

**Adriana Pimentel de Almeida Carvalho**

**Otimização e Validação de Método para Análise Simultânea de  
Dicofol, Permetrina, Dieldrin, Endosulfan e Diclorvos em Ração  
Animal, Fígado e Cérebro de Ratos**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi**

**Araraquara  
2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C331o Carvalho, Adriana Pimentel de Almeida  
Otimização e validação de método para análise simultânea de dicofol, permetrina, dieldrin, endosulfan e diclorvos em ração animal, fígado e cérebro de ratos / Adriana Pimentel de Almeida Carvalho. – Araraquara : [s.n], 2010  
135 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

1. Química analítica. 2. Pesticidas. 3. Cromatografia gasosa. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara


Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

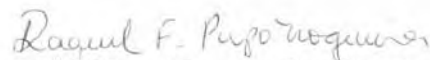
ADRIANA PIMENTEL DE ALMEIDA CARVALHO

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

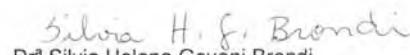
Araraquara, 29 de março de 2010.

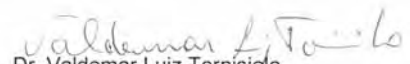
BANCA EXAMINADORA

  
Profª Drª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Profª Drª Raquel Fernandes Pupo Nogueira  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Mario Sergio Galhiane  
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru

  
Drª Silvia Helena Govoni Brondi  
Centro de Pesquisa de Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos

  
Dr. Valdemar Luiz Tornisielo  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, Piracicaba

*Dedico esse trabalho ao meu marido Fernando...  
amigo, companheiro.... simplesmente meu amor!  
Muito obrigada por estar em minha vida.  
Muito obrigada por me fazer tão feliz!  
Te amo....*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Mary pelos ensinamentos profissionais, pela paciência, compreensão, amadurecimento pessoal e principalmente pela palavra amiga no momento mais difícil da minha vida.

À querida Bilu, pelos cafés, conversas, congressos e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESKO) pela companhia e auxílio em diversas etapas da realização deste trabalho.

À Selminha pela amizade e nossas conversas que diminuíram a saudade de casa.

Aos amigos José Antonio, Flávio e Day por todo o carinho que sempre tiveram comigo.

Aos colegas de grupo e de projeto Pedro e Alex pela parceria nesse caminho tão longo.

À minha família mineira e santista pelo incentivo e carinho.

À Bela e ao Fe pelo amor incondicional.

A todos aqueles que de uma maneira ou outra participaram desse momento da minha vida e que com certeza fazem parte dele.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química, pelo incentivo e prontidão sempre que necessário.

Ao Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM) pelas amostras cedidas.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Chico Xavier

## RESUMO

Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) indicou que a população brasileira está exposta aos resíduos de pesticidas. Considerando este contexto, foi proposto um projeto temático, coordenado pelo Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo (Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP), com o apoio da Fapesp. Para investigar o efeito da exposição a baixas doses de misturas de pesticidas quanto à carcinogenicidade e alteração do sistema endócrino em ratos machos de Lewis, foram escolhidos quatro pesticidas dentre os mais encontrados pela ANVISA (2005) em frutas e vegetais consumidos no país: diclorvos, dicofol, permetrina (cis-trans), dieldrin e endosulfan ( $\alpha$ - $\beta$ ). Na avaliação da toxicidade destes pesticidas e sua eventual importância para a saúde humana foram utilizados modelos com ratos machos da linhagem de Lewis expostos a esses agentes por via oral durante 8 semanas alimentados com uma ração basal enriquecida com os pesticidas nas concentrações NOEL e LOEL. Como parte do referido projeto temático, o desenvolvimento deste trabalho contempla a otimização e validação de métodos analíticos para a quantificação dos pesticidas selecionados em amostras de ração e tecidos provenientes dos animais de experimentação (fígado e cérebro). É parte fundamental deste projeto, a garantia da dose que estará sendo ingerida pelo animal, por isso foi desenvolvido e validado um método para análise dos pesticidas na ração animal. 0,5 g da amostra de ração triturada e homogeneizada foi extraída com 5 mL de acetato de etila em banho de ultrassom por 20 minutos seguido de centrifugação. O sobrenadante foi concentrado até à secura sob suave corrente de nitrogênio, redissolvido em 1,0 mL de isooctano e 1  $\mu$ L foi analisado por GC/ECD. Os parâmetros de validação do método foram: recuperação entre 70 e 99%, precisão inferior a 10% (valores de coeficiente de variação) e limites de quantificação LQ entre 0,4 e 0,8  $\mu$ g/g. O método proposto para análise das amostras de fígado de rato consistiu na extração dos pesticidas com acetato de etila em banho de ultrassom seguido de clean up em cartuchos de florisil (500mg). A amostra de fígado triturada e homogeneizada é inicialmente transferida para um tubo de vidro com tampa contendo 5 mL de acetato de etila e submetida ao banho de ultrassom. Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante é transferida para o cartucho de florisil, eluída com acetato de etila, seca com fluxo de  $N_2$ , redissolvida em isooctano e analisada por GC-ECD utilizando uma coluna ZB-5. Os parâmetros de validação obtidos demonstram a adequação do método para a sua aplicação em estudos biológicos: exatidão (valores de recuperação entre 65 e 94%), precisão (valores de coeficiente de variação inferiores a 10%) e

limites de quantificação LQ (entre 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/g}$  ). O método de extração proposto anteriormente para a ração animal foi utilizado para amostras de cérebro de rato (1,0 g de amostra previamente triturado, homogeneizado e condicionado à temperatura ambiente). Os resultados de validação obtidos demonstraram a adequação do método para a sua aplicação em amostras de cérebro: exatidão (valores de recuperação entre 70 e 87%), precisão (valores de coeficiente de variação inferiores a 10%) e limites de quantificação LQ (entre 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/g}$ ). A aplicação dos métodos às amostras provenientes do estudo biológico (ração animal, fígado e cérebro dos animais de experimentação) forneceu os seguintes intervalos de concentração para os pesticidas em estudo: dicofol (8,64 a 21,50 $\mu\text{g/g}$ ), endosulfan (23,16 a 34,70 $\mu\text{g/g}$ ) e permetrina (60,03 a 196,47 $\mu\text{g/g}$ ) para as amostras de ração; dicofol (0,46 a 1,28  $\mu\text{g/g}$ ), dieldrin (1,57 a 5,38  $\mu\text{g/g}$ ) e endosulfan (1,90 a 9,59  $\mu\text{g/g}$ ) para amostras de fígado; e dicofol (0,21 a 51,64  $\mu\text{g/g}$ ), dieldrin (0,04 a 5,82  $\mu\text{g/g}$ ) e endosulfan (0,04 a 43,72  $\mu\text{g/g}$ ) para as amostras de cérebro. Os métodos propostos nesse trabalho permitiram análise simultânea dos pesticidas em um tempo menor quando comparado aos descritos na literatura, viabilizando sua aplicação em estudos que envolvem matrizes complexas e com elevado número de amostras.

**Palavras chave:** Pesticidas, ração animal, fígado, cérebro, GC/ECD.



## ABSTRACT

In 2005, the National Health Surveillance Agency through the program for the analysis of residues in foods indicated that the Brazilian population was exposed to pesticide residues. Considering this context, a thematic project was proposed, under Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo (Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP), with FAPESP financial support. In order to investigate the carcinogenic and endocrine effect of exposure to low doses of pesticide mixtures in Lewis male mice, were chosen four types of pesticides found in fruits and vegetables by ANVISA survey in 2005. The selected pesticides were: dichlorvos, dicofol, permethrin (cis-trans), dieldrin and endosulfan ( $\alpha$ -  $\beta$ ). The toxicity evaluation of these pesticides was carried out in Lewis male mice fed for 8 weeks with a basal ration enriched with pesticides at concentrations NOEL and LOEL. The main purpose of this work was to optimize and validate analytical methods for determination pesticides in samples of feed and tissue from the experimental animals (liver and brain). The security of dose in animal feed was also developed and validated; 0.5 g sample of feed was triturated, homogenized and extracted with 5 mL of ethyl acetate in ultrasonic bath for 20 minutes followed by centrifugation. The supernatant was concentrated to dryness in a gentle stream of nitrogen, dissolved in 1.0 mL of isooctane and 1  $\mu$ L was analyzed by GC / ECD. The validation parameters of the method were: recovery of 70 to 99 %, accuracy of less than 10 % (coefficient of variation) and quantification limits LQ between 0.4 and 0.8 mg/g. The proposed method for analysis of mice liver samples was the extraction of pesticides with ethyl acetate in ultrasonic bath followed by cleanup on florisil cartridges (500 mg). The triturated and homogenized liver sample was initially transferred to a glass tube with lid containing 5 mL of ethyl acetate and submitted to ultrasonic bath. A 2 mL aliquot of supernatant was transferred to the cartridge, eluted with ethyl acetate, dried with N<sub>2</sub>, dissolved in isooctane and analyzed by GC-ECD using a ZB-5 column. The obtained validation parameters demonstrated the method suitability and its application in biological studies: accuracy (recovery values between 65 and 94 %), precision (coefficient of variation < 10 %) and quantification limits LQ (0.1 - 0.5  $\mu$ g/g). The extraction method for animal feed was used for mice brain samples (1g of sample previously grounded, homogenized and kept at room temperature). The validation parameters showed the suitability of the method for its application in brain samples: accuracy (recovery values of 70 to 87 %), precision (coefficient of variation < 10 %) and quantification limits LQ (0.1 - 0.5  $\mu$ g/g). Applying the methods in samples from the toxicological study (animal feed, liver and brain), the results provided the following concentration range for pesticides: dicofol (8.64 to 21.50  $\mu$ g/g), endosulfan (23.16 to

34.70 µg/g) and permethrin (41.89 to 196.47 µg/g) in animal feed samples; dicofol (0.46 to 1.28 µg/g), dieldrin (1.57 to 5.38 µg/g) and endosulfan (1.90 to 9.59 µg/g) for liver samples; dicofol (0,21 to 51,64 µg/g), dieldrin (0,04 to 5.82 µg/g) and endosulfan (0,04 to 43,72 µg/g) for brain samples. The proposed methods in this work allowed simultaneous determination of pesticides in a shorter time when comparing to the reported literature and proved its use in studies involving complex matrices and large number of samples.

**Keywords:** pesticides, animal feed, liver, brain, GC / ECD.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	15
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. PESTICIDAS - HISTÓRICO, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICOS, COMPORTAMENTO TOXICOLÓGICO E OCORRÊNCIA AMBIENTAL E EM ALIMENTOS .....	23
2.1 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS.....	24
2.1.1 DIELDRIN .....	25
2.1.2 DICOFOL.....	27
2.1.3 ENDOSULFAN .....	29
2.2 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	31
2.3 PESTICIDAS PIRETRÓIDES.....	33
2.4 MECANISMOS DE AÇÃO TÓXICA DOS PESTICIDAS.....	36
3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	39
3.1 PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
4. ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	43
5 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO.....	48
6 EXPERIMENTAL.....	49
6.1. MATERIAIS .....	49
6.1.1 PADRÕES ANALÍTICOS DOS PESTICIDAS, SOLVENTES E REAGENTES .....	49
6.1.2 VIDRARIA E EQUIPAMENTOS .....	49
6.2 MÉTODOS GERAIS.....	50
6.2.1 LIMPEZA DA VIDRARIA.....	50
6.2.2 PREPARO DA RAÇÃO ANIMAL E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DESTA MATRIZ .....	51
6.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS DO ESTUDO: FÍGADO E CÉREBRO .....	54
6.3.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO (BIOTÉRIO) .....	54
6.3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	56
6.3.3 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO BIOLÓGICO.....	57
6.3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS DE FÍGADO E CÉREBRO.....	57
6.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO PARA O ESTUDO CROMATOGRÁFICO .....	57
6.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA ANALÍTICO (GC/ECD).....	58
6.5.1 REPETIBILIDADE DAS ÁREAS E TEMPOS DE RETENÇÃO PARA OS PESTICIDAS ESTUDADOS .....	60
6.5.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA GC/ECD .....	60
6.6. ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO .....	61
6.6.1. A EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS .....	61
6.6.2. OS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO .....	61

6.6.3. ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO.....	62
6.6.4 ESCOLHA DOS NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RAÇÃO ANIMAL .....	62
6.6.5 ESCOLHA DOS NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO E CÉREBRO.....	63
6.7 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS EM MATRIZ DE RAÇÃO ANIMAL .....	63
6.7.1 MÉTODO 1: EXTRAÇÃO COM SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM.....	64
6.7.2 MÉTODO 2: DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA (MSPD).....	65
6.8 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS DE AMOSTRA DE FÍGADO DE RATO.....	68
6.9 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS DE AMOSTRAS DE CÉREBRO DE RATO	
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
7.1 LIMPEZA DA VIDRARIA.....	72
7.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	73
7.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO (GC/ECD) .....	76
7.3.1. REPETITIVIDADE: ÁREAS E TEMPO DE RETENÇÃO .....	76
7.3.2. LINEARIDADE E CURVA ANALÍTICA, LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	78
7.3.3. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	79
7.4. AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS NAS DIFERENTES MATRIZES .....	80
7.4.1. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS DAS AMOSTRAS DE RAÇÃO ANIMAL .....	80
7.4.1.1 MÉTODO PROPOSTO: EXTRAÇÃO COM SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM .....	82
7.4.1.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	85
7.4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS (FÍGADO E CÉREBRO) DE RATO MACHO DE LEWIS.....	88
7.4.2.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA AMOSTRAS DE FÍGADO E CÉREBRO DE RATOS .....	91
7.5. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO ESTUDO BIOLÓGICO.....	95
7.5.1 ESTUDOS DE QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RAÇÃO BASAL ANIMAL .....	95
7.5.2 ESTUDOS DE QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO E CÉREBRO DE RATOS.....	98
8 CONCLUSÕES .....	105
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	113
ANEXO I – RESUMO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP (PROC. 2006/60506-1) .....	113
ANEXO II - DESCARTE DE RESÍDUOS .....	115
ANEXO III - CURVAS ANALÍTICAS PARA OS PESTICIDAS ESTUDADOS .....	116
ANEXO IV- CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE RAÇÃO ANIMAL ANALISADAS .....	117
ANEXO V- CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE FÍGADO DE RATO ANALISADAS.....	118
ANEXO VI- CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE CÉREBRO DE RATO ANALISADAS .....	123
ANEXO VII – PESO DOS ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	10

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo de defensivos agrícolas no Brasil no período de 1964-2000. (Em toneladas de ingrediente ativo) FONTE: ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal, 2008.	24
Figura 2: Estrutura química do dieldrin.	25
Figura 3: Rota de degradação do pesticida aldrin em dieldrin (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2002a).	26
Figura 4: Estrutura química dos isômeros da molécula de dicofol.	27
Figura 5: Estrutura química da molécula de diclorobenzofenona.	28
Figura 6: Estrutura química dos isômeros (a) $\alpha$ -endosulfan e (b) $\beta$ -endosulfan.	29
Figura 7: Estrutura química da molécula de diclorvos.	32
Figura 8: Estrutura química dos isômeros da molécula da permetrina.	35
Figura 9: Amostra de ração animal preparada em misturador de inox, envolvidas em papel alumínio e congeladas em freezer a $-18^{\circ}\text{C}$ .	53
Figura 10: Animais utilizados no experimento: ratos isogênicos machos da linhagem Lewis.	55
Figura 11: Gaiolas utilizadas durante o experimento para acomodação dos animais.	56
Figura 12: Amostras de fígado e cérebro de ratos machos da linhagem de Lewis utilizados durante o experimento.	57
Figura 13: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em ração animal (adaptado de LIU et al., 2007)	65
Figura 14: Ilustração do preparo da coluna de extração.	66
Figura 15: Ilustração do procedimento de extração utilizando a dispersão em fase sólida.	67
Figura 16: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em ração animal utilizando dispersão de matriz em fase sólida.	67
Figura 17: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em fígado de rato macho de Lewis.	69
Figura 18: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em cérebro de rato macho de Lewis.	71
Figura 19: Cromatograma referente a limpeza da vidraria obtido de acordo com as seguintes condições cromatográficas: CG-ECD (VARIAN-3300) – coluna: ZB-5(30mx0.25mm,0.2 $\mu$ m). Programação de Temperatura: $170^{\circ}\text{C}(1\text{min}) \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 250^{\circ}\text{C}(10\text{min}) \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 280^{\circ}\text{C}$ . $T_{\text{detector}}: 300^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{injetor}}: 210^{\circ}\text{C}$ . Volume de injeção: 1 $\mu$ L.	72

- Figura 20: Perfil Cromatográfico de uma solução padrão contendo a mistura de pesticidas em isooctano (1ng/μL). CG-ECD, coluna: ZB-5(30mx0.25mm,0.2μm).  
 Programação de Temperatura:  
 $170^{\circ}\text{C}(1\text{min}) \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 250^{\circ}\text{C}(10\text{min}) \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 280^{\circ}\text{C}$ .  $T_{\text{detector}}: 300^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{injetor}}: 210^{\circ}\text{C}$ . Volume de injeção: 1μL. 1: Dicofol; 2: Endosulfan-α; 3: Dieldrin; 4: Endosulfan-β; 5: Permetrina-cis; 6: Permetrina-trans. (\*) picos provenientes do dicofol 73
- Figura 21: Fragmentogramas no modo *Scan* dos isômeros I e II do pesticida dicofol (TOLEDO NETTO, 2009). 75
- Figura 22: Cromatogramas obtidas pela injeção dos extratos redissolvidos em isooctano das amostras de ração basal fortificadas com a mistura de pesticidas extraídos utilizando o método 2 para os diferentes cartuchos. 1- dicofol; 2- endosulfan-α; 3-dieldrin; 4-endosulfan-β; 5-permetrina cis-trans. 82
- Figura 23: Cromatograma obtido pela injeção de 1μL do extrato em da amostra de ração basal controle (A), amostra ração basal fortificada com Dicofol (B), Permetrina (C), Endosulfan (D), Dieldrin (E), Diclorvos (F) e mistura dos pesticidas (G) extraídas utilizando o método 1. 1- dicofol; 2-endosulfan-α; 3-dieldrin; 4-endosulfan-β; 5-permetrina cis-trans; 6-diclorvos. 84
- Figura 24: Comparação entre o cromatograma obtido da amostra de ração basal controle e da amostra fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan-α; 3-dieldrin; 4-endosulfan-β; 5-permetrina cis-trans; 6-diclorvos. 85
- Figura 25: Cromatogramas obtidos das extrações das amostras de fígado controle fortificadas com os pesticidas de interesse: dicofol, dieldrin, endosulfan, permetrina e mistura de pesticidas. 89
- Figura 26: Cromatogramas obtidos das extrações das amostras de cérebro controle fortificadas com os pesticidas de interesse: dicofol, dieldrin e endosulfan. 90
- Figura 27: Comparação entre o cromatograma obtido do fígado controle e da amostra de fígado fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan-α; 3-dieldrin; 4-endosulfan-β; 5-permetrina cis-trans. 91
- Figura 28: Comparação entre o cromatograma obtido do fígado controle e da amostra de fígado fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan-α; 3-dieldrin; 4-endosulfan-β. 92

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Sumário de algumas propriedades químicas dos pesticidas em estudo	36
Tabela 2: Composição da Dieta Padrão AIN-93M utilizada no preparo da ração animal (reprodução do rótulo do produto, tal qual fornecido)	51
Tabela 3: Composição da Ração fornecida aos animais durante o experimento.	53
Tabela 4: Condições Cromatográficas utilizadas para análises dos pesticidas.	60
Tabela 5: Estimativa da concentração de pesticidas nos animais alimentados com a ração preparada no estudo.	63
Tabela 6: Valores de tempo de retenção, áreas e CV para os pesticidas estudados.	76
Tabela 7: Intervalos de Linearidade (IL) e Coeficientes de Variação (CV%) para as amostras enriquecidas com a mistura dos pesticidas estudados.	78
Tabela 8: Valores de limites de detecção (LD), de limites de quantificação (LQ) e $r^2$ do sistema GC/ECD para os pesticidas estudados em isooctano.	80
Tabela 9: Valores de recuperação (%) para os dois métodos testados no nível de concentração de 0,6 µg/g para cada pesticida.	81
Tabela 10: Valores de limites de quantificação (LQ) do método 1 e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas nas amostras de ração animal.	87
Tabela 11: Valores de limites de quantificação (LQ) e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas organoclorados e permetrina das amostras de fígado de rato.	94
Tabela 12: Valores de limites de quantificação (LQ) e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas organoclorados das amostras de cérebro de rato.	95
Tabela 13: Valores de concentração encontrados nas amostras de ração basal animal.	96
Tabela 14: Valores de concentração dos pesticidas encontrados nas extrações das amostras de fígado de ratos machos de Lewis.	100
Tabela 15: Sumário dos resultados obtidos para determinação dos pesticidas estudados em matriz de fígado de ratos Lewis	102
Tabela 16: Valores de concentração dos pesticidas encontrados nas extrações das amostras de cérebro de ratos machos de Lewis.	103
Tabela 17: Sumário dos resultados obtidos para determinação dos pesticidas estudados em matriz de cérebro de ratos Lewis	105

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ANDEF** Associação Nacional de Defesa Vegetal

**CEMIB** Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

**COBEA** Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

**CRMs** Materias de Referência Certificados

**DDT** Diclorodifeniltricloroetano

**DP ou SD** Desvio Padrão

**ECD** Detector de Captura de Elétrons

**EI** Impacto Eletrônico

**GAMA** Ácido Gama-Amino-Butirico

**GC** Cromatografia Gasosa

**GPC** Cromatografia de Permeação em Gel

**IDA** Ingestão Diária Aceitável

**HCB** Hexaclorociclobenzeno

**HCH** Hexaclorociclohexano

**LLE** Extração Líquido-Líquido

**LMR** Limite Máximo de Resíduo

**LOEL** Menor Nível de Efeito Adverso Observável

**MAE** Extração Assistida por Microondas

**MS** Espectrometria de Massas

**MSPD** Dispersão da Matriz em Fase Sólida



**NCI** Ionização Química Negativa

**NOEL** Nível Sem Efeito Observável

**PARA** Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

**PCI** Ionização Química Positiva

**PLE** Extração por Líquido Pressurizado

**SPE** Extração em Fase Sólida

**SFE** Extração por Fluido Supercrítico

**USEPA** Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

**WHO** Organização Mundial da Saúde

## 1. Introdução

Desde os primórdios da humanidade, a produção de alimentos definiu a posição política e econômica de uma sociedade. De forma que a qualidade atribuída à produção dos alimentos encarrega-se de trazer muito mais do que simplesmente um requisito de qualidade do produto, mas também todo o ciclo de produção, envolvendo a tecnologia aplicada e o uso de insumos.

A agricultura tem sido apontada como uma das principais atividades produtivas responsáveis pela degradação do ambiente, principalmente devido à grande extensão de terra utilizada. O crescimento populacional mundial demandou a intensificação da agricultura, que para atender a necessidade cada vez maior de produção de alimentos tornou-se dependente de insumos químicos e físicos, os quais causam impactos negativos nos diferentes compartimentos do ambiente. (CISCATO et al., 2004).

Os resíduos de pesticidas são encontrados em todos os compartimentos ambientais, especialmente os pesticidas organoclorados, que, ainda são objeto de estudo freqüente devido sua elevada persistência no ambiente, o que justifica a atenção a eles dedicada, mesmo nas avaliações mais recentes. (TOMITA; BEYRUTH, 2002). Por apresentarem alta lipofilicidade são bioacumulados, aparecendo também em organismos, inclusive no homem, em todas as partes do globo terrestre.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em um relatório de 1990 estimava que 50 milhões de pessoas em países em desenvolvimento estavam submetidas a uma elevada exposição a pesticidas, sendo que este número alcançava 500 milhões para baixa exposição. Além disso, os casos de intoxicações crônicas são ainda maiores e os casos de dermatoses foram estimados em 700 mil por ano. Os diagnósticos de câncer podem atingir cerca de 40 mil por ano e os que causam seqüelas neurocomportamentais estariam em torno de 25 mil casos anuais (ALVES FILHO, 2002; PIRES, 2005).

No Brasil a introdução dos pesticidas organoclorados teve início em 1943, quando chegaram ao país as primeiras amostras de DDT. Em 1946 foram introduzidos os inseticidas sistêmicos. Durante os anos de 1954 a 1960, foi intenso o processo de registro de novos produtos junto ao Ministério da

Agricultura, o número divulgado era de 2045 produtos registrados no período (CISCATO et al. 2004).

Segundo Ciscato et al. (2004), o consumo de pesticidas no Brasil é de aproximadamente 3,4kg de ingrediente ativo por hectare, ocupando a oitava posição em um *ranking* liderado pela Holanda que consome aproximadamente 10 kg de ingredientes ativos por hectare cultivado.

A associação entre o alto consumo e o completo despreparo para a utilização de tecnologia química no contexto atual da agricultura brasileira tem potencializado a ocorrência de danos, os quais têm início na exposição ocupacional, passa pela exposição ambiental e podem atingir a população em geral, pela contaminação dos alimentos e dos mananciais de abastecimento (ALVES FILHO, 2002).

Durante as duas últimas décadas o monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos no Brasil foi realizado por órgãos isolados do governo e instituições de pesquisas. Essa situação promoveu a necessidade de discutir estratégias de monitoramento que aperfeiçoassem a atuação desses órgãos e permitissem à população melhor conhecimento da qualidade dos alimentos consumidos no país (ANVISA, 2004).

Dessa forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) iniciou em 2001, o Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), visando avaliar a qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de pesticidas. O projeto inicial foi transformado em programa através da Resolução RDC 119 de 19 de maio de 2003 (ANVISA, 2006).

Assim, o PARA é uma ferramenta para garantir a qualidade e segurança alimentar no que diz respeito aos resíduos de pesticidas em alimentos consumidos em todo território nacional (ANVISA, 2004).

Na execução do PARA, a ANVISA trabalha em conjunto com as Coordenações de Vigilância Sanitária dos estados brasileiros envolvidos. Atualmente fazem parte do PARA os seguintes Estados: Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraíba, Paraná,

Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins. As coordenações de Vigilância Sanitária desses estados são responsáveis pelos procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados e envio aos laboratórios credenciados do programa.

Em 2008 foram monitoradas pelo PARA cerca de 17 culturas (abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate e uva) escolhidas com base nos dados fornecidos pela cesta básica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (ANVISA, 2010b).

Em seus últimos relatórios do PARA, a ANVISA indicou que a população brasileira também está exposta a resíduos de pesticidas. Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) pesquisou 4.001 amostras de alimentos in natura (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 apresentaram resíduos de pesticidas, sendo que 931 (28,5%) amostras continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (16,6%) ou continham resíduos de produtos não-autorizados para aquele tipo de cultura (83,4%). As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates analisados entre 2001 e 2004, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, diendrin, endossulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvos), e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis de resíduos estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2010).

No ano de 2008, os relatórios do PARA indicaram que novos alimentos apresentavam resultados irregulares, como por exemplo, alface (19,8%), cenoura (30,4%), laranja (14,9%), mamão (17,3%), pimentão (64,4%) e uva (32,7%), além dos comumente afetados em relatórios anteriores como tomate (18,3%), morango (36,1%) e maçãs (3,9%) (ANVISA, 2010b).

Os contaminantes encontrados pela ANVISA pertencem a diferentes classes de pesticidas, como por exemplo, organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan), organofosforados (diclorvos monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós) e piretróides (permetrina e cialotrina). Embora o potencial cancerígeno dos pesticidas organoclorados seja controverso existem inúmeras evidências associando-os à promoção da carcinogênese (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1998; HOWSAM et al, 2004). Semelhantemente a alguns organoclorados, os pesticidas diclorvos e permetrina são apontados pelo USEPA como de evidência sugestiva de potencial cancerígeno, quando testados em roedores (USEPA, 2005). A estimativa do risco da exposição aos diferentes tipos de pesticidas é complexa e devemos considerar possíveis efeitos somatórios ou sinérgicos que podem ocorrer quando há exposição concomitante e ou prolongada a dois ou mais destes agentes.

Além do câncer, outro efeito da exposição a substâncias químicas vem sendo investigado mais recentemente e trata-se da atuação sobre o sistema hormonal na forma de alteradores endócrinos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Muitas substâncias consideradas alteradores endócrinos foram classificadas primeiramente como micro-poluentes orgânicos. Esta classe inclui compostos tais como alquilfenóis, alquilfenóis polietoxilados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas, ftalatos, bisfenol-A, retardantes de chama polibromados, dioxinas, furanos, pesticidas e hormônios esteróides. À medida que o conhecimento sobre os alteradores endócrinos aumenta, cresce também a lista dos compostos suspeitos de apresentar este comportamento (HOEKSTRA et al., 2006).

Desta maneira, embora a presença de pesticidas em matrizes ambientais e biológicas venha sendo investigada há décadas, estudos sobre a atuação de baixas concentrações de misturas destes contaminantes como agentes carcinogênicos e alteradores endócrinos ainda são incipientes. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Estudos envolvendo a exposição a agentes químicos e os efeitos fisiológicos desta exposição têm suas conclusões influenciadas de forma inquestionável pela exatidão e precisão dos resultados químico-analíticos gerados a partir do meio de exposição (dieta e/ou ambiente) e dos fluidos ou tecidos biológicos analisados.

Desta maneira é imprescindível assegurar a qualidade dos dados químico-analíticos gerados, o que deve ser feito utilizando-se técnicas e métodos sensíveis, seletivos, exatos e precisos e que tenham sido validados para as matrizes de interesse.

No projeto temático, no qual esse trabalho de doutorado está inserido propôs explorar a questão da toxicidade de pesticidas e sua eventual importância para a saúde humana utilizando modelos com ratos machos de Lewis expostos a esses agentes via oral ou cutânea. Ao todo são sete subprojetos distribuídos em diferentes linhas de pesquisa explorando os efeitos da exposição prolongada e à baixas doses de uma mistura de cinco praguicidas cujos resíduos foram encontrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano de 2005 que são: dicofol, permetrina, dieldrin, endosulfan e diclorvos. Cada linha de pesquisa contém um subprojeto que objetiva aperfeiçoar e validar métodos de análise e determinação química dos pesticidas estudados. A coordenação deste projeto temático, aprovado pela Fapesp em setembro/2007, é exercida pelo Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo da Faculdade de Medicina da UNESP, em Botucatu.

Desta maneira, no primeiro capítulo desta tese é apresentado um breve histórico sobre a utilização de pesticidas no mundo e no Brasil, em particular, além de uma abordagem sucinta sobre as características químicas e toxicológicas das classes de pesticidas aqui estudadas (organoclorados, organofosforados e piretróides), bem como a sua ocorrência no ambiente, em alimentos e tecidos biológicos e as estratégias analíticas utilizadas para a sua determinação nestas matrizes.

Tendo como cenário o contexto apresentado no capítulo inicial, o segundo capítulo traz as justificativas e objetivos desta tese, enquanto que no capítulo três detalha a parte experimental, cujo desafio central foi o

desenvolvimento e validação de métodos para análise dos pesticidas de interesse em três matrizes: ração animal, cérebro e fígado de ratos machos de Lewis incluídas em estudo de toxicologia experimental, no âmbito do projeto temático supra citado.

O capítulo quatro apresenta os dados obtidos e os discute no contexto do projeto temático e da literatura recente. Finalmente, o capítulo cinco encerra este trabalho, trazendo as conclusões e as considerações finais pertinentes.

## **2. Pesticidas - Histórico, características físico-químicos, comportamento toxicológico e ocorrência ambiental e em alimentos**

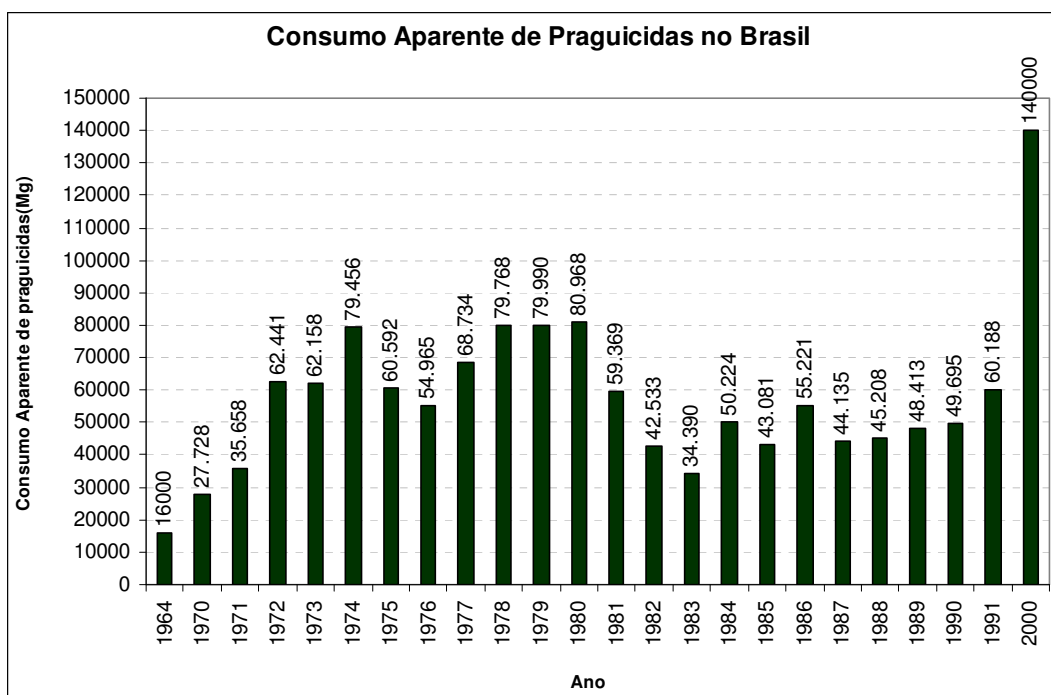
Pesticida é a denominação utilizada para diversos produtos químicos, sintéticos ou naturais, utilizados intensamente na agricultura moderna para combater a proliferação de insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, roedores e outras pestes (BARBOSA, 2004). Embora a recomendação feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a utilização do termo “pesticida”, no Brasil e em alguns países latino-americanos, os termos praguicida, agrotóxico e defensivo agrícola também são utilizados para definir essa extensa gama de substâncias. Neste trabalho o termo utilizado será pesticida, por ser a terminologia mais comumente utilizada em trabalhos analíticos envolvendo o estudo dessas substâncias.

