

PEDRO TOLEDO NETTO

**Exposição à Mistura de Pesticidas em Baixas Doses:
Validação de Método e Aplicação a Tecido Adiposo de
Animais de Experimentação (ratos Lewis)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

T649e	Toledo Netto, Pedro Exposição à mistura de pesticidas em baixas doses : validação de método e aplicação a tecido adiposo de animais de experimentação (ratos Lewis) / Pedro Toledo Netto. – Araraquara : [s.n], 2009 100 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi Co-orientador: Maria Lúcia Ribeiro 1. Pesticidas. 2. Validação. 3. Cromatografia gasosa. 4. Saúde humana. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

PEDRO TOLEDO NETTO

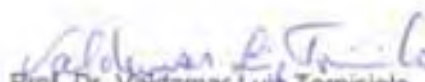
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 28 de julho de 2009.

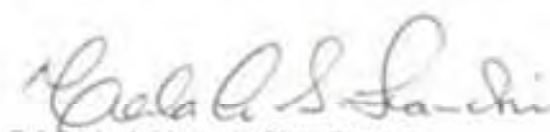
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



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



Dr.ª Carla Adriene da Silva Franchi
Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais e meus irmãos pela confiança, incentivo e amor. Esse trabalho também é fruto de vocês.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas orientadoras, Mary e Bilú, pelos ensinamentos profissionais e amadurecimento pessoal. Mais que professoras e orientadoras, as considero minhas amigas.

À Nathalie, pelos grandes momentos de alegria, pelo conforto nas horas mais difíceis, pela amizade sincera, pela paciência e por todos os momentos que passamos juntos.

Ao Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESO) pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

Aos professores, colegas e funcionários do curso, pelo incentivo e prontidão sempre que necessário.

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

E à “República Espanha 1515” pelas festas e anos de convivência.

RESUMO

A presença de pesticidas em matrizes ambientais e biológicas vem sendo investigada há décadas e estudos sobre a atuação de baixas concentrações destes contaminantes, como possíveis alteradores endócrinos e agentes carcinogênicos, ainda são incipientes. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação destes compostos em matrizes biológicas torna-se necessário para se ter uma estimativa da quantidade que pode ser bioacumulada e relacioná-la ao desenvolvimento de alterações em diversos tecidos do organismo.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método eficiente e rápido para determinação de resíduos dos pesticidas dicofol, dieldrin, endosulfan e permetrina em matriz de tecido adiposo de ratos. Estes pesticidas foram selecionados por apresentarem controvérsias quanto aos efeitos nocivos que podem causar ao homem, como por exemplo desregulação do sistema endócrino e, coincidentemente, por terem sido encontrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em matrizes vegetais consumidas pela população brasileira nos últimos anos.

A principal dificuldade do trabalho foi estabelecer um procedimento experimental que permitisse a remoção de lipídios. Nesse sentido diversas condições experimentais foram avaliadas para eliminação destas macromoléculas, entre elas: extração em fase sólida, dispersão da matriz em fase sólida, envolvendo combinações de diversos adsorventes e extração por congelamento da amostra. Finalmente o método otimizado incluiu a extração das amostras de tecido adiposo com hexano em banho de ultrassom, seguida da extração em fase sólida (alumina) utilizando uma alíquota (1 mL) do extrato, sendo a eluição processada com hexano:diclorometano e, finalmente a concentração do eluato a securo, sua redissolução em isooctano e análise por GC/ECD.

O método foi validado com sucesso de acordo com os seguintes parâmetros: faixa de trabalho, obtida a partir de curvas analíticas preparadas no extrato da amostra controle: 5

a 1200 ng g⁻¹; recuperação em três níveis de fortificação da amostra (50, 100 e 500 ng g⁻¹ para dieldrin e endosulfan, 500, 1000 e 5000 ng g⁻¹ para dicofol e permetrina); exatidão (recuperação: 75 – 119%); precisão (coeficiente de variação: 3 – 19%); seletividade (ausência de interferentes nas amostras testemunhas de tecido adiposo); e baixos limites de quantificação para todos os pesticidas estudados (50 ng g⁻¹ para dieldrin e endosulfan e 500 ng g⁻¹ para dicofol e permetrina).

A aplicação do método às amostras de tecido adiposo forneceu os seguintes intervalos de concentração para os pesticidas em estudo: dicofol (872 a 12000 ng g⁻¹), dieldrin (82 a 2045 ng g⁻¹) e β -endosulfan (5 a 63 ng g⁻¹). Os valores encontrados indicam um acúmulo elevado destes compostos no tecido, comparados ao consumido durante o tratamento, mesmo quando expostos à baixas doses NOEL (1,42 a 283,3 mg kg⁻¹) e LOEL (2,84 a 1416,4 mg kg⁻¹) estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. Esses resultados, portanto, podem subsidiar estudos que avaliam os efeitos quanto aos danos causados ao organismo e que estejam associados ao tecido adiposo, como por exemplo as funções neuroendócrinas.

O método proposto além de mostrar-se adequado aos objetivos do projeto, permitiu análise simultânea dos pesticidas em um tempo relativamente curto quando comparado aos descritos na literatura, viabilizando sua aplicação em estudos que envolvem matrizes gordurosas e com elevado número de amostras.

Palavras-chave: pesticidas, validação de método, tecido adiposo de ratos.

ABSTRACT

The presence of pesticides in environmental and biological materials have been known for decades, but studies regarding their low concentration on potential carcinogenic and endocrine disruption effects are only beginning. Therefore, the development of quantitative analytical methods for pesticides in complex biological samples is important not only to estimate pesticide accumulation but also to evaluate possible tissue damages.

The aim of this work was to develop and validate a simple, fast and sensitive method for the pesticides dicofol, dieldrin, endosulfan *and* permethrin in rat adipose tissue. These specific molecules have been selected because they are the most frequently found in fruit and vegetables consumed in Brazil, according a survey performed by the National Health Surveillance Agency (Anvisa) and because they have been recently found to affect the endocrine system.

