado, ainda, que o efeito matriz é dependente das propriedades físico-químicas do praguicida e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, etc.) (HAJSLOVÁ et al., 1998; SANCHEZ-BRUNETE et al., 2005).

Em relação a **precisão e exatidão** do método, foi possível observar que o CV e o EPR não excederam ao limite máximo de 15%, conforme a RDC Nº 27 (BRASIL, 2012), para todos os níveis de concentração avaliados, tanto nos experimentos intracorrída, quanto intercorridas. Os valores maiores que 15% foram encontrados apenas no LIQ e estes atendem a faixa de aceitabilidade estipulada pela RDC Nº 27 (BRASIL, 2012), a qual limita ao valor máximo de 20% para este nível de validação.

Considerando a **curva de calibração**, o coeficiente de correlação (r^2) apresentou valores iguais ou superiores que 0,99 nas diferentes matrizes para o carbofurano, enquanto para o 3-hidroxicarbofurano duas matrizes (fígado e conteúdo estomacal) apresentaram o valor de 0,98 e as demais superior a 0,99. Esses resultados permitem concluir que não houve dispersão do conjunto de concentrações de recuperações nas faixas estudadas dos analitos em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue. Os valores de r^2 superiores a 0,90 indicam linearidade em níveis fortificados preconizados para curva analítica (INMETRO, 2003).

Os níveis de fortificação no presente trabalho estabelecidos para a curva de calibração variaram de 6,25 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Os dados da literatura mostram uma grande variação na presença de carbofurano e seus metabólitos em diferentes matrizes e espécies de animais intoxicados por esse praguicida. Assim, Ameno et al. (2001) relataram quatro casos de suicídio, em seres humanos, nos quais a concentração de carbofurano no sangue variou de 0,32 a 11,6 $\mu\text{g/mL}$. Esses autores sugeriram que em casos de intoxicação sem tratamento médico, a

concentração de carbofurano de 0,32 $\mu\text{g/mL}$ ou superior no sangue deve ser considerado como fatal. A maior concentração de carbofurano arterial relatada foi de 29,3 $\mu\text{g/mL}$, em um caso de suicídio no qual 155 g do praguicida foram ingeridos pelo indivíduo (FERSLEW et al., 1992).

Recentemente, Tennakoon et al. (2013) relataram concentrações de carbofurano e de seus metabólitos (3-hidrocarbofurano e carbofurano-fenol) em sangue humano, que variaram entre 0,4 a 18,0 $\mu\text{g/mL}$ e no conteúdo estomacal de 0,3 a 300 $\mu\text{g/mL}$, em casos de intoxicação e de suicídio.

No Sri Lanka, em cães intoxicados por carbofurano, Tennakoon et al. (2009) relataram concentrações que variaram entre 50 a 800 $\mu\text{g/mL}$ em conteúdo estomacal e entre 13 a 20 $\mu\text{g/mL}$ em fígado desses animais.

Em animais selvagens, Antoniou et al. (1996) relataram a presença de 0,53 $\mu\text{g/mL}$ de carbofurano em amostra de fígado de uma raposa, e num abutre-preto (*Aegypius monachus*) 0,33 $\mu\text{g/mL}$ no fígado e 0,11 $\mu\text{g/mL}$ em rim. No Quênia, em um estudo realizado em diferentes tecidos de abutres brancos africanos (*Gyps africanus*) mortos, detectou-se a presença de carbofurano, 3-hidroxicarbofurano e 3-cetocarbofurano na faixa de 0,02 a 0,060 mg/kg, de 0,014 a 0,146 mg/kg e de 0,030 a 0,487 mg/kg, respectivamente (PETER et al., 2010). Em urso marrom intoxicado na Croácia, a concentração de carbofurano encontrada foi de 2,7 $\mu\text{g/mL}$ no rim e 12,6 $\mu\text{g/mL}$ no fígado (RELJIC et al., 2012).

Considerando esses achados da literatura sobre casos de intoxicação por carbofurano em diferentes espécies animais, nota-se que o LIQ empregado no presente estudo se mostra adequado para indicar a ocorrência de óbito causado pela exposição ao carbofurano.