A era dos pesticidas sintéticos orgânicos começou por volta de 1940 e desde então têm fornecido enormes benefícios à agricultura, aumentando a produção e a qualidade das colheitas devido ao fato de que as pestes e as doenças danificam até um terço das colheitas (CHU et al., 2005).

O crescimento rápido do uso dos pesticidas e a pesquisa técnica insuficiente geraram muitos problemas ambientais e tem exposto indiretamente os seres humanos aos praguicidas, através de resíduos presentes em certos gêneros alimentícios (COUTINHO et al., 2005).

Nas últimas décadas o uso de pesticidas no Brasil vem crescendo muito. Em 1964, o consumo total de pesticidas era de 16 mil toneladas, passando para 60 mil toneladas no ano de 1991, chegando a 140 mil toneladas em 2000, representando um aumento no consumo de 276% entre 1964 e 1991 e de 176% entre 1991 e 2000 (Figura 1).





**Figura 1: Consumo de defensivos agrícolas no Brasil no período de 1964-2000. (Em toneladas de ingrediente ativo) FONTE: ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal, 2008.**

A diversidade em termos de composição química dos pesticidas é muito grande, de acordo com essas diferenças eles podem ser classificados em grupos separados, os quais compreendem propriedades físicas e químicas diferentes, áreas de aplicação e atuação distintas e diferentes níveis de toxicidade (ALVES FILHO, 2002; BARBOSA, 2004; COUTINHO et al., 2005; COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

A seguir, serão apresentadas as principais características de cada uma das classes de pesticidas que foram estudadas neste trabalho.

## 2.1 Pesticidas Organoclorados

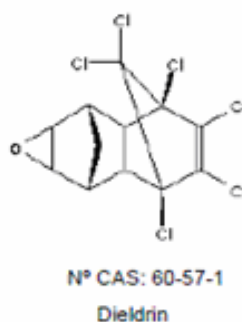
Os pesticidas organoclorados correspondem a uma classe de compostos, os quais foram utilizados de forma eficiente como inseticidas e em grande escala na agricultura e para controle de doenças.

Essa classe de substâncias tem em comum a presença de átomos de cloro na estrutura química, alta lipossolubilidade e suas propriedades físico-químicas conferem a essas substâncias destilação global e elevada persistência ambiental. Embora, essas substâncias sejam conhecidas de longa data mais estudos são necessários para ampliar o entendimento do seu comportamento no ambiente e avaliar o risco para a saúde nos mais variados compartimentos ambientais e na cadeia alimentar até o homem (BARBOSA, 2004).

Dentre os pesticidas encontrados pela ANVISA como contaminantes nas amostras de alimentos analisadas três são organoclorados. São eles, o dieldrin, o dicofol e o endosulfan.

### 2.1.1 Dieldrin

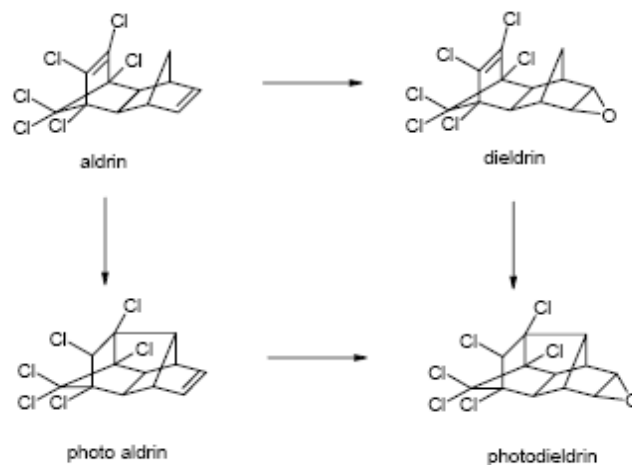
O dieldrin (Figura 2) foi sintetizado nos EUA pela primeira vez em 1948. Dos anos 50 até 1970, foi muito utilizado nas culturas de algodão e milho até 1970, quando os seus registros foram cancelados. Em 1972, entretanto, a EPA aprovou o aldrin e dieldrin para fins de controle de pragas. O uso para controlar pragas continuou até 1987, quando o fabricante cancelou voluntariamente o registro dessas substâncias (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2002a).



**Figura 2: Estrutura química do dieldrin.**

O dieldrin e o aldrin são inseticidas sintéticos com similaridades na forma estrutural e não ocorrem naturalmente no ambiente. Quando puro o

dieldrin e o aldrin apresentam-se na forma de pó branco e odores químicos suaves. Esses inseticidas são encontrados no solo e na água, ou nas plantas e nos animais de locais próximos a sua utilização. As duas substâncias são discutidas juntas, uma vez que incorporada ao ambiente ou ao organismo, a molécula de aldrin se transforma prontamente em dieldrin pela ação da luz solar ou de bactérias (Figura 3).



**Figura 3: Rota de degradação do pesticida aldrin em dieldrin (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY,2002a).**

Grandes quantidades desses pesticidas foram lançadas no ambiente durante sua utilização no controle de pragas na agricultura. Ainda hoje podemos encontrar o dieldrin nos lugares onde o aldrin foi originalmente utilizado. As moléculas de dieldrin presentes no solo ou na água degradam lentamente, podendo permanecer inalteradas por muitos anos e as plantas presentes em áreas contaminadas podem armazená-lo em suas folhas e raízes.

A solubilidade desse pesticida em água é pequena e conseqüentemente não é encontrado em concentrações elevadas nesse meio. Os peixes ou os animais expostos a contaminação com dieldrin acumulam essa substância em sua gordura. Os animais ou os peixes que comem outros animais têm níveis de dieldrin em sua gordura muitas vezes mais significantes do que os animais ou

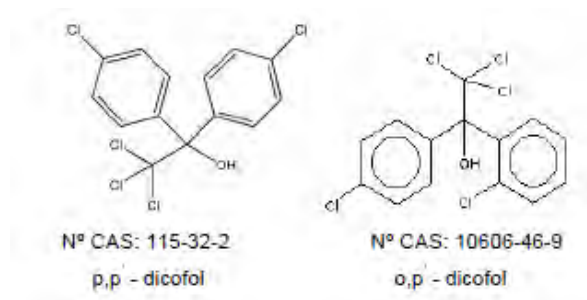
os peixes que comem plantas, devido a biomagnificação dessa classe de pesticida.

Partículas de poeira contendo dieldrin podem viajar grandes distâncias transportadas pelo vento, o que justifica a contaminação de áreas onde nunca foi utilizado.

Na maioria dos casos, a maior fonte de exposição ao dieldrin acontece com a ingestão de alimentos contaminados, como por exemplo, peixes ou legumes e verduras, colheitas de raiz, produtos lácteos e carnes (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

### 2.1.2 Dicofol

O dicofol (Figura 4), um acaricida organoclorado e com pequena atividade inseticida, foi introduzido na agricultura em 1955, tendo sido largamente utilizado no controle de muitas espécies de ácaros, em uma grande gama de culturas de frutas e vegetais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010c).



**Figura 4: Estrutura química dos isômeros da molécula de dicofol.**

Sua produção, formulação e uso difundido como um dos acarídeos no algodão e em colheitas comestíveis foram fontes potenciais de exposição dos trabalhadores e da população em geral (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1998). Durante esse período, nenhum estudo estava disponível para avaliar os efeitos teratogênicos ou carcinogênicos nos seres

humanos e não havia relatório de caso ou estudo epidemiológico da dicofol disponível.

O efeito carcinogênico do dicofol foi avaliado mais tarde em ratos pela administração dessa substância na dieta alimentar. Em alguns casos observou a indução de carcinomas hepatocelulares nos ratos masculinos e mesmo quando administrado em doses elevadas não observou nenhum efeito na reprodução ou no desenvolvimento fetal dos animais (SCHWARZBACH, 1991).

Entretanto, as doses elevadas nos ratos pareceram ter um efeito adverso em estágios do desenvolvimento embrionário. Os protocolos e os resultados experimentais dos estudos não foram apresentados como adequado para que uma avaliação total da mutagenicidade do dicofol e fornecem evidência limitada no que diz respeito ao efeito carcinogênico em animais experimentais (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1998).

O produto comercial do pesticida dicofol possui em sua composição uma mistura de dois isômeros denominados de o,p' e p,p' de acordo com a posição do átomo de cloro no anel benzênico, traços de DDT e seus derivados DDD e DDE (TOMLIN, 2004). Em meio ácido a molécula de dicofol apresenta estabilidade. Já em meio alcalino, o dicofol hidrolisa formando a diclorobenzofenona (Figura 5), nesse caso o isômero o,p' é hidrolizado mais rapidamente que o isômero p,p'. Outra forma de degradação desse pesticida acontece quando há exposição à luz e o produto formado também é a diclorobenzofenona. Este produto de degradação têm sido o principal composto encontrado em animais e plantas, quando são administrados com dicofol.



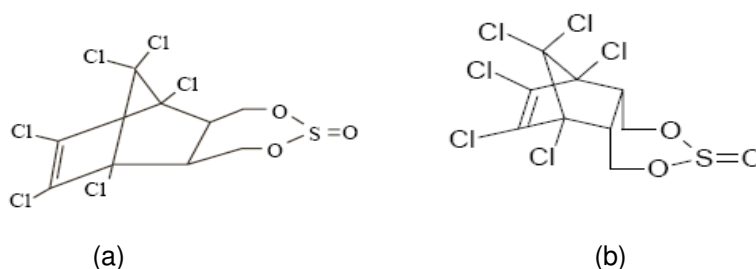
**Figura 5: Estrutura química da molécula de diclorobenzofenona.**

O dicofol possui  $K_w$  igual a 4,30 (coeficiente de partição octanol-água) o que favorece o acúmulo em tecidos lipídicos, assim como dieldrin e endosulfan, citados anteriormente (TOMLIN, 2004).

O pesticida dicofol tem sido indicado como alterador do sistema endócrino apresentando alta afinidade por receptores de moléculas de esteróides. Como na sua composição podem ocorrer traços de DDT com diversas características tóxicas, esse pesticida pode atuar como promotor de tumores, já sendo observado a incidência aumentada de tumores hepáticos em camundongos, após exposição a altas doses à longo prazo desse pesticida (HOEKSTRA et al, 2006).

### 2.1.3 Endosulfan

O endosulfan, também um inseticida organoclorado, foi introduzido nos EUA em 1954 pela Farbwerke Hoechst A.G, registrado como Thiodan® (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2000). Na formulação do produto comercial encontram-se duas formas químicas o  $\alpha$ -endosulfan e o  $\beta$ -endosulfan (Figura 6) as quais possuem propriedades químicas semelhantes aos isômeros do HCH.



**Figura 6: Estrutura química dos isômeros (a)  $\alpha$ -endosulfan e (b)  $\beta$ -endosulfan.**

Essas substâncias foram utilizadas para controlar o número de insetos em lavouras de alimentos tais como grãos, chás, frutas, e vegetais e em lavouras de tabaco e algodão, e usado igualmente como um preservativo de madeira. É considerado como altamente tóxico (classe I) de uso restrito e autorizado para a aplicação foliar em culturas de algodão, cacau, café, cana-

de-açúcar e soja pela ANVISA em alguns estados do Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010c).

O endosulfan é liberado para o meio ambiente durante sua produção ou quando usado como um inseticida, aplicado freqüentemente às colheitas usando pulverizadores.

O endosulfan aplicado nas lavouras permanece durante algumas semanas nas áreas de aplicação. Entretanto, pode permanecer inalterado no solo por diversos anos. A água da chuva pode carregar o endosulfan adsorvido às partículas do solo até as água de superfície, como essa substância não se dissolve facilmente na água, a maioria de endosulfan presente na água esta aderido as partículas do solo que flutuam ou unido ao sedimento (TOMLIN, 2004).

Os animais que vivem em águas contaminadas com endosulfan podem acumular a substância na parte lipídica de seus corpos. A quantidade de endosulfan em seus corpos pode ser diversas vezes maior do que na água circunvizinha. Dessa forma, a maneira mais provável para que o homem seja exposto ao endosulfan será pela ingestão do alimento contaminado. O endosulfan foi encontrado em alguns alimentos tais como óleos, gorduras, frutas e verduras (HACK et al., 1995; EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 2009a).

A exposição aos baixos níveis de endosulfan pode igualmente ocorrer pelo contato dérmico ou fumando os cigarros feitos do tabaco que contem resíduos do endosulfan. Outra fonte de exposição é a ocupacional, quando os trabalhadores podem respirar o produto químico ao pulverizar o inseticida em lavouras (PIRES et al., 2005; VEIGA et al., 2006).

Todas essas substâncias tiveram sua eficácia inseticida comprovada tendo sido amplamente utilizadas. Contudo os efeitos para saúde humana ainda estão sendo estudados, principalmente a interferência endócrina e a carcinogenese em pequenas concentrações. Enquanto alguns dos mecanismos tóxicos já estão claros, outros ainda precisam ser melhor elucidados (HACK et al., 1995; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON

CANCER, 1998; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2000).

Além da sua ação tóxica em mamíferos, os organoclorados por sua persistência e propriedades físico-químicas sofrem transporte e dispersão no ambiente. Podem ser transportados por processos de solubilização, adsorção, remobilização, bioacumulação e volatilização, por possuírem relativa alta volatilidade, elevada constante de Henry e baixa reatividade (TOMLIN, 2002).

Os organoclorados ainda estão em uso na África e Índia para controle de vetores e possivelmente em uso no Brasil, através do tráfico.

Todos esses fatos demonstram que embora a proibição e restrição do uso dessas substâncias tenham acontecido há décadas, a exposição a elas é muito freqüente, e essas estão presentes no cotidiano das populações pelas vias ambientais e principalmente pela cadeia alimentar (CALDAS, SOUZA, 2000).

## **2.2 Pesticidas Organofosforados**

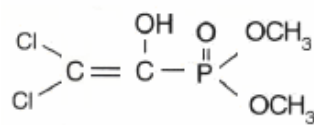
Os pesticidas classificados como organofosforados possuem como característica principal a presença de um átomo de fósforo (P) em sua estrutura. A diversidade estrutural dessa classe confere aos pesticidas organofosforados propriedades físicas e químicas distintas, como volatilidade e solubilidade em água, permitindo o uso dessas substâncias em diferentes aplicações (BARBOSA, 2004).

Com os estudos e as descobertas sobre o efeito de bioacumulação e persistência dos organoclorados, os inseticidas organofosforados tornaram-se extremamente importantes na agricultura. Apesar dos inseticidas organofosforados serem menos persistentes no ambiente que os clorados, apresentam toxicidade aguda (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003; BARBOSA, 2004; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1998), implicando maior cuidado na aplicação do produto e maior risco de exposição (PIRES et al., 2005; VEIGA et al., 2006).



Os compostos organofosforados atuam no sistema nervoso de maneira diferente dos organoclorados que desestabilizam a atividade neural. No caso dos organofosforados devido à semelhança estrutural com a acetilcolina, o grupo fosfato se liga ao sítio esterásico da acetilcolinesterase, no mesmo local onde se ligaria o grupo acetato da acetilcolina, ocorrendo a reação de fosforilação enzimática. Como o tempo gasto para a recuperação da enzima fosforilada é aproximadamente um milhão de vezes maior que no caso de uma catálise enzimática do grupo acetato da acetilcolina, a intoxicação por essas substâncias é aguda e requer um tratamento rápido e em algumas vezes com antídotos que atuam bloqueando o excesso de acetilcolina ou acelerando a desfosforilação da acetilcolinesterase (COUTINHO et al., 2005).

Dentre os pesticidas organofosforados encontrados nas amostras de alimentos analisadas pela ANVISA, está o diclorvos (Figura 7).



**Figura 7: Estrutura química da molécula de diclorvos.**

A molécula de diclorvos não ocorre naturalmente no meio ambiente. A substância pura é apresentada como um líquido denso e incolor, de cheiro adocicado, evapora facilmente em contato com o ar e se dissolve parcialmente em água (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

Em 1984, cerca de 1 milhão de libras de diclorvos foi fabricado nos Estados Unidos. Comercialmente pode ser encontrado com diferentes nomes, como por exemplo, Vapona®, Atgard®, Nuvan® e Task®. Vapona®, åtgård, Nuvan® e ® Tarefa. O diclorvos também pode ser chamado de DDVP, que é uma abreviatura de seu nome químico completo (O,O-Dimetil-O-(2,2-DichloroViinyl)Phosphate).

O inseticida diclorvos é comumente utilizado na forma de pellets ou tiras, devido sua facilidade de incorporação ao material plástico e sendo

liberado lentamente para o ambiente. Outra forma de apresentação é uma solução diluída com outros líquidos e usado como um spray.

Geralmente não é usado em culturas ao ar livre e sua principal aplicação é no controle de pragas e insetos em áreas de armazenamento de alimentos, estufas e celeiros, como para controle de parasitas em animais de estimação e gado.

Resíduos de diclorvos podem ser encontrados nos diferentes compartimentos ambientais ar, água e solo. Durante o seu processo de fabricação, os resíduos gerados são eliminados em aterros sanitários e a pela ação da chuva podem ser carregados para o solo e águas.

O diclorvos evapora facilmente e por isso geralmente é aplicado em áreas fechadas. Uma vez no ar, ele pode reagir com o vapor de água e ser facilmente degradado e distribuído por todo o ambiente. Quanto maior a temperatura e a umidade do local, mais rapidamente o diclorvos será dissipado. Experiências em estufas e áreas de armazenamento de alimentos mostram que 90% do diclorvos aplicado desapareceu em 3-6 horas após aplicação. O produto desta degradação é o produto químico chamado de fosfato-dimetil-dicloroacetaldeído (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

### **2.3 Pesticidas Piretróides**

As piretrinas são inseticidas de origem botânica conhecidas desde 1800 na Ásia quando eram usadas para exterminar vários insetos tais como pulga e mosquitos. Esses inseticidas naturais são extraídos do *pyrethrum*, o óleo-resina do *Chrysanthemum cinerariaefolium* e do *Chrysanthemum coccineum*. O extrato do *pyrethrum* é composto por seis substâncias com atividade inseticida: os ésteres do ácido crisatêmico - piretrina I, cinerina I e jasmolina I; e os ésteres do ácido pirétrico - piretrina II, cinerina II e jasmolina II (BARBOSA, 2004).

Todavia sua utilização mais intensa tem acontecido na atualidade, principalmente após modificações estruturais originando a classe de inseticidas piretróides.

Os piretróides surgiram a partir de modificações na estrutura química das piretrinas, se tornaram mais tóxicos e mais estáveis no ambiente. Atualmente existem mais de mil substâncias desenvolvidas a partir dessas estruturas químicas.

Os piretróides permitem apresentar de dois a oito isômeros do mesmo inseticida, conseqüentemente os produtos comerciais são misturas de isômeros. Esta característica de isomeria influencia diretamente a toxicidade dessas substâncias. Contudo, tanto os isômeros *cis* quanto os *trans* apresentam atividade inseticida. Porém existem diferenças na toxicidade para mamíferos, sendo mais potente o isômero *cis* (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

Os piretróides são agrupados em duas classes: Tipo I (não possui grupamento ciano) e Tipo II (possui grupamento ciano), de acordo com a presença do grupamento ciano, o que determinará suas características toxicológicas e algumas propriedades físicas (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

Piretróides tipo II, os que possuem o grupamento ciano, demonstram diferente toxicidade baseada no isomerismo óptico em relação ao carbono alfa.

Os piretróides são ligeiramente solúveis na água e solúveis em solventes orgânicos como alcoóis e hidrocarbonetos. São usados frequentemente em inseticidas e em produtos domiciliares para controlar insetos em animais de estimação ou em rebanhos animais.

A maioria dos piretróides comercialmente utilizados encontram-se na forma de mistura de isômeros. Os isômeros presentes na mistura conferem ao pesticida propriedades físico-químicas e toxicidade diferentes.

Essas substâncias são eficientes inseticidas e de amplo uso, contudo, a exposição crônica e intensa por via oral, como é o caso da exposição por resíduos de piretróides em alimentos de diversas origens, poderá causar danos à saúde humana (SCHETTGEN et al., 2002).

Nas amostras avaliadas pela ANVISA, o pesticida da classe dos piretróides encontrado foi a permetrina que é considerada moderadamente

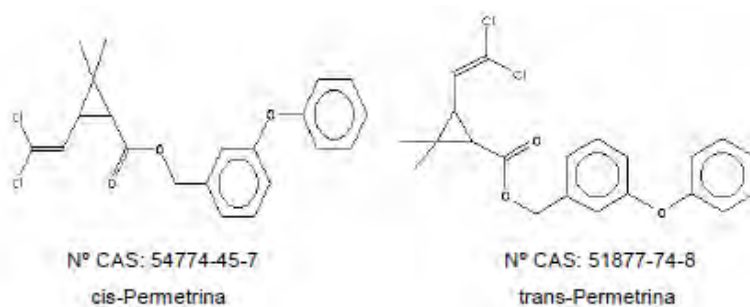
tóxica e apresenta em sua composição uma mistura de dois isômeros, cis e trans (TOMLIN, 2004).

Segundo a ANVISA, a permetrina é aplicada no Brasil nas culturas de algodão, arroz, café, milho, soja, tomate e trigo e está presente nas formulações comerciais para o controle de formigas e baratas, bem como no uso doméstico para controle de insetos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010c).

A permetrina apresenta maior estabilidade em meio ácido e a altas temperaturas. Seu Kow é igual a 6,1, não sendo relatado o acúmulo em tecidos lipídicos e sendo excretada rapidamente. Quanto à sua metabolização em animais, pode ocorrer através de hidrólise (TOMLIN, 2004).

As evidências sobre a carcinogenicidade da permetrina são inconclusivas, embora a fertilidade de fêmeas de rato tenha sido afetada, quando estes receberam doses orais elevadas de permetrina. (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 2009b).

A estrutura química da permetrina, que representa a classe de piretroide do Tipo I está representada na Figura 8.



**Figura 8: Estrutura química dos isômeros da molécula da permetrina.**

Os pesticidas das classes dos organoclorados e piretróides, citados anteriormente, tiveram sua eficácia inseticida comprovada e têm sido muito utilizados. Entretanto, os efeitos para a saúde humana ainda estão sendo

estudados, principalmente, quanto à alteração do sistema endócrino e atividade carcinogênica, mesmo quando a exposição ocorre à baixas concentrações. Além disso, enquanto alguns mecanismos tóxicos já estão claros, outros ainda precisam ser elucidados (COUTINHO et al.,2005)..

As propriedades químicas dos pesticidas em estudo estão na tabela 1.

**Tabela 1: Sumário de algumas propriedades químicas dos pesticidas em estudo**

Pesticidas	Massa Molecular (g/mol)	Solubilidade em água	Kow (logP)
Dieldrin	380,9	0,110**	6,20
Dicofol	370,5	0,8*	4,30
Diclorvos	221,0	18,0**	1,9
$\alpha$ -endosulfan	406,9	0,32**	4,74
$\beta$ -endosulfan	406,9	0,33**	4,79
Cis-permetrina	391,3	$6 \times 10^{-3}$ **	6,1
Trans-permetrina	391,3	$6 \times 10^{-3}$ **	6,1

Fonte: TOMLIN, 2004; Solubilidade em água = \*mg/L a 25° C; \*\* g/L a 25° C

## 2.4 Mecanismos de Ação Tóxica dos Pesticidas

A exposição aos pesticidas pode acontecer por meio de inúmeras fontes, sendo os alimentos, a mais importante. Acredita-se que cerca de 90 % da exposição do homem aos pesticidas dá-se por meio de ingestão de alimentos como frutas, legumes, grãos (ANVISA, 2004), bem como pela ingestão de alimentos de origem animal como peixes, carnes, ovos, leite e seus derivados (CISCATO et al., 2004).

Devido a lipossolubilidade dos compostos organoclorados, o acúmulo em tecidos gordurosos determina a sua capacidade de biomagnificação. Dessa forma, a exposição oral é a mais preocupante no caso de consumo de alimentos com alto teor de gordura (CISCATO et al., 2005).

Estudos experimentais em animais demonstraram que outros sistemas como o renal, hepático, hematológico e o de homeostase bioquímica seriam alvos de ação dos compostos organoclorados e seus isômeros, confirmando os

estudos anteriores (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2005).

Os mecanismos de ação não são, porém, totalmente conhecidos. Há hipóteses que sugerem haver mecanismo de inibição do neurotransmissor ácido gama-amino-butírico (GABA) e outros efeitos de estimulação e inibição do SNC (BARBOSA, 2004).

A toxicidade dos compostos organoclorados varia segundo o isômero. Por exemplo, o  $\alpha$ -HCH parece ser o mais importante desencadeador de nódulos hepáticos e hepatocarcinomas, mas há estudos limitados sobre o mesmo. O  $\beta$ -HCH tende a ser o isômero de maior importância toxicológica devido à sua persistência no ambiente e efeitos estrogênicos em células mamárias de animais, ratos e cobaias. (HOWSAM et al., 2004).

O inseticida organoclorado dieldrin apresenta dose letal ( $DL_{50}$  para ratos) variando de 37 a 46  $mg.kg^{-1}$  sendo classificando como moderadamente tóxico pela Organização Mundial da Saúde (HACK et al., 1995; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2002a). Exposição em níveis moderados de aldrin ou o dieldrin causam por muito tempo dores de cabeça, vertigem, irritabilidade, vômitos, ou movimentos incontrolláveis do músculo abdominal (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

Para o endosulfan são muitas as atuações tóxicas em diversos sistemas do organismo. O endosulfan apresenta neurotoxicidade, pois, abaixa a atividade da acetilcolinesterase no plasma e no cérebro, essa atividade é maior para ratos machos do que para as fêmeas (HACK, 2007).

No sistema renal, a presença de endosulfan pode inibir a atividade do sistema de oxidases e causar necrose no epitélio tubular. O endosulfan também é responsável por perda da glutatona redutase eritrocitária e hemoglobinas. Provoca dispnéia, enfisema agudo, cianose e hemorragia na porção interalveolar do pulmão de ratos. Causa aumento da glicose no sangue, decréscimo significativo da concentração dos íons sódio, potássio e magnésio (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2000).

Piretróides são usados extensivamente como inseticidas, porém apresentam relativamente pouco risco para mamíferos pelas rotas naturais de exposição. Nos níveis de concentração encontrados no ambiente ou pelo resultado do uso domiciliar recomendado promovem pequena taxa de

exposição humana (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

Contudo, a exposição humana aos piretróides torna-se cada dia mais freqüente devido a inúmeras atividades onde são utilizados, na produção de alimentos, fármacos, inseticidas domésticos e produtos veterinários (PIRES, 2005).

As vias de exposição humana a essas substâncias são múltiplas, via dérmica pelos fármacos e exposição ocupacional (para trabalhadores rurais) e vias aéreas pelos inseticidas domésticos, para as quais têm sido relatados inúmeros casos de intoxicação. Como via de exposição oral, a ingestão de alimentos torna-se a mais importante (CALDAS; SOUZA, 2000).

Embora as dose letais agudas para os pesticidas piretroides sejam consideradas altas, a variação entre as respostas classifica o grupo de altamente tóxicos a pouco tóxicos segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), alertando para o risco de exposição oral a essas substâncias.

A variação na toxicidade dessas substâncias depende de fatores como a substância, a relação entre os isômeros e também o veículo de exposição.

Os efeitos sistêmicos causados pela permetrina também são variados, contudo presentes em muitos sistemas: hepático, neurológico, desenvolvimento, reprodutivo (BARBOSA, 2004).

Aumento da massa do fígado, congestão e hipertrofia das células hepáticas foram modificações observadas em animais de teste durante a exposição sub-crônica e crônica a permetrina (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

O primeiro sítio de ação desse pesticida é o canal de sódio nas membranas de células de tecido nervoso, causando repetitiva descarga neural e uma prolongada excitação, análoga a ação neurotóxica do DDT. Outro sítio de ação de atuação principalmente à permetrina é a inibição do transporte dos íons de cálcio, magnésio e interferindo na enzima ATPase. Como resultado, tem-se um aumento dos níveis de cálcio intracelular acompanhado do aumento da liberação do neurotransmissor e da despolarização pós-sináptica (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY; BARBOSA, 2004).

A exposição humana e animal aos pesticidas envolve um fator que aumenta a complexidade de avaliação do risco toxicológico devido sua

característica lipofílica e efeito cumulativo no organismo. Deste modo, possíveis efeitos somatórios ou sinérgicos merecem atenção especial quando há exposição concomitante a dois ou mais pesticidas (CARPENTER, 1998).

### **3. Validação de métodos analíticos**

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método conhecido envolve um processo de avaliação para estimar sua eficiência durante a sua aplicação na análise de amostras de interesse. Esse processo de avaliação é denominado de validação. A validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito de utilização e esta adequado aos critérios e pré-requisitos estabelecidos (BRITO, et al., 2003).

Vários autores definem o conceito de validação de método e existem diversos conceitos e definições elaboradas por agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, com o objetivo de responder o que é validação analítica e de que forma está deve ser realizada. Contudo, esse conceito de validação continua evoluindo e está constantemente sob observação dos órgãos reguladores e pesquisadores.

Segundo a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação de um método deve garantir através de estudos experimentais que o método em questão atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos. Para esse fim, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo de precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados ao processo analítico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Para o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), a validação consiste na comprovação dos requisitos pretendidos para uma aplicação ou uso específico, através de evidencia objetiva dos resultados (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).



Geralmente a validação de um método analítico é separada em dois tipos. A *validação no laboratório*, que consiste nas etapas da validação dentro de um único laboratório, seja na validação de um método novo ou na aplicação de um método já estabelecido. Esse tipo de validação é utilizado em etapas iniciais do desenvolvimento do método analítico, sendo considerada a etapa preliminar à *validação completa* (RIBANI, et al., 2004).

No caso da *validação completa*, todas as características de desempenho do método e um estudo interlaboratorial são realizados para verificação do comportamento do método aplicado a uma determinada matriz em vários laboratórios diferentes, estabelecendo critérios de reprodutibilidade. Só após essa etapa, um método é considerado oficial para uma determinada aplicação (RIBANI, et al., 2004).

No Brasil há duas agências credenciadoras e reguladoras para laboratórios de ensaios oficiais, a ANVISA (Agência Nacional da Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam material de orientação para o procedimento de validação de método analítico, para a ANVISA a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o para o INMETRO, o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003. (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).

### **3.1 Parâmetros para validação de métodos analíticos**

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de método analítico são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRITO, et al., 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).

O parâmetro de *Seletividade* corresponde à capacidade de um método em determinar de maneira inequívoca e segura o analito desejado, mesmo na presença de outras substâncias potencialmente interferentes na sua identificação e determinação, como impurezas, produtos de degradação e componentes da própria matriz. Algumas vezes, o termo *Especificidade* pode

ser empregado como sinônimo de seletividade, nesse caso aplica-se a um método que produz uma resposta para um único analito. Como poucos métodos respondem a apenas um único analito, o termo seletividade é mais apropriado e utilizado (LANÇAS, 2004).

A *Linearidade* do método analítico corresponde a sua capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo ou faixa de aplicação ou trabalho (BRITO et al., 2003). A ANVISA recomenda que a linearidade do método analítico seja determinada pela análise de pelo menos cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003). O intervalo de aplicação ou trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo entre o menor e o maior nível de concentração do analito, onde foi possível a sua determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; BRITO et al., 2003).

Simultaneamente aos testes de *Linearidade* do método analítico obtém-se também a *Sensibilidade* do mesmo. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica e indica a capacidade do método analítico discriminar, com confiança, duas concentrações próximas do analito em estudo (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; BRITO et al., 2003).

O desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação resultante de uma série de medidas fornece o parâmetro da *Precisão* de um método analítico. Portanto, a *Precisão* do método analítico representa a dispersão dos resultados entre as análises e ao mesmo tempo a concordância entre eles (BRITO et al., 2003).

A *Precisão* em validação de método analítico é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A *Repetitividade* representa a concordância de resultados obtidos em sucessivas medições utilizando o mesmo método, as mesmas condições e em curto intervalo de tempo. Outra denominação utilizada para a *Repetitividade* pode ser a precisão intra-ensaio ou a intra-corrída (RIBANI et al., 2004; BRITO et al., 2002).

A *Precisão intermediária* refere-se concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, analistas diferentes, diferentes equipamentos ou mesmo com a combinação destes fatores. Esse parâmetro representa a variabilidade dos resultados obtidos em um mesmo laboratório e seu objetivo é verificar se no mesmo laboratório o método analítico proposto fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, et al., 2004). Enquanto a *Reprodutibilidade* expressa a concordância dos resultados obtidos entre diferentes laboratórios em estudos colaborativos, usualmente aplicados para padronização de metodologias (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1999).

A concordância entre o valor encontrado pelo método analítico e o valor real ou de referência aceito como verdadeiro define a *Exatidão* do método proposto (LANÇAS, 2004; BRITO et al., 2002). Os principais métodos propostos para o estudo da *Exatidão*, são baseados na utilização de materiais de referência certificados (CRMs) ou na comparação do método proposto com um método de referência (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

A menor concentração do analito de interesse presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais do método analítico proposto, representa o chamado *Limite de detecção* (BRITO et al., 2003). O *Limite de detecção* (LD) pode ser calculado de três maneiras distintas: método visual, método da relação sinal-ruído e parâmetros da curva analítica.

Quando essa menor concentração detectada do analito em estudo pode ser mensurada com exatidão e precisão utilizando o método analítico proposto, tem-se o *Limite de quantificação* (LQ) do mesmo (BRITO et al., 2003).

Havendo a necessidade da interferência ou de modificações no método analítico proposto e este não sofrer alterações decorrentes dessas pequenas variações, tem-se a *Robustez* desse método (LANÇAS, 2004).

Por fim, durante a validação de um método analítico faz-se o *Estudo de recuperação*, que é definido como a porcentagem do analito de interesse que é extraído da amostra controle (branco) após ser fortificada com o mesmo em

uma concentração conhecida. É recomendável que o analito seja adicionado na amostra controle da mesma maneira em que seria naturalmente encontrado ou perto disso. O contato com o analito e a amostra controle deve acontecer por algumas horas, ou mesmo por dias, antes da aplicação do método de extração (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

A recuperação deve ser avaliada em três níveis de concentração (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999), e em geral, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (THIER; ZEUMER, 1987). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI et al., 2004; GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999).

#### **4. Estratégias analíticas na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos e amostras biológicas**

Amostras de alimentos ou biológicas são matrizes complexas, tanto pelo conteúdo de proteínas quanto pelo teor de gordura, o que torna a análise de pesticidas nessas amostras mais difícil, devido a lipofilicidade dessas substâncias. A utilização de inseticidas sintéticos piretróides na agricultura e para o controle de insetos na medicina veterinária acarretou a necessidade da análise desses pesticidas também em alimentos gordurosos (KODBA; VONCINA, 2007).