The establishment of an efficient procedure to eliminate lipids was a very difficult step. Therefore, several combinations of sorbents and eluents were tested coupled to solid phase extraction, matrix solid phase dispersion and sample freezing extraction. Finally the optimized method includes the extraction from rat adipose tissue samples with hexane in ultrasonic bath. The resulting extract is submitted to solid phase extraction using alumina and eluted with hexane:dichloromethane. Extracted solvent was dried and redissolved in isooctane and analysed by GC/ECD.

The method was successfully validated by following parameters: linearity range (analytical curve in sample extract): 5 to 1200 ng g⁻¹; recovery at three different levels of sample fortification (50, 100 and 500 ng g⁻¹ for dieldrin and endosulfan, 500, 1000 and 5000 ng g⁻¹ for dicofol and permethrin); accuracy (recovery: 75 – 119%); precision (coefficient of variation: 3 – 19%); selectivity (no interference of pesticides free adipose tissues samples);

and low limits of quantification for all the studied pesticides (50 ng g⁻¹ for dieldrin and endosulfan and 500 ng g⁻¹ for dicofol and permethrin).

The concentrations range of studied pesticides in adipose tissue were: dicofol (872 to 12000 ng g⁻¹), dieldrin (82 to 2000 ng g⁻¹) and β -endosulfan (5 to 63 ng g⁻¹). These values indicate a high concentration of these compounds in the tissue, compared to the consumption during the treatment even when they were exposed to low doses NOEL (1,42 to 283,3 mg kg⁻¹) e LOEL (2,84 to 1416,4 mg kg⁻¹) establishment by the World Health Organization). These results, therefore, can be a base to further studies in which they will be able to be evaluated by effects caused in the adipose tissue, as well as, the damages and alterations in animal neuroendocrine functions.

The method developed is more simple and faster than existing methods, shows good validation parameters and allows simultaneous determination of the pesticides in studies with a large number of samples and complex matrixes such as rat adipose tissue.

Keywords: pesticides, validation of method, rat adipose tissue.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	15
1. Apresentação e justificativa do estudo.....	16
2. Introdução.....	20
2.1. Pesticidas.....	20
2.1.1. Pesticidas organoclorados.....	20
2.1.2. Pesticidas piretróides.....	24
2.2. Alteradores endócrinos.....	26
3. Métodos analíticos para determinação de pesticidas organoclorados, organofosforados e piretróides em matrizes lipídicas.....	29
4. Validação de métodos analíticos.....	39
5. Objetivos do estudo.....	43
6. Materiais e métodos.....	44
6.1. Materiais.....	44
6.1.1. Padrões analíticos dos pesticidas, solventes e reagentes.....	44
6.1.2. Vidraria e equipamentos.....	44
6.2. Métodos.....	45
6.2.1. Limpeza de vidraria.....	45
6.2.2. Purificação da lã de vidro.....	45
6.2.3. Tratamento da alumina.....	45
6.2.4. Obtenção das amostras de tecido adiposo.....	46
6.2.5. Condições cromatográficas.....	48
6.2.6. Preparo das soluções dos padrões.....	49
6.2.7. Determinação da linearidade do detector (GC/ECD, Varian 3800) e construção das curvas analíticas.....	49
6.2.8. Determinação dos limites de detecção (LDe) e quantificação (LQe) do equipamento (GC/ECD, Varian 3800).....	50

6.2.9. Preparo inicial das amostras de tecido adiposo.....	50
6.2.10. Otimização do método para determinação de resíduos dos pesticidas dicofol, dieldrin , endosulfan e permetrina em tecido adiposo de ratos.....	51
6.2.11. Estimativa da quantidade de lipídios extraíveis das amostras de tecido adiposo de ratos.....	54
6.2.12 Avaliação do método proposto (estudo de recuperação).....	55
6.2.13. Avaliação de efeito de matriz.....	56
6.2.14. Determinação dos limites de detecção (LDm) e quantificação (LQm) do método.....	57
6.2.15. Aplicação do método proposto às amostras de tecido adiposo de ratos.....	57
7. Resultados e discussões.....	59
7.1. Condições cromatográficas.....	59
7.2. Linearidade da resposta do detector (GC/ECD, Varian 3800).....	61
7.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento (GC/ECD, Varian 3800).....	62
7.4. Resultados do teor de lipídios e preparo das amostras de tecido adiposo.....	63
7.5. Resultados dos testes preliminares de extração.....	63
7.6. Método proposto: determinação de resíduos dos pesticidas organolcorados dicofol, dieldrin e endosulfan e do piretróide permetrina em amostras de tecido adiposo de ratos.....	67
7.7. Limite de detecção (LDm) e quantificação (LQm) do método (GC/ECD, Varian 3800).....	75
7.8. Aplicação do método proposto às amostras provenientes dos ensaios biológicos.....	76
8. Conclusões.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	91
ANEXO I – Resumo do projeto temático.....	91
ANEXO II – Preparo da ração.....	93
ANEXO III – Espectro de massas do dicofol.....	95
ANEXO IV – Cromatogramas das amostras analisadas.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do pesticida organoclorado dieldrin e seu isômero endrin.....	21
Figura 2 – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado endosulfan.....	22
Figura 3 – Estrutura química do principal metabólito do pesticida organoclorado endosulfan.....	23
Figura 4 – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado dicofol e seu principal metabólito diclorobenzofenona.....	23
Figura 5 – Estrutura química dos isômeros do pesticida piretróide permetrina.....	25
Figura 6 – O sistema endócrino.....	26
Figura 7 – Disfunções endócrinas: (a) resposta natural, (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista.....	27
Figura 8 – Animais utilizados no experimento (ratos isogênicos machos da linhagem Lewis) e gaiolas para acomodação dos animais.....	47
Figura 9 – Amostras de tecido adiposo subcutâneo, peritoneal e perirenal.....	48
Figura 10 – Amostras de tecido adiposo de ratos antes e após a homogeneização.....	51
Figura 11 – Fluxograma do teste preliminar I para extração das amostras de tecido adiposo.....	52
Figura 12 – Fluxograma do teste preliminar II para extração das amostras de tecido adiposo.....	53
Figura 13 – Fluxograma do procedimento de extração proposto para determinação de resíduo de pesticidas em amostras de tecido adiposo de ratos.....	54
Figura 14 – Cromatograma (GC/ECD, Varian 3800) dos pesticidas: (1) dicofol I 650 pg μL^{-1} , (2) α -endosulfan 65 pg μL^{-1} , (3) dieldrin 65 pg μL^{-1} , (4) β -endosulfan 65 pg μL^{-1} , (5) dicofol II 650 pg μL^{-1} , (6) cis-permetrina 650 pg μL^{-1} e (7) trans-permetrina 650 pg μL^{-1}	59
Figura 15 – Curvas de linearidade dos pesticidas obtidas por GC/ECD, Varian 3800.....	62
Figura 16 – Cromatograma da amostra testemunha submetida ao tratamento descrito no teste preliminar I, utilizando alumina (GC/ECD, Varian 3300).....	64
Figura 17 – Cromatogramas das amostras testemunhas submetidas ao tratamento descrito no teste preliminar II, utilizando florissil, alumina e celite (GC/ECD, Varian 3300).....	65
Figura 18 – Cromatogramas sobrepostos (GC/ECD, Varian 3800) referente ao branco do método e mistura dos pesticidas dicofol I (100 pg μL^{-1}), α -Endosulfan (10 pg μL^{-1}), dieldrin (10 pg μL^{-1}), β -Endosulfan (10 pg μL^{-1}), dicofol II (100 pg μL^{-1}), cis-Permetrina (100 pg μL^{-1}) e trans-Permetrina (100 pg μL^{-1}).....	67

Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos (GC/ECD, Varian 3800) referente à amostra testemunha obtida pelo método proposto e mistura dos pesticidas dicofol I ($400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), α -Endosulfan ($40 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), dieldrin ($40 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), β -Endosulfan ($40 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), dicofol II ($400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), cis-Permetrina ($400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$) e trans-Permetrina ($400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$) preparada no extrato da amostra testemunha.....68

Figura 20 – Procedimento de preparo das soluções dos pesticidas na matriz.....70

Figura 21 – Curvas analíticas na matriz (destaque em magenta) e em solvente (destaque em azul) para os pesticidas em estudo.....71

Figura 22 – Cromatograma (GC/ECD, Varian 3800) da testemunha e da amostra de tecido adiposo peritoneal G3-Cx1-animal 4, sendo (1) dicofol I, (2) α -endosulfan, (3) dieldrin, (4) β -endosulfan e (5) dicofol II.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pesticidas classificados como alteradores endócrinos por algumas organizações.....	28
Tabela 2 – Métodos encontrados na literatura para análise de resíduos de pesticidas em matrizes gordurosas.....	30
Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas na análise dos pesticidas de interesse por GC/ECD.....	48
Tabela 4 – Níveis de fortificação das amostras testemunhas de tecido adiposo de ratos.....	56
Tabela 5 – Tempos de retenção e desvio padrão dos pesticidas estudados.....	60
Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação do equipamento GC/ECD (Varian 3800) para os pesticidas estudados.....	63
Tabela 7 – Equações das curvas analíticas dos pesticidas e respectivos coeficientes de correlação (GC/ECD, Varian 3800).....	69
Tabela 8 – Resultado do efeito de matriz de tecido adiposo de ratos.....	70
Tabela 9 – Estimativa da concentração de pesticidas nos animais.....	73
Tabela 10 – Recuperações percentuais e coeficientes de variação dos pesticidas estudados.....	74
Tabela 11 – Limites de detecção e quantificação do método (GC/ECD, Varian 3800) dos pesticidas estudados.....	76
Tabela 12 – Concentração dos pesticidas nas amostras de tecido adiposo peritoneal de ratos.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Extração Acelerada com Solventes
ASTM	American Society for Testing Materials
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CRMs	Materias de Referência Certificados
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DP	Desvio Padrão
ECD	Detector de Captura de Elétrons
EI	Impacto Eletrônico
FPD	Detector Fotométrico de Chama
GC	Cromatografia Gasosa
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HCB	Hexaclorociclobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HEX	Hexano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Conference on Harmonisation
JEA	Agencia Ambiental do Japão
LC	Cromatografia Líquida
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
MTBE	Éter Metil Terc-Butílico
NCI	Ionização Química Negativa
NOEL	Nível Sem Efeito Observável
NPD	Detector de Nitrogênio-Fósforo
OCs	Organoclorados
OPs	Organofosforados
OSPAR	Comissão de Paris e Oslo
p.a.	Grau Analítico
PAHs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PBBs	Bifenilos Polibromados
PBDEs	Éteres Difenil Polibromados
PCBS	Bifenilos Policlorados
PCI	Ionização Química Positiva
PFPD	Detector Fotométrico de Chama Pulsante
PLE	Extração por Líquido Pressurizado
SE	Extração por Sonificação
SFE	Extração por Fuido Supercrítico
SPE	Extração em Fase Sólida
TOF	Tempo de Voo
UKEA	Agência Ambiental do Reino Unido
USEPA	Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	Ultra Violeta
WHO	Organização Mundial da Saúde
WWF	Fundação Mundial de Conservação da Natureza

1. APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pesticida, praguicida, agrotóxico e defensivo agrícola são termos usados para uma gama de substâncias químicas, sintéticas ou naturais, que servem para controlar insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, nematóides, roedores e outras pragas. Desde 1940, os pesticidas orgânicos sintéticos fornecem benefícios para aumentar a produção e a qualidade agrícola (CHU; HU; YAO, 2005). Neste texto optou-se por empregar o termo pesticida para tais substâncias.

A agricultura praticada em todo mundo ainda é altamente dependente dos pesticidas. Sem o uso deles, a produção e a qualidade dos alimentos seria drasticamente afetada, além dos riscos de gerar falta de alimentos e promover aumento de preços dos produtos agrícolas. Entretanto, muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização destes produtos na agricultura, devido aos riscos que podem causar a saúde do consumidor e ao meio ambiente, oriundos da sua utilização inadequada (JARDIM, 2004).