A eficiência do método de tratamento das amostras biológicas foi avaliada através da **recuperação**. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz biológica e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100% (US – FDA, 2001; ANVISA, 2003; SHAH et al., 1992).

Para avaliar a recuperação, no presente trabalho utilizou-se o número de fortificações estabelecidas pela RDC Nº 27 (BRASIL, 2012), que indica no mínimo três níveis (baixo, médio e alto), de acordo com a curva de calibração. Valores altos de recuperação são desejáveis, porém não é necessário atingir o valor de 100%; contudo a recuperação deve ser precisa, consistente e reprodutiva (US – FDA, 2001; ANVISA, 2003; SHAH et al., 2000). Comumente, utilizam-se as mesmas concentrações empregadas como controles de qualidade do método (US – FDA, 2001; ANVISA, 2003; SHAH et al., 1992). A aceitação de variação para a recuperação em métodos bioanalíticos é de até 15% para o analito de interesse (CAUSON, 1997).

A recuperação é avaliada após o processo de **extração**. A extração líquido-líquido pode fornecer diferentes resultados para a recuperação, dependendo da técnica empregada. Tennakoon et al. (2009) obtiveram recuperação de 77,3 a 91,7% para o carbofurano, em diferentes matrizes biológicas, empregando a extração líquido-líquido, na qual o LQ foi de 2,4 µg/mL. No estudo realizado por Papoutsis et al. (2012), a faixa de recuperação do carbofurano obtida pela extração líquido-líquido em sangue variou de 88,9 a 103,1%, para um LQ de 0,015 µg/mL. A recuperação encontrada no presente trabalho foi adequada e aceitável para atender a finalidade proposta, pois a extração líquido-líquido forneceu valores entre 74,29 a 100,1% para o carbofurano e entre 64,72 a 100,61% para o 3-hidroxicarbofurano, sendo o LIQ de 6,25 µg/mL.

Após avaliar os parâmetros de linearidade dos resultados da média de recuperação em diferentes níveis de fortificação, foram estabelecidos os LIQs para o carbofurano e seu metabólito. Estes apresentaram alta sensibilidade e confiabilidade, em níveis que variaram de 6,25 a 100 µg/mL, tanto para o carbamato como para o seu metabólito. O LD do método para cada analito foi calculado em relação ao sinal da concentração padrão no nível de 2 a 3 vezes superiores ao ruído da linha de base de cada analito nas amostras brancas, conforme a RD Nº 27 (ANVISA, 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram a detecção e quantificação do carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em matrizes biológicas oriundas de animais com suspeita de intoxicação. Assim, foi possível desenvolver

e validar um método analítico para detecção desse praguicida e seu metabólito em matrizes biológicas e empregá-lo em amostras encaminhadas ao LADTOX.

7 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e validado um método analítico para detectar e quantificar o carbofurano e seu metabólito em matrizes biológicas de diferentes espécies animais por CLAE-DAD.

Os dados obtidos indicam que todas as matrizes empregadas neste estudo (conteúdo estomacal, fígado, sangue, cérebro, coração, humor vítreo, pulmão e rim) podem ser utilizadas em exame toxicológico qualitativo para indicar a presença de carbofurano e seu metabólito.

O método se mostrou adequado para a quantificação de carbofurano e 3-hidroxicarbofurano em conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue, atendendo os parâmetros de validação RDC Nº 27 (BRASIL, 2012).

Esse método foi empregado para identificar e quantificar a presença de carbofurano em amostras reais de animais com suspeita de intoxicação encaminhadas ao LADTOX.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; SHARMA, B. Pesticide induced oxidative stress in mammalian systems. **International Journal of Biological and Medical Research**, v.1, n.3, p.90-104, 2010.

AMENO, K.; LEE, S. K.; IN, S. W.; YANG, J. Y.; YOO, Y.C.; AMENO, S.; KUBOTA, T.; KINOSHITA, H.; IJIRI, I. Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. **Forensic Science International**, v.116, p.59-61, 2001.

ANDREI, E. **Compêndio dos defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 8.ed. São Paulo, ANDREI, 2009. 34p.