A maior dificuldade analítica encontrada na análise de resíduos de pesticidas em matrizes de alta complexidade é a presença de uma grande quantidade de pesticidas em baixíssimas concentrações.

Dessa maneira, a análise de resíduos de pesticidas pode ser uma tarefa extremamente difícil no caso de matrizes como cereais e alimentos secos devido a grande quantidade de componentes co-extraídos (amido, proteínas, gorduras) durante o procedimento de extração dos analitos e que podem afetar negativamente a seletividade do método. Por isso, uma importante etapa na

determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas é a etapa de *clean up* com aplicação de uma eficiente extração seguida por uma determinação seletiva e segura. Assim, um método será adequado quando for capaz de separar, tanto quanto possível, os analitos de interferentes da análise (WALORCZYK, 2007). Apesar de avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica para a sua determinação de pesticidas, o pré-tratamento das amostras continua sendo uma importante etapa para se obter resultados quantitativos precisos.

Diferentes técnicas têm sido propostas para o pré-tratamento e/ou extração de resíduos de pesticidas em alimentos. Na maioria das vezes o procedimento de extração envolve a homogeneização da amostra com um solvente orgânico, isoladamente ou misturados com água com ou sem ajuste de pH, utilizando um homogenizador, misturador, ou ultrassom. Além dos métodos clássicos de extração, outras abordagens mais recentes, por exemplo, extração com fluido supercrítico (SFE), extração com líquidos pressurizados (PLE), extração assistida por microondas (MAE), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) destacam-se como novas possibilidades de tratamento e vantagens como uma redução no tempo de extração. Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens e a escolha dependerá das características dos analitos, da matriz e do objetivo da análise. As aplicações destas técnicas de extração em diferentes tipos de amostras (por exemplo, frutas, sucos, legumes, lácteos, cereais, etc) para a determinação de resíduos de pesticidas estão largamente descritas na literatura (LAMBROPOULOU, ALBANIS, 2007).

Poucos trabalhos relatam a análise de pesticidas em ração animal, recentemente foi realizado por Iglesias-García et. al (2008) um estudo 21 pesticidas organoclorados em ração para porcos. Seu método consistia de extração em ultrassom com uma mistura de hexano:acetona (50:50) e depois extração em fase sólida utilizando alumina e florissil como adsorventes e eluição com hexano:acetato de etila (80:20). A análise foi realizada por GC/ECD e com valores de recuperação próximos de 100% e coeficiente de variação de 10%.

Matrizes como grãos e cereais, similares a ração geralmente são analisadas por GC/MS. E GC/ECD. Walorczyk (2007) desenvolveu um método para análise simultânea de resíduos de 122 pesticidas em matrizes secas, como

cereais, grãos e certos tipos de alimentos envolvendo uma simples extração da amostra com acetonitrila seguido da dispersão da matriz em fase sólida. Para avaliar o desempenho do método, foi feita a validação em três níveis (0,01,0,02 e 0,05 mg/kg) com valores de recuperações entre 73 e 129%. A aplicabilidade do método proposto para detectar e quantificar resíduos de pesticidas foi demonstrado na análise de 136 amostras de alimentos.

Para matrizes complexas, por exemplo, óleos vegetais, gordura animal, fígado e cérebro encontram-se na literatura a utilização de colunas de alumina seguida de extração líquido-líquido ou precipitação a baixa temperatura, a extração com cloreto de metilamônio seguida de extração em fase sólida com coluna de carvão ativado eluído com acetonitrila, extração líquido-líquido (LLE) com acetona e éter de petróleo particionado com acetonitrila-cloreto de metileno, centrifugado a  $-10^{\circ}\text{C}$  e purificado por permeação em gel (GPC), extração líquido-líquido seguida de dispersão da matriz em fase sólida utilizando aminopropil como adsorvente e purificação com Florisil entre outros (PANG et al., 2006; FERRER et al., 2005; BARRINUEVO, LANÇAS, 2000).

Os métodos encontrados na literatura incluem principalmente a extração com solventes (soxhlet, ultrassom ou micro-ondas) seguida da extração em fase sólida, utilizando como adsorvente principalmente florisil e C18. A etapa de clean up, para amostras com alto teor de lipídios inclui a saponificação ou a utilização de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. A utilização da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) para análise de pesticidas em matrizes biológicas é bem descrita na literatura. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na análise de diversos pesticidas em sangue, solo, composto de resíduos sólidos urbanos, frutas e alimentos processados (ALBERO et al., 2003; FURUSAWA, 2004; CARDOSO et al., 2004).

A MSPD consiste em dispersar a matriz sólida, liofilizada ou não, em um adsorvente apropriado (Celite, alumina e Florisil), acrescido de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro no caso de amostras não liofilizadas. A mistura matriz+adsorvente é colocada em uma coluna e os analitos são eluídos por um solvente apropriado. Esta coluna pode estar acoplada em série a um cartucho SPE comercial. A vantagem deste tipo de técnica é que em uma única etapa consegue-se extrair, limpar e concentrar o extrato. Esse tipo de abordagem é crucial no estudo de

moléculas de interesse biológico, pois a complexidade das matrizes e a multiplicidade de classes de substâncias envolvidas freqüentemente exigem um número muito grande de operações analíticas, que podem levar à perda dos analitos de interesse. O eluato obtido é evaporado à secura e o resíduo redissolvido no solvente de injeção, sendo isooctano ou ciclohexano os mais utilizados (IGLESIAS-GARCÍA et al., 2008; CHU et al., 2005)

Quanto à análise cromatográfica dos pesticidas é utilizada preferencialmente cromatografia a gás acoplada aos detectores por captura de elétrons e por espectrometria de massas devido a sua maior sensibilidade (KOBDA, VONCINA, 2007; PANG et al., 2006)

Na análise de pesticidas organoclorados a técnica de maior sensibilidade e seletividade é a cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (GC/ECD) largamente utilizada em amostras ambientais, alimentos (GOULART, 2008), estudos epidemiológicos e em estudos com tecidos e órgãos de animais, para avaliação dos efeitos da exposição (GARRIDO FRENICH et al., 2006). Muitos compostos organoclorados apresentam uma boa detectabilidade quando analisados por GC/MS com ionização química negativa (NCI), essa resposta pode ser maior quando comparada aos modos de ionização por impacto eletrônico (EI) e ionização química positiva (PCI) (PIZZUTTI, 2006). A elevada resposta cromatográfica promovida por NCI é muito bem conhecida para compostos que apresentam em suas estruturas grupos que capturam elétrons, por exemplo, os átomos de halogênio ou enxofre formam ânions muito estáveis no sistema por NCI e, conseqüentemente, promovem uma boa detectabilidade para pesticidas organoclorados e alguns pesticidas organofosforados (PIZZUTTI, 2006; SERRANO et al., 1999; CHALER et al., 1998).

Observa-se ainda que em vários casos, para maior confiabilidade analítica, especialmente aqueles envolvendo a determinação de pesticidas em matrizes de alta complexidade, os dois tipos de detectores são empregados conjuntamente. Além disso, também evidenciam o potencial dessas técnicas para a análise de diferentes tipos de pesticidas numa ampla gama de matrizes (SERRANO et al., 1999; CHALER et al., 1998).

Ainda, no caso de agentes químicos tóxicos, essa utilização conjunta é essencial, pois o analito inicialmente administrado pode sofrer transformações metabólicas, levando à produção de derivados, que não podem ser identificados inequivocamente apenas pelo uso de CG-ECD.



## 5 Justificativa e Objetivos do Trabalho

Esta tese insere-se em um projeto temático da Fapesp (proc.2006/60506-1) de caráter multidisciplinar, pois integra profissionais de diferentes áreas (agronomia, biologia, biomedicina, medicina, medicina veterinária e química) de quatro unidades de ensino superior da UNESP, sendo coordenado pelo Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. A relevância do projeto reside no fato de existir real exposição da população brasileira aos resíduos de pesticidas e verifica experimentalmente se uma exposição individual ou a mistura destes pesticidas em baixas doses tem ação sobre os organismos, principalmente carcinogênese hepática e alteração endócrina.

Estão incluídos neste estudo cinco pesticidas cujos resíduos foram detectados no período de 2001 a 2005 em amostras de legumes e frutas no território nacional durante o monitoramento do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): dicofol, dieldrin, endosulfan, diclorvos e permetrina. Considerando-se que a determinação fidedigna da concentração dos pesticidas administrados aos animais na ração que os tenha alimentado e nos tecidos-alvo deste estudo (fígado e cérebro), na presente tese são objetivos específicos:

- Otimizar e validar método para análise de dicofol, permetrina, dieldrin, endosulfan e diclorvos nas matrizes: ração animal, fígado e cérebro de ratos machos de Lewis.
- Aplicar o método validado às amostras de ração utilizadas na etapa de alimentação dos ratos e nas amostras de fígado e cérebro de ratos provenientes do estudo toxicológico em desenvolvimento (projeto temático Fapesp).

## 6 Experimental

### 6.1. Materiais

#### 6.1.1 Padrões analíticos dos pesticidas, solventes e reagentes

Os padrões dos pesticidas dieldrin (97,9%), endosulfan (99,9%) e permetrina (98%) foram adquiridos do laboratório Riedel-de-Haën (Alemanha), enquanto o pesticida dicofol (96,5%) foi adquirido do laboratório Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha).

Os solventes utilizados foram acetato de etila, acetona e isooctano (grau HPLC, Mallinckrodt).

#### 6.1.2 Vidraria e equipamentos

As vidrarias utilizadas foram: béquer, pipeta, funil, cadinho, balão, pistilo, vidro de relógio, proveta etc., além de cartuchos para extração em fase sólida (SPE- JT-BAKER 500mg/6mL) de florisil e tubos de vidro para centrifuga com tampa.

Os equipamentos utilizados foram:

- Cromatógrafo a gás (Varian - modelo 3300), equipado com detector por captura de elétrons ( $^{63}\text{Ni}$ ), injetor (Modelo 1040, Varian) e integrador (modelo 4290, Varian).
- Cromatógrafo a gás (Varian – 450-GC), equipado com detector por captura de elétrons ( $^{63}\text{Ni}$  - amount: 15mCi), injetor auto sample VARIAN – CP 8400.
- Ultra-som Cleaner Thornton;
- Estufa Fanem, modelo 315 SE;

- Balança, precisão de  $\pm 0,01$  mg, Mettler Toledo, modelo AG 245.

As colunas cromatográficas utilizadas foram:

- ZB-5 (Zebron - 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme recoberta com fase 5% fenil 95% metilpolisiloxano).
- VF-5MS (Varian - 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme recoberta com fase 5% fenil 95% metilpolisiloxano).

## 6.2 Métodos gerais

### 6.2.1 Limpeza da vidraria

A limpeza da vidraria é uma etapa muito importante no desenvolvimento de procedimentos laboratoriais. Seu objetivo é evitar contaminação das amostras e garantir a veracidade dos resultados.

Inicialmente toda a vidraria foi deixada imersa (mínimo de 2 horas) em solução aquosa de detergente Extran Neutro (Merck) 2%, em seguida lavadas várias vezes em água corrente. Em seguida foram deixadas em banho de ultrassom com a mesma solução de Extran 2% durante 10 minutos, enxaguadas várias vezes com água destilada e secas em estufa a 150°C (material não volumétrico) ou a temperatura ambiente (material volumétrico). Quando limpas, as vidrarias foram separadas e guardadas em armário fechado.

O material cirúrgico utilizado durante a necropsia foi lavado com Extran Neutro (Merck) 2%, enxaguado várias vezes com água destilada e seco em estufa a 150°C.

Foi usado material cirúrgico diferente para cada grupo de animais para evitar contaminação cruzada entre as amostras.

## 6.2.2 Preparo da ração animal e obtenção das amostras desta matriz

A ração utilizada na alimentação dos animais durante o experimento foi preparada no Biotério do Departamento de Patologia da FMBBo da UNESP no Campus de Botucatu.

O pó utilizado como base do preparo das amostras de ração foi uma dieta padrão chamada AIN-93M, devidamente armazenado e conservado em temperatura de 4º C. A dieta padrão AIN-93M consiste na mistura de amido de milho, caseína, amido dextrinizado, sacarose, óleo de soja, celulose microfina, pré-mix mineral e vitamínico, L-cisteína, bitartaro de colina e tert-butilhidroquinona. A quantidade em gramas de cada constituinte da AIN-93M pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 2: Composição da Dieta Padrão AIN-93M utilizada no preparo da ração animal (reprodução do rótulo do produto, tal qual fornecido)**

<b>Dieta Padrão AIN-93M (g / 2,7 x 10<sup>3</sup> g de AIN-93)</b>			
<b>Amido de Milho</b>	1257,37	<b>Celulose Microfina</b>	135,00
<b>Caseína</b>	378,00	<b>Pré-mix Mineral AIN-M</b>	94,50
<b>Amido dextrinizado</b>	418,00	<b>Pré-mix Vitamínico AIN-93</b>	27,00
<b>Sacarose</b>	270,00	<b>L-Cistina</b>	4,86
<b>Óleo de soja</b>	108,00	<b>Bitartaro de Colina</b>	6,75
<b>Tert-butilhidroquinona</b>	0,02		

As amostras de ração animal foram preparadas em misturador de inox. Os padrões dos pesticidas foram dissolvidos em etanol absoluto e adicionados ao pó da dieta AIN-93M sob homogeneização constante. A mistura foi peletizada e seca em fluxo de ar. Os *pellets* fortificados com os pesticidas individualmente e na forma de mistura foram mantidos em freezer a -18º C.

Para o estudo, foram preparados 8 tipos diferentes de ração animal. A ração Basal Controle G1 foi preparada sem a adição dos pesticidas. A ração

G2 e G3 foram preparadas pela mistura dos pesticidas de acordo com a dose NOEL (*No Observed Effects Level - Nível de efeito não observado*) e LOEL (*Lowest Observed Level - Nível mais baixo de efeito observado*) respectivamente.

Alem das rações preparadas pela mistura dos pesticidas de interesse, também foram preparadas amostras de ração fortificadas com os pesticidas individualmente e na concentração estabelecida pela dose LOEL. Essas amostras de ração foram denominadas de G4, G5, G6, G7 e G8 para dicofol, permetrina, diclorvos, dieldrin e endosulfan, respectivamente. Os pesticidas adicionados à ração foram de grau cromatográfico fornecidos pela Sigma-Aldrich.

Cerca de 100g da ração foi separada logo após o preparo, envolvidas em papel alumínio e congeladas em freezer a -18° C (Figura 9). Essas amostras foram transportadas devidamente refrigeradas da FM-Botucatu ao IQ-UNESP para estudo de otimização e validação do método a ser empregado para análise dos pesticidas.

A composição e a quantidade dos constituintes presentes em cada preparo dos diferentes tipos de ração animal estão apresentados na Tabela 2 a seguir.

**Tabela 3: Composição da Ração fornecida aos animais durante o experimento.**

<b>Código da Ração</b>	<b>Dieta Padrão AIN-93 (kg)</b>	<b>Etanol Absoluto (L)</b>	<b>Óleo de Soja (g)</b>	<b>Dieldrin (mg)</b>	<b>Diclorvos (mg)</b>	<b>Permetrina (mg)</b>	<b>Endosulfan (mg)</b>	<b>Dicofol (mg)</b>
<b>G1</b>	12,0	0,10	480	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>G2</b>	12,0	0,10	480	3,5	32,2	700,0	8,4	30,8
<b>G3</b>	12,0	0,10	480	7,0	322,0	3500,0	406,0	350,0
<b>G4</b>	12,0	0,10	480	0,0	0,0	0,0	0,0	175,0
<b>G5</b>	12,0	0,10	480	0,0	0,0	1750,0	0,0	0,0
<b>G6</b>	12,0	0,10	480	0,0	161,0	0,0	0,0	0,0
<b>G7</b>	12,0	0,10	480	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>G8</b>	12,0	0,10	480	0,0	0,0	0,0	203,0	0,0

**Figura 9: Amostra de ração animal preparada em misturador de inox, envolvidas em papel alumínio e congeladas em freezer a -18° C.**

### **6.3 Amostras biológicas do estudo: fígado e cérebro**

O experimento com os animais, a alimentação e o sacrifício para retirada das amostras de tecidos e órgãos foi realizado na FMB-UNESP no Campus de Botucatu.

A elaboração do protocolo de sacrifício e de amostragem para obtenção das amostras biológicas foram realizadas com a participação de todos os pesquisadores envolvidos, visando condições e procedimentos para melhor conservação das amostras para análise dos pesticidas estudados, bem como para evitar a contaminação cruzada entre as amostras.

Todos os aspectos éticos envolvidos estão disciplinados pela Comissão de ética em Experimentação com Animais da FMB-Botucatu.

#### **6.3.1 Animais e ambiente de experimentação (biotério)**

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (CEEA, protocolo nº 498).

Foram utilizados 62 ratos machos isogênicos da linhagem Lewis, com 6 semanas de idade, adquiridos do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP (Campinas, SP). A utilização de animais isogênicos proporciona a obtenção de respostas mais homogêneas possíveis dentro de cada grupo experimental (Figura 10).

Foram recebidos dois lotes sucessivos de animais, com pesos médios iniciais de 185,51g e 143,45g respectivamente.



**Figura 10: Animais utilizados no experimento: ratos isogênicos machos da linhagem Lewis.**

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMBBo da UNESP no Campus de Botucatu, sob condições ambientais controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $55\pm 10\%$ ), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e circulação/exaustão contínua de ar.

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno (04 animais/gaiola), forradas com maravalha de pinho branco autoclavada e fechadas com grades de inox, que foram trocadas e limpas três vezes por semana (Figura 11).

Durante o período de aclimação de quatro semanas, os animais receberam água filtrada em bebedouros de vidro com capacidade de 500 mL, com rolhas de borracha e bicos de aço inoxidável e ração foram fornecidas aos animais *“ad libitum”*, e suas ingestões foram registradas semanalmente. Os bebedouros foram trocados e limpos três vezes por semana.





**Figura 11: Gaiolas utilizadas durante o experimento para acomodação dos animais.**

### **6.3.2 Delineamento experimental**

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 8 grupos de 6 a 12 animais cada, que receberam a ração basal peletizada adicionada das misturas dos praguicidas ou de cada um deles de acordo com o especificado na Tabela 2.

As concentrações dos praguicidas nas rações dependeram das doses críticas NOEL (acrônimo em inglês, nível sem efeito observável) ou LOEL/LOAEL (acrônimo em inglês, menor nível com efeito observável/ menor nível com efeito adverso observável), tal como determinadas em ensaios crônicos com ratos (FAO/WHO, 1986). Estas doses críticas foram transformadas em concentrações, baseadas em estimativas de consumo diário pelo rato, para serem adicionadas à ração.

Durante o período experimental (8 semanas) os grupos receberam as diferentes rações, para cada grupo, sendo que ao final da 8ª semana de tratamento os animais foram submetidos à eutanásia.

### 6.3.3 Avaliação dos animais durante o experimento biológico

Os animais foram pesados e submetidos à avaliação clínica semanal durante todo o período experimental.

Qualquer alteração observada foi registrada em ficha clínica individual. Em caso de detecção de morbidade ou morte iminente o animal será sacrificado e os dados de necropsia registrados.

### 6.3.4 Eutanásia dos animais e coleta das amostras de fígado e cérebro

Os animais foram sacrificados ao final da 8<sup>a</sup> semana pela secção dos vasos da base do coração após narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub>.

Logo após a retirada das amostras de cérebro e fígado (Figura 12), estas foram devidamente identificadas e pesadas, armazenadas em papel alumínio e congeladas imediatamente em freezer a -18°C.



**Figura 12: Amostras de fígado e cérebro de ratos machos da linhagem de Lewis utilizados durante o experimento.**

### 6.4 Preparo das soluções padrão para o estudo cromatográfico

As soluções estoque individuais de cada padrão de pesticida foram preparadas em isooctano na concentração de 100 ng/μL cada uma. Pela diluição da solução estoque foram preparadas soluções intermediárias na concentração de 10 ng/μL. As soluções contendo a mistura dos pesticidas (dicofol, endosulfan, dieldrin e permetrina) foram preparadas a partir da diluição

das soluções estoques individuais de concentração de 10 ng/μL. As soluções de trabalho, utilizadas para construção das curvas analíticas, foram preparadas a partir das soluções individuais e na forma de mistura de pesticidas. Todas as soluções padrões armazenadas em frascos âmbar, vedadas com *parafilm* e matindas à -18°C por um período máximo de 6 meses.

### **6.5 Otimização das condições cromatográficas e avaliação da resposta do sistema analítico (GC/ECD)**

A etapa inicial do desenvolvimento de qualquer método analítico consiste na otimização das condições cromatográficas utilizadas, como por exemplo: modo de injeção (split/splitless), programação de temperatura da coluna, do injetor e detector, fluxo da fase móvel, escolha da coluna cromatográfica e até mesmo em algumas vezes a escolha do detector, baseado na seletividade e sensibilidade do mesmo para com os analitos de interesse.

As condições cromatográficas otimizadas para o cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons GC/ECD (VARIAN-3300 e VARIAN-450-GC) foram baseadas em trabalhos da literatura que apresentavam estudos com os pesticidas de interesse como mostrado no item 4.

Esse estudo foi realizado utilizando solução padrão da mistura dos pesticidas na concentração de 1,0 ng/μL. A identificação correta dos picos correspondentes aos pesticidas individualmente, foi realizada utilizando soluções de padrões individuais preparadas em isooctano na concentração de 1,0 ng/μL para cada pesticida: dicofol, dieldrin, endosulfan e permetrina e fez-se o estudo comparativo entre os tempos de retenção na coluna destes padrões individualmente com os constituintes das solução na forma de mistura (LANÇAS, 1993).

O sistema de detecção escolhido foi o captura de elétrons (GC/ECD) devido sua alta sensibilidade e seletividade a moléculas que possuem átomos de cloro em sua estrutura. Nesse sistema de detecção o funcionamento é

baseado na captura de elétrons pelo analito. Esses elétrons lentos são gerados pela ionização do gás de arraste (geralmente o nitrogênio - N<sub>2</sub>), através de uma fonte radioativa (<sup>63</sup>Ni ou <sup>3</sup>H). Uma molécula que contenha grupos com afinidade por elétrons, ao eluir junto ao gás de arraste e ao passar pelo detector irá capturar esses elétrons livres gerando um sinal elétrico fazendo com que o analito seja identificado. Assim, o ECD é um detector seletivo, sensível e não destrutivo, sendo bastante utilizado na análise de compostos orgânicos halogenados, nitrilas, pesticidas, etc (LANÇAS, 1993). Se a seletividade do sistema não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI, et al., 2004).

As condições cromatográficas otimizadas neste trabalho, para as análises dos pesticidas por GC-ECD podem ser vistas na Tabela 3.

Os equipamentos utilizados na otimização dessas condições foram:

- ✓ Para amostras de ração animal e fígado: Cromatógrafo a gás Varian (GC) modelo 3300, equipado com detector por captura de elétrons (<sup>63</sup>Ni), injetor (Varian - Modelo 1040) e integrador Varian - modelo 4290. As injeções foram efetuadas manualmente no modo splitless utilizando uma coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (Zebron - 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme recoberta com fase 5% fenil 95% metilpolisiloxano).
- ✓ Para amostras de cérebro: Cromatógrafo a gás Varian 450-GC, equipado com detector de captura de elétrons (<sup>63</sup>Ni), auto sample CP-8400. As injeções foram feitas automaticamente no modo splitless utilizando uma coluna capilar de sílica fundida VF-5MS (Varian - 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme recoberta com fase 5% fenil 95% metilpolisiloxano) e software para aquisição dos dados Galaxie Varian.

**Tabela 4: Condições Cromatográficas utilizadas para análises dos pesticidas.**

<b>Condições Cromatográficas – GC/ECD(VARIAN/3300 e VARIAN/450-GC)</b>	
<b>Programação Temperatura</b>	170°C (1min) $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250°C (10min) $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C
<b>Colunas</b>	ZB-5 e VF-5MS
<b>Temperatura do Injetor</b>	210°C
<b>Temperatura do Detetor</b>	300°C
<b>Gases – N<sub>2</sub></b>	1mL/min
<b>Volume injeção</b>	1µL - splitless

### **6.5.1 Repetibilidade das áreas e tempos de retenção para os pesticidas estudados**

Os dados para o cálculo da repetibilidade foram obtidos pela injeção em replicata de soluções padrão de diferentes concentrações em um mesmo dia, e em dias alternados para o cálculo da precisão intermediária.

Para os estudos de repetibilidade realizados no GC/ECD VARIAN-3300, foi utilizando injetor manual e seringa de 10µL, injetor e detector a uma temperatura de 210°C e 300°C, respectivamente. Foram efetuadas várias injeções consecutivas de soluções padrões dos pesticidas em isooctano em diferentes concentrações conhecidas (RIBANI et al., 2004).

### **6.5.2 Avaliação da resposta do sistema GC/ECD**

Foram utilizadas soluções padrão dos pesticidas em concentrações variando entre 0,2 a 1,0 ng/µL, cada solução padrão foi injetada em triplicata. A partir dos resultados obtidos foram obtidas as curvas de linearidade (Área/Concentração vs Concentração) que orientaram a construção das curvas

analíticas (Área vs Concentração). A partir das curvas analíticas foram obtidos os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do sistema cromatográfico utilizado (RIBANI et al., 2004).

## **6.6. Estudos de Avaliação do Método**

Para os estudos de avaliação dos métodos propostos foram analisadas amostras de ração animal, fígado e cérebro controles enriquecidas com os pesticidas em diferentes concentrações conhecidas.

### **6.6.1. A eficiência do processo de extração dos pesticidas**

Como se trata de um método de extração de pesticidas em matrizes complexas, esse processo foi avaliado na eficiência de suas etapas para não ocorrer perdas analíticas e garantir completa retirada dos pesticidas das matrizes estudadas (ração animal, fígado e cérebro de ratos de Lewis).

### **6.6.2. Os Limites de detecção e quantificação do método**

Define-se como sendo o limite de detecção de um método analítico o menor valor de concentração do analito na amostra estudada, para o qual um determinado método analítico produz um sinal, cujo valor difere com 95% de probabilidade daquele produzido pela solução de controle (ANVISA, 2003, RIBANI, 2004).

O limite de quantificação do método, avaliado pela utilização de material de referência certificado (quando disponível) ou pelo uso de amostras enriquecidas com os analitos de interesse, deve satisfazer a três condições:

- o limite de quantificação deve ser maior ou igual ao limite de detecção;

- a sensibilidade ou a recuperação para o limite de quantificação deve ser igual ou maior que 70%;
- o coeficiente de variação (CV) para o limite de quantificação deve ser igual ou inferior a 20%.

### **6.6.3. Estudos de Recuperação**

Toda amostra que recebe tratamento de análise indireta, ou seja, diluição, extração, derivação, etc, antes da injeção no cromatógrafo a gás, deve ter calculado experimentalmente o erro ou a perda dos compostos de interesse durante toda análise.

A validação de método analítico para análise de resíduos de pesticidas usualmente é feita através dos ensaios de recuperação. Os estudos de recuperação dos pesticidas e a avaliação de todas as perdas no procedimento analítico garantem maior veracidade nos resultados encontrados nas amostras analisadas através do método proposto.

Para o estudo de recuperação, as amostras testemunhas (ração animal, fígado e cérebro) foram fortificadas com soluções dos pesticidas em três concentrações diferentes e em triplicata para cada nível ( $n = 3$ ), segundo as recomendações da literatura (GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999). O tempo de contato entre a matriz e as soluções dos pesticidas foi de 12 horas de acordo com a literatura (CARDOSO et al., 2004).

### **6.6.4 Escolha dos níveis de fortificação das amostras de ração animal**

Os níveis de fortificação das amostras de ração animal utilizadas para o estudo de recuperação dos métodos propostos foram escolhidos considerando a concentração dos pesticidas adicionados durante o preparo da ração, conforme descrito no item 6.2.2.

### 6.6.5 Escolha dos níveis de fortificação das amostras de fígado e cérebro

Os níveis de fortificação das amostras de fígado e cérebro para o estudo de recuperação dos métodos propostos foram escolhidos considerando o consumo médio de ração, peso médio e tempo de exposição dos animais aos pesticidas nas doses NOEL e LOEL.

A tabela 4 mostra uma estimativa da concentração de pesticidas bioacumulada, considerando que o pesticida se distribuiu igualmente por todo o corpo do animal, não havendo excreção e nem degradação e/ou metabolização dos pesticidas. Apesar de dados teóricos, estes foram de grande valia na escolha dos níveis de fortificação mais adequados ao estudo e serviram para estimar a quantidade que poderia ter sido bioacumulada nos animais.

**Tabela 5: Estimativa da concentração de pesticidas nos animais alimentados com a ração preparada no estudo.**

Pesticida	NOEL (mg/Kg)	LOEL (mg/kg)
Dicofol	12,5	141,6
Dieldrin	1,42	2,84
Endosulfan ( $\alpha$ - $\beta$ )	3,40	164,3
Permetrina (cis-trans)	283,3	1416,4

### 6.7 Otimização da extração dos pesticidas em matriz de ração animal

Essa etapa do trabalho foi dividida em duas partes.

O método de extração em banho de ultrassom (método 1) otimizado e validado para o estudo das amostras de ração animal contendo pesticidas organoclorados (dieldrin, endosulfan, dicofol) e piretroide (permetrina) foi



adaptado por um aluno de graduação para extração das amostras de ração contendo o pesticida organofosforado (diclorvos).

Foram testados dois métodos de extração:

Método 1: extração com solvente (acetato de etila) em banho de ultrassom;

Método 2: dispersão da matriz em fase sólida utilizando C18 e clean up em cartuchos de sílica gel 60, florisil e celite.

### **6.7.1 Método 1: Extração com solvente em banho de ultrassom**

Para a extração da amostra testemunha foi pesado e transferido para um tubo de vidro de centrifuga com tampa 0.5 g de amostra de ração basal controle, previamente triturada, homogeneizada e condicionada à temperatura ambiente. Um volume correspondente a 5 mL de acetato de etila foi transferido para um tubo de vidro de centrifuga, hermeticamente fechado e envolvido em papel alumínio e filme plástico. O tubo contendo a mistura foi submetido a banho de ultrassom sem aquecimento durante 20 minutos e seguido de 2 minutos de repouso. Ao término do repouso foi adicionado ao tubo de centrifuga 0.1g de sulfato de sódio anidro seco em estufa por 4h a 130°C. Repetiu-se o banho de ultrassom por 20 minutos seguido de centrifugação por 10 minutos. Uma alíquota do extrato orgânico foi transferida para um vial e seca sob fluxo leve de nitrogênio, sendo redissolvido em isooctano. Injetou-se 1µL do extrato em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (CG/ECD) (Figura 13)

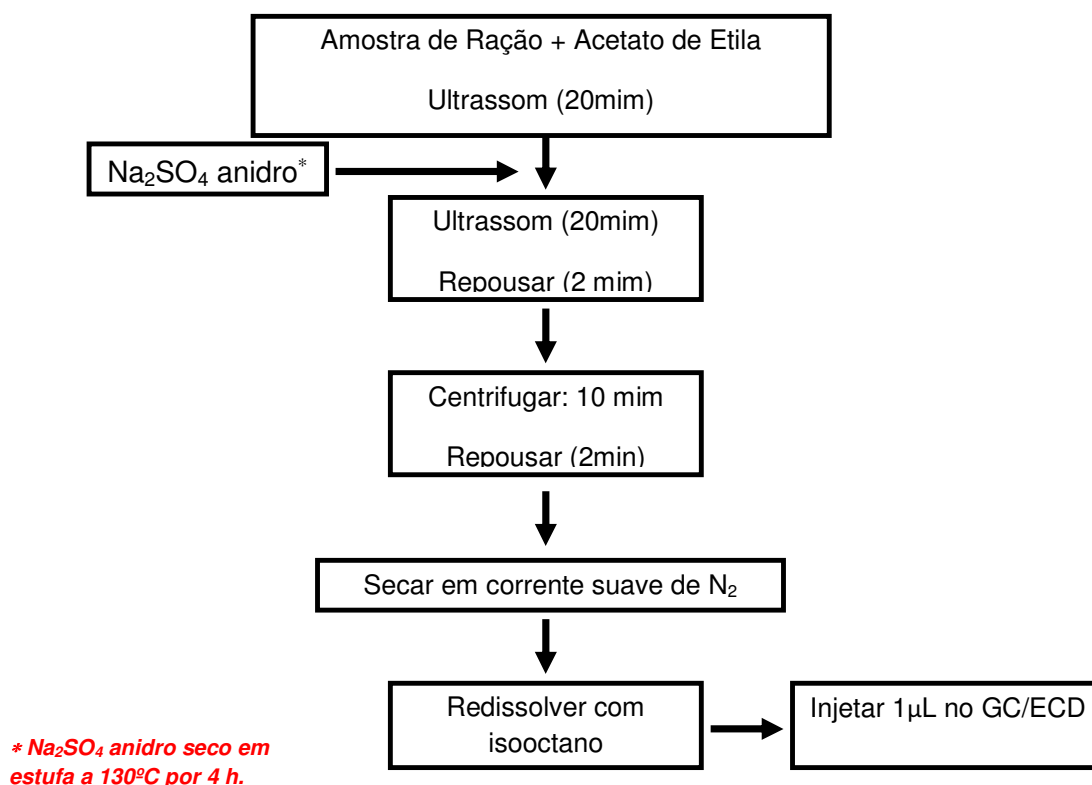


Figura 13: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em ração animal (adaptado de LIU et al., 2007)

No estudo de recuperação do método de extração com solvente e banho de ultrassom, foram pesados 0.5 g de amostra de ração basal homogeneizada com bastão de vidro, adicionou-se a esta solução dos padrões de trabalho em três níveis diferentes de fortificação (0,4;0,6;0,8  $\mu\text{g/g}$ ). As amostras fortificadas foram estocadas em freezer durante um período de 24h. Após este período, as amostras fortificadas foram submetidas ao mesmo procedimento utilizado para a amostra testemunha (sem fortificação).