A exposição humana aos pesticidas pode ser atribuída ao contato indireto, através do consumo de alimentos oriundos da produção agropecuária, ou ainda, ao contato direto, exposição ocupacional, no caso dos aplicadores rurais e ou manipuladores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009a).

Resíduos de pesticidas são encontrados em todos os compartimentos ambientais, especialmente os organoclorados, que, apesar de terem sido proibidos para uso agrícola na década 80, ainda são objeto de estudo devido a elevada persistência no ambiente (RODRIGUES, 2003). Por apresentarem alta lipofilicidade são bioacumulados, sendo encontrados em tecidos lipídicos, tais como, peixes, fígado e tecido adiposo (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2008; CHEN et al., 2007; KUVAREGA; TARU, 2007; MUÑOZ-DE-TORO et al., 2006; NAERT et al., 2006; NARDELLI; PALERMO; CENTONZE, 2004)

Dessa forma, para assegurar a saúde das pessoas, diversos países têm estabelecido programas de monitoramento de resíduos de pesticidas no ambiente e em

alimentos. No Brasil, foi criado o PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) que entre julho de 2001 e dezembro de 2004, pesquisou 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate). Neste estudo foram encontrados resíduos de pesticidas em 3.271 amostras, sendo que 71,5% são regulares e o restante (28,5%) irregulares, cujo termo irregular significa amostras que apresentam ingredientes ativos acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido ou resíduos de pesticidas não autorizados para determinada cultura. Dos irregulares, 83,4% não são autorizados e 16,6% apresentaram valores acima do LMR (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009a).

As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente, com relação aos tomates analisados, foram detectados resíduos de seis pesticidas não autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós), e de cinco pesticidas permitidos, mas cujos níveis de resíduos estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009a). Dados recentes do PARA de 2008, apresentaram novos alimentos com resultados irregulares. Entre eles: alface (19,8%), cenoura (30,4%), laranja (14,9%), mamão (17,3%), pimentão (64,4%) e uva (32,7%), além dos comumente afetados tomate (18,3%), morango (36,1%) e maçãs (3,9%) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009b).

A exposição do homem aos pesticidas pode causar intoxicações crônicas que chegam a 700 mil por ano em todo mundo. Os diagnósticos de câncer podem atingir cerca de 37 mil por ano e os que causam seqüelas neurocomportamentais estariam em torno de 25 mil casos anuais (ALVES FILHO, 2002). Estudos realizados com trabalhadores ou animais demonstraram relação entre a exposição crônica a pesticidas e efeitos adversos à saúde, como alterações neurológicas, reprodutivas, no sistema imunológico ou metabólicas (DALSENTER et al., 1997; SONNENSCHN; SOTO, 1998; KOIFMAN; KOIFMAN; MEYER, 2002).

Muitas substâncias suspeitas de desregulação endócrina foram classificadas, inicialmente, como micro-poluentes orgânicos. Esta classe inclui compostos tais como: alquilfenóis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas, ftalatos, bisfenol-A, polibromados, pesticidas e hormônios esteroidais (DAMSTRA et al., 2002). À medida que o conhecimento sobre os alteradores endócrinos avança, cresce também a lista dos compostos suspeitos de apresentar este comportamento. Diclorvós, endosulfan, dieldrin, permetrina, atrazina, simazina, lindano, clordano, hexaclorobenzeno são alguns dos pesticidas classificados como possíveis alteradores endócrinos por alguns órgãos governamentais (BIRKETT; LESTER, 2003).

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 possíveis alteradores endócrinos e agentes carcinogênicos, ainda são incipientes. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação destes compostos em matrizes biológicas torna-se necessário para se ter uma estimativa da quantidade bioacumulada e relacioná-la ao desenvolvimento de alterações em diversos tecidos do organismo.

Dessa forma, através de um projeto temático, cujo resumo encontra-se no Anexo I desta dissertação, profissionais da área de química, biologia e medicina propuseram o estudo da exposição de ratos à baixas doses de misturas de pesticidas, para avaliar seus efeitos quanto à carcinogenicidade e alteração do sistema endócrino. Para este estudo foram escolhidos os pesticidas que apresentam controvérsias quanto aos efeitos nocivos que podem causar ao homem, como por exemplo desregulação do sistema endócrino e, coincidentemente, por terem sido encontrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em matrizes vegetais consumidas pela população brasileira nos últimos anos, que são: dicofol, dieldrin, endosulfan, diclorvós e permetrina. Embora, o pesticida diclorvós esteja inserido no projeto temático, não foi objeto de estudo neste projeto de mestrado, uma

vez que esse composto é rapidamente metabolizado no fígado, e possui um tempo de meia vida em torno de 25 minutos (TOMLIN, 2004).

Neste projeto de mestrado, inserido no referido projeto temático, pretendeu-se otimizar, validar e aplicar um método para análise de resíduos de três pesticidas organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan) e um piretróide (permetrina) em tecido adiposo de ratos, buscando procedimentos eficientes e que envolvam menor número de etapas experimentais.

2. INTRODUÇÃO

2.1. PESTICIDAS

Os pesticidas podem ser classificados segundo seu modo de ação, forma de atuação e estrutura química. De acordo com o tipo de ação, são classificados, por exemplo, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas e bactericidas. Quanto à forma de atuação, os pesticidas podem ser sistêmicos e não sistêmicos. Os sistêmicos surgiram como um aperfeiçoamento na seletividade do combate à praga, combatendo apenas os organismos alvo e poupando os demais presentes naquele meio. Os não sistêmicos apresentam ação de contato (derme), penetração, ingestão e fumigante (respiratória). Os pesticidas também são classificados de acordo com a estrutura química em diversas classes. Entre elas, podem ser citadas as classes dos organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, ácidos, uréias, amidas, triazinas, uracilas e triazóis (GREEN; HASKELL; WATSON; GOULD apud FREITAS, 2005).