ANTONIOU, V.; ZANTOPOULOS, N.; SKARTSI, D.; TSOUKALIPAPADOPOULOU, H. Pesticide poisoning of animals of wild fauna. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 38, n.3, p. 212-213, 1996.

Arnold, J. D. **Carbamate (Carbofuran) human dermal study**: final report (Unpublished study received Oct. 24, 1979 under 279-2712) prepared by Quincy Research Center, submitted by FMC Corp., Philadelphia, 1977. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/articles/2009/11/18/E9-27261/carbofuran-order-denying-fmcs-objections-and-requests-for-hearing>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 38, p. 151-216, 2004.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 9, p. E109–E114, 2007.

BARON, R. L. Carbamates inseticidas. In: HAYES JR., W. J.; LAWS, E. R. (Ed.) **Handbook of pesticides toxicology**. San Diego: Academic Press, p.1125-1141. 1991.

BERNY, P.; VILAGINES, L.; CUGNASSE, J-M.; MASTAIN, O.; CHOLLET, J-Y.; JONCOUR, G.; RAZIN, M. Vigilance poison: Illegal poisoning and lead intoxication are the main factors affecting avian scavenger survival in the Pyrenees (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 71–82, 2015.

BINEV, R.; VALCHEV, I.; RUSSENOV, A.; NIKOLOV, Y. Clinical toxicological investigations on acute carbofuran intoxication in dogs. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 17, n.1, p. 61-68, 2014.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**: Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**: relatório anual 04/06/2001-30/06/2002. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Seminário de Mercado de Agrotóxico e Regulação, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

BRASIL. Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2002.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de julho de 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 17 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.938, de 20 de dezembro de 2012. Autoriza o repasse do Fundo Nacional de Saúde aos Fundos Estaduais de Saúde e do Distrito Federal, para o fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, destinado aos Estados e Distrito Federal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 20 de dezembro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde ambiental**: dados e indicadores selecionados 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/folder/vigilancia_saude_ambiental_2009.pdf>. Acesso em 30 jun 2015.

BRASIL. Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão 97 de uso de produtos agrotóxicos e afins. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de fevereiro de 1992.

BRASIL. Portaria Normativa Ibama nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 de outubro de 1996.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2001.

BROOKS, M. W., et al. Determination of carbosulfan and its carbamate and phenolic metabolites in oranges. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 211, n. 1155, 1996.

Carbofuran. In: PESTICIDE RESIDUES IN FOOD. Toxicological Evaluations, Joint meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group, Rome, p. 23-43, 1996. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v96pr03.htm>>. Acesso em: 02 out. 2015.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, v. 9, n. 7-8, p. 685-692, 2006.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, p.175-180, 1997.

CHAUHAN, L. K. S. ; PANT, N; GUPTA, S. K; SRIVASTAVA, S. P. Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, p. 123-129, 2000.

CREPEAU, K. L., KUIVILA, K. M. Rice pesticide concentrations in the Colusa Basin Drain and the Sacramento River, California, 1990–1993. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 3, p. 926–935, 2000.

CURRIE, L. A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 595-908, 1994.

DADGAR, D.; BURNETT, P. E.; CHOC, M. G.; GALLICANO, K.; HOOPER, J. W.; Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.13, n. 2, p. 89-97, 1995.

DRUID, H. **Post-mortem toxicology**. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 2006.

EU COMMISSION. Commission Decision EC 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Union**, L 221, 2002.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 643–690.

FARIA, N. M. X; FASSA, A. G.; FACHINNI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12 n. 1, p. 25-38, 2007.

FERNÁNDEZ A. J. G.; MOJICA, P. M.; LÓPEZ E. M.; ROMERO, D.; NAVAS, I.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-RAMÍREZ, P. Aspectos clínicos y forenses del envenenamiento de aves silvestres: diferencias entre aldicarb e estricnina. Jornada técnica sobre intoxicaciones y envenenamientos en fauna silvestre y doméstica. **Revista de Toxicología**, v. 23, p. 44-48, 2006.