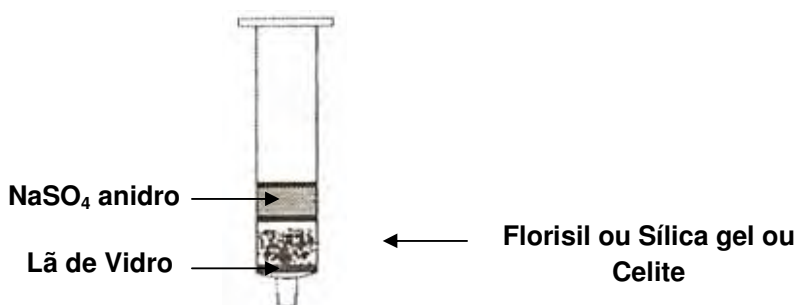
### 6.7.2 Método 2: Dispersão da Matriz em fase sólida (MSPD)

As amostras de ração inicialmente congeladas na forma de *pellets* foram retiradas do freezer e condicionadas à temperatura ambiente e então, trituradas em almofariz de porcelana com auxílio de pistilo de porcelana e devidamente

homogeneizadas. Após a homogeneização foram novamente mantidas em freezer até o momento das análises.

As fases sólidas e os solventes utilizados no processo de extração foram: C18 (40 – 63  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich), sílica gel 60 (70 – 230 Mesh ASTM, Sigma Aldrich), Celite (acid washed, Alltech), florisil (60 – 100 Mesh ASTM, Acros Organics), sulfato de sódio anidro (p.a., Sigma Aldrich) e acetato de etila (Mallinckrodt),

Para a extração da amostra testemunha pesou-se 0.5 g de amostra de ração basal controle, previamente triturada e homogeneizada. A ração pesada foi colocada em um almofariz juntamente com 0.5g de C18, a seguir homogeneizou-se a mistura com o auxílio de um pistilo. A mistura homogênea foi transferida para uma coluna de extração de vidro (10cm (h) x 5cm (d)). Foram preparadas três diferentes tipos de coluna de extração: contendo 0.1g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro seco em estufa a  $130^\circ\text{C}$  por 4 h adicionado de 0.5 g de sílica gel 60, florisil e celite separadamente em cada coluna. A montagem desta coluna está ilustrada na figura 14. 10 mL de acetato de etila foi adicionado processando a eluição sob leve vácuo. O eluato foi recolhido em balão volumétrico de 10mL e avolumado. Uma alíquota do eluato foi transferida para um vial e seco em fluxo leve de nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em isooctano. Injetou-se  $1\mu\text{L}$  do extrato em isooctano no cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (CG/ECD) (Figura 16).



**Figura 14: Ilustração do preparo da coluna de extração.**

As amostras fortificadas foram preparadas da mesma maneira descrita no item anterior (6.6.1.). O procedimento de extração das amostras fortificadas

segue o procedimento descrito para a ração testemunha e pode ser visto na figura 15.

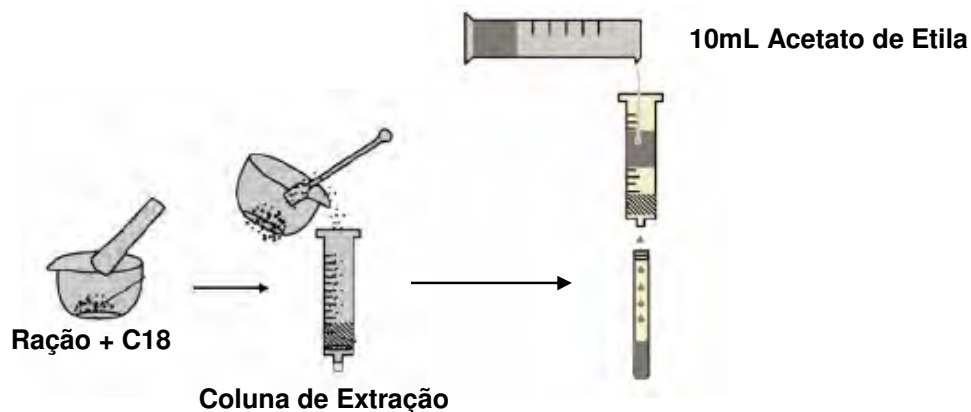


Figura 15: Ilustração do procedimento de extração utilizando a dispersão em fase sólida.

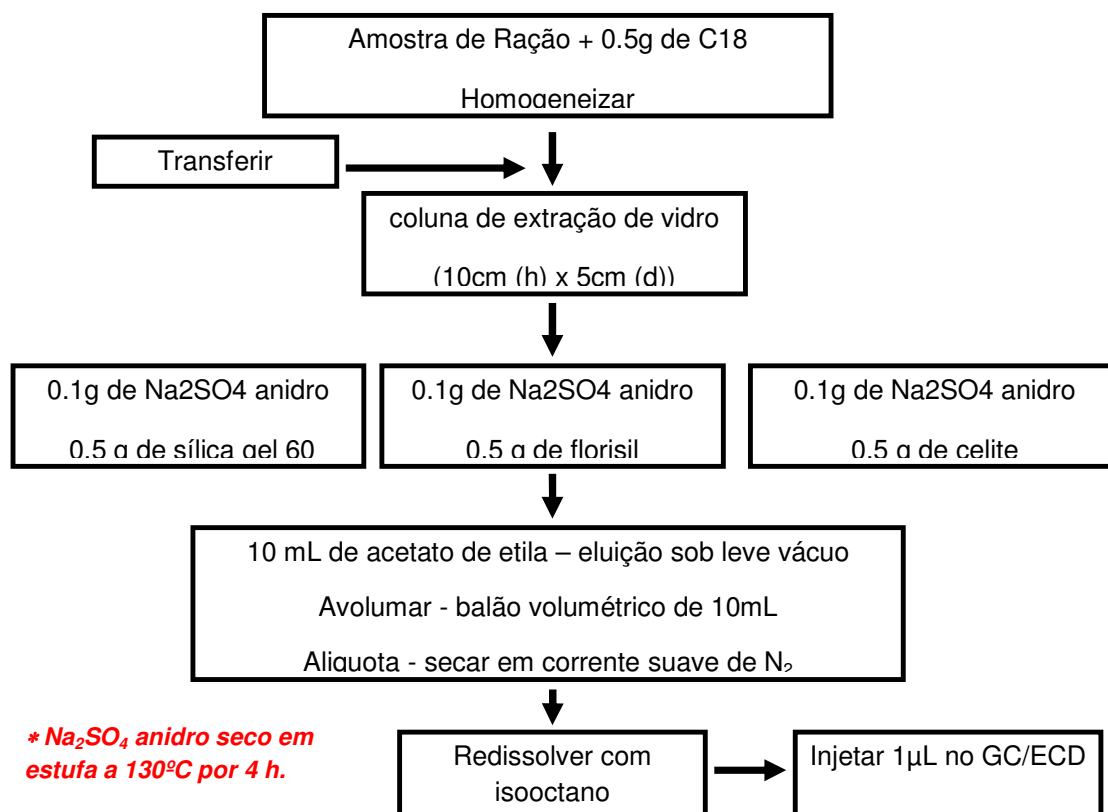
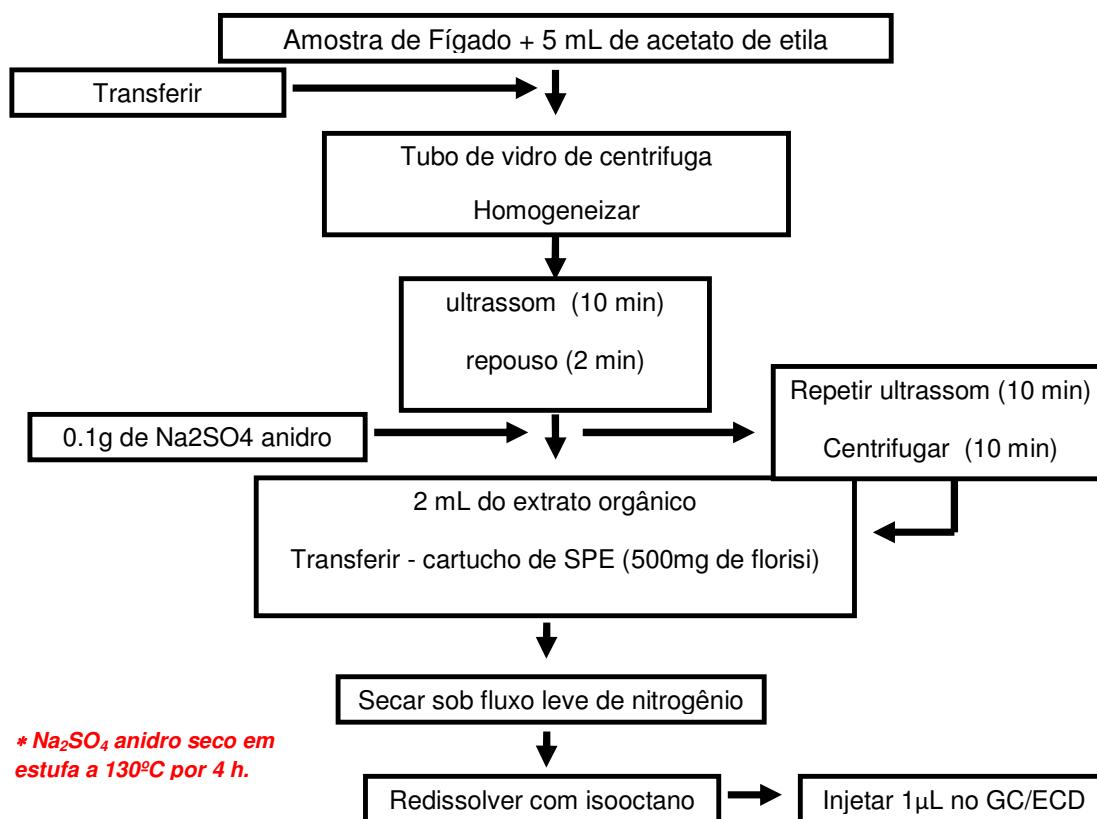


Figura 16: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em ração animal utilizando dispersão de matriz em fase sólida.

### **6.8 Otimização da extração dos pesticidas de amostra de fígado de rato**

Para a extração da amostra testemunha de fígado, foi pesado e transferido para um tubo de vidro de centrifuga com tampa 0.5 g de amostra de fígado controle, previamente triturado, homogeneizado e condicionado à temperatura ambiente. Um volume correspondente a 5 mL de acetato de etila foi transferido para um tubo de vidro de centrifuga, hermeticamente fechado e envolvido em papel alumínio e filme plástico. O tubo contendo a mistura foi submetido a banho de ultrassom sem aquecimento durante 10 minutos e seguido de 2 minutos de repouso. Ao término do repouso foi adicionado ao tubo de centrifuga 0.1g de sulfato de sódio anidro seco em estufa por 4h a 130°C. Repetiu-se o banho de ultrassom por 5 minutos seguido de centrifugação por 10 minutos. Uma alíquota do extrato orgânico de 2 mL foi transferida para um cartucho de SPE contendo 500mg de florisil e eluida com acetato de etila. O eluato foi transferido para um vial e seco sob fluxo leve de nitrogênio, sendo redissolvido em 1mL de isooctano. Injetou-se 1µL do extrato em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons. A figura 17 ilustra procedimento de extração para essa matriz.



**Figura 17: Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em fígado de rato macho de Lewis.**

No estudo de recuperação do método de extração proposto, foram pesados 0,5 g de amostra de fígado controle homogeneizada e adicionou-se a este solução dos padrões de trabalho em três níveis diferentes de fortificação: 0,1; 0,3 e 0,5  $\mu\text{g/g}$ . As amostras fortificadas foram estocadas em freezer durante um período de 24h. Após o período de fortificação, as amostras fortificadas foram submetidas ao mesmo procedimento utilizado para a amostra testemunha (sem fortificação).

Na matriz de fígado, os estudos de recuperação envolveram apenas os pesticidas organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan) e piretróides (permetrina).

### **6.9 Otimização da extração dos pesticidas de amostras de cérebro de rato**

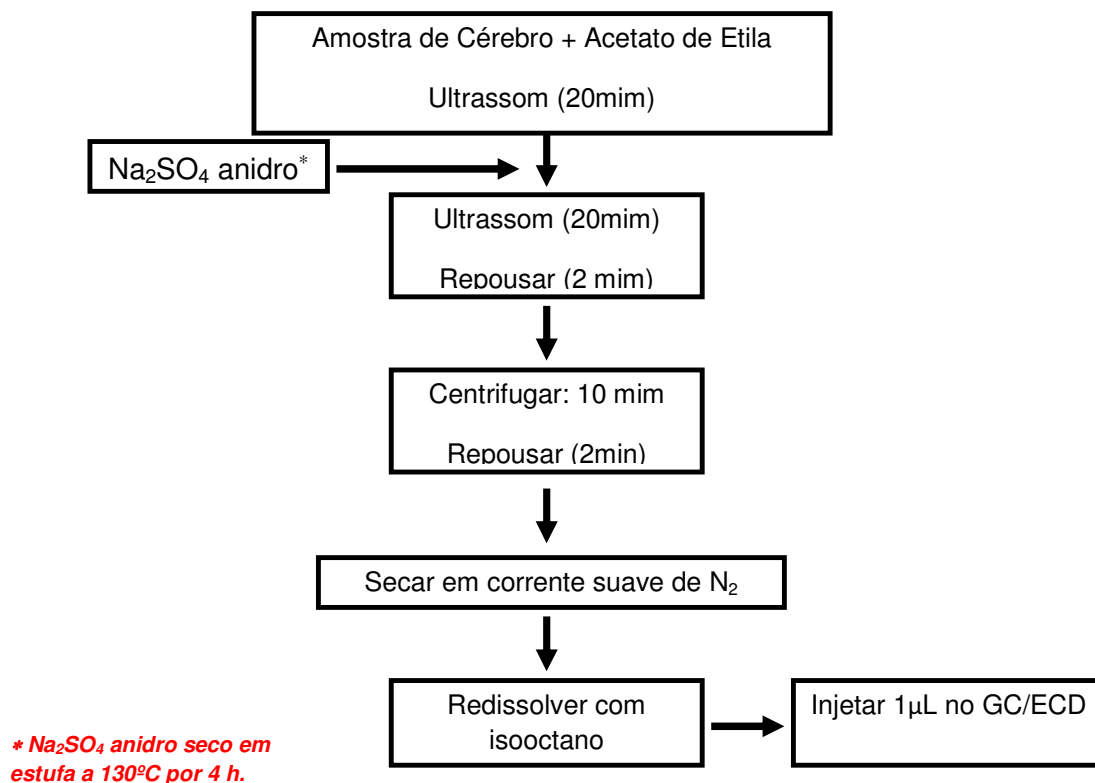
Para a extração da amostra testemunha, foi pesado e transferido para um tubo de vidro de centrifuga com tampa 1,0 g de amostra de cérebro controle, previamente triturado, homogeneizado e condicionado à temperatura ambiente. Um volume correspondente a 5 mL de acetato de etila foi transferido para um tubo de vidro de hermeticamente fechado e envolvido em papel alumínio e filme plástico.

O tubo contendo a mistura foi submetido a banho de ultrassom sem aquecimento durante 10 minutos e seguido de 2 minutos de repouso. Ao término do repouso foi adicionado ao tubo de centrífuga 0.1g de sulfato de sódio anidro seco em estufa por 4h a 130°C. Repetiu-se o banho de ultrassom por 5 minutos seguido de centrifugação por 10 minutos.

Uma alíquota do extrato orgânico de 1 mL foi transferido para um vial e seco sob fluxo leve de nitrogênio, sendo redissolvido em 1mL de isooctano.

Injetou-se 1µL do extrato em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

O fluxograma do método de extração dos pesticidas na matriz cérebro pode ser visto na figura 18.



**Figura 18:** Fluxograma ilustrativo do método proposto para extração dos pesticidas em cérebro de rato macho de Lewis.

No estudo de recuperação do método de extração proposto, foram pesados 1,0 g de amostra de cérebro controle homogeneizada e adicionou-se a este solução dos padrões de trabalho em três níveis diferentes de fortificação: 0,1; 0,3 e 0,5 µg/g. As amostras fortificadas foram estocadas em freezer durante um período de 24h. Após o período de fortificação, as amostras fortificadas foram submetidas ao mesmo procedimento utilizado para a amostra testemunha (sem fortificação).

Para essa matriz foram escolhidos apenas os pesticidas organoclorados do estudo devido as suas características estabilidade e persistência (TOMLIN, 2002).



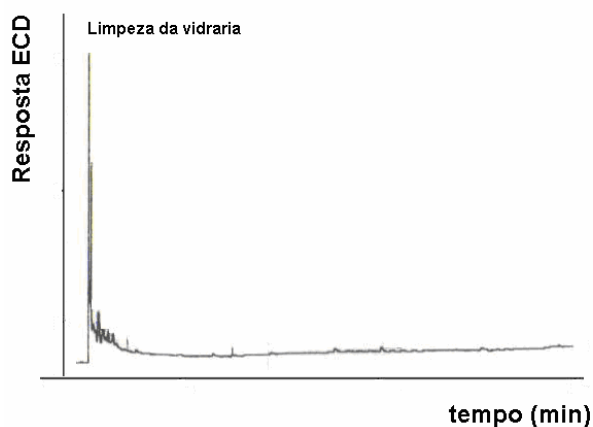
## 7 Resultados e Discussões

### 7.1 Limpeza da vidraria

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos e minimizar a interferência de impurezas nas injeções das amostras desse estudo, fez-se necessário a otimização do procedimento de limpeza de toda vidraria utilizada durante o procedimento experimental, descrito no item 6.2.1.

Todos os métodos propostos nesse trabalho foram avaliados após o procedimento de limpeza da vidraria utilizada.

O cromatograma a seguir (Figura 19) mostra que o procedimento de limpeza da vidraria está adequado as necessidades do trabalho, uma vez que não apresenta picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos pesticidas estudados.

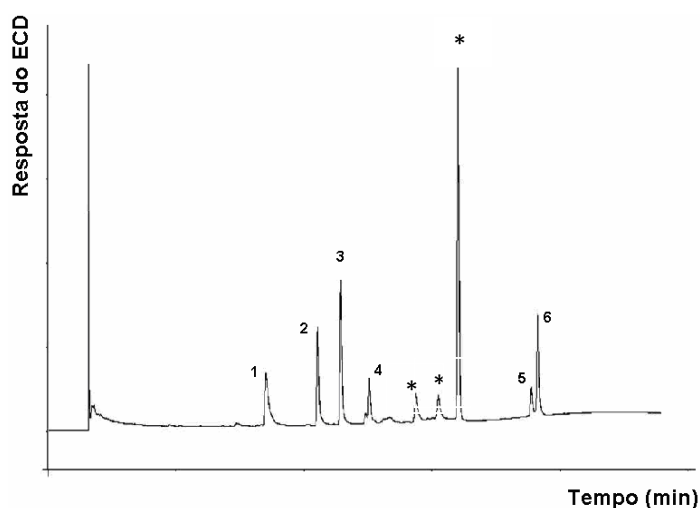


**Figura 19: Cromatograma referente a limpeza da vidraria obtido de acordo com as seguintes condições cromatográficas: CG-ECD (VARIAN-3300) – coluna: ZB-5(30mx0.25mm,0.2µm). Programação de Temperatura: 170<sup>0</sup>C(1min)  $\xrightarrow{5^{\circ}C/min}$  250<sup>0</sup>C(10min)  $\xrightarrow{5^{\circ}C/min}$  280<sup>0</sup>C. T<sub>detector</sub>:300 °C e T<sub>injetor</sub>:210 °C. Volume de injeção: 1µL.**

## 7.2 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas proporcionaram uma boa separação e resolução dos pesticidas nos dois sistemas cromatográficos utilizados: GC/ECD - VARIAN-3300 e GC/ECD - VARIAN-450GC. O tempo total de análise foi de 33 minutos, com a vantagem de diminuir o tempo de análise desses pesticidas quando comparado à literatura que muitas vezes chega a 50 minutos (CARDOSO et al. 2004).

A figura 20 ilustra a resolução cromatográfica obtida para os analitos de interesse nos dois sistemas cromatográficos utilizados neste trabalho.



**Figura 20:** Perfil Cromatográfico de uma solução padrão contendo a mistura de pesticidas em isooctano (1ng/μL). CG-ECD, coluna: ZB-5(30mx0.25mm,0.2μm). Programação de Temperatura: 170°C(1min)  $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$  250°C(10min)  $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$  280°C. T<sub>detector</sub>:300°C e T<sub>injetor</sub>:210°C. Volume de injeção: 1μL. 1: Dicofol; 2: Endosulfan-α; 3: Dieldrin; 4: Endosulfan-β; 5: Permetrina-cis; 6: Permetrina-trans. (\*) picos provenientes do dicofol

Na Figura 20 pode-se observar dois picos entre os compostos 4 e 5 referentes as impurezas do pesticida dicofol (96,5%) utilizado no preparo das soluções padrões. Essas impurezas são originadas durante o processo de síntese do dicofol, podendo ser resíduos de DDT, DDE e DDD, e também diclorobenzofenona que é o principal metabólito deste composto (TOMLIN, 2002; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010c).

Para elucidar a identidade dos picos marcados com asterisco na figura 20, uma solução padrão de dicofol foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) em outro trabalho desenvolvido neste grupo de pesquisa (Toledo Netto, 2009), sendo possível a identificação de dois picos, que correspondem aos picos número 1 e o mais intenso, com asterisco do cromatograma da figura 20. Na figura 21 são apresentados os fragmentogramas destes picos, que foram identificados com os isômeros I e II do dicofol. Os outros dos picos, de menor intensidade (também marcados com asterisco) da figura 20, podem ser as impurezas de processo do dicofol, para as quais não foi possível efetuar a identificação no sistema GC/MS utilizado por causa da baixa detectabilidade para moléculas organocloradas. As condições de operação do GC/MS (VARIAN-3800) para identificação dos isômeros do dicofol foram: ionização por impacto eletrônico de 70 eV no modo *Scan*; voltagem da eletro multiplicadora (1800V); as temperaturas do injetor, *trap*, do *manifold* e da linha de transferência foram respectivamente, 270°C, 180°C, 50°C e 200°C; 15mA de corrente de 49 emissão; 70-420 m/z de *scanned-mass-range*; a programação de aquecimento coluna foi 90°C por 3 min, a 20°C min<sup>-1</sup> até 230°C e a 5°C min<sup>-1</sup> até 280°C permanecendo por 8 min nesta temperatura.; volume de injeção de 1mL; modo de injeção split (10:1); vazão do gás de arraste (He) 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

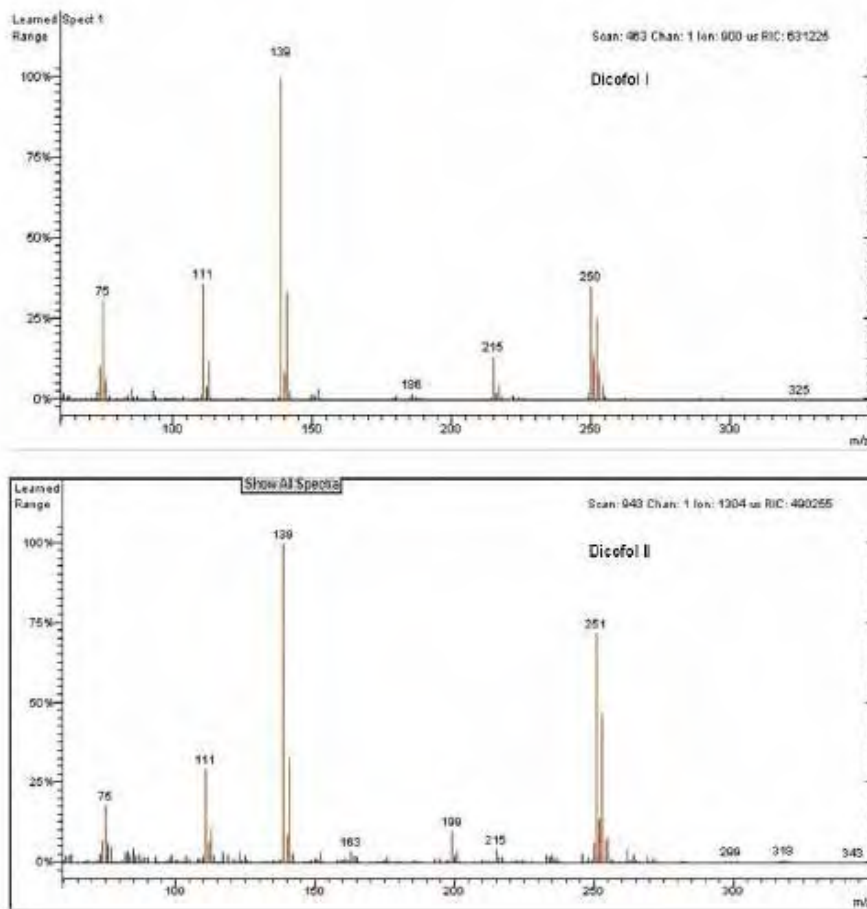


Figura 21: Fragmentogramas no modo *Scan* dos isômeros I e II do pesticida dicofol (TOLEDO NETTO, 2009).

### 7.3. Avaliação da resposta do sistema cromatográfico (GC/ECD)

#### 7.3.1. Repetitividade: áreas e tempo de retenção

A Tabela 5 apresenta os tempos de retenção dos pesticidas de interesse obtidos pelos dois sistemas cromatográficos utilizados durante o trabalho.

**Tabela 6: Valores de tempo de retenção, áreas e CV para os pesticidas estudados.**

Pesticida	VARIAN GC-3300			VARIAN GC-450			Precisão intermediária (%)
	T <sub>Ret</sub> * (min)	CV <sub>TR</sub> (%)	CV <sub>AREAS</sub> (%)	T <sub>Ret</sub> * (min)	CV <sub>TR</sub> (%)	CV <sub>AREAS</sub> (%)	
Dicofol	11,04	0,03	4,08	11,49	0,05	6,86	0,04
Dieldrin	14,27	0,04	3,13	14,50	0,04	3,38	0,03
Endosulfan- $\alpha$	13,40	0,04	2,45	13,57	0,04	3,85	0,04
Endosulfan- $\beta$	15,46	0,04	2,75	15,72	0,04	3,42	0,04
Permetrina-cis	24,84	0,06	3,16	24,77	0,04	6,16	0,05
Permetrina-trans	25,40	0,02	2,59	25,40	0,05	7,26	0,03

\*média de 5 injeções. CV = coeficiente de variação

As injeções no GC/ECD/VARIAN-3300 foram feitas de forma manual utilizando seringa de 10 $\mu$ L, o que requer um controle rigoroso para evitar perdas no procedimento analítico. Deve-se também, manter um controle periódico da programação de temperatura escolhida e da estabilidade do equipamento utilizado (temperatura de injetor e detector).

No GC/ECD/VARIAN-450GC utilizado principalmente para a análise das amostras de cérebro de ratos, as injeções foram automáticas utilizando o auto sampler CP-8400.

Os coeficientes de variação percentual (CV%) obtidos em ambos os sistemas demonstraram que os tempos de retenção não sofreram variação

considerável, expressando assim a repetitividade das injeções, tanto as injeções manuais como as automáticas.

O modo de injeção escolhido e utilizado desde o início do estudo e para todas as análises foi o modo splitless. Nessa situação a válvula de split permanece fechada durante a injeção e maior quantidade do analito entra na coluna, resultando maior detectabilidade. Esse modo splitless possibilitaria a melhor sensibilidade e determinação dos pesticidas estudados em concentrações pequenas, como por exemplo, no caso das amostras de fígado e cérebro onde se espera encontrar níveis de concentração bem baixos dos pesticidas (LANCAS, 1998).

A precisão intermediária é a maior representação da variabilidade dos resultados em um único laboratório, e por isso é aconselhável ser adotada (ANVISA, 2003). O seu objetivo foi verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados quando as injeções dos padrões forem feitas em dias diferentes. Os valores de precisão intermediária obtidos demonstram a concordância entre os resultados obtidos para os tempos de retenção em dias diferentes.

### 7.3.2. Linearidade e curva analítica, Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O intervalo de linearidade é a região no sistema de detecção no qual o sinal do detector escolhido (ECD) é diretamente proporcional à concentração do analito detectado na amostra (RIBANI, et al., 2004).

A linearidade desse sistema pode ser observada pelo método da regressão linear. Para construção das curvas de linearidade foram plotados no eixo y os valores de Área do Pico/Concentração do pesticida e no eixo x os valores de concentração. Através desses pontos experimentais, no total de cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003) e da construção da curva analítica, foi obtido o coeficiente angular, linear e de correlação (r) da curva.

Os intervalos de linearidade (IL) e os coeficientes de variação (CV%) podem ser vistos na tabela 6.

**Tabela 7: Intervalos de Linearidade (IL) e Coeficientes de Variação (CV%) para as amostras enriquecidas com a mistura dos pesticidas estudados.**

Pesticidas	IL(ng/μL)	CV (%)
Dicofol	0, 2 a 0,8	2,1
Dieldrin	0,2 a 1,0	2,9
Endosulfan α	0,3 a 0,8	9,3
Endosulfan β	0,3 a 0,8	8,9
Permetrina	0.2 –1.0	6,7
Diclorvos	0,6 a 1,4	7,4

Uma vez avaliada a linearidade da resposta no GC/ECD para as soluções padrão utilizadas, construiu-se a curva analítica: área vs concentração.

As curvas analíticas que foram construídas utilizando os valores de concentração (ng/μL) no eixo x e das áreas dos picos obtidos no eixo y, das soluções padrão de pesticidas em diferentes concentrações conhecidas que

variaram entre 0,5 a 1,0 ng/ $\mu$ L, e os coeficientes de correlação (r) para dieldrin, dicofol, permetrina, endosulfan e diclorvos foram 0,9996; 0,9998; 0,9986; 0,9998 e 0,9979 respectivamente. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 evidencia um ajuste ideal dos dados obtidos para uma linha de correlação (RIBANI et al., 2004). A recomendação da ANVISA é um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor superior a 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

### 7.3.3. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção de um sistema pode ser calculado de três maneiras: método visual, método da relação sinal/ruído e o método dos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção e de quantificação dos sistemas utilizados nesse trabalho foram calculados, seguindo-se a recomendação da IUPAC, utilizando-se os parâmetros das curvas analíticas construídas dentro do intervalo de linearidade:

$$LD = 3 \times Sd/b \text{ e } LQ = 3 \times LD.$$

Onde Sd é a média dos desvios do y e b é o coeficiente angular da reta.

Foi avaliado o comportamento dos pesticidas injetados no equipamento de cromatografia a gás. Para isso foram construídas curvas analíticas utilizando soluções padrão em isooctano em concentrações que variaram entre 0,1 a 1,0 ng/ $\mu$ L.

A tabela 7 apresenta os valores obtidos de LD e LQ para os equipamentos (GC/ECD) e para os pesticidas estudados utilizando as curvas analíticas obtidas pelo método do padrão externo.



**Tabela 8: Valores de limites de detecção (LD), de limites de quantificação (LQ) e  $r^2$  do sistema GC/ECD para os pesticidas estudados em isoctano.**

<b>Pesticidas</b>	<b>IL(ng/μL)</b>	<b>LD (ng/μL)</b>	<b>LQ (ng/μL)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Dicofol	0,2 a 0,8	0,018	0,060	0,9991
Dieldrin	0,2 a 1,0	0,005	0,015	0,9989
Endosulfan- $\alpha$	0,3 a 0,8	0,003	0,009	0,9994
Endosulfan- $\beta$	0,3 a 0,8	0,005	0,015	0,9985
Permetrina- cis	0,2 a 1,0	0,004	0,012	0,9986
Permetrina- trans	0,2 a 1,0	0,005	0,015	0,9971
Diclorvos	0,6 a 1,4	0,050	0,150	0,9979

#### **7.4. Avaliação do método de extração dos pesticidas nas diferentes matrizes**

##### **7.4.1. Método de extração dos pesticidas das amostras de ração animal**

Para a extração dos pesticidas presentes nas amostras de ração animal preparadas e utilizadas para alimentação dos animais do projeto temático foram testados dois métodos diferentes.

Os testes preliminares realizados aplicando a técnica de MSPD e a extração com solvente (acetato de etila) em banho de ultrassom foram realizados utilizando apenas um nível de fortificação para cada pesticida de interesse. Esse valor de concentração foi escolhido com base na concentração encontrada em 0,5 g de ração animal preparada para a alimentação dos animais, submetida ao processo de extração descrito em 6.2.2.

O valor de recuperação, neste nível de fortificação, foi o parâmetro utilizado para avaliar eficiência da extração dos métodos propostos e dar

continuidade a validação do mesmo, na escolha do melhor do método a ser utilizado para a análise dos pesticidas nas amostras de ração animal.

Na MSPD, o uso de fases sólidas polares, sílica gel, florisil e celite para a realização do clean up das amostras após a dispersão em C18, apesar de fornecerem cromatogramas limpos (Figura 22), os valores de recuperação obtidos foram inferiores aos da recuperação para o mesmo nível de concentração quando utilizada a extração com solvente, em banho de ultrassom.

Esses valores de recuperação podem ser vistos na tabela 8. Os dados foram obtidos para as amostras fortificadas, seguindo-se o procedimento descrito na parte experimental. O método de MSPD proposto não pode ser considerado exato, uma vez que as recuperações obtidas no nível de fortificação escolhido não estão dentro dos limites estabelecidos pela literatura no que diz respeito a análises de pesticidas: 70 – 120% (BRITO et al.,2003)

**Tabela 9: Valores de recuperação (%) para os dois métodos testados no nível de concentração de 0,6 µg/g para cada pesticida.**

Comparação entre os métodos: MSPD x Acetato de Etila em banho de ultrassom				
Pesticida	Nível de Fortificação (µg/g)	Tipos de Fase sólida	Recuperação* (%) MSPD	Recuperação* (%) Extração com acetato de etila e banho de ultrassom
Dicofol	0,6	Sílica gel	--	90,2
	0,6	Florisil	--	
	0,6	Celite	--	
Dieldrin	0,6	Sílica gel	77,5	94,9
	0,6	Florisil	70,4	
	0,6	Celite	75,8	
Endosulfan - $\alpha$	0,6	Sílica gel	72,5	95,3
	0,6	Florisil	75,0	
	0,6	Celite	75,8	
Endosulfan - $\beta$	0,6	Sílica gel	68,0	70,1
	0,6	Florisil	69,5	
	0,6	Celite	72,0	
Permetrina cis	0,6	Sílica gel	76,0	82,3
	0,6	Florisil	78,1	
	0,6	Celite	78,5	
Permetrina trans	0,6	Sílica gel	75,0	97,2
	0,6	Florisil	76,9	
	0,6	Celite	77,2	
Diclorvos	0,6	Sílica gel	--	75,0
	0,6	Florisil	--	
	0,6	Celite	--	

De acordo com os valores de recuperação obtidos nesse nível de fortificação, pode-se determinar a eficiência do método, tanto no sentido da extração dos pesticidas de interesse como na obtenção de um extrato limpo e com o menor número de interferentes possíveis. Outro ponto importante nessa escolha foi o custo associado a realização do procedimento analítico escolhido (BARKER, 2000).