Os pesticidas estudados neste trabalho pertencem às classes dos inseticidas organoclorados e piretróides. Suas principais características estão apresentadas nos itens a seguir.

2.1.1. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Os pesticidas organoclorados são considerados compostos relativamente inertes e estáveis. São muito estudados devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e elevada solubilidade em tecido lipídico (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2008; CHEN et al., 2007; KUVAREGA; TARU, 2007; MUÑOZ-DE-TORO et al., 2006; NAERT et al., 2006; NARDELLI; PALERMO; CENTONZE, 2004). Dessa forma, tanto as águas de mananciais de rios e represas que abastecem as populações, quanto os peixes que vivem nesses locais podem apresentar resíduos de pesticidas organoclorados, mesmo anos após aplicação. Dentre os pesticidas organoclorados, aldrin, dieldrin, endosulfan, dicofol, clordano, DDT e derivados,

heptacloro, HCH (lindano), mirex, HCB (hexaclorobenzeno) e metoxicloro são os principais compostos representantes desta classe.

DIELDRIN

Este pesticida está banido para utilização no Brasil e foi introduzido em 1950, sendo comercializado em larga escala em todo mundo até a década de 70, utilizado, principalmente, na agricultura e em campanhas de saúde pública, como por exemplo, no combate a mosca tsé-tsé. Pertence à subclasse dos ciclodienos, possui ação inseticida e tem como isômero o pesticida endrin (Figura 1). Apresenta estabilidade em soluções básicas, porém moderada em soluções ácidas e também a luz (TOMLIN, 2004).

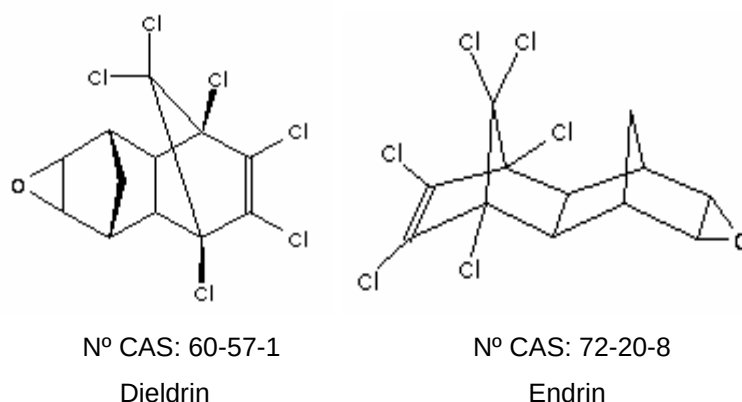


Figura 1 – Estrutura química do pesticida organoclorado dieldrin e seu isômero endrin.

Devido sua elevada lipossolubilidade ($K_{ow} = 6,20$), apresenta tendência ao acúmulo em tecidos ricos em lipídios. Ilustrando esta tendência, para cada unidade de dieldrin encontrada no sangue, há 136 vezes mais no tecido adiposo, 23 vezes mais no fígado e 4 vezes mais no tecido nervoso (WHO apud PAULÍNIA, 2009). Segundo algumas organizações governamentais, o pesticida dieldrin é caracterizado como desregulador do sistema endócrino e foi banido para aplicação em diversos países (BIRKETT; LESTER, 2003). Vários estudos sobre a carcinogenicidade do dieldrin em camundongos evidenciaram tumores hepáticos benignos e malignos, sendo as fêmeas menos sensíveis que os machos.

(AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY; DE JONG; STEVENSON apud COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

ENDOSULFAN

Pesticida organoclorado, pertencente à subclasse dos ciclodienos, classificado como moderadamente tóxico, possui ação inseticida e, como isômeros, os compostos α -endosulfan e β -endosulfan (Figura 2) na proporção 7:3 respectivamente (TOMLIN, 2004). Segundo a ANVISA, o endosulfan é autorizado para utilização no Brasil nas culturas de algodão, cacau, café, cana-de-açúcar, soja e também como preservante de madeira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009c).

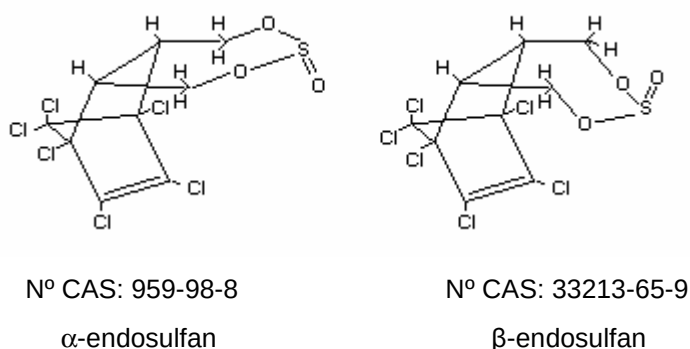
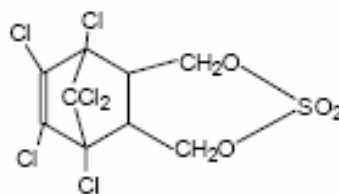


Figura 2 – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado endosulfan.

Este pesticida apresenta estabilidade quando exposto à luz, porém, em soluções ácidas ou básicas pode sofrer hidrólise, com conseqüente perda do grupo sulfato, liberando dióxido de enxofre. Além disso, apresenta como principal produto de degradação o metabólito endosulfan sulfato (Figura 3). Com valores de coeficientes de partição octanol-água (K_{OW}) iguais a 4,74 e 4,79 para α -endosulfan e β -endosulfan, respectivamente, este pesticida apresenta características lipossolúveis e, portanto, tende a se bioacumular em tecidos lipídicos, sendo entretanto mais detectado nos rins do que em tecido adiposo. Além disso, é rapidamente metabolizado para compostos menos tóxicos e a principal rota de eliminação são as fezes. O metabólito endosulfan sulfato também foi encontrado em tecidos

animais e vegetais e tem sido investigado sob o ponto de vista toxicológico (TOMLIN, 2004). Quanto aos efeitos toxicológicos, alguns estudos com camundongos e ratos mostraram que o endosulfan parece não apresentar atividade carcinogênica (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 2009a)



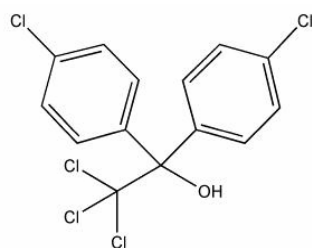
Nº CAS: 1031-07-8

Endosulfan sulfato

Figura 3 – Estrutura química do principal metabólito do pesticida organoclorado endosulfan.