FERSLEW, K. E., HAGARDORN, A. N., MCCORMICK, W. F., Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase-inhibiting carbamate insecticide, and its effects on cholinesterase activity in various biological fluids. **Journal of Forensic Sciences**, v.37, p. 337–344, 1992.

FIOCRUZ. Centro de Informação Científica e Tecnológica. Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=411>>. Acesso em 02 ago. 2015.

FMC QUÍMICA DO BRASIL. **Furadan**: bula de agrotóxicos. Uberaba: FMC, 2006.

FRAZIER, K.; HULLINGER G.; HINES M, LIGGET A, SANGSTER L. Clinical reports: 162 cases of aldicarb intoxication in georgia domestic animals from 1988-1998. **Veterinary Human Toxicology**, v.41, p.233-235, 1999.

GARCIA, E. G. Pesticide control experiences in Brazil. **Pesticides Safe**, v. 2, p. 5, 1997.

GERA, N.; KIRAN, R.; MAHMOOD, A. Carbofuran administration induces genotoxic effects in epithelial cells across crypt-villus axis in rat intestine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 2, p. 80-283, 2011.

GUPTA, R. C. Carbofuran toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, p. 383-418, 1994.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283-295, 1998.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; MCDOWALL, R. D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 2, p. 193-218, 1998.

HICKOX, W. H. Public health goals for chemicals in drinking water. In: CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Carbofuran**. California: CEPA, 2000. 19 p.

HILL, E. F.; CAMARDESE, M. B. Toxicity of anticholinesterase insecticides to birds: technical grade versus granular formulations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 8, n. 6, p. 551-563, 1984.

HOPKINS, A.W, SCHOLZ, L.N. Ecotoxicology of anticholinesterase pesticides: data gaps and research challenges. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.5, p.1185-1186, 2006.

IBGE, Censo agropecuário do Brasil 2006. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: 20 abr 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. São Paulo: Inmetro, 2003.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/IEC 17025**: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Switzerland: ISO, 1999.

JURY, W. A.; GHODRATI, M. Overview of organic chemical environmental fate and transport modeling approaches. In: SAWHNEY, B.L.; BROWN, K. (Ed.). **Reactions and movement of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p. 271-304.

KAMBOJ, A.; KIRAN, R.; SANDHIR, R. N-acetylcysteine ameliorates carbofuran induced alterations in lipid composition and activity of membrane bound enzymes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 286, p.107–114, 2006.

KONSTANTINOOU, I.; HELA, D.; ALBANIS, T. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece: review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v.141, n. 3, Part I, p. 555-570, 2006.

KRULL, I.S; Swartz, M.E. Frequently asked questions about analytical method validation. **LC-GC Magazine**, v.16, p.464, 1998.

LALAH, J.O., WANDIGA, S.O. Adsorption/desorption and mobility of carbofuran in soil samples from Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 575-583, 1996.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**: métodos cromatográficos de análise. 6. ed. São Carlos: Rima, 2004.

LEVINE, B. S. J.; REBECCA, A. Drugs-of-abuse testing in vitreous humor. In: JENKINS, A. J. C.; Yale, H. **Drug testing in alternate biological specimens**. New Jersey: Humana Press, 2008. p. 117–130.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

LORGUE G.; LECHENET J.; RIVIERE, A. **Clinical veterinary toxicology: carbamates**. Disponível em: <<http://www.provet.co.uk/lorgue/>>. Acesso em 29 jun. 2015.

MARTÍNEZ-HARO, M.; MATEO, R.; GUITART, R.; SOLER-RODRÍGUEZ, F.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MARÍA-MOJICA, P.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 396-402, 2008.

MCEWEN, B.J. Trends in domestic animal medico-legal pathology cases submitted to a veterinary diagnostic laboratory 1998-2010. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 5, p. 1231-1233, 2012.

MINEAU, P. The hazard of carbofuran to birds and other vertebrate wildlife. **Canadian Wildlife Service Technical Report**, n.177, p. 96, 1993.