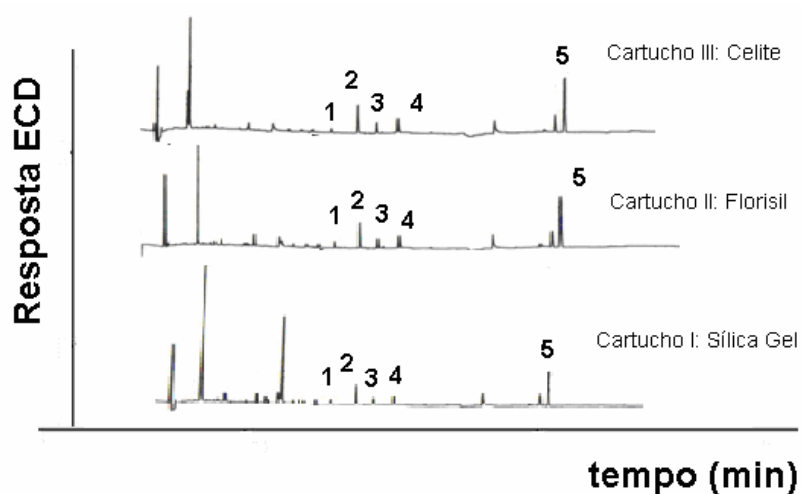
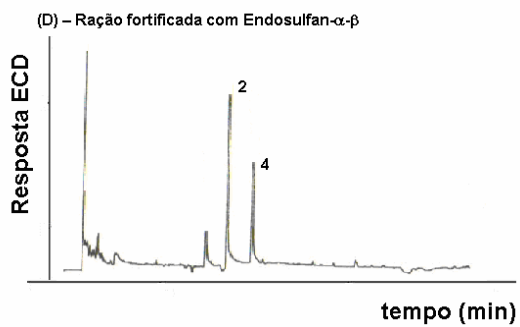
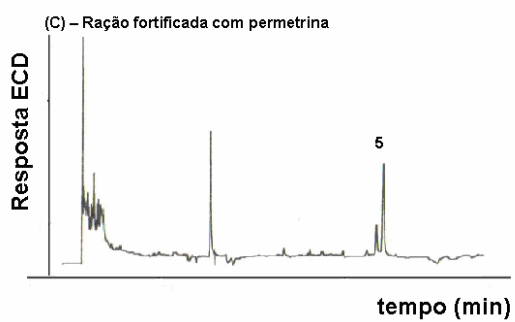
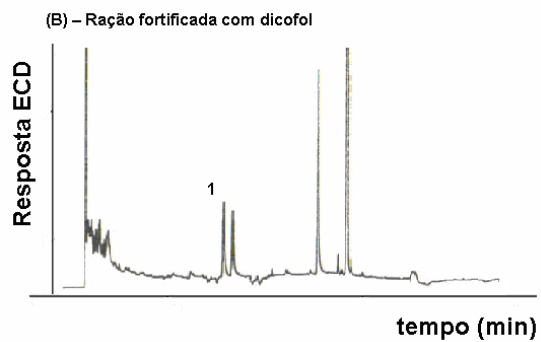
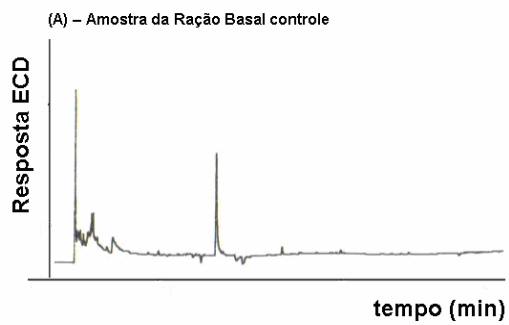


Figura 22: Cromatogramas obtidas pela injeção dos extratos redissolvidos em isoctano das amostras de ração basal fortificadas com a mistura de pesticidas extraídos utilizando o método 2 para os diferentes cartuchos. 1- dicofol; 2-endosulfan- $\alpha$ ; 3-dieldrin; 4-endosulfan- $\beta$ ; 5-permetrina cis-trans.

#### 7.4.1.1 Método proposto: extração com solvente em banho de ultrassom

A figura 23 mostra os cromatogramas obtidos a partir da extração da amostra de ração basal controle fortificada com os pesticidas individualmente e na forma de mistura utilizando o método de extração escolhido e descrito em 6.7.1.



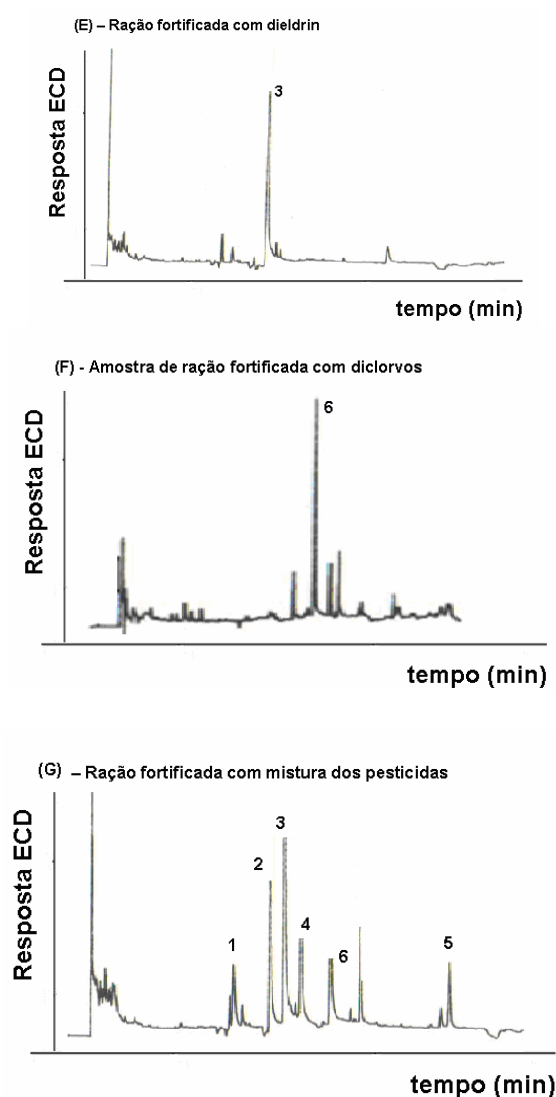


Figura 23: Cromatograma obtido pela injeção de 1 $\mu$ L do extrato em da amostra de ração basal controle (A), amostra ração basal fortificada com Dicofol (B), Permetrina (C), Endosulfan (D), Dieldrin (E), Diclorvos (F) e mistura dos pesticidas (G) extraídas utilizando o método 1. 1- dicofol; 2-endosulfan- $\alpha$ ; 3-dieldrin; 4-endosulfan- $\beta$ ; 5-permetrina cis-trans; 6-diclorvos.

No cromatograma (A) da figura 23 obtido da extração da amostra de ração basal controle foi detectado um pico não identificado e que permaneceu nas outras extrações, não comprometendo a avaliação das amostras de ração fortificadas com os pesticidas individualmente e na forma de mistura.

Em (B), a ração fortificada com dicofol apresentou picos em tempos de retenção distintos aos esperados para o padrão de dicofol (11,04 minutos). Em

estudos de rastreabilidade do padrão de dicofol utilizado tanto no preparo das amostras de ração como no preparo das soluções padrões em isooctano, este pesticida apresentou problemas de estabilidade e impurezas que serão discutidos posteriormente.

#### 7.4.1.2 Validação do método proposto

##### Seletividade:

A seletividade do método proposto foi avaliada através da comparação de uma amostra de ração controle (isenta de pesticidas) e outra amostra fortificada com a mistura dos pesticidas na concentração de 1,0 ng/ $\mu$ L.

De acordo com a figura 24, pode-se afirmar que o método proposto é seletivo, pois não apresenta nenhum sinal de pico cromatográfico com tempos de retenção iguais ou muito próximos aos tempos de retenção dos pesticidas de interesse.

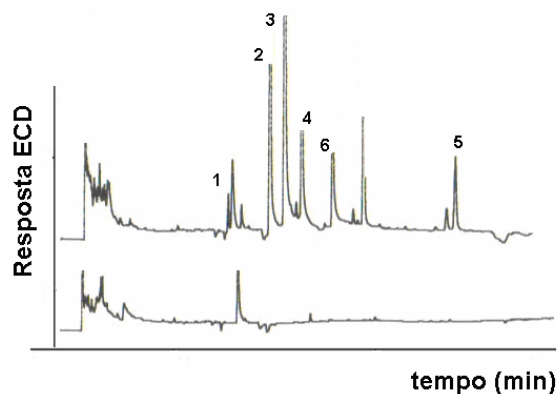


Figura 24: Comparação entre o cromatograma obtido da amostra de ração basal controle e da amostra fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan- $\alpha$ ; 3-dieldrin; 4-endosulfan- $\beta$ ; 5-permetrina cis-trans; 6-diclorvos.

### **Limites de detecção e quantificação do método**

O limite de quantificação do método proposto para todos os pesticidas é 0,4 µg/g, o menor nível de fortificação. Os resultados obtidos (Tabela 9) estão de acordo com as condições estipuladas por Thier (1987):

- LQ maior que o LD para todos os contaminantes;
- %recuperação variaram entre 70-120%;
- Coeficientes de variação (CV) foram menores que 20%.

### **Estudos de recuperação do método proposto**

Os estudos de recuperação foram realizados para verificar exatidão e precisão do método proposto, uma vez que esses estudos fornecem parâmetros seguros para avaliação dessas variáveis.

Os dados obtidos para as amostras fortificadas, seguindo-se o procedimento descrito na parte experimental encontram-se na tabela 9.

Tabela 10: Valores de limites de quantificação (LQ) do método 1 e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas nas amostras de ração animal.

Método: Extração com acetato de etila e banho de ultrassom					
Pesticida	Nível Fortificação (µg/g)	LQ (µg/g)	Recuperação* (%)	Sd	CV(%)
Dicofol	0,4		95,3	6,7	7,0
	0,6	0,4	90,2	4,9	5,0
	0,8		96,1	5,5	5,7
Dieldrin	0,4		88,1	3,8	4,3
	0,6	0,4	94,9	7,5	7,5
	0,8		97,6	2,8	2,8
Endosulfan- α	0,4		99,2	0,9	0,9
	0,6	0,4	95,3	6,5	6,8
	0,8		96,4	2,4	2,5
Endosulfan-β	0,4		98,1	2,6	2,7
	0,6	0,4	70,1	8,7	12,4
	0,8		88,2	2,5	2,9
Permetrina-cis	0,4		86,8	3,5	4,0
	0,6	0,4	82,3	2,5	3,0
	0,8		91,9	5,8	6,4
Permetrina-trans	0,4		97,1	2,2	2,3
	0,6	0,4	97,2	3,4	3,5
	0,8		98,6	0,8	1,0

\* 3 extrações para cada nível de fortificação e 3 injeções de cada amostra.

### Exatidão

Como foi dito anteriormente, a exatidão pode ser avaliada pela porcentagem de recuperação do método. Como pode ser observado na tabela 9, o método proposto é considerado exato, uma vez que as recuperações em todos os níveis de fortificação estão dentro dos limites estabelecidos pela literatura no que diz respeito a análises de pesticidas: 70 – 120% (INSTITUTO



NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).

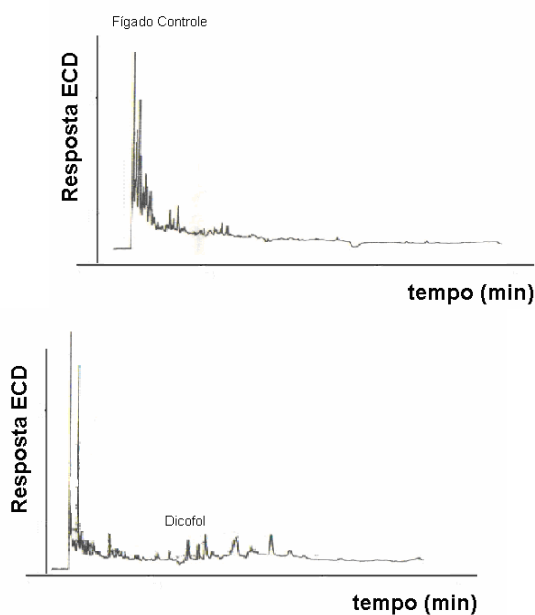
### **Precisão**

A precisão do método proposto foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual (CV%) obtidos nos estudos de recuperação. Como podem ser observados na tabela 9, os valores de CV (%) variam entre 0,9 e 12,4% e estão abaixo dos limites estabelecidos pela literatura que é de 20% (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA, 2003; RIBANI et al., 2004).

#### **7.4.2 Método de extração dos pesticidas das amostras biológicas (fígado e cérebro) de rato macho de Lewis**

O método utilizado para extração dos pesticidas nas amostras de fígado foi uma adaptação dos métodos descritos na literatura para análises de amostras de fígado em diferentes animais: galinha, porco, peixes (FRENICHI et al., 2007).

Os cromatogramas obtidos das amostras de fígado controle fortificadas com os pesticidas estudados podem ser vistos na figura 25.



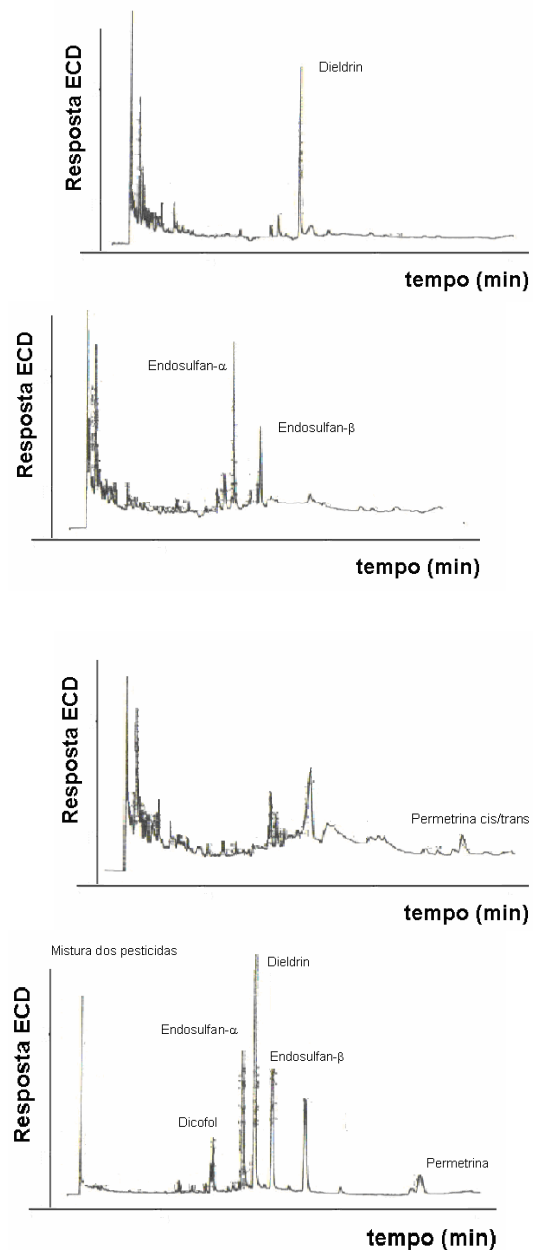


Figura 25: Cromatogramas obtidos das extrações das amostras de fígado controle fortificadas com os pesticidas de interesse: dicofol, dieldrin, endosulfan, permetrina e mistura de pesticidas.

Para as amostras de cérebro de rato foi testado o método utilizado para extração dos pesticidas na ração animal. Os cromatogramas das extrações podem ser vistos na figura 26.

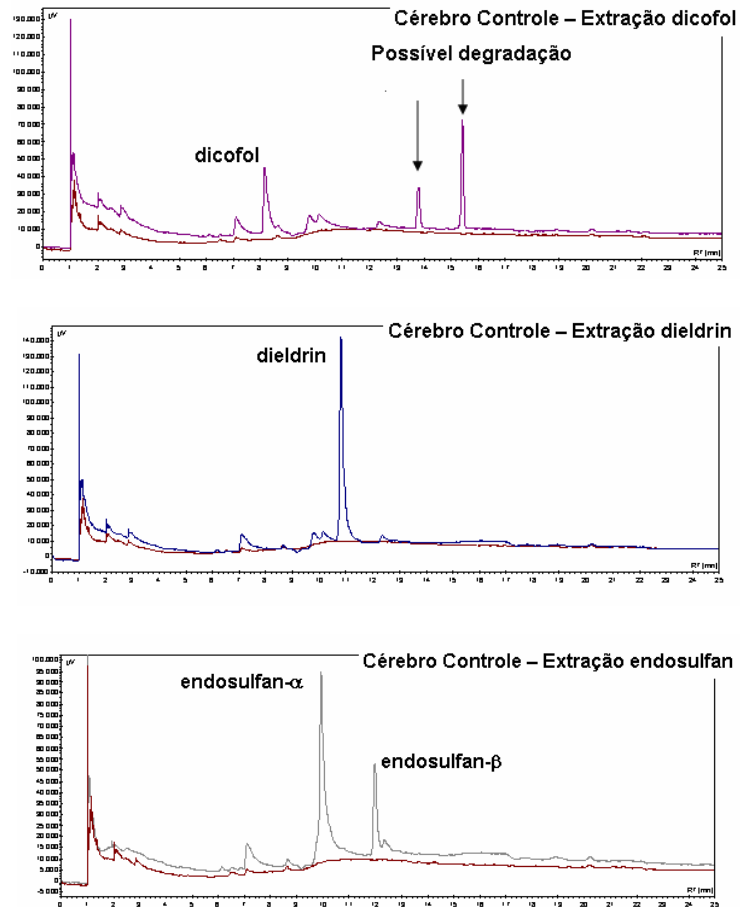


Figura 26: Cromatogramas obtidos das extrações das amostras de cérebro controle fortificadas com os pesticidas de interesse: dicofol, dieldrin e endosulfan.

### 7.4.2.1 Validação dos métodos de extração para amostras de fígado e cérebro de ratos

#### Seletividade:

A seletividade dos métodos propostos foi avaliada através da comparação de uma amostra de fígado e cérebro controle (isenta de pesticidas) e outra amostra fortificada com a mistura dos pesticidas na concentração de 1,0 ng/ $\mu$ L.

De acordo com a figura 27 pode-se afirmar que o método proposto para extração dos pesticidas das amostras de fígado é seletivo, pois não apresenta nenhum sinal de pico cromatográfico com tempos de retenção iguais ou próximos aos tempos de retenção dos pesticidas de interesse. O mesmo pode-se dizer do método proposto para a extração desses pesticidas nas amostras de cérebro, conforme figura 28.

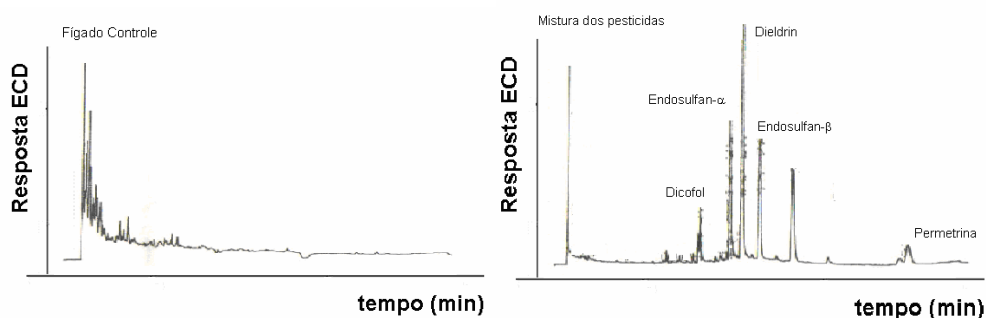


Figura 27: Comparação entre o cromatograma obtido do fígado controle e da amostra de fígado fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan- $\alpha$ ; 3-dieldrin; 4-endosulfan- $\beta$ ; 5-permetrina cis-trans.

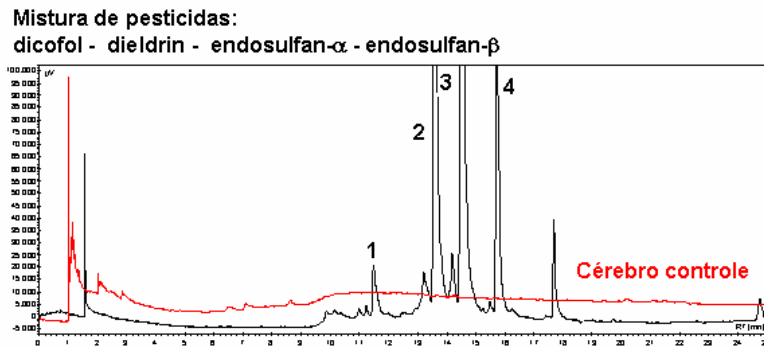


Figura 28: Comparação entre o cromatograma obtido do fígado controle e da amostra de fígado fortificada com os pesticidas: 1- dicofol; 2-endosulfan- $\alpha$ ; 3-dieldrin; 4-endosulfan- $\beta$ .

### Limites de detecção e quantificação do método

O limite de quantificação do método proposto para extração dos pesticidas das amostras de fígado é 0,1  $\mu\text{g/g}$  para dicofol, dieldrin, endosulfan ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e de 0,5  $\mu\text{g/g}$  para permetrina (o menor nível de fortificação para todos os pesticidas estudados).

Para as amostras de cérebro, o limite de quantificação do método é de 0,1  $\mu\text{g/g}$  para dicofol, dieldrin e endosulfan ( $\alpha$ - $\beta$ ).

Os valores de LQ e LD para os métodos propostos para amostras de fígado e cérebro podem ser visto nas tabelas 10 e 11, estando de acordo com as condições estipuladas por Thier (1987).

### Estudos de recuperação dos métodos propostos

Os estudos de recuperação foram feitos para verificar exatidão e precisão dos métodos propostos e fornecem parâmetros seguros para avaliação dessas variáveis. As recuperações foram calculadas da mesma maneira do método de extração da ração animal. Os dados obtidos para as

amostras fortificadas, seguindo-se o procedimento descrito na parte experimental, encontram-se nas tabelas 10 e 11.

### **Exatidão**

Os métodos propostos podem ser considerados exatos conforme os valores de recuperação obtidos para amostras de fígado e cérebro (Tabelas 10 e 11), respeitando os limites estabelecidos pela literatura no que diz respeito a análises de pesticidas: 70 – 120% (BRITO et al.,2003).

### **Precisão**

A precisão dos métodos propostos foi avaliada através dos valores obtidos dos coeficientes de variação percentual (CV%) nos estudos de recuperação. Como podem ser observados na tabela 10, os valores de CV (%) variam entre 0,2 e 7,1% para amostras de fígado e entre 0,4 e 6,0% para as amostras de cérebro (Tabela 11), e estão abaixo dos limites estabelecidos pela literatura de 20% (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

**Tabela 11: Valores de limites de quantificação (LQ) e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas organoclorados e permetrina das amostras de fígado de rato.**

<b>Pesticida</b>	<b>Nível Fortificação (µg/g)</b>	<b>LQ (µg/g)</b>	<b>Recuperação* (%)</b>	<b>Sd</b>	<b>CV(%)</b>
<b>Dicofol</b>	0,1		77,5	0,5	0,6
	0,3	0,1	66,7	3,3	4,9
	0,5		104,2	4,0	3,8
<b>Dieldrin</b>	0,1		92,6	1,4	1,5
	0,3	0,1	78,2	1,4	1,8
	0,5		51,0	3,6	7,1
<b>Endosulfan- α</b>	0,1		87,5	2,0	2,3
	0,3	0,1	52,0	1,0	1,3
	0,5		81,0	2,4	3,0
<b>Endosulfan-β</b>	0,1		70,0	1,0	1,4
	0,3	0,1	75,0	1,5	2,0
	0,5		94,0	1,2	1,3
<b>Permetrina-cis</b>	0,5		68,9	0,1	0,2
	0,8	0,5	69,0	1,1	1,6
	1,0		70,4	1,6	2,3
<b>Permetrina-trans</b>	0,5		72,9	1,4	2,0
	0,8	0,5	75,6	2,4	3,2
	1,0		79,0	1,1	1,4

\* 3 extrações para cada nível de fortificação e n=5 injeções de cada amostra.

**Tabela 12: Valores de limites de quantificação (LQ) e Recuperação (%) encontrados nas extrações dos pesticidas organoclorados das amostras de cérebro de rato.**

<b>Pesticida</b>	<b>Nível Fortificação (µg/g)</b>	<b>LQ (µg/g)</b>	<b>Recuperação* (%)</b>	<b>Sd</b>	<b>CV(%)</b>
<b>Dicofol</b>	0,1		80,0	1,1	1,4
	0,3	0,1	77,6	0,7	0,9
	0,5		82,1	0,8	1,0
<b>Dieldrin</b>	0,1		87,5	0,5	0,6
	0,3	0,1	84,5	0,7	0,9
	0,5		81,0	1,1	1,4
<b>Endosulfan- α</b>	0,1		75,8	2,8	3,7
	0,3	0,1	77,4	1,0	1,3
	0,5		81,0	1,1	1,4
<b>Endosulfan-β</b>	0,1		70,0	4,2	6,0
	0,3	0,1	75,0	1,1	1,5
	0,5		79,2	0,3	0,4

\* 3 extrações para cada nível de fortificação e n=5 injeções de cada amostra.

## **7.5. Quantificação das amostras provenientes do estudo biológico**

### **7.5.1 Estudos de quantificação das amostras de ração basal animal**

Baseado nas melhores condições cromatográficas e nos valores de recuperação dos métodos estudados obteve-se um método para quantificação dos pesticidas nas amostras de ração animal preparadas durante o estudo e utilizadas na alimentação dos ratos machos de Lewis.

Essas amostras de ração foram preparadas no início do estudo e ministradas para os animais durante o período de alimentação. Após o preparo, foram armazenadas em papel alumínio e mantidas em freezer a temperatura de -18°C.



O controle de qualidade dessas amostras de ração que foram preparadas com uma concentração conhecida dos pesticidas estudados permitiu avaliar se durante o experimento, os animais se alimentaram com a concentração desejada dos pesticidas. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 13: Valores de concentração encontrados nas amostras de ração basal animal.**

Ração	Pesticida	Concentração esperada	Concentração encontrada	Concentração encontrada	Contaminantes
		( $\mu\text{g/g}$ )	(L1) ( $\mu\text{g/g}$ )	(L2) ( $\mu\text{g/g}$ )	
G4	Dicofol	29,18	21,50	8,64	
G5	Permetrina cis	290,92	191,37	41,89	
	Permetrina trans		196,47	60,03	
G6	Diclorvos	26,80	ND	ND	
G7	Dieldrin	0,584	+	+	
G8	$\alpha$ -Endosulfan	33,77	29,60	25,63	Endosulfan
			34,70	23,16	
	$\beta$ -Endosulfan				Dieldrin

ND: não detectado ou abaixo do LDm (limite de detecção); +: abaixo do LQm (limite de quantificação) e acima do LDm (limite de detecção).

As amostras de ração animal analisadas apresentaram valores inferiores aos esperados. Essas perdas podem ter ocorrido por diversos fatores e em diferentes etapas do processo de preparo da mesma, na homogeneização da mistura da ração basal controle com os padrões dos pesticidas, na decomposição dos pesticidas durante todo o processo ou mesmo pela forma de amostragem da ração. Na tentativa de minimizar as diferenças entre os resultados encontrados as amostras de ração animal foram separadas em dois lotes:

- **LOTE 1:** amostras de ração coletadas e armazenadas logo após o preparo.

- **LOTE 2**: amostras de ração coletadas e armazenadas após o término do período de alimentação.

Como pode ser observado na tabela 12, as concentrações encontradas nos dois lotes das amostras não estão dentro do esperado. Além disso, nas amostras preparadas pela adição de dieldrin e diclorvos não foram detectados esses pesticidas.

A falta de homogeneidade da amostra pode explicar a não detecção do dieldrin. Nesse caso, foi adicionado 0,007 gramas do pesticida em 12.000 gramas de ração basal. Essa diferença de massa e a solubilidade do dieldrin no solvente escolhido (etanol) para dispersão do pesticida por toda a massa de ração não favoreceu de forma eficiente a agregação no preparo da ração. A degradação do dieldrin durante o preparo ou durante a alimentação dos animais é praticamente nula devido a alta estabilidade desta molécula (TOMLIN, 2002; ASTDR, 2002a).

O outro pesticida do estudo não detectado nas amostras analisadas foi o diclorvos que é um pesticida organofosforado e apresenta menor estabilidade frente aos organoclorados (Tomlin, 2002).

O dicofol apesar de ser organoclorado e persistente sofre fotodegradação (TOMLIN, 2002) formando dois produtos de degradação identificados nos cromatogramas das amostras (ANEXO IV). O pesticida organoclorado dicofol é extremamente importante, uma vez que seu uso é permitido para citrus no Brasil (ANVISA, 2010c) e apresenta como produto de degradação a substância 4,4'-diclorobenzofenona quando exposto a luz, quando presente em meio básico ou quando submetido a altas temperaturas e seus produtos de degradação não são incluídos na definição de resíduo de pesticida pela legislação. Uma sugestão para a inibição ou controle dessa degradação seria a adição de ácido acético ou ácido ortofosfórico no processo de preparo de amostras contendo o pesticida (TONLIM, 2002).

De acordo com os valores encontrados nas amostras de ração utilizadas durante o período de alimentação dos animais, as alterações fisiológicas, patológicas encontradas nos animais não podem ser diretamente e somente relacionadas à concentração adicionada do pesticida. Com isso deve-se ressaltar a importância do preparo da ração utilizada e a relação com os

efeitos toxicológicos observados nos animais. Esse controle de qualidade da ração não é realizado ou pelo menos não é citado na literatura, o que pode colocar em dúvida a veracidade dos resultados obtidos em ensaios desse tipo.

Alguns cromatogramas obtidos para as amostras de ração (ANEXO IV) apresentaram a presença de picos desconhecidos o que sugere uma possível degradação dos pesticidas. Frente a essa situação, torna-se importante os estudos de estabilidade dos pesticidas na amostra de ração basal, para determinar quanto tempo após o preparo pode-se confiar na concentração adicionada. Esse estudo foi realizado pelo aluno de monografia pertencente ao projeto temático.

Foram preparadas cinco amostras de ração, cada uma contendo um dos pesticidas em estudo nas concentrações utilizados no projeto temático. No dia do preparo foram recolhidas três amostras de cada porção e analisadas por CG/ECD. As amostras foram refrigeradas e analisadas semanalmente. Durante o período de seis semanas, não foi observado nenhuma alteração significativa nos valores de concentração dos pesticidas, garantindo assim a ingestão da concentração desejada neste período.

### **7.5.2 Estudos de quantificação das amostras de fígado e cérebro de ratos**

As amostras de fígado e cérebro quantificadas nesse trabalho foram obtidas dos ensaios biológicos realizados na Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP (FMB). Os ratos machos da linhagem Lewis foram contidos em gaiolas no biotério do Departamento de Patologia da FMB-UNESP e alimentados durante o período de 8 semanas com a ração preparada no mesmo local, com os pesticidas individuais na dose LOEL e na mistura nas doses LOEL e NOEL.

Após o período de experimentação, os animais foram submetidos à eutanásia para retirada dos órgãos. O procedimento foi realizado na sala de necropsia do Departamento de Patologia da FMB envolvendo todos os pesquisadores do projeto temático. Cada pesquisador, respeitando sua linha de pesquisa, realizou a coleta e o devido armazenamento das suas amostras.

Todo procedimento cirúrgico para a retirada do fígado e cérebro foi realizado utilizando luvas de nitrila e material cirúrgico individual e trocado para cada tipo de pesticida com o objetivo de evitar a contaminação cruzada entre as amostras.

As amostras de cérebro foram pesadas logo após a sua retirada, mantidas inteiras e armazenadas em papel alumínio e refrigeração a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As amostras de fígado foram divididas para os respectivos grupos de pesquisa, ficando para esse estudo a última porção do órgão retirado. Em seguida, foram armazenadas conforme feito com as amostras de cérebro.

Todas as amostras foram devidamente transportadas ao laboratório GRESCO do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química-UNESP, onde ficaram refrigeradas até o momento da análise de quantificação.

Após desenvolvimento e validação dos métodos propostos para essas matrizes, as amostras foram condicionada à temperatura ambiente e submetidas ao processo de extração descrito nos itens 7.4.1 e 7.4.2.

As amostras de fígado apresentavam-se em pequenos pedaços e para extração dos pesticidas foi feita a sua completa homogeneização. Para o estudo de quantificação, foi pesado 0,5g da amostra em triplicata e submetido ao método de extração.

As amostras de fígado foram quantificadas individualmente e os valores de concentração encontrados estão na tabela 13.