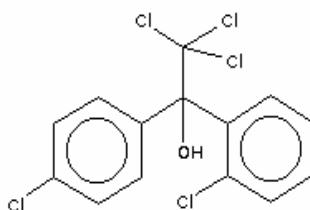
DICOFOL

Introduzido comercialmente a partir de 1955, dicofol é um pesticida da classe dos organoclorados, classificado como levemente tóxico e apresenta estrutura química similar ao DDT. Possui em sua composição uma mistura de dois isômeros denominados de o,p' e p,p', de acordo com a posição do cloro no anel benzênico, além de traços de DDT e seus derivados DDD e DDE (TOMLIN, 2004) (Figura 4). Segundo a ANVISA, é aplicado no Brasil nas culturas de algodão, cacau, café, cana-de-açúcar e soja (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009c).



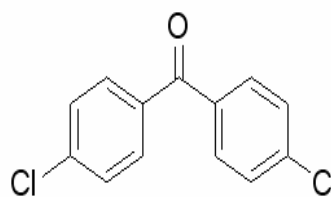
Nº CAS: 115-32-2

p,p' - dicofol



Nº CAS: 10606-46-9

o,p' - dicofol



Nº CAS: 90-98-2

Diclorobenzofenona

Figura 4 – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado dicofol e seu principal metabólito diclorobenzofenona.

Apresenta estabilidade em soluções ácidas, mas sofre hidrólise em meio alcalino, formando diclorobenzofenona (Figura 4), sendo que o isômero o,p' é hidrolizado mais rapidamente que o isômero p,p'. Quando exposto à luz, dicofol é degradado formando também diclorobenzofenona, e este metabólito têm sido o principal composto encontrado em animais e plantas, quando são administrados com dicofol. Com coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) igual a 4,30, dicofol apresenta tendência ao acúmulo em tecidos lipídicos, assim como dieldrin e endosulfan, citados anteriormente (TOMLIN, 2004).

O dicofol tem sido indicado como um potencial perturbador do sistema endócrino apresentando alta afinidade por receptores de esteróides. Cabe ressaltar que na composição deste pesticida há traços de DDT, que apresenta diversas características tóxicas, como por exemplo, atuando como promotor de tumores, ou seja, não causa os efeitos genéticos que culminam com o surgimento das neoplasias, mas potencializa a divisão das células neoplásicas que já tenham surgido. Além disso, foi observada a incidência aumentada de tumores hepáticos em camundongos, após exposição a altas doses à longo prazo (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002; THIBAUT; PORTE, 2004; HOEKSTRA et al, 2006)

2.1.2. PESTICIDAS PIRETRÓIDES

Os piretróides foram originalmente obtidos a partir de compostos naturais, tais como piretro, nicotina e ácido crisantêmico. Apesar de possuírem uma menor toxicidade que os pesticidas organoclorados, podem apresentar uma longa persistência em ambientes fechados, uma vez que são, freqüentemente, utilizados como inseticidas domésticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009 c). Sua utilização mais intensa tem acontecido na atualidade, principalmente após modificações em sua estrutura química. Devido a essas modificações, os piretróides se tornaram mais tóxicos e mais estáveis no ambiente. Atualmente existem mais de mil substâncias desenvolvidas a partir dessas estruturas químicas. Essas substâncias são eficientes inseticidas e de amplo uso, contudo,

a exposição crônica e intensa por via oral, como é o caso da exposição a resíduos de piretróides em alimentos de diversas origens, pode causar danos à saúde humana (SCHETTGEN et al., 2002).

PERMETRINA

Pesticida da classe dos piretróides, classificado como moderadamente tóxico apresenta em sua composição uma mistura de dois isômeros, cis e trans (TOMLIN, 2004) (Figura 5). Segundo a ANVISA é aplicado 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 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009c).

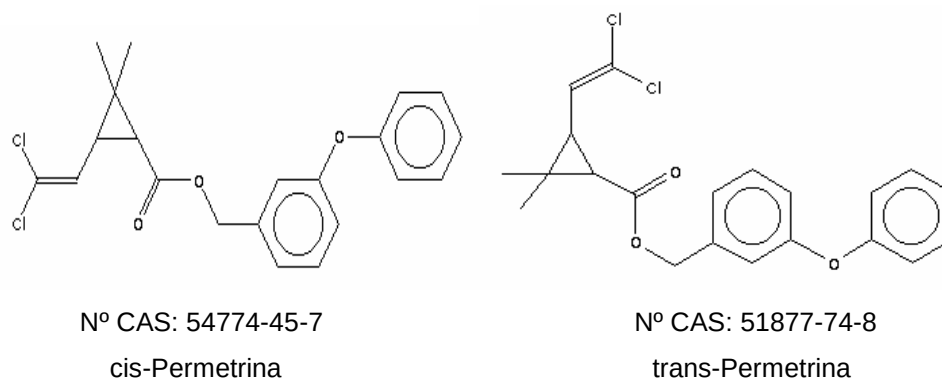


Figura 5 – Estrutura química dos isômeros do pesticida piretróide permetrina.

Apresenta maior estabilidade em meio ácido do que em meio alcalino, além de ser estável ao aquecimento. Não é reportado o acúmulo em tecidos lipídicos, sendo excretada rapidamente, mesmo apresentando um coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) igual a 6,1. Quanto à sua metabolização em animais, pode sofrer hidrólise, hidroxilação, bem como a eliminação do glicosídeo conjugado (TOMLIN, 2004). Quanto às características toxicológicas, as evidências sobre a carcinogenicidade da permetrina é inconclusiva. Embora a fertilidade de fêmeas de rato tenha sido afetada, quando estas receberam doses orais muito elevadas de permetrina, não é provável que alterem o sistema reprodutivo em

seres humanos em circunstâncias normais (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 2009b).