MINEAU, P.; FLETCHER, M.R.; GLASER, L.C.; THOMAS, N.J.; BRASSARD, C.; WILSON, L.K.; ELLIOT, J.E; LYON, L.; HENNY, C.J.; BOLLINGER, P.; PORTER, S.L. Poisoning of raptors with organophosphorous and carbamate pesticides with emphasis on Canada, US and U.K. **Journal of Raptor Research**, v. 33, n. 1, p. 1–37, 1999.

MURA, P.; SAUSSEREAU, E.; BRUNET, B. GOULLÉ, J. P. Workplace testing of drugs of abuse and psychotropic drugs. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 70, n. 3, p. 120-32, 2012.

NORBERG-KING, T. J., DURHAN, E. J., ANKLEY, G. T. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin Drain, California. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, p. 891–900, 1991.

NOSTRANDT, A. C.; J.A. DUNCAN AND S. PADILLA. 1993. A modified spectrophotometric method appropriate for measuring cholinesterase activity in tissue from carbaryl-treated animals. **Fundamental and Applied Toxicology** v. 21, p. 196-203.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA P.; OLIVEIRA J.; COLAÇO A. Recolha e envio de amostras biológicas para o diagnóstico de intoxicações em carnívoros domésticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 544, p. 161-16, 2002.

OLIVEIRA, R. D. R.; MENEZES, J. B. Intoxicações exógenas em clínica médica. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36 n. 2/4, p. 472-479, 2003.

OOM, P.; PEREIRA, P.; SANTOS, E.; CARVALHO, A.; CORREIA, M. ; RODRIGUES, G.; SILVA SEQUEIRA, J. Poisoning with methanol and carbamates. **Acta Médica Portuguesa**, v. 15, n.1, p. 45-8, 2002.

OTIENO, P. O.; LALAH, J. O.; VIRANI, M.; JONDIKO, I.O.; SCHRAMM, K. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for furadan exposure in vultures (*gyps africanus*) in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 536-544, 2010.

PADILLA, S.; HOOPER, M. J. Cholinesterase measurements in tissues from carbamate- treated animals: cautions and recommendations. In: USEPA Workshop on Cholinesterase Methodologies, 1992. **Proceedings** Washington, DC: US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, 1992. p. 63-81.

PAPOUTSIS, I.; MENDONIS, M.; NIKOLAOU, P.; ATHANASELIS, S.; PISTOS, C. development and validation of a simple gc-ms method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood-clinical and forensic toxicology applications. **Journal of Forensic Sciences**, v.57, n.3, p.806-12, 2012.

PERES, F.; MOREIRA, J.; RODRIGUES, K.; CLAUDIO, L. Risk perception and communication regarding pesticide use in rural work: a case study in Rio de Janeiro state, Brazil. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 12, p. 400–407, 2006.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F.; Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216-224, 2007.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H.; Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology: a review. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, n.11, p.441-449, 2002.

POKLIS A. Forensic toxicology. In: ECKERT, W. G. **Introduction to forensic sciences**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1997.

POKLIS A. Analytic /forensic toxicology. In: KLAASSEN C. D. **Casarett & doull: toxicology-the basic science of poisons** 7. ed. New York: McGraw-Hill, 2008.
QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. I. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992. p. 301-327.

RAI, D. K., SHARMA, R. K., RAI, P. K., WATAL, G. ; SHARMA, B. Role of aqueous extract of *Cynodon dactylon* in prevention of carbofuran induced Oxidative stress and acetyl cholinesterase inhibition in rat brain, **Cellular & Molecular Biology**, v. 57, n. 1, p. 135-142, 2011.

RANGEL, R. Toxicologia forense. In RANGEL R.; PINHEIRO, M. F.; MAGALHÃES, T. **Noções básicas sobre outras ciências forenses**. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade, 2003/2004.

RELJIĆ, S.; SREBOČAN, E.; HUBER, D. A case of a brown bear poisoning with carbofuran in Croatia. **Ursus**, v. 23, n. 1, p. 86-90, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771, 2004.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTÍN. G.; TADEO, J. L. Determination of pesticide residues by gc-ms using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**. v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. ; MURTHY, R. C., Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: a spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 93-100, 2010.