**Tabela 14: Valores de concentração dos pesticidas encontrados nas extrações das amostras de fígado de ratos machos de Lewis.**

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) dos pesticidas encontrados nas amostras de fígado de rato					
	Dicofol	$\alpha$ - Endosulfan	Dieldrin	$\beta$ - Endosulfan	Cis- permetrina-	Trans- permetrina
R2CX1-1	+	+	+	+	+	+
R2CX1-2	+	+	+	+	+	+
R2CX1-3	+	+	+	+	+	+
R2CX1-4	+	+	+	+	+	+
R2CX1-5	+	+	+	+	+	+
R2CX2-1	+	+	+	+	+	+
R2CX2-2	+	+	+	+	+	+
R2CX2-3	+	+	+	+	+	+
R2CX2-4	+	+	+	+	+	+
R2CX2-5	+	+	+	+	+	+
R3CX1-1	+	+	+	+	+	+
R3CX1-2	+	+	+	+	+	+
R3CX1-3	+	+	+	+	+	+
R3CX1-4	+	+	+	+	+	+
R3CX1-5	+	+	+	+	+	+
R3CX2-1	+	+	+	+	+	+
R3CX2-2	+	+	+	+	+	+
R3CX2-3	+	+	+	+	+	+
R3CX2-4	+	+	+	+	+	+
R3CX2-5	+	+	+	+	+	+
R3CX3-1	+	+	+	+	+	+
R3CX3-2	+	+	+	+	+	+
R4CX1-1	1,28	----	----	----	----	----
R4CX1-2	ND	----	----	----	----	----
R4CX1-3	1,10	----	----	----	----	----

R4CX1-4	0,46	----	----	----	----	----
R4CX1-5	1,07	----	----	----	----	----
R4CX3-1	0,61	----	----	----	----	----
R6CX1-1	----	----	----	----	+	+
R6CX1-2	----	----	----	----	+	+
R6CX1-3	----	----	----	----	+	+
R6CX2-1	----	----	----	----	+	+
R6CX2-2	----	----	----	----	+	+
R6CX2-3	----	----	----	----	+	+
R7CX1-1	----	ND	+	ND	----	----
R7CX1-2	----	1,90	+	2,98	----	----
R7CX1-3	----	7,97	+	9,59	----	----
R7CX2-1	----	ND	+	ND	----	----
R7CX2-2	----	2,78	+	6,06	----	----
R7CX2-3	----	ND	ND	ND	----	----
R8CX1-1	----	----	ND	----	----	----
R8CX1-2	----	----	5,38	----	----	----
R8CX1-3	----	----	1,57	----	----	----
R8CX2-1	----	----	ND	----	----	----
R8CX2-2	----	----	ND	----	----	----
R8CX2-3	----	----	ND	----	----	--

\*R2CX1-1: ração R2 (mistura NOEL), caixa 1, animal 1; R2: mistura NOEL; R3: mistura LOEL; R4: dicofol (LOEL); R6: permetrina (LOEL); R7: endosulfan (LOEL); R8: dieldrin (LOEL); ND: não detectado ou abaixo do LDm (limite de detecção); +: abaixo do LQm (limite de quantificação) e acima do LDm (limite de detecção); ---: não analisado.

Nesse estudo não foi considerado o grupo alimentado com diclorvos, uma vez que no procedimento de quantificação das amostras de ração utilizadas para alimentação dos animais não foi encontrado o pesticida.

Os grupos R2 e R3, alimentados com a mistura dos pesticidas na dose LOEL e NOEL, forneceram amostras de fígado em que os pesticidas

encontrados ficaram abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção do método.

No grupo R4 apenas um animal não apresentou nas amostras de fígado o pesticida dicofol. Nesse grupo, os picos possivelmente referentes a degradação do dicofol estiveram presentes em todos os cromatogramas obtidos (ANEXO V).

O efeito da contaminação observada nas amostras de ração contendo dieldrin e endosulfan pode ser observada nas amostras de fígado do grupo R7, onde além de endosulfan também foi encontrado dieldrin abaixo do limite de quantificação. Apenas duas amostras do grupo R8 apresentaram a presença de dieldrin, não sendo detectado nas demais amostras do mesmo grupo.

A tabela. 15 sumariza os dados obtidos para fígado dos animais de experimentação (ratos Lewis) neste trabalho.

**Tabela 15:** Sumário dos resultados obtidos para determinação dos pesticidas estudados em matriz de fígado de ratos Lewis

Pesticida	N	n	Concentração (µg/g)	
			Intervalo	mediana
dicofol	45	5	0,46 – 1,28	1,07
dieldrin	45	2	1,57 e 5,38	--
α endossulfan	45	3	1,9 – 7,97	2,78
β endossulfan	45	3	2,98 – 9,59	6,06
cis-permetrina	45	0	--	--
trans-permetrina	45	0	--	--

N = número total de amostras; n= numero de amostras no qual o analito foi quantificável.

Diferentemente das amostras de fígado, as amostras de cérebro foram mantidas inteiras e intactas após sua retirada do animal. Essas amostras foram pesadas antes do armazenamento em papel alumínio e refrigeração a - 18°C.

Para o estudo de quantificação dessa matriz, foi utilizado o cérebro inteiro com cerca de 1,0g.

Todo o procedimento de condicionamento da amostra para início da extração foi realizado no tubo de extração, inclusive a homogeneização para evitar perdas da amostra e dos pesticidas.

Os valores de concentração obtidos para as amostras de cérebro podem ser vistos na tabela 14.

**Tabela 16: Valores de concentração dos pesticidas encontrados nas extrações das amostras de cérebro de ratos machos de Lewis.**

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) dos pesticidas encontrados nas amostras de cérebro de rato			
	Dicofol	$\alpha$ -Endosulfan	Dieldrin	$\beta$ -Endosulfan
R2CX1-1	+	3,92	0,22	0,69
R2CX1-2	30,67	4,13	3,13	34,64
R2CX1-3	12,08	3,40	0,26	2,13
R2CX1-4	24,65	2,42	0,46	7,83
R2CX1-5	16,28	0,92	0,36	14,14
R2CX2-1	0,95	ND	0,04	1,10
R2CX2-2	2,39	0,55	0,78	22,19
R2CX2-3	29,41	1,50	3,09	43,72
R2CX2-4	9,73	0,04	0,63	12,59
R2CX2-5	8,70	0,08	0,60	23,60
R3CX1-1	2,02	0,50	0,07	4,77
R3CX1-2	24,71	2,84	0,56	17,95
R3CX1-3	5,80	1,16	0,46	20,88
R3CX1-4	51,64	8,96	5,82	22,22
R3CX1-5	16,28	0,92	0,36	14,4
R3CX2-1	27,09	2,58	0,73	25,40
R3CX2-2	28,35	2,11	0,59	20,54
R3CX2-3	3,65	2,18	0,78	28,48
R3CX2-4	11,85	1,06	0,52	29,10
R3CX2-5	1,69	1,31	0,52	32,87
R3CX3-1	10,73	1,58	0,47	22,18
R3CX3-2	22,09	2,46	0,46	20,07



R4CX1-1	2,91	0,61	----	----
R4CX1-2	7,26	----	----	----
R4CX1-3	3,88	----	----	----
R4CX1-4	3,36	----	----	----
R4CX1-5	16,76	----	----	----
R7CX1-1	0,21	----	0,10	0,14
R7CX1-2	20,72	0,07	+	0,53
R7CX1-3	----	0,58	0,06	0,06
R7CX2-1	29,37	2,31	4,9	+
R7CX2-2	----	1,42	2,08	+
R7CX2-3	27,23	+	+	0,94
R8CX1-1	32,57	1,72	1,65	6,43
R8CX1-2	0,40	0,10	0,41	10,70
R8CX1-3	----	0,08	+	4,43
R8CX2-1	3,33	0,47	1,39	12,96
R8CX2-2	----	0,04	0,20	0,79
R8CX2-3	0,25	0,34	0,12	+

\*R2CX1-1: ração R2 (mistura NOEL), caixa 1, animal 1; R2: mistura NOEL; R3: mistura LOEL; R4: dicofol (LOEL); R7: endosulfan (LOEL); R8: dieldrin (LOEL); ND: não detectado ou abaixo do LDm (limite de detecção); +: abaixo do LQm (limite de quantificação) e acima do LDm (limite de detecção) e ----: não analisado.

Todas as amostras do grupo R2 e R3 forneceram cérebros contendo os pesticidas administrados durante a alimentação dos animais.

O efeito da contaminação observada nas amostras de ração contendo dieldrin e endosulfan continuou nas amostras de cérebro do grupo R7 e R8. Os cromatogramas destas amostras apresentaram picos característicos da presença conjunta destes pesticidas.

A tabela 17 sumariza os dados obtidos para cérebro dos animais de experimentação (ratos Lewis) neste trabalho.

**Tabela 17:** Sumário dos resultados obtidos para determinação dos pesticidas estudados em matriz de cérebro de ratos Lewis

Pesticida	N	n	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	
			Intervalo	mediana
dicofol	38	34	0,21 – 51,64	11,29
dieldrin	38	31	0,04 – 5,82	0,52
$\alpha$ endossulfan	38	32	0,04 – 8,96	1,24
$\beta$ endossulfan	38	31	0,06 – 43,72	14,14

N = número total de amostras; n= numero de amostras no qual o analito foi quantificável

## 8 Conclusões

As condições cromatográficas otimizadas nesse trabalho permitem a análise simultânea dos pesticidas desejados em um tempo menor quando comparado aos descritos na literatura (CARDOSO et al., 2004) em estudos que envolvem matrizes complexas, viabilizando sua aplicação em trabalhos que exigem um elevado número de amostras.

Os métodos propostos para as diferentes matrizes (ração animal, fígado e cérebro) estão adequados aos parâmetros de validação analítica (intervalo de trabalho, linearidade do detector, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação do equipamento e do método). Outra característica é a pequena massa de amostra necessária para os processos de extração, o que facilita a aplicação destes em amostras como as do estudo (cérebro e fígado).

Os valores dos limites de quantificação dos métodos e demais parâmetros de validação (recuperação e precisão) foram adequados aos objetivos do trabalho, onde os animais foram expostos aos pesticidas em concentrações conhecidas através da alimentação.

A aplicação dos métodos nas amostras provenientes do estudo biológico (ração animal, fígado e cérebro dos animais de experimentação) possibilitou a quantificação dos pesticidas dicofol, endossulfan, dieldrin, diclorvos e permetrina para as amostras de ração; dicofol, dieldrin, endossulfan e permetrina para amostras de fígado e dicofol, dieldrin e endossulfan para as amostras de

cérebro. Nas amostras de ração preparadas com diclorvos não pode ser quantificado e detectado a presença deste pesticida.

Para as amostras de ração animal, os resultados encontrados ficaram muito abaixo do esperado, de acordo com a concentração de pesticida utilizada no preparo da mesma. Acredita-se que esse problema durante o preparo da ração seja decorrente principalmente da falta de homogeneidade da mesma. A hipótese de degradação de algumas das moléculas estudadas durante o preparo ou durante a alimentação dos animais foi descartada baseando-se nos resultados encontrados no estudo de estabilidade. Não houve decréscimo significativo nas concentrações ao longo deste tempo, o que reforça a hipótese da falta de homogeneidade ser a causadora das baixas concentrações encontradas.

Também pode ser detectada a contaminação cruzada nas amostras de ração, ou seja, alguns dos grupos de ração (G1 a G7) continham pesticidas que não foram adicionados durante o seu preparo. Este achado foi de extrema importância no estudo biológico, tanto para a interpretação dos resultados para animais alimentados com estas rações, como para revisão do processo de preparação da ração, buscando eliminar este tipo de contaminação.

Esses resultados podem orientar os estudos biológicos em que são avaliados os efeitos da exposição aos pesticidas, entretanto, a avaliação da possível relação entre os dados obtidos neste trabalho e sua interferência no funcionamento do organismo dos animais deve ser melhor investigada.

Como perspectivas futuras pode-se destacar: a necessidade da análise de sangue e excreta dos animais para buscar dados sobre a dose corpórea dos analitos, bem como sua distribuição e excreção.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 maio 2003, guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Coordenação Geral de Acreditação-Documento de caráter orientativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 maio 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Controlando agrotóxicos nos alimentos**: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, A FIOCRUZ/INCQS e os Laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE. 2001-2004. p. 98. Relatório de Atividades.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 361-363, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório 2001-2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel\\_anual\\_2001-2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2007.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2010a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados\\_PARA\\_2008.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados_PARA_2008.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2010b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: monografias de produtos de agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2010c.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. **Toxicological profile for Endosulfan**. Atlanta, 2000. p. 323.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. **Toxicological profile for Aldrin/Dieldrin**. Atlanta, 2002a. p. 354.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. **Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD**. Atlanta, 2002b. p. 497.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for Pyrethrins and Pyrethroids**. Atlanta, 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. **Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane**. Atlanta, 2005. p. 377.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1007, p. 137-143, 2003.

- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: Ed. UFV, 2004.
- BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion: review. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.
- BARRINUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Recent results on the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides from water at ppt levels. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 485-488, 2000.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 113, p. 129-146, 2003.
- CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 529-537, 2000.
- CARDOSO, M. H. W. M.; BASTOS, L. H.; NEVES, T. S.; ABRANTES, S. Implementação da técnica de MSPD para determinação de resíduos de agrotóxicos em laranjas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 298-302, 2004.
- CARPENTER, D. O.; ARCARO, K. F.; BUSH, B.; NIEMI, W. D.; PANG, S.; VAKHARIAD, D. Human health and chemical mixtures: an overview. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 1263-1270, 1998.
- CARVALHO, A. W.; MATOS, G. B.; CRUZ, S. L. B.; RODRIGUES, D. S. Intoxicação aguda por Aldrin: relação dos níveis séricos com efeitos tóxicos no homem. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 34-46, 1990.
- CHALER, R.; VILANOVA, R.; SANTIAGO-SILVA, M.; FERNANDEZ, P.; GRIMALT, J. O. Enhanced sensitivity in the analysis of trace organochlorine compounds by negative ion mass spectrometry using ammonia as reagent gas. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 73-79, 1998.
- CHU, X-G.; HU, X-Z.; YAO, H-Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 201-210, 2005.
- CISCATO, C. C. H. P.; GEBARA, A. B.; SPINOZA, H. S. Resíduos de pesticidas em leite bovino e materno. **Pesticidas: Revista de Toxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 25-38, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Valores de referência de toxicidade para a saúde humana:** Aldrin, Dieldrin e Endrin. Disponível em: <[http://www.ambiente.sp.gov.br/uploads/arquivos/publicacoes/valores\\_referencia\\_toxicidade .pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/uploads/arquivos/publicacoes/valores_referencia_toxicidade.pdf)>. Acesso em: 30 jul. 2009.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; LUIZ, H.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas:** Revista de Toxicologia e Meio- Ambiente, v. 15, p. 65-72, 2005.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIA, M. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 553, n. 1/2, p. 50-57, 2005.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide information profiles:** endosulfan. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>>. Acesso em: 31 jul. 2009a.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide information profiles:** permethrin. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/permethr.htm>>. Acesso em: 31 jul. 2009b.

FURUSAWA, N. A toxic reagent-free method for normal-phase matrix solid-phase dispersion extraction and reversed-phase liquid chromatographic determination of aldrin, dieldrin, and DDTs in animal fats. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 8, p. 2004-2007, 2004.

GARRIDO FRENICH, A.; MARTINEZ VIDAL, J. L.; CRUZ SICILIA, A. D.; GONZALEZ RODRIGUEZ, M. J.; PLAZA BOLANOS, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, n. 1/2, p. 42-52, 2006.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.

GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos.** São Paulo, 1999.

HACK, R.; EBERT, E.; LEIST, K-H. Chronic toxicity and carcinogenicity studies with the insecticide endosulfan in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 941-950, 1995.

HOEKSTRA, P. F.; BURNISON, B. K.; GARRISON, A. W.; NEHELI, T.; MUIR, D. C.G. Estrogenic activity of dicofol with the human strogen receptor: isomer- and enantiomerspecific implications. **Chemosphere**, v. 64, p. 174-177, 2006.

HOWSAM, M.; GRIMALT, J. O.; GUINÓ, E.; NAVARRO, M.; MARTÍ-RAGUÉ, J.; PEINADO, M. A.; CAPELLÁ, G.; MORENO, V. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 15, p.1460-1466, 2004.

IGLESIAS-GARCÍA, I.; BARRIADA-PEREIRA, M.; GONZÁLEZ-CASTRO, M. J.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Development of an analytical method based on microwave-assisted extraction and solid phase extraction cleanup for the determination of organochlorine pesticides in animal feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 745-752, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. World Health Organization. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, miscellaneous pesticides summary of data reported and evaluation**. Lyon, 1998. v. 30, p.37.

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2010.

KODBA, Z. C.; VONCINA, D. B. A rapid method for the determination of organochlorine, pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in fatty foods using GC with electron capture detection. **Chromatographia**, v. 66, n. 7/8, p. 619-624, Oct. 2007.

KUVAREGA, A. T.; TARU, O. Accumulation of endosulfan in wild rat, *rattus norvegicus* as a result of application to soya bean in Mazoe (Zimbabwe). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 125, n. 1/3, p. 333-345, 2007.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p.1663-1683, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: ACTA, 1993.  
MOHAMMAD, A.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, p.141-147, 2004.

PANG, G-F.; FAN, C-L.; LIU, Y-M.; CAO, Y-Z.; ZHANG, J-J.; LI, X-M.; LI, Z-Y.; WU, Y-P.; GUO, T-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 6, p. 1366-1408, 2006.

PIRES, D. X.; RECENA, M. C. P.; CALDAS, E. D. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul – Brasil, no período de 1992 a 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 804-814, 2005.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS-MS e LC-MS-MS**. 2006. 297 f. Tese

(Doutorado em Química)- Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBAS-FITÓ, N.; SALA, M.; CARDO, E.; MAZÓN, C.; MUGA, M.; VERDÚ, A.; MARCO, E.; GRIMALT, J. O.; SUNYER, J. Occup organochlorine compounds and concentrations of thyroid stimulating hormone in newborns. **Environmental Medicine**, v. 60, p. 301-303, 2003.

SCHWARZBACH, S. E. The role of dicofol metabolites in the eggshell thinning response of ring neck doves. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p. 200-205, 1991.

SERRANO, R.; LOPEZ, F. J.; HERNANDEZ, F. Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic–mass spectrometric detection **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 633-643, 1999.

SHEN, X.; CAI, J.; GAO, Y.; SU, Q. Determination of organophosphorus pesticides in soil by MMSPD-GC-NPD and confirmation by GC-MS. **Chromatographia**, v. 64, p. 71-77, 2006.

SUN, F.; LIN, F.-Y.; WONG, S.-S.; LI, G.-C. The screening of organophosphorus, organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides residues in beef fat by tandem solid-phase extraction technique. **Yaowu Shipin Fenxi**, v. 11, n. 3, p. 258-265, 2003. In: **ScinFinder Scholar**. Version 2007. Abstract CAN 140:216341.

TANG, B.; ZHANG, J.-E.; ZANG, L.-G.; ZHANG, Y.-Z.; LI, X.-Y.; ZHOU, L. Determination of nine organophosphorus pesticides in cereals and kidney beans by capillary gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 43, n. 7, p. 337-341, 2005.

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

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental**, v. 64, n. 2, p.135-142, jul./dez. 2002.

TOMLIN, C. D. S. **The e-pesticide manual**. Farnham: The British Crop Protection Council, 2004. 1 CD-ROM.

TOLEDO NETTO, P. **Exposição à Mistura de Pesticidas em Baixas doses: Validação de Método e Aplicação a Tecido Adiposo de Animais de Experimentação (ratos Lewis)**. 2009. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2009.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. S.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.



WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1165, p. 200-212, 2007.

ZHANG, W-G.; CHU, X-G.; CAI, H-X.; AN, J.; LI, C-J. Simultaneous determination of 109 pesticides in unpolished rice by a combination of gel permeation chromatography and Florisil column purification, and gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 4, p.609-617, 2006.

## **ANEXOS**

### **Anexo I – Resumo do projeto temático FAPESP (proc. 2006/60506-1)**

#### **Praguicidas Agrícolas Como Fator de Risco: Avaliações Toxicopatológica, Imunológica, Molecular e Analítica em Modelos Experimentais de Exposição Única ou Combinada**

##### **RESUMO**

Este projeto temático pretende explorar a questão da toxicidade de praguicidas agrícolas e sua eventual importância para a saúde humana utilizando modelos com ratos e camundongos expostos a esses agentes via oral ou cutânea. Os sete subprojetos que o constituem distribuem-se em duas linhas de pesquisa; na primeira serão explorados os efeitos da exposição prolongada e à baixas doses de uma mistura de cinco praguicidas cujos resíduos foram encontrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no tomate à disposição da população brasileira. Pretende-se verificar se essa mistura: 1) induz o sistema enzimático CYP450 hepático, 2) promove a carcinogênese em um ensaio de média duração que utiliza o fígado como órgão-alvo e, 3) altera a homeostase endócrina no rato macho. A outra linha refere-se ao Diuron, um herbicida amplamente utilizado no Brasil nas culturas de cana-de-açúcar e de soja. Este herbicida foi cancerígeno para a bexiga de ratos e é considerado como provável cancerígeno para o homem pela EPA norte-americana. Pretende-se estudar: 1) o modo de ação cancerígena do Diuron na mucosa urotelial de ratos, 2) seu potencial imunotóxico em ratos e, 3) seu potencial iniciador e promotor da carcinogênese cutânea no camundongo. Os métodos e procedimentos a serem usados incluem a

microscopia óptica convencional, imunistoquímica, Western-blot, PCR em tempo real, determinação hormonal e testes de integridade morfológica e funcional espermática, e microscopia eletrônica de varredura. Cada tema contém um subprojeto que objetiva aperfeiçoar e validar métodos de análise e determinação química dos praguicidas estudados.

### **Subprojetos:**

Subprojeto 1: Mistura de praguicidas em baixas doses: efeitos sobre o sistema de biotransformação e carcinogênese hepática em ratos.

Subprojeto 2: Mistura de praguicidas em baixas doses: verificação de desregulação endócrina em ratos Lewis machos.

Subprojeto 3: Otimização e validação de método para determinação simultânea de Dicofol, Permetrina, Dieldrin, Endosulfan e Diclorvos em ração animal, fígado, cérebro e tecido adiposo de ratos.

Subprojeto 4: Modo de ação (MOA) cancerígena do Diuron sobre o urotélio de ratos Wistar machos.

Subprojeto 5: Avaliação do potencial cancerígeno do Diuron [3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia] na pele de camundongos.

Subprojeto 6: Avaliação do potencial imunotóxico do herbicida Diuron em ratos Wistar machos: estudo de toxicidade de 28 e 90 dias (doses repetidas).

Subprojeto 7: Otimização e validação de método para determinação do Diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU em urina de ratos.

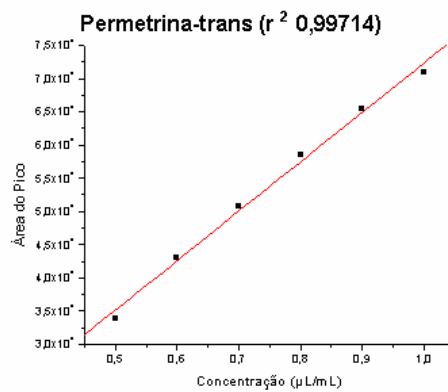
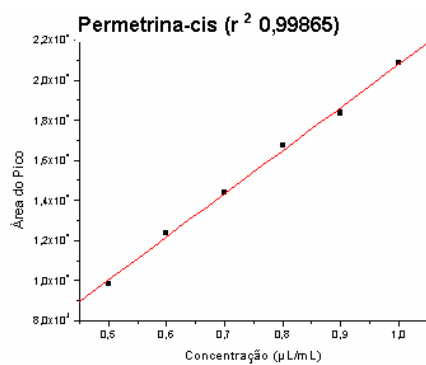
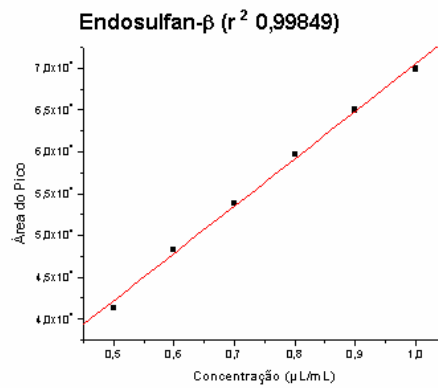
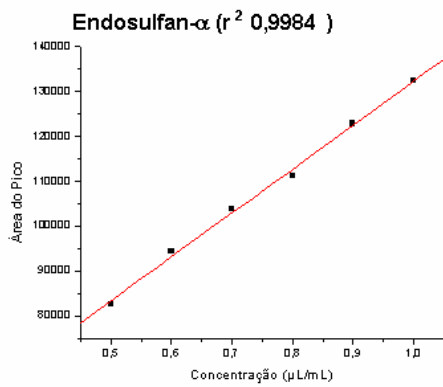
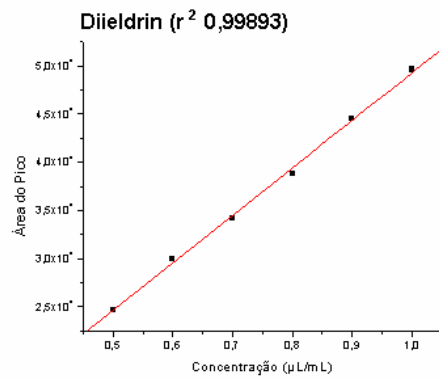
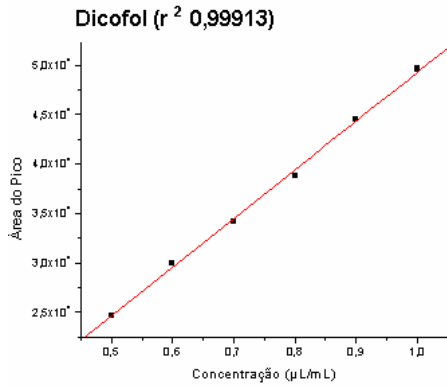
## **Anexo II - Descarte de Resíduos**

Os resíduos gerados durante esse trabalho foram divididos em duas classes: os resíduos químicos (solvente, padrões, etc.) e os resíduos biológicos (amostras de tecidos e órgãos).

Todos os resíduos químicos originados no trabalho experimental, constituídos principalmente por solventes orgânicos e pesticidas, foram acondicionados em frascos apropriados, rotulados e encaminhados ao depósito de resíduos, para posterior encaminhamento ao tratamento.

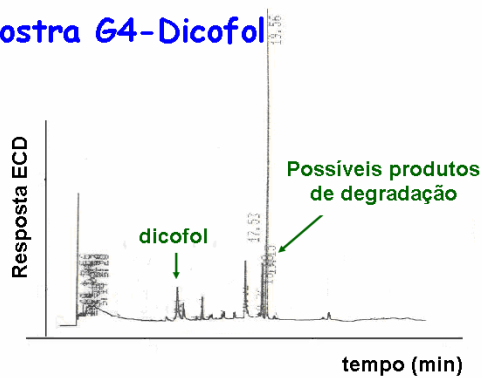
Os resíduos biológicos foram acondicionados em frascos apropriados e mantidos sob refrigeração a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior encaminhamento ao tratamento.

### Anexo III - Curvas Analíticas para os pesticidas estudados

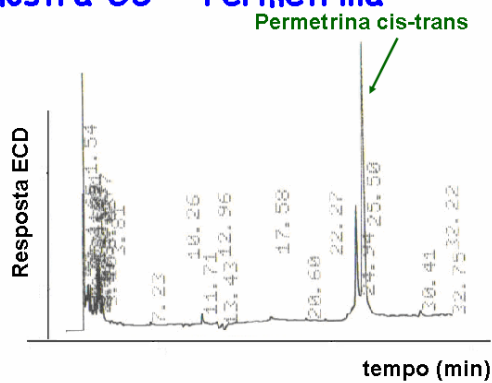


## Anexo IV- Cromatogramas das amostras de ração animal analisadas

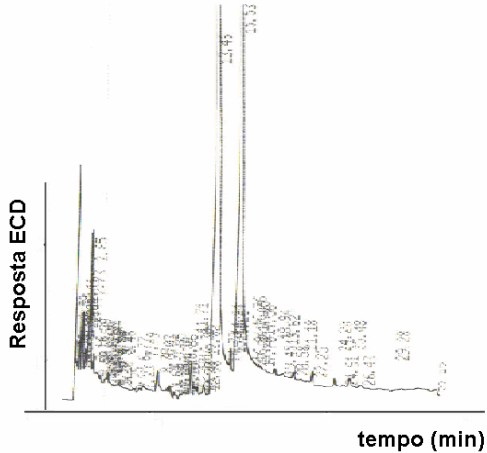
Amostra G4-Dicofol



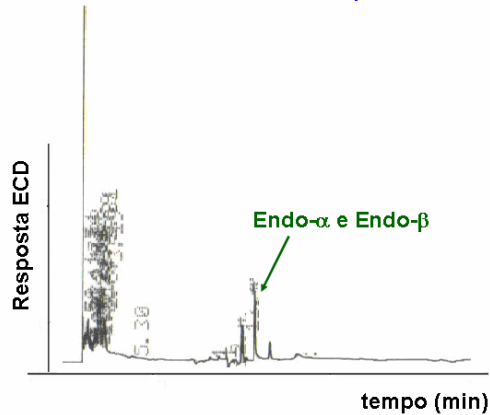
Amostra G5 - Permetrina



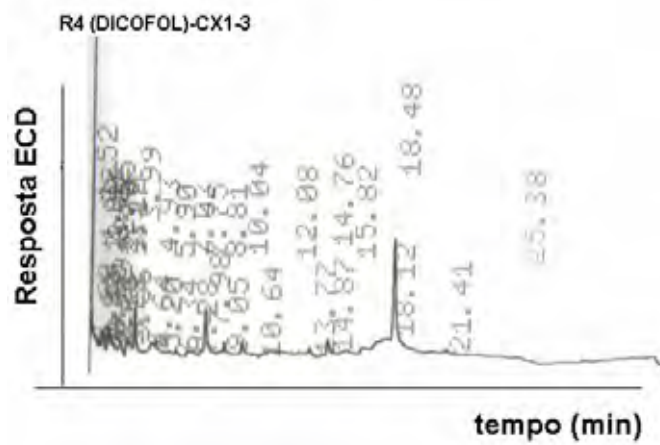
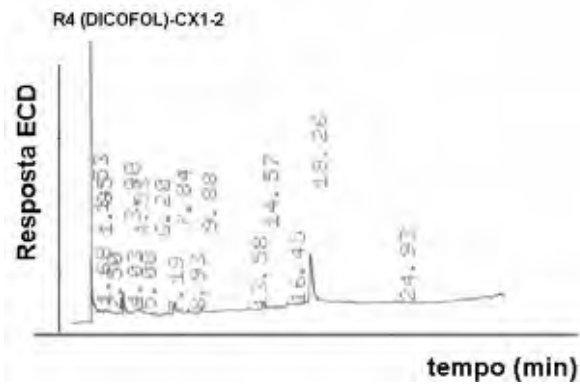
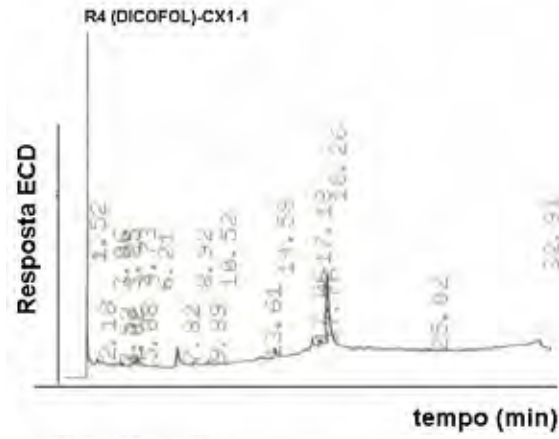
Amostra G7 - Dieldrin

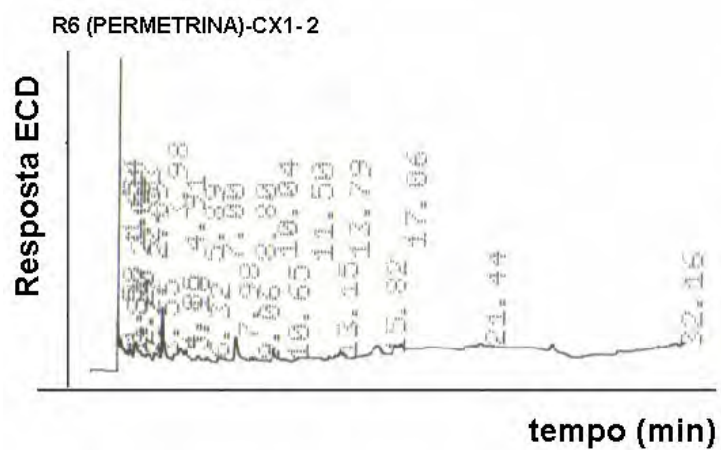
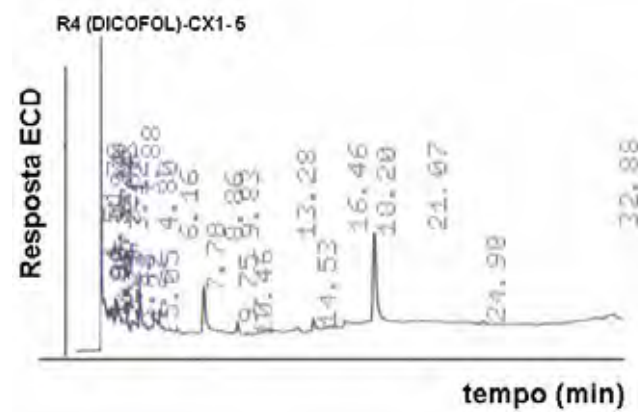
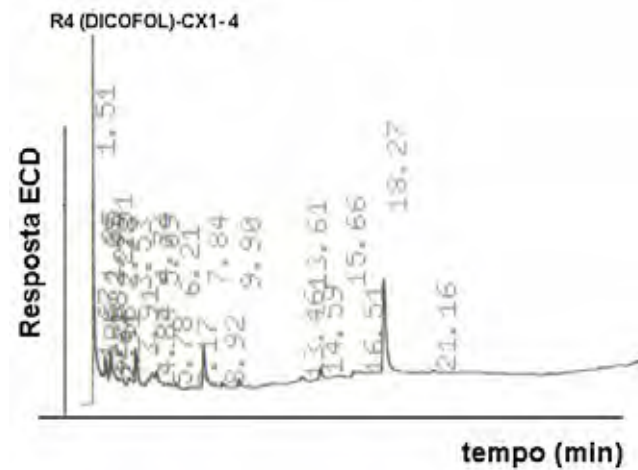