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. Nesse sentido, o item 2.2, a seguir, explica o que são alteradores endócrinos e apresenta alguns pesticidas que estão sendo apontados como detentores destas características.

2.2. ALTERADORES ENDÓCRINOS

Os alteradores endócrinos pertencem a uma categoria de substâncias que interferem no funcionamento do sistema endócrino. O sistema endócrino (Figura 6) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como a tireóide, as gônadas e as glândulas supra-renais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina (BIRKETT; LESTER, 2003).

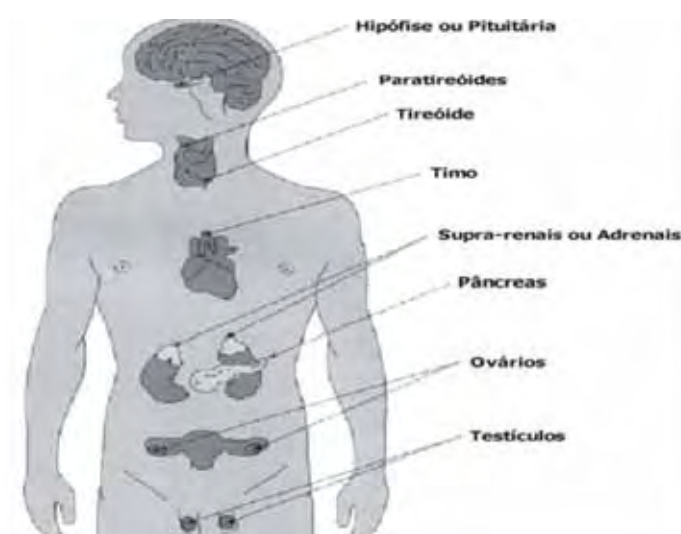


Figura 6 – O sistema endócrino (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os alteradores endócrinos podem interferir no funcionamento do sistema endócrino de três formas: imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, como, por exemplo, o estrogênio ou a testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo (efeito agonista); bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo assim a ação dos hormônios naturais (efeito antagonista); ou afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando as concentrações dos hormônios naturais (BAIRD apud GHISELLI; JARDIM, 2007) (Figura 7).

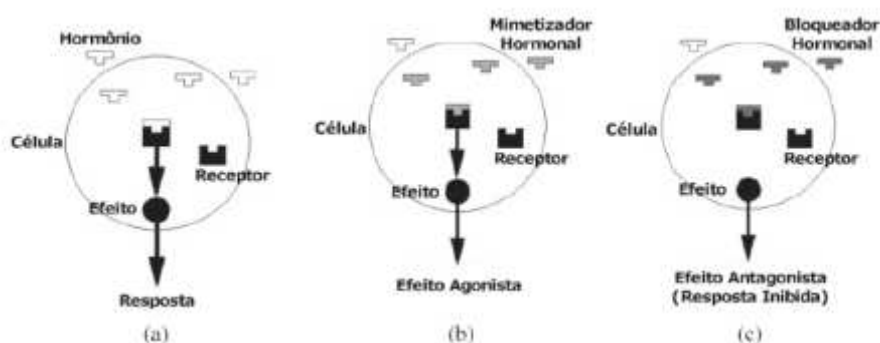


Figura 7 – Disfunções endócrinas: (a) resposta natural, (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Com base em informações da literatura foi elaborada, por diversas organizações mundiais, uma lista de substâncias suspeitas de causar alteração do sistema endócrino. A Tabela 1 apresenta alguns compostos classificados como alteradores endócrinos, com destaque para os pesticidas do presente estudo.

Tabela 1 – Pesticidas classificados como alteradores endócrinos por algumas organizações (BIRKETT; LESTER, 2003).

Pesticidas	UKEA	USEPA	OSPAR		JEA	WWF
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		
Atrazina	X	X		X	X	X
Simazina	X	X		X	X	X
Diclorvós	X					
Endosulfan	X	X		X	X	X
Trifluralina	X	X				X
Dimetoato	X					X
Linuron						X
Permetrina	X	X			X	
Lindano	X	X	X			X
Clordano	X			X	X	X
Dieldrin	X	X		X	X	X

UKEA – United Kingdom Environmental Agency; USEPA – United States Environmental Protection Agency; OSPAR – Oslo and Paris Commission; JEA – Japan Environmental Agency; WWF – World Wildlife Foundation.

O pesticida DDT e seus derivados não foram citados na Tabela 1, porém, representam o caso mais famoso sobre alteradores endócrinos, além de fazerem parte da composição do dicofol, composto avaliado no presente trabalho. Foram compostos largamente utilizados em todo mundo durante as décadas de 50 e 60 e, ainda hoje, alguns pesticidas, como o dicofol, derivado do DDT, são utilizados por diversos países. Estudos mostraram que o DDT é persistente no meio ambiente, apresenta atividade estrogênica e pode afetar o sistema reprodutivo de mamíferos e pássaros. Exemplo disso são as anomalias detectadas no sistema reprodutivo de jacarés em vários lagos da Flórida contaminados com DDT (GUILLETTE apud BILA; DEZOTTI, 2007).

3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES EM MATRIZES LIPÍDICAS

O objetivo da revisão bibliográfica foi avaliar o cenário atual referente aos métodos utilizados para análise de resíduos de pesticidas organoclorados, organofosforados e piretróides em diferentes tipos de matrizes lipídicas. Entre elas, merecem especial destaque, tecido adiposo animal e humano, já que diversos pesticidas têm sido encontrados nestas matrizes, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Métodos encontrados na literatura para análise de resíduos de pesticidas em matrizes gordurosas.