SCHOBINGER, Lars. **Kleffmann: IDH de regiões agrícolas deve crescer mais por pelo menos 10 anos**. Rio de Janeiro: Globo Rural, 2014. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Economia-e-Negocios/noticia/2014/07/kleffmann-idh-de-regioes-agricolas-deve-crescer-mais-por-pelo-menos-10-anos.html>>. Acesso em: 01 set. 2015.

SHAH, V. P.; Confirmatory reanalysis of incurred bioanalytical samples. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 3, p. E336-E343, 2007.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p.588, 1992.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W.; HILL, H. M. Bioanalytical method validation:a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p.1551, 2000.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Defensivos. **Expectativa de aumento da demanda para 2007**. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/upload/IEA-expectativaaumentodemanda.doc>> Acesso em 6 set 2007.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas Óbitos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstância. Rio de Janeiro, 2009.

SIQUEIRA, A.; SALVAGNI F. A.; YOSHIDA, A. S.; GONÇALVES, V.; CALEFI, A. S.; FUKUSHIMA, A. R.; SPINOSA, H. S.; MAIORKA, P. C. Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 142–149, 2015.

SKOPP, G. Postmortem toxicology. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 6, p. 314-325, 2010.

SPENCER, E.Y. **Guide to the chemicals used in crop protection** 7.ed. Ontário: Research Branch Agriculture Canada, 1982. p. 595.

SPINOSA H, FLORIO JC. Poisonings in animals: case-reports of the LADTOX (Laboratory of Toxicology Diagnosis) during 1989-1992. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, p. 69, 1993.

STINSON, E. R.; HAYES, L. E.; BUSH, P. B.; WHITE, D. Carbofuran affects wildlife on Virginia corn fields. **Wildlife Society Bulletin**. v. 22, p. 566–575, 1994.

TEJADA, A.W.; SAMANIEGO, N.A.; SANCHEZ, T. E.; MAGALLONA, E. D. Fate of ¹⁴C- carbofuran in lactating goats. **The Philippine Agriculturist**, v. 71, p. 149-155, 1988.

TENNAKOON, D. S.; KARUNARATHNA, W.; UDUGAMPALA, U. Carbofuran concentrations in blood, bile and tissues in fatal cases of homicide and suicide. **Forensic Science International**, v. 227, n. 1-3, p. 106-10, 2013.

TENNAKON, S.; PERERA, B.; HATURUSINGHE, L. Intentional poisoning cases of animals with anticholinesterase pesticide-carbofuran in Sri Lanka. **Legal Medicine**, v. 11, p. S500-2, 2009.

THEISEN, G. **O mercado de agroquímicos**. Disponível em:
<<http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/slides.phpTHEISEN.pdf>>
Acesso em 20 abr 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOBIN, J. S. Carbofuran: a new carbamate insecticide. **Occupational Medicine**, v. 12, p., 1619, 1970.

TOMLIN, C. **The pesticide manual**. 10.ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. p.1341.

TRABUE, S. L.; FENG X.; OGRAN, A. V.; OU, L. T. Carbofuran degradation in soil profiles. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 2, n. 6, p. 861-878, 1997.

UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Granular carbofuran; conclusion of special review. Federal Register 56: 64621-64624. Washington: EPA, 1991.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Environmental **Fact Sheet for Carbofuran**. Washington, DC: EPA, Office of Pesticides and Toxic Substances, 1991.

UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **Reviewer guidance; validation of chromatographic methods**. Rockville: FDA, 1994.

UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA); **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. Rockville: FDA, 2001.

VALIDATION of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH, p.5,1995. ICH: Harmonised Tripartite Guideline. (CPMP/ICH/381/95). Disponível em:
<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf>. Acesso em 25 out. 2015.

VALIDATION of analytical procedures: methodology: ICH harmonised tripartite guideline. In: international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Disponível em:
<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 25 out. 2015.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL; S.; BOOTH, B. Workshop/conference report: quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 1, p. E30-E42, 2007.

WESSLER I, KIRKPATRICK CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 1558-71, 2008.

WHIKEHART, D. **Biochemistry of the eye**. Boston: Butterworth-Heinemann, 2004. p. 11-13,