Amostra G8 - Endosulfan

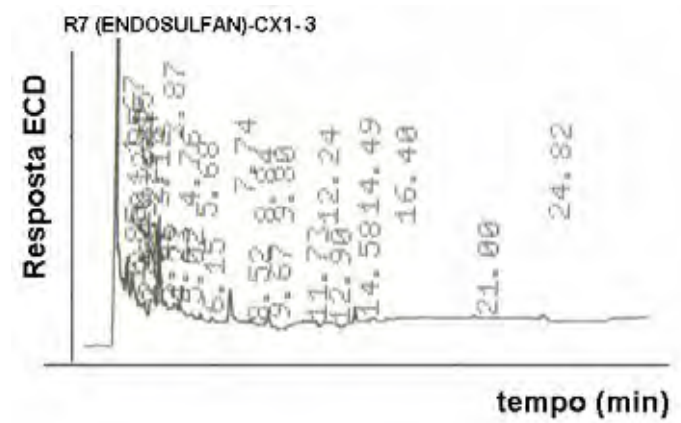
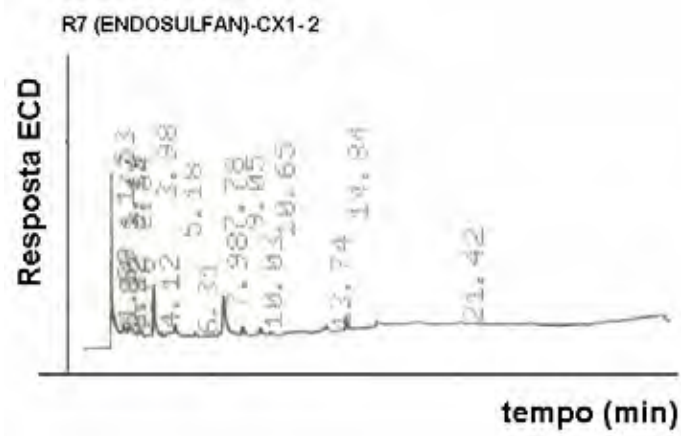
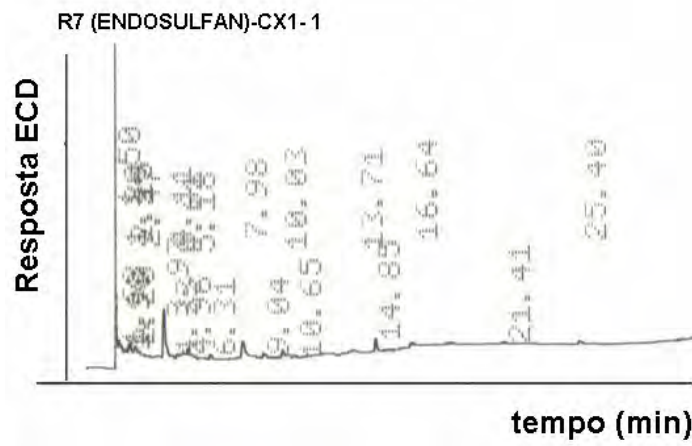


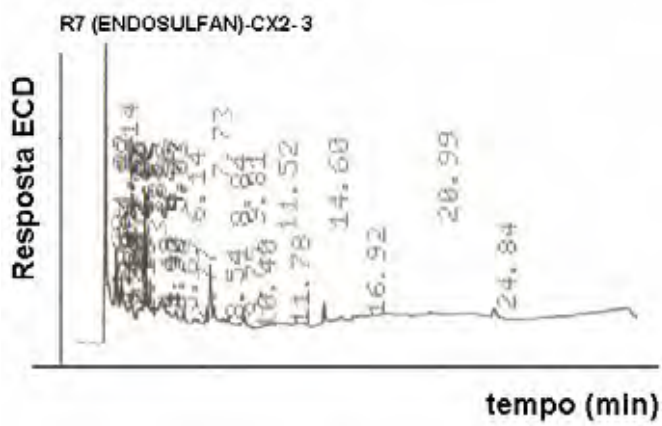
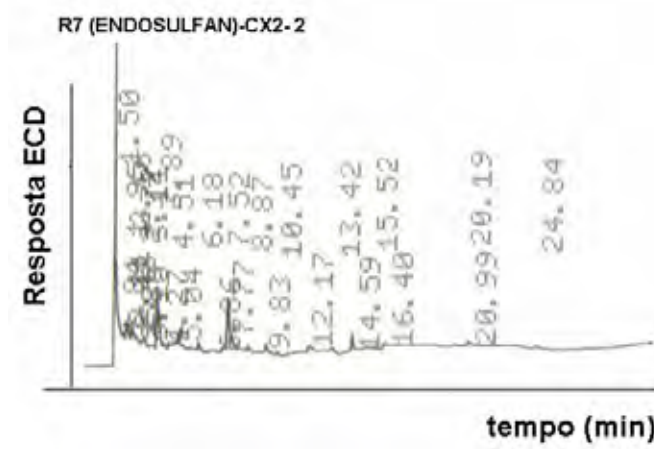
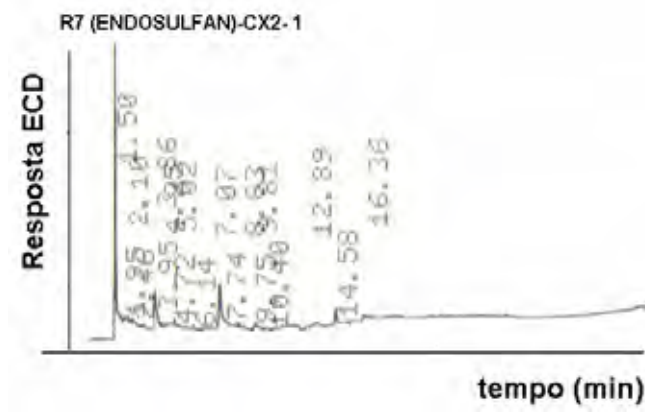
### Anexo V- Cromatogramas das amostras de fígado de rato analisadas

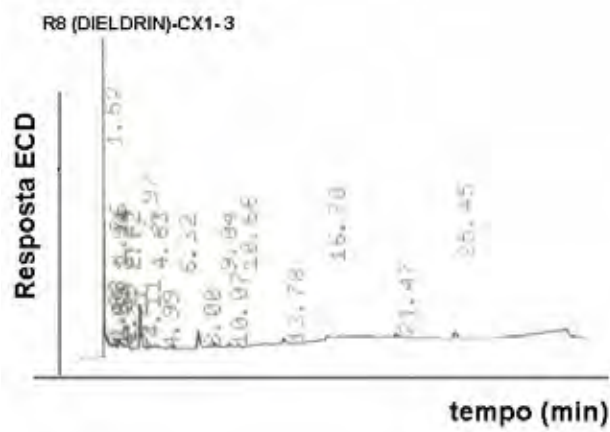
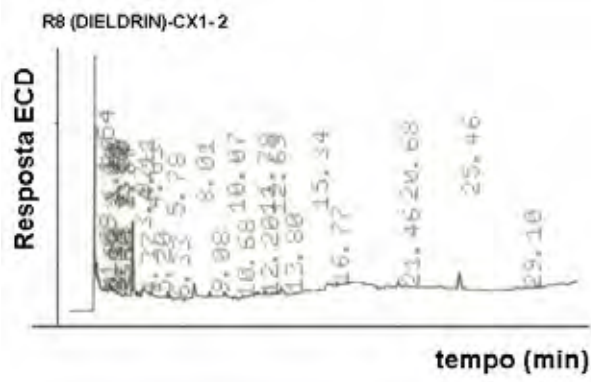
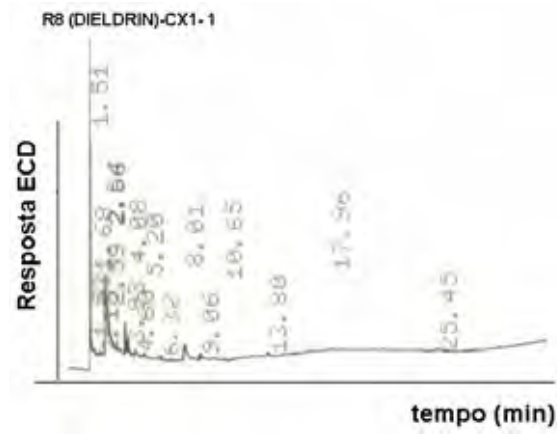


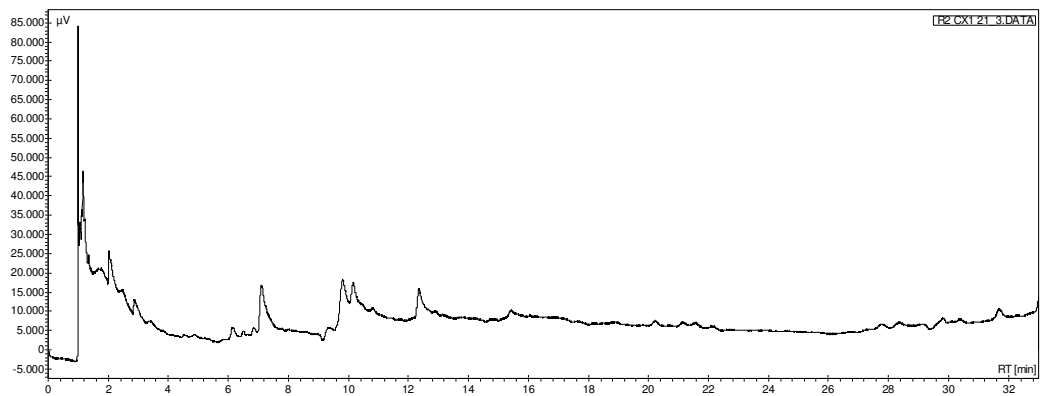
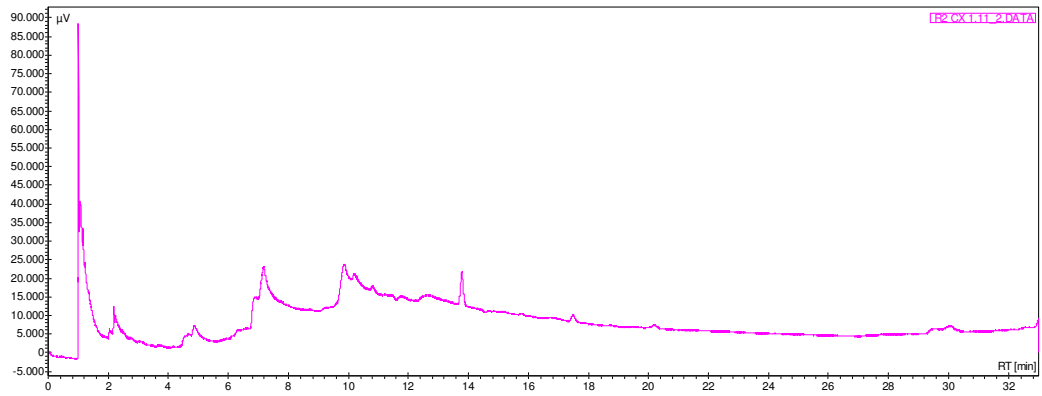
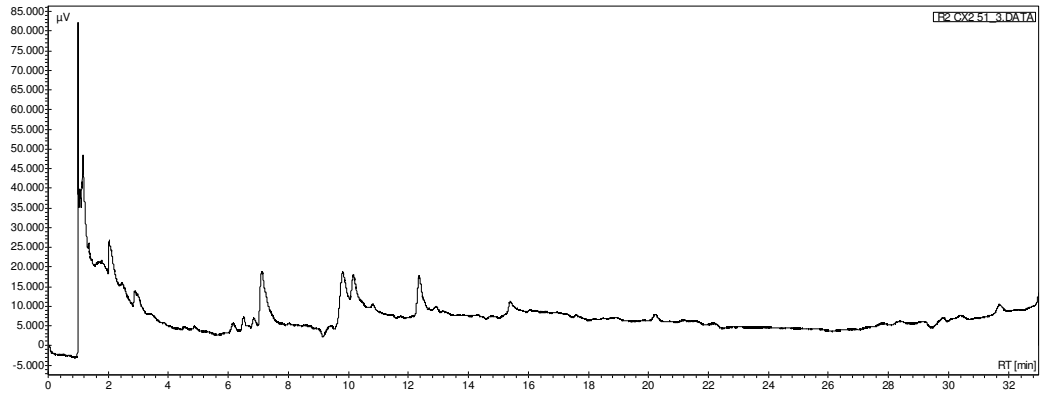


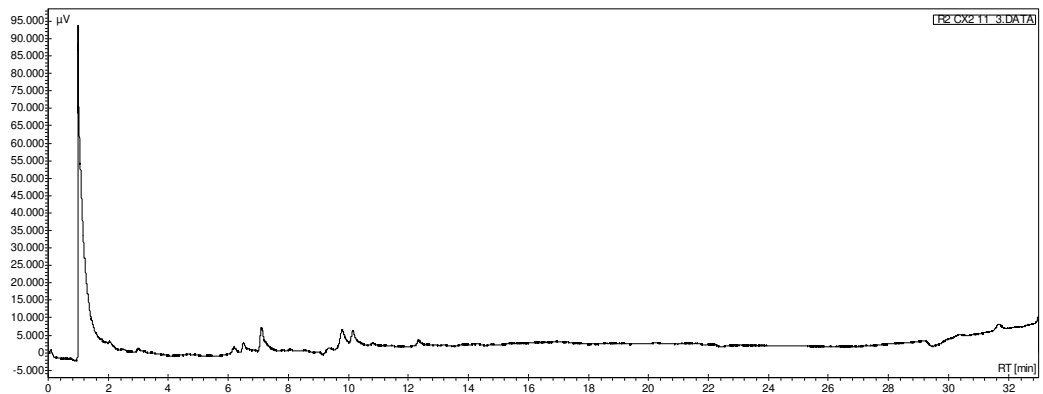
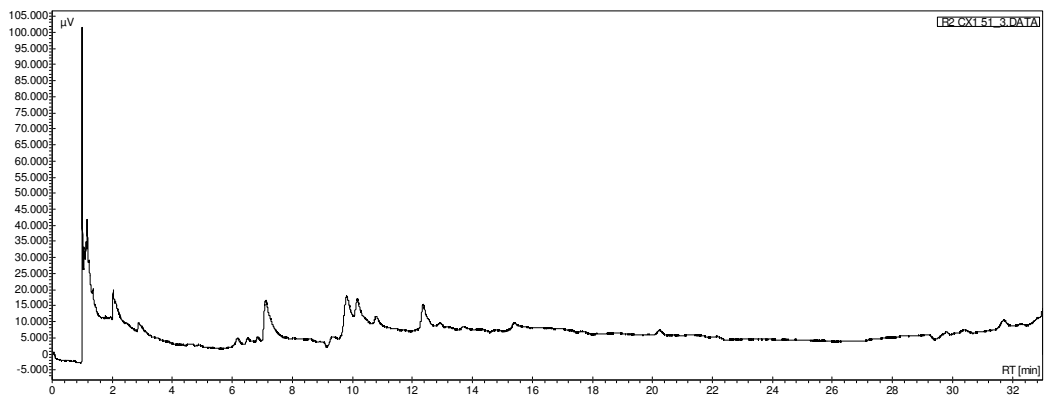
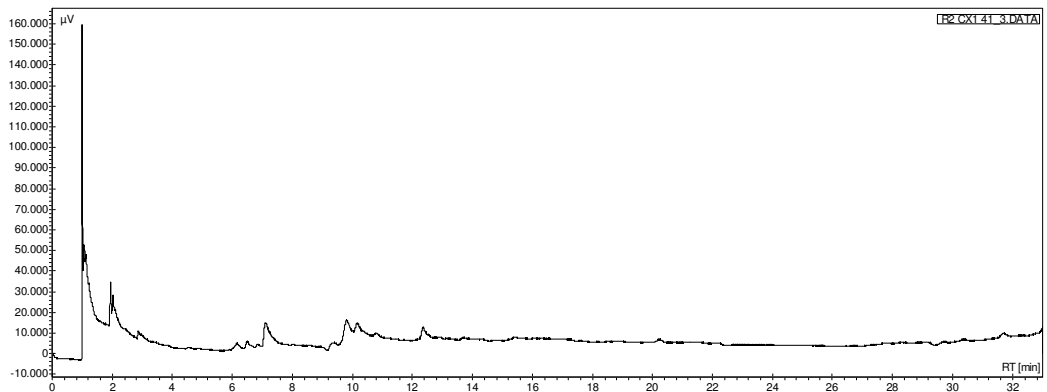
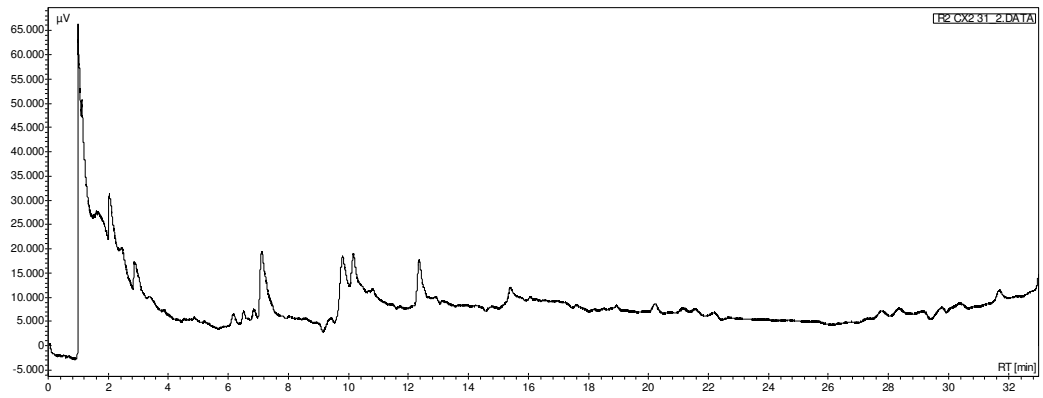


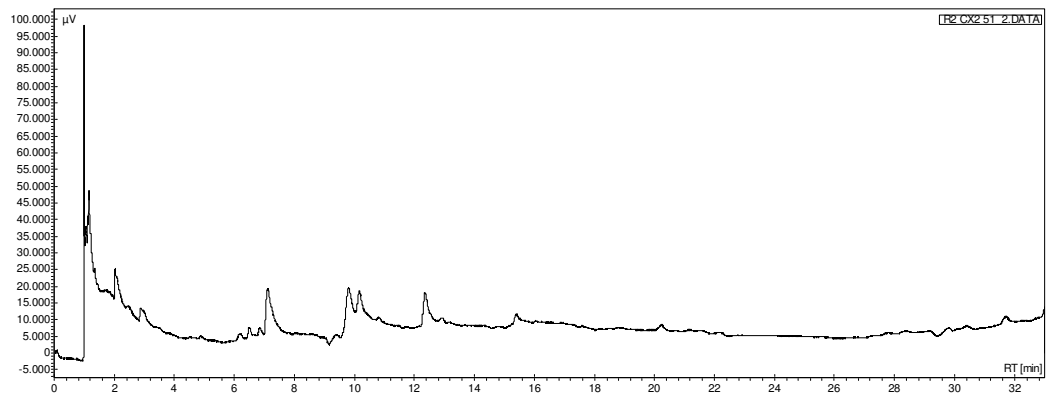
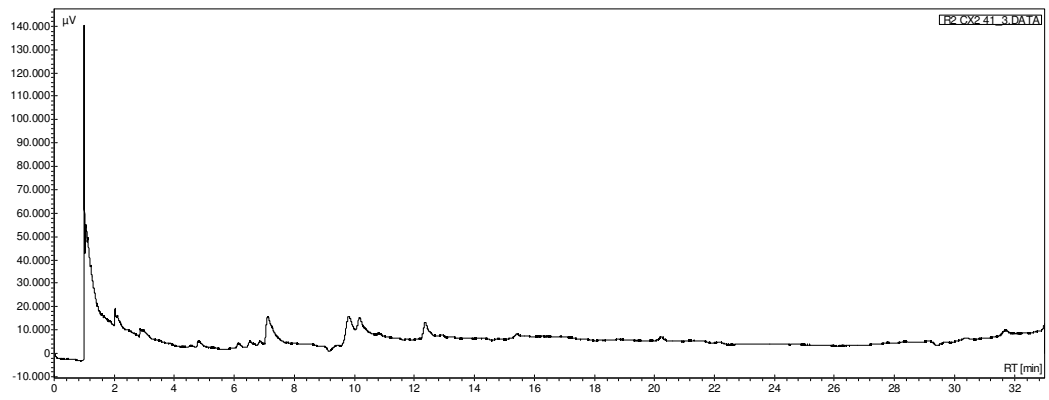
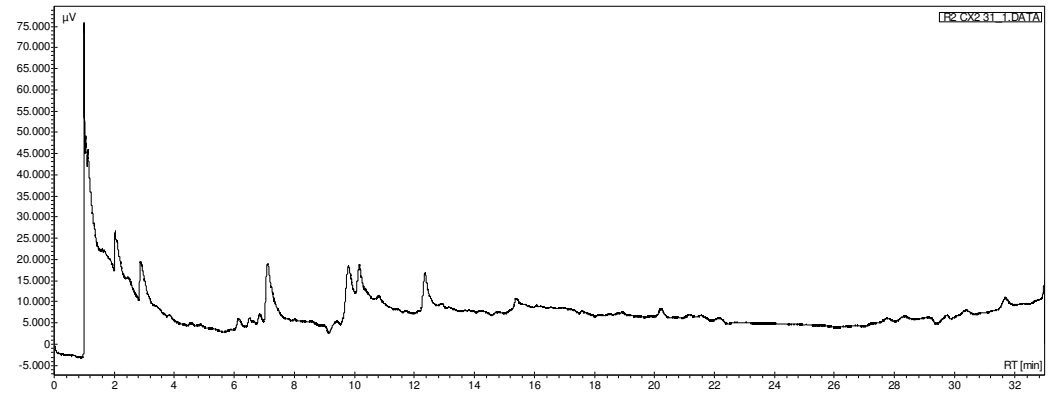
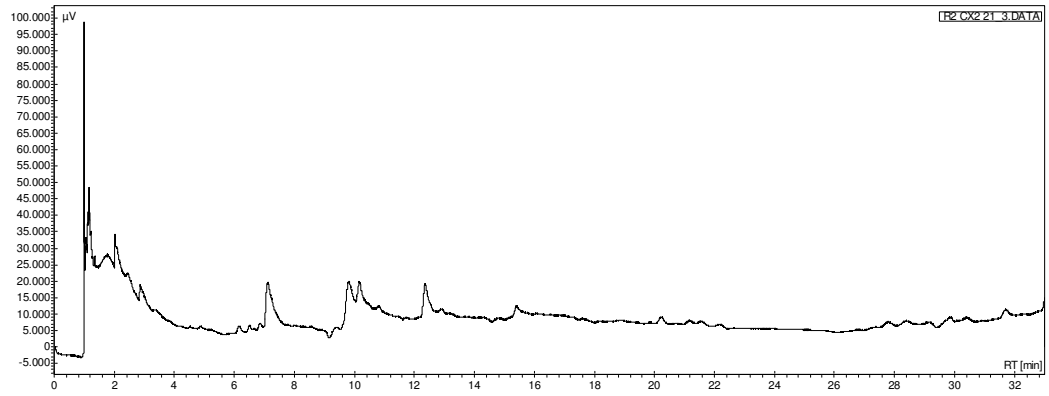


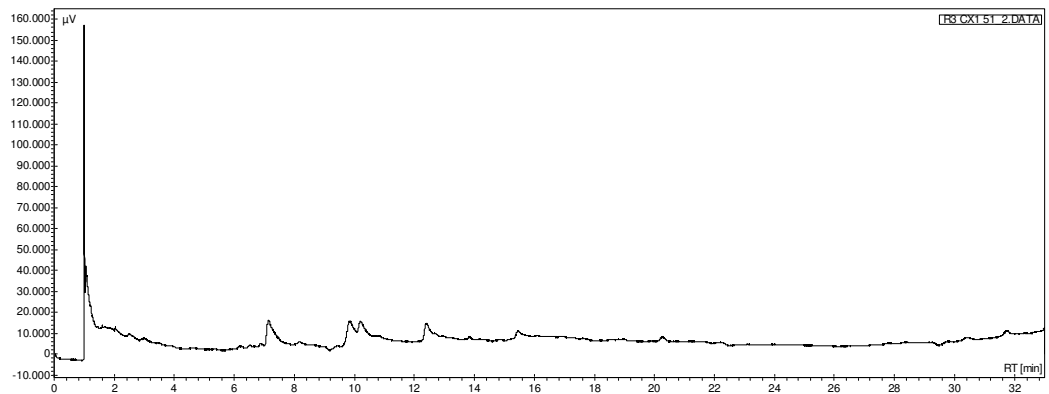
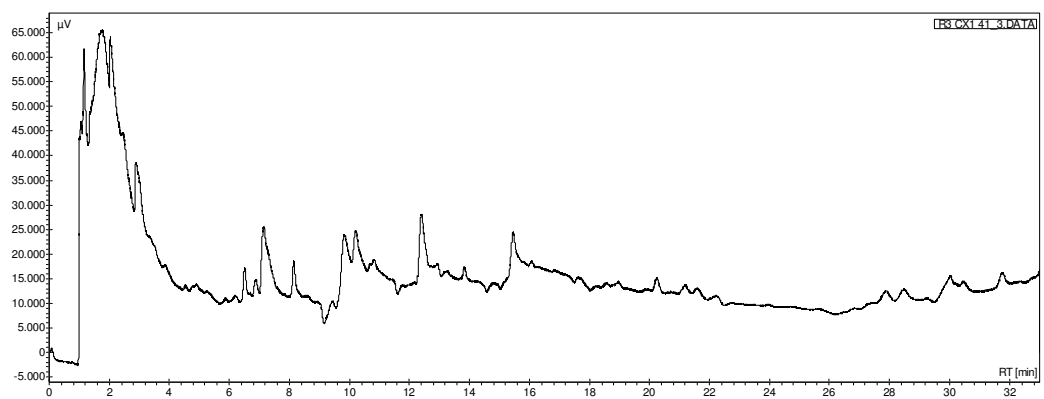
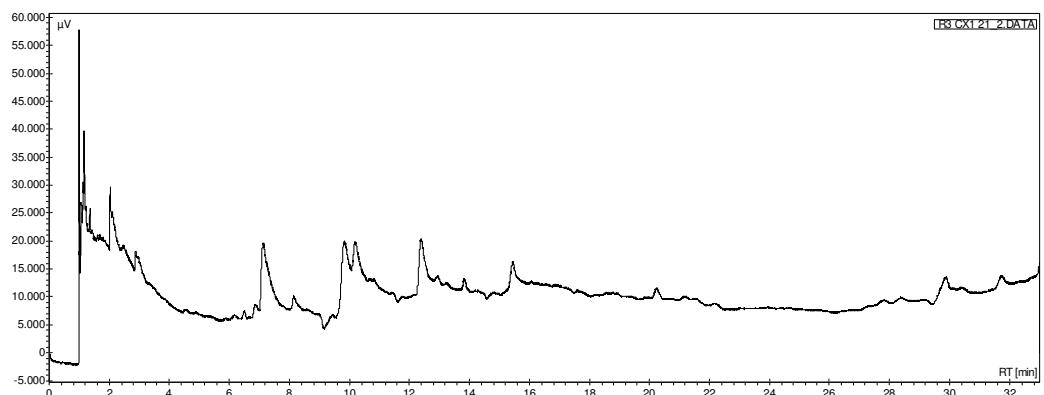
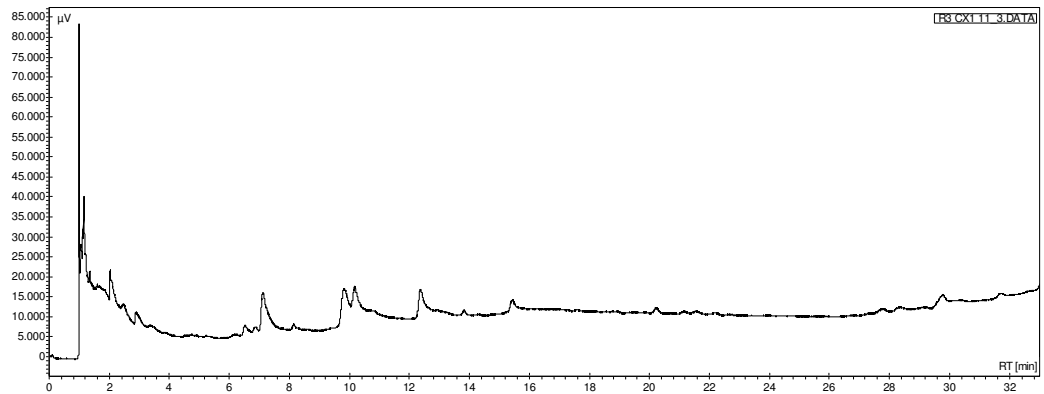


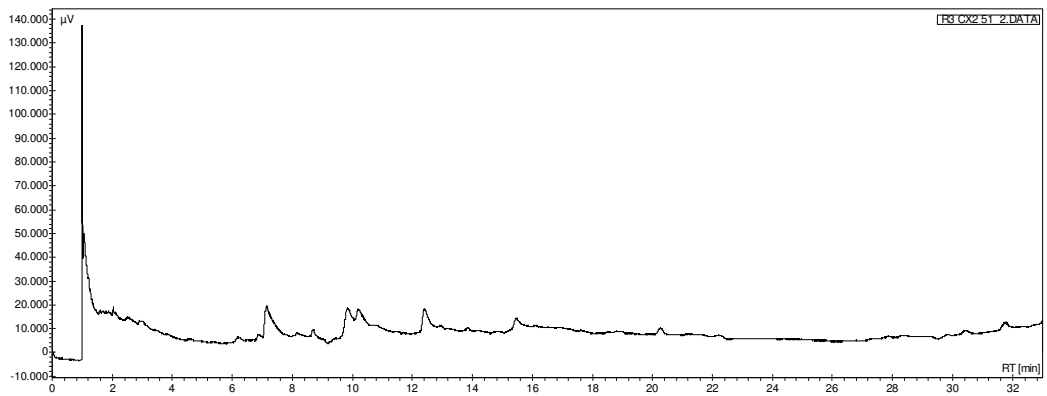
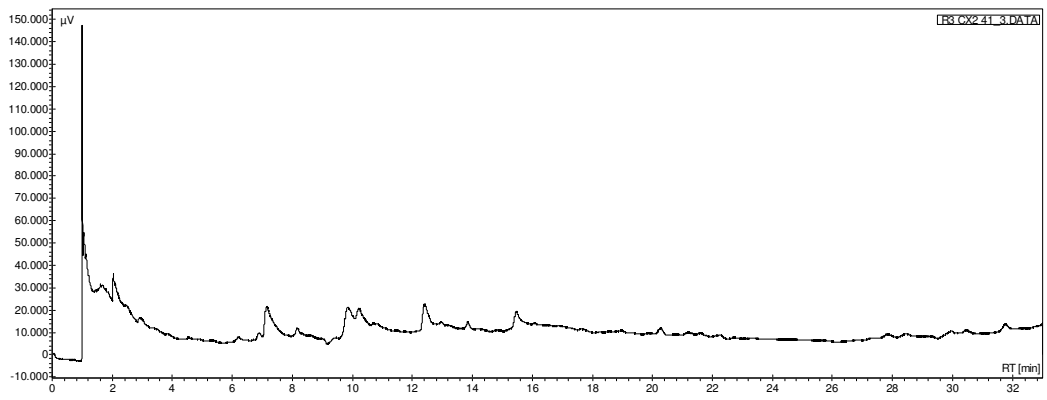
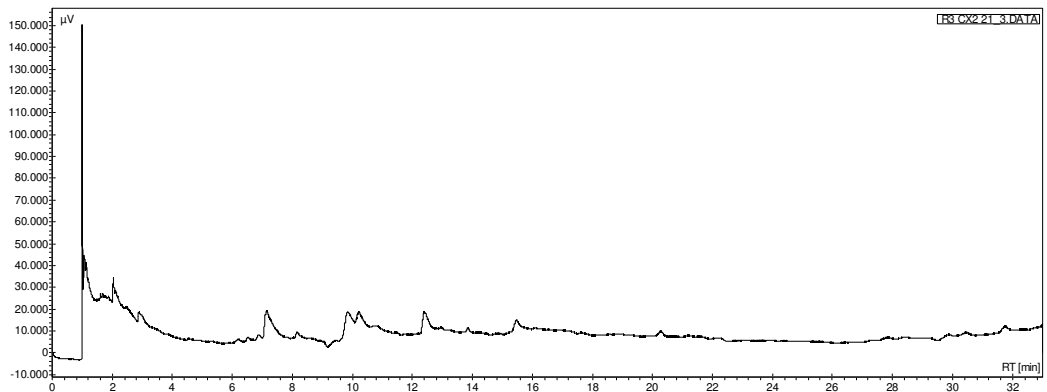
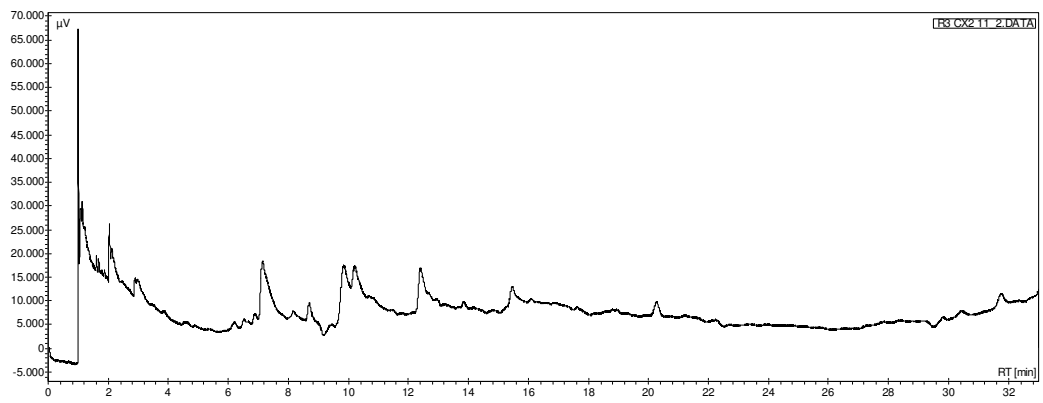


**Anexo VI- Cromatogramas das amostras de cérebro de rato analisadas****R2 – Animais alimentados com Mistura de Pesticidas – dose NOEL**