Referências	Matrizes/ analitos	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnicas de análise	Concentração de Contaminantes encontrados
FRENICH et al., 2008	Ovos e pepinos/pesticidas organoclorados e organofosforados	1) MSPD: C18+MgSO ₄ 2) SPE: florisil. Eluição com hexano saturado com acetonitrila (fração 1) e acetato de etila (fração 2)	GC/MS/MS	NA*
LOPEZ-ESPINOSA et al., 2008	Tecido adiposo humano/pesticidas organoclorados	1) Extração sólido-líquido com hexano 2) SPE: alumina desativada (5%). Eluição com hexano	GC/ECD e HPLC/UV	DDE: 710 ng g ⁻¹ DDT: 330 ng g ⁻¹ DDD: 1510 ng g ⁻¹
GOULART et al., 2008	Leite/pesticidas piretróides	1) Extração com solvente orgânico 2) <i>Freezer</i> à -20°C (12h) 3) Fase orgânica (constituída de pesticidas) separada da fase aquosa que contém a fração lipídica 4) Redissolução da fase orgânica em acetonitrila	GC/ECD	0,28 a 3,68 µg L ⁻¹
CHEN et al., 2007	Tecido adiposo humano e gordura de peixe/pesticidas organoclorados	1) Extração com éter de petróleo (ultrassom) 2) SPE: florisil. Eluição com acetato de etila/éter de petróleo, 9:1, v/v	GC/ECD	HCH (peixe): 28 ng g ⁻¹ HCH (homem): 898 ng g ⁻¹ DDT (peixe): 666 ng g ⁻¹ DDT (homem): 3800 ng g ⁻¹
GARCIA-REYES et al., 2007	Óleo de oliva/pesticidas organoclorados e piretróides	Comparação e combinação entre GPC, MSPD e LLE	GC/MS, LC/MS e LC/TOF/MS	NA

*NA (não aplicado em amostras reais); **ND (não detectado)

Tabela 2 – Continuação.

Referências	Matrizes/ analitos	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnicas de análise	Concentração de Contaminantes encontrados
KUVAREGA et al., 2007	Fígado, músculo e tecido adiposo de ratos/Endosulfan	1) MSPD: alumina 2) Extração com solvente: hexano 3) Soxhlet: utilizando sólido e sobrenadante do item 2 4) Extrato do item 3: SPE-florisil e hexano (eluente)	GC/ECD	Endosulfan: 0,083 a 4,785 ng g ⁻¹ Endosulfan sulfato: até 2,93 ng g ⁻¹
FERNANDEZ-MORENO et al., 2006	Abacate/65 pesticidas	1) Extração com solvente comparado com PLE 2) <i>Cleanup</i> - GPC	GC/MS/MS	β - endosulfan: 25 ng g ⁻¹
MUÑOZ-DE-TORO et al., 2006	Tecido adiposo de mulheres/organoclorados	1) Extração com acetona/éter de petróleo 2) SPE: alumina e éter de petróleo (eluente) 3) SPE: florisil e éter de petróleo/éter etílico (eluente)	GC/ECD	p,p'-DDE: 4974 ng g ⁻¹ β - HCB: 1780 ng g ⁻¹
VALSAMAKI et al., 2006	Ovos de galinha/pesticidas e PCBs	1) MSPD: florisil e eluição (Hex/DCM) 2) Adição de H ₂ SO ₄ concentrado e agitação vortex	GC/ECD e GC/MS	γ - BHC: 15 ng g ⁻¹ PCB 28: 10 ng g ⁻¹

*NA (não aplicado em amostras reais); **ND (não detectado)

Tabela 2 – Continuação.

Referências	Matrizes/ analitos	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnicas de análise	Concentração de Contaminantes encontrados
NAERT et al., 2006	Tecido adiposo humano/PCBs e PBDEs	1) Derretimento em microondas 2) SPE: sílica acidificada+alumina desativada+sulfato de sódio e hexano (eluente)	GC/MS	PBDEs :1,23 a 57,2 ng g ⁻¹
CARRO et al., 2005	Mariscos e peixes/ PBDEs, PCBs, PBBs e pesticidas	MSPD: C ₁₈ + alumina básica e hexano (eluente)	GC/MS/MS	PBDE 47: 1,3 ng g ⁻¹ 4,4'-DDT: 0,9 a 166,6 ng g ⁻¹ γ - BHC: 5,2 e 9,4 ng g ⁻¹ PCBs: 0,1 a 22,3 ng g ⁻¹
ESTEVE-TURRILLAS et al., 2005	Óleo vegetal/piretróides	1) Partição líquido-líquido 2) SPE: comparação florisil, alumina, C18, carbono grafitizado	GC/MS/MS	NA
FERRER et al., 2005	Azeitonas e azeite de oliva/11 organoclorados, fosforados e piretróides	1) MSPD: aminopropil e acetonitrila (eluente) 2) Co-coluna: florisil e acetonitrila (eluente)	GC/MS e LC/MS/MS	Endosulfan sulfato: 38 ng g ⁻¹
LEHOTAY et al., 2005	Alimentos gordurosos/32 pesticidas	Comparação de dois métodos: A) Extração com solvente + <i>cleanup</i> SPE (C18 + amina + MgSO ₄) e acetonitrila (eluente) B) MSPD: 0,5g amostra+ C18 + Na ₂ SO ₄ ; mistura colocada em cartucho florisil e acetonitrila (eluente)	GC/MS e LC/MS/MS	NA
YAGUE et al., 2005	Óleo de oliva/organoclorados, organofosforados e PCBs	Para OPs: SPE com C18 e eluição com acetonitrila saturada com hexano; Para OCs e PCBs: SPE com alumina neutra e eluição com n-hexano/DCM (8:2, v/v)	GC/NPD GC/ECD e GC/MS	Acefato: 10 ng g ⁻¹ OCs: 1,5 a 5,2 ng g ⁻¹ PCBs: 2,3 a 17,3 ng g ⁻¹

*NA (não aplicado em amostras reais); **ND (não detectado)

Tabela 2 – Continuação.

Referências	Matrizes/ analitos	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnicas de análise	Concentração de Contaminantes encontrados