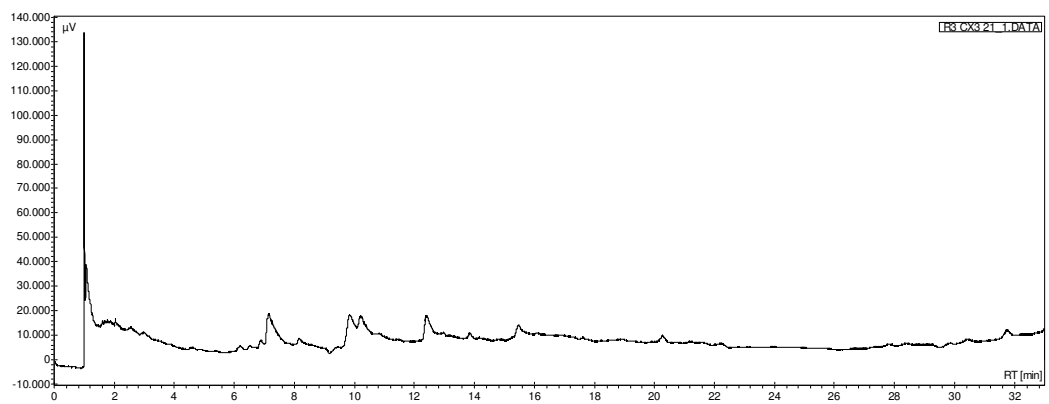
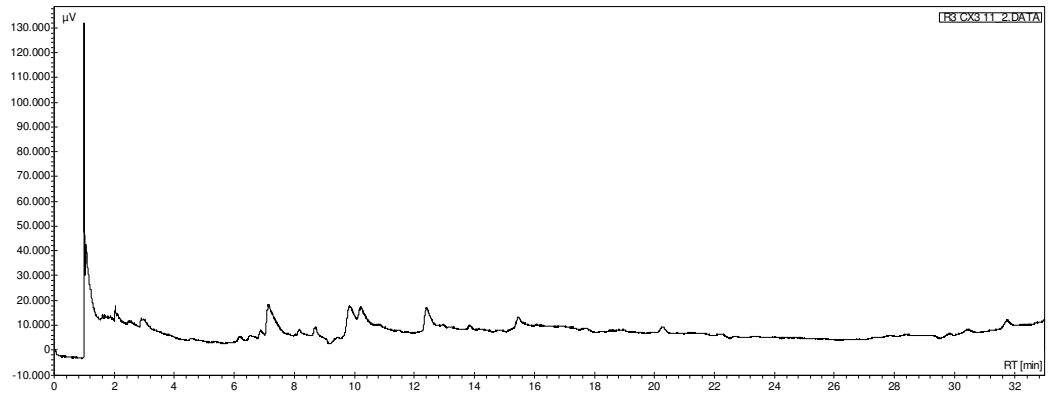




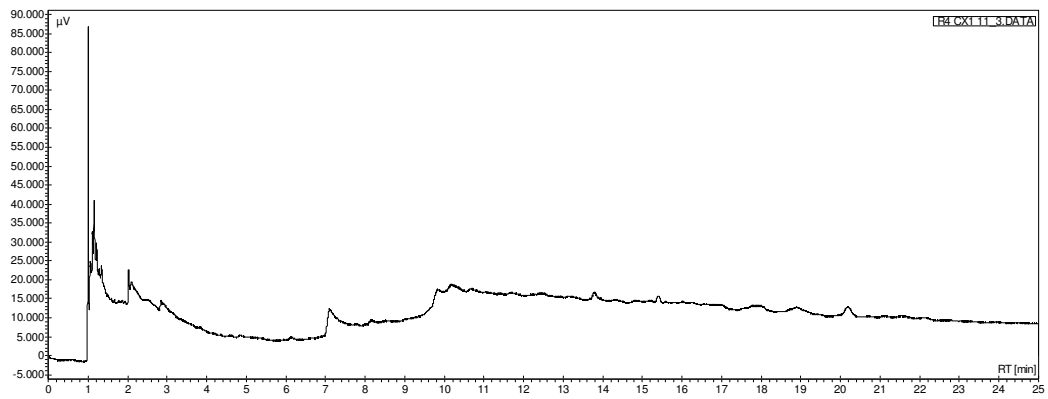
**R3 – Animais alimentados com Mistura de Pesticidas – dose LOEL**

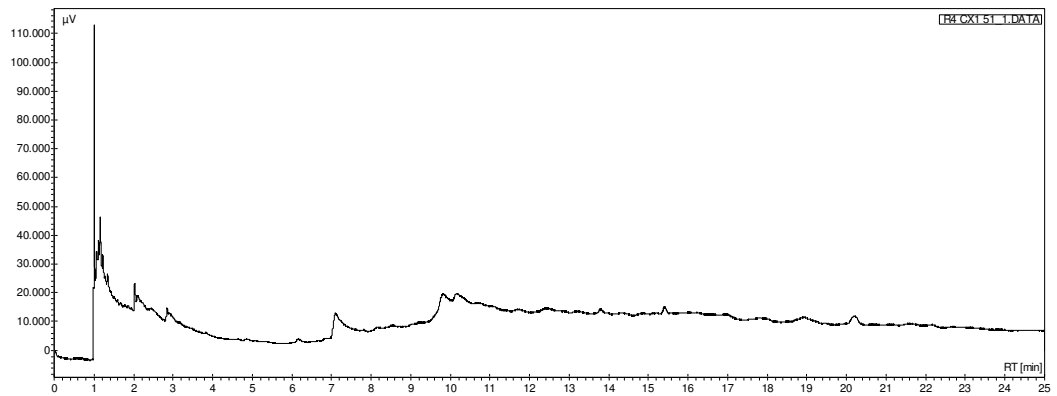
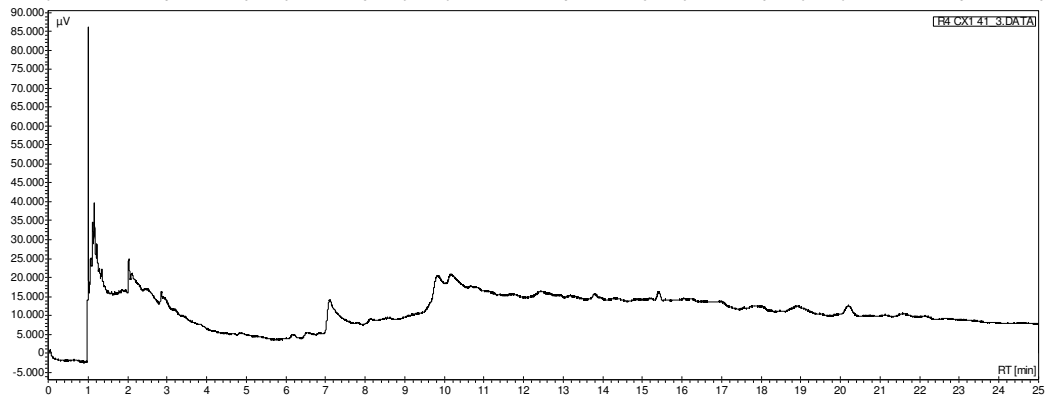
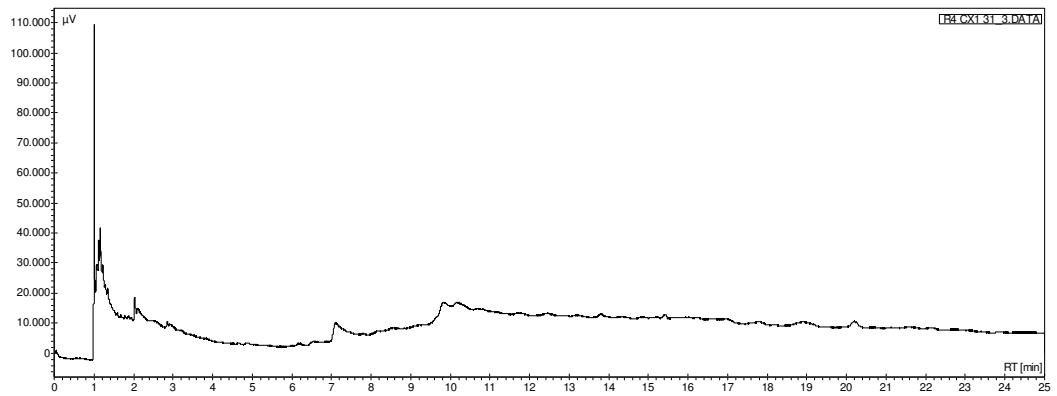
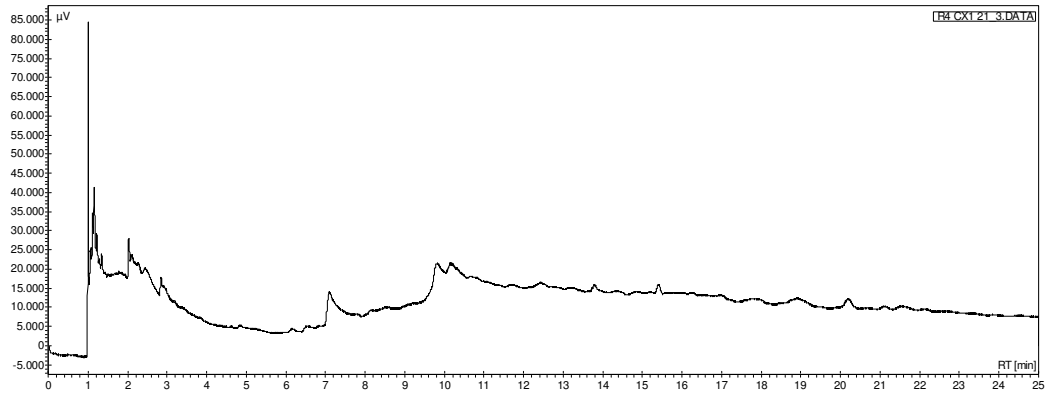


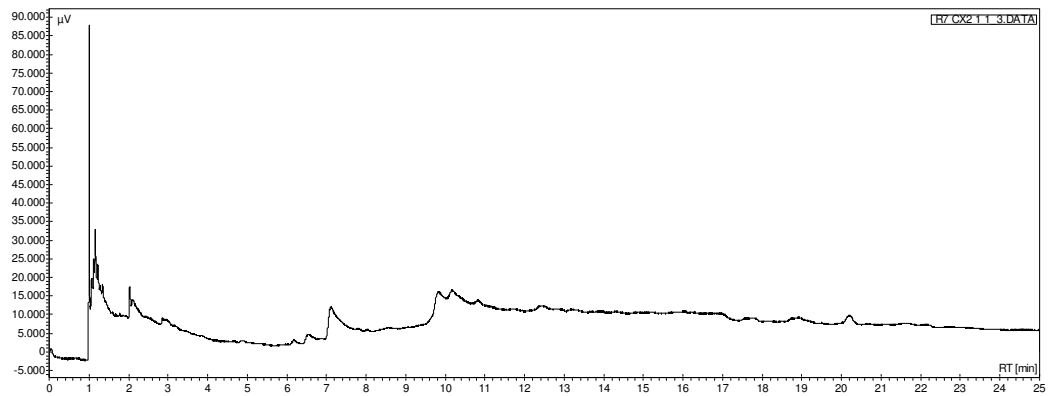
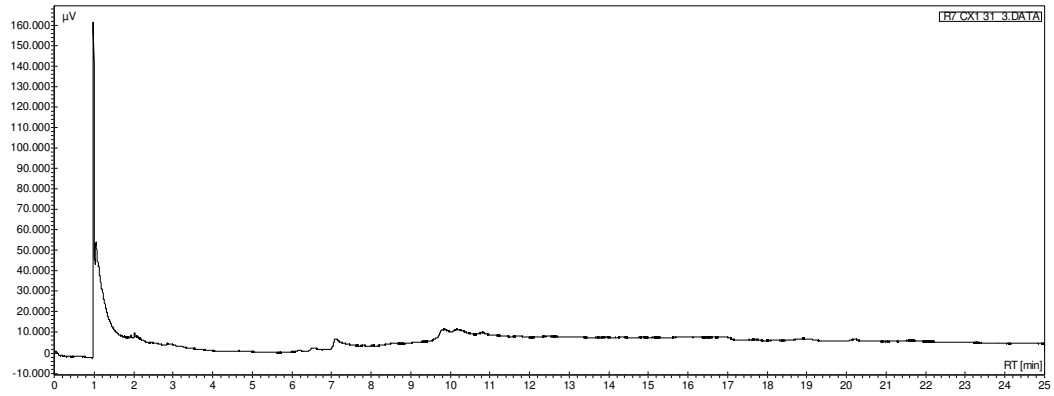
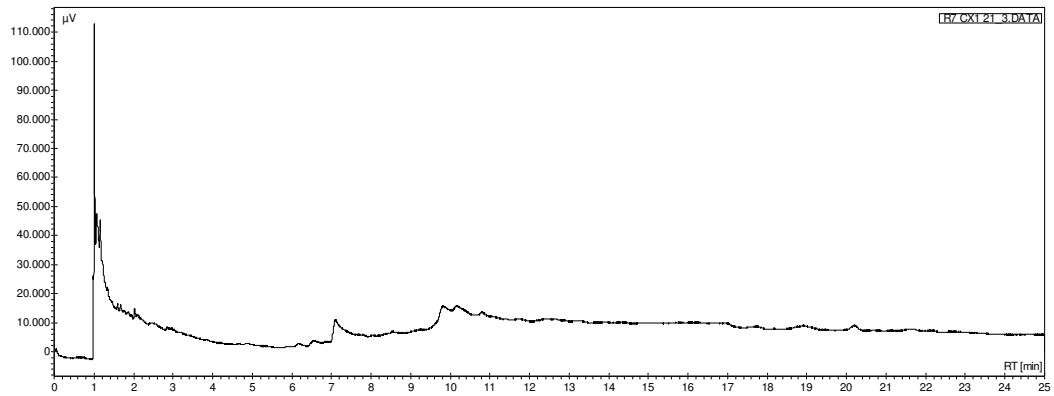
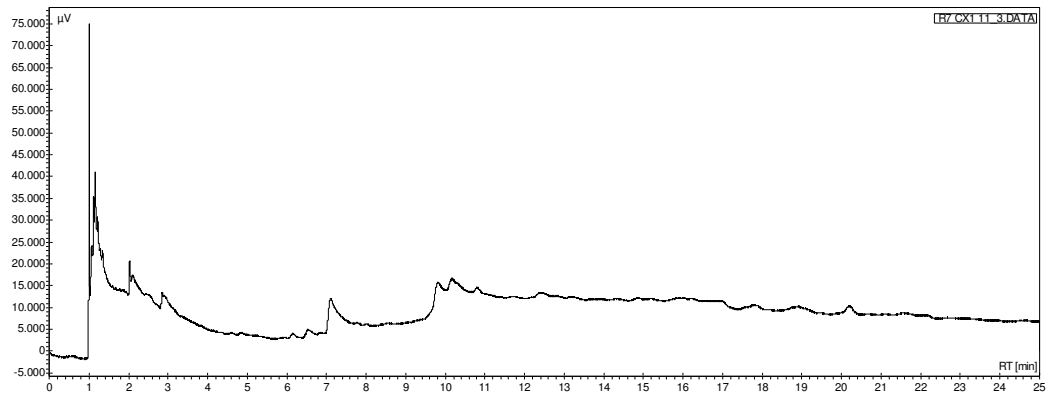


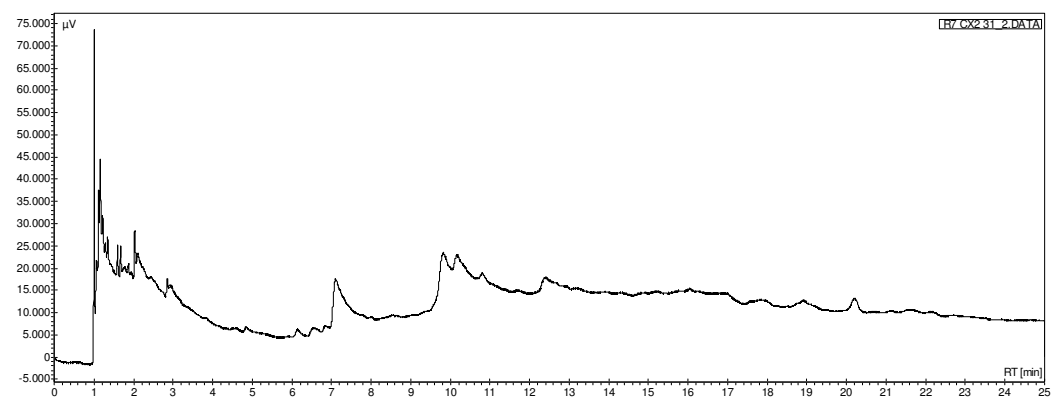
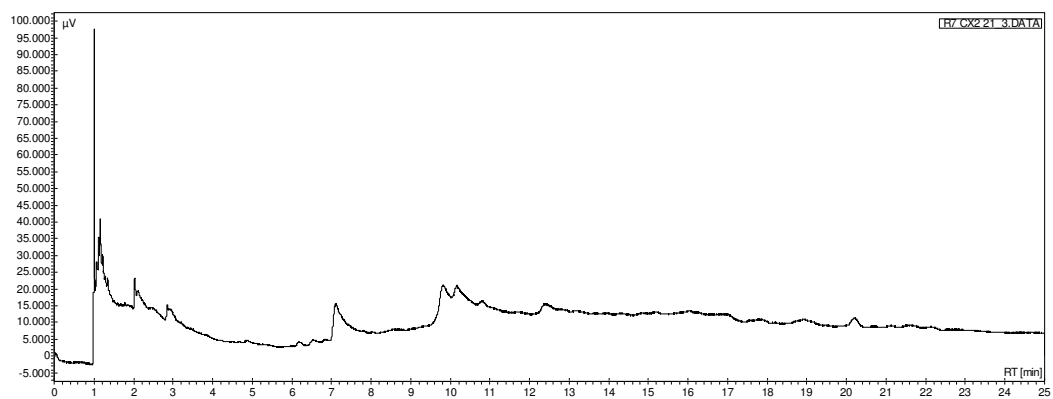


#### R4 – Animais alimentados com Dicofol – dose LOEL

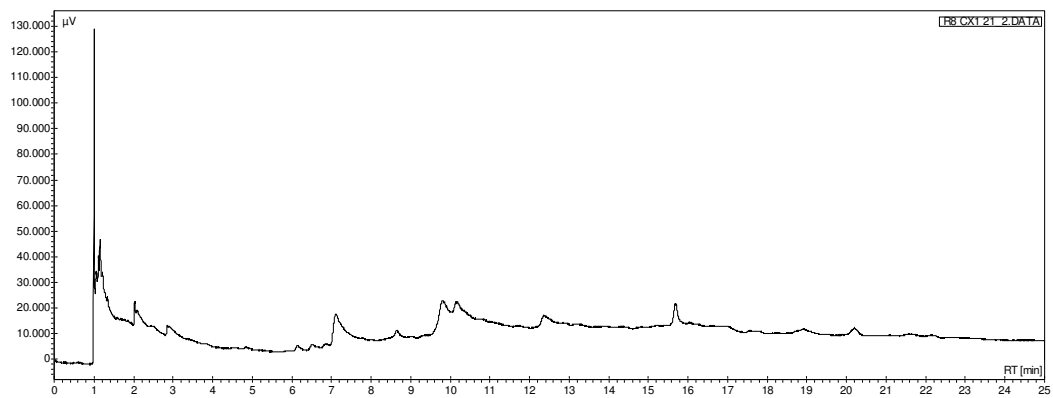
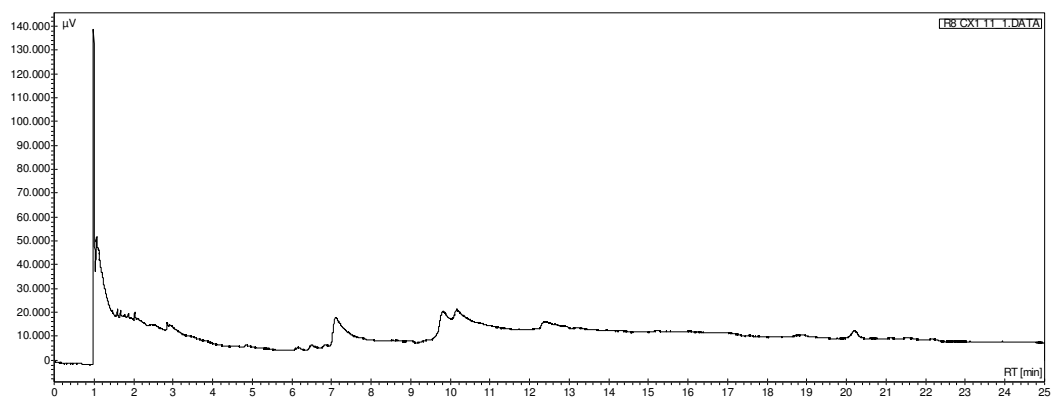


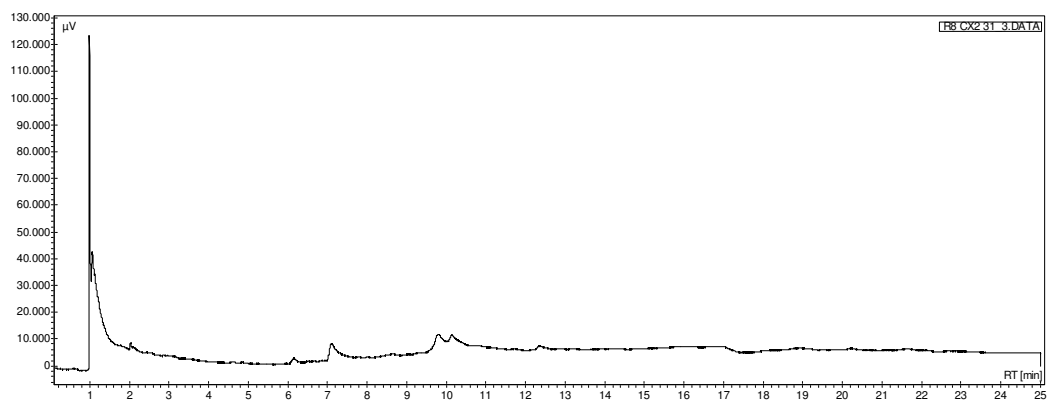
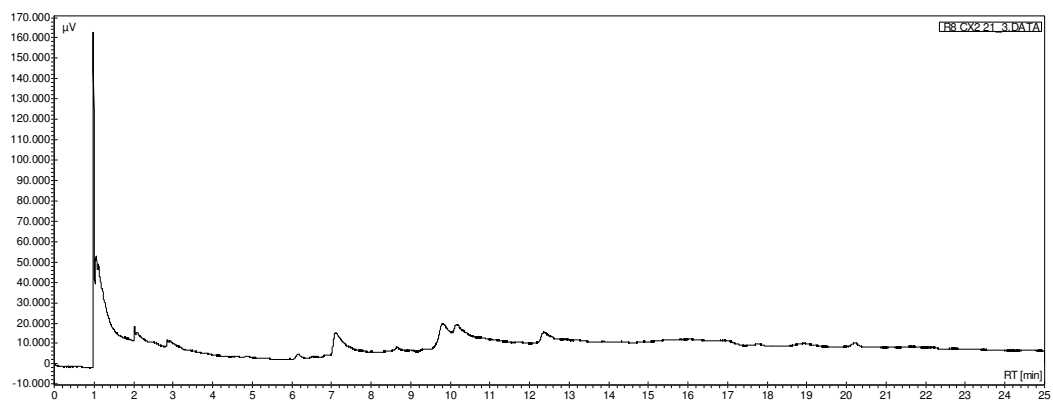
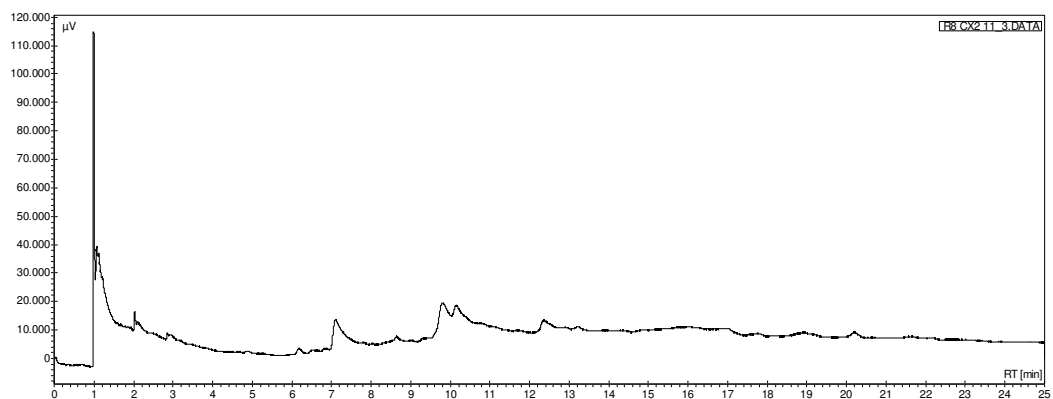
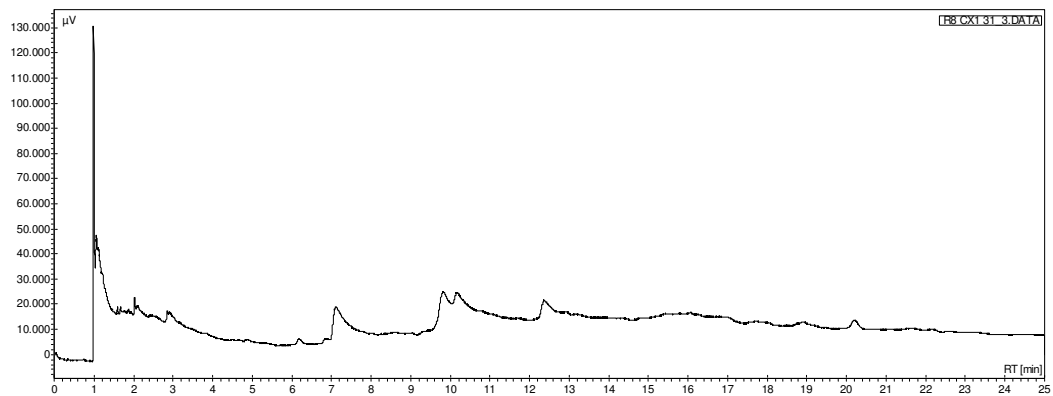


**R7 – Animais alimentados com dieldrin – dose LOEL**



### R8 – Animais alimentados com endossulfan – dose LOEL





**Anexo VII – Peso dos animais de experimentação**

ANIMAL	FÍGADO	RIM DIR.	RIM ESQ.	AD. DIR.	AD.ESQ.	TEST. DIR	TEST.ESQ	SAL.DIR.	SAL.ESQ.	CÉREBRO	PROSTATA	VES.SEMI	EPID.DIR	EPID.ESQ
111	13,760	1,190	1,170	0,015	0,020	1,340	1,360	0,310	0,420	2,040	0,154	0,790	0,500	0,500
112	13,740	1,350	1,250	0,028	0,022	1,390	1,300	0,650	0,680	2,080	0,560	1,125	0,460	0,470
113	13,200	1,200	1,170	0,200	0,022	1,330	1,270	0,350	0,330	2,400	0,160	0,550	0,490	0,460
114	15,530	1,500	1,420	0,190	0,018	1,490	1,490	0,300	0,280	2,040	0,390	1,150	0,560	0,550
115	14,350	1,450	1,460	0,012	0,021	1,350	1,360	0,320	0,300	2,140	0,190	1,018	0,510	0,490
121	18,330	1,720	1,680	0,026	0,027	1,740	1,020	0,460	0,430	2,130	0,320	0,770	0,330	0,340
122	14,220	1,430	1,440	0,028	0,036	1,310	1,320	0,320	0,460	2,080	0,360	1,160	0,480	0,480
123	12,580	1,530	1,470	0,028	0,037	1,320	2,830	0,320	0,380	2,060	0,420	1,110	0,520	0,520
124	12,470	1,440	1,430	0,033	0,031	1,210	1,190	0,330	0,350	2,040	0,450	0,910	0,460	0,450
125	12,870	1,410	1,420	0,023	0,023	0,089	1,300	0,310	0,300	2,010	0,430	1,040	0,320	0,480
211	7,270	0,730	0,700	0,021	0,013	1,090	1,100	0,160	0,160	1,780	0,230	0,600	0,390	0,390
212	13,350	1,410	1,380	0,023	0,019	1,420	1,400	0,310	0,330	1,970	0,410	1,160	0,510	0,500
213	15,280	1,550	1,530	0,021	0,019	1,440	1,470	0,320	0,300	2,180	0,460	1,050	0,540	0,510
214	13,090	1,250	1,290	0,026	0,025	1,350	1,350	0,290	0,300	2,140	0,410	1,090	0,500	0,470
215	13,230	1,400	1,310	0,026	0,027	1,320	1,310	0,310	0,310	2,110	0,410	1,280	0,480	0,510

221	13,240	1,390	1,430	0,028	0,024	1,140	1,290	0,030	0,330	2,010	0,460	0,900	0,470	0,460
222	15,660	1,650	1,660	0,030	0,029	1,500	1,460	0,350	0,340	2,160	0,510	1,070	0,530	0,500
223	13,140	1,630	1,540	0,028	0,033	1,270	1,300	0,310	0,300	1,970	0,430	0,930	0,460	0,440
224	14,460	1,640	1,700	0,030	0,033	1,320	1,340	0,350	0,340	2,100	0,550	1,250	0,500	0,470
225	14,540	1,590	1,560	0,030	0,034	1,310	1,280	0,031	0,320	2,060	0,450	1,070	0,500	0,450
311	14,520	1,340	1,390	0,021	0,024	1,100	1,080	0,330	0,280	2,000	0,400	1,210	0,450	0,440
312	17,960	1,740	1,750	0,020	0,019	1,450	1,460	0,280	0,280	2,120	0,430	1,050	0,530	0,500
313	13,790	1,540	1,580	0,024	0,023	1,330	1,320	0,280	0,290	2,060	0,310	1,170	0,510	0,500
314	16,180	1,630	1,590	0,035	0,030	1,470	0,870	0,300	0,290	2,110	0,520	1,260	0,530	0,290
315	13,310	1,480	1,380	0,034	0,030	1,150	1,200	0,280	0,310	2,000	0,370	1,270	0,440	0,440
321	12,150	1,360	1,320	0,030	0,029	1,120	1,130	0,280	0,320	1,860	0,420	0,760	0,450	0,430
322	15,890	1,620	1,640	0,034	0,029	1,410	1,420	0,290	0,310	2,100	0,490	0,930	0,480	0,470
323	16,260	1,740	1,740	0,030	0,029	1,270	1,290	0,330	0,310	2,010	0,570	1,120	0,450	0,460
324	17,820	1,970	1,860	0,028	0,029	1,520	1,500	0,320	0,350	2,190	0,590	1,030	0,560	0,540
325	13,860	1,630	1,550	0,030	0,028	1,370	1,370	0,300	0,290	2,150	0,510	0,970	0,510	0,490
331	7,780	0,730	0,730	0,016	0,017	1,070	1,060	0,150	0,140	1,710	0,160	0,560	0,370	0,370
332	7,110	0,640	0,630	0,015	0,020	1,090	1,050	0,140	0,150	1,760	0,160	0,620	0,410	0,380

411	15,510	1,520	1,470	0,320	0,027	1,350	1,330	0,320	0,320	2,050	0,510	1,070	0,490	0,470
412	16,250	1,670	1,670	0,029	0,029	1,360	1,270	0,033	0,480	2,170	0,330	0,890	0,470	0,460
413	14,390	1,470	1,540	0,036	0,025	1,280	1,280	0,300	0,330	2,110	0,500	1,050	0,470	0,480
414	13,280	1,350	1,360	0,025	0,024	1,280	1,280	0,290	0,300	2,080	0,430	1,130	0,470	0,450
415	15,810	1,660	1,530	0,230	0,024	1,470	1,520	0,310	0,310	2,180	0,430	1,160	0,540	0,520
421	12,079	1,329	1,406	0,028	0,033	1,268	1,255	0,365	0,282	2,025	0,547	1,098	0,456	0,430
511	12,724	1,427	1,274	0,029	0,019	1,063	1,119	0,319	0,312	1,818	0,540	0,952	0,391	0,424
512	15,461	1,445	1,320	0,021	0,033	1,277	1,291	0,027	0,338	2,122	0,545	1,041	0,460	0,447
513	14,537	1,346	1,306	0,022	0,020	1,365	1,345	0,312	0,327	2,015	0,473	0,904	0,511	0,532
521	11,317	1,483	1,482	0,030	0,037	1,359	1,393	0,285	0,286	2,154	0,510	0,808	0,504	0,511
522	12,018	1,645	1,530	0,035	0,028	1,293	1,356	0,275	0,310	2,071	0,661	0,965	0,483	0,495
523	12,014	1,461	1,499	0,039	0,033	1,207	1,222	0,303	0,309	2,016	0,542	0,911	0,441	0,419
611	16,253	1,423	1,399	0,035	0,038	1,280	1,318	0,286	0,310	2,032	0,544	0,965	0,456	0,455
612	13,478	1,081	1,144	0,022	0,034	1,118	1,091	0,279	0,291	1,965	0,580	0,963	0,400	0,383
613	13,065	1,311	1,236	0,045	0,038	0,973	0,944	0,312	0,296	2,001	0,580	0,907	0,413	0,378
621	13,494	1,408	1,344	0,053	0,051	1,266	1,246	0,307	0,312	1,991	0,570	0,885	0,454	0,452
622	13,458	1,331	1,354	0,025	0,034	1,377	1,390	0,300	0,296	2,034	0,492	0,984	0,467	0,455



623	13,508	1,371	1,312	0,021	0,033	1,341	1,357	0,315	0,232	2,072	0,490	0,961	0,480	0,479
711	15,220	1,509	1,441	0,030	0,035	1,335	1,319	0,316	0,307	2,044	0,569	0,917	0,493	0,477
712	13,641	1,534	1,408	0,024	0,027	1,287	1,301	0,331	0,277	1,926	0,600	1,008	0,462	0,440
713	14,354	1,470	1,520	0,029	0,030	0,710	0,791	0,313	0,321	2,002	0,512	0,959	0,353	0,352
721	10,336	1,098	1,131	0,017	0,024	1,231	0,666	0,264	0,273	1,881	0,595	0,977	0,425	0,284
722	13,170	1,544	1,486	0,026	0,025	1,226	1,254	0,310	0,325	2,044	0,588	0,833	0,476	0,436
723	13,582	1,500	1,410	0,026	0,025	1,273	1,280	0,222	0,217	2,082	0,685	1,204	0,461	0,450
811	11,207	1,615	1,523	0,210	0,035	1,309	1,316	0,301	0,299	2,084	0,635	0,914	0,460	0,466
812	12,355	1,652	1,628	0,039	0,025	1,280	1,147	0,293	0,286	2,063	0,488	0,919	0,478	0,423
813	10,399	1,528	1,508	0,033	0,026	1,316	1,334	0,206	0,301	2,033	0,472	0,769	0,460	0,500
821	8,265	1,633	1,560	0,035	0,032	1,187	1,228	0,283	0,284	2,057	0,566	0,723	0,440	0,425
822	10,988	1,438	1,388	0,034	0,028	1,223	1,172	0,306	0,281	1,381	0,650	0,699	0,436	0,407
823	10,681	1,529	1,531	0,024	0,021	1,280	1,356	0,306	0,334	2,076	0,502	0,779	0,444	0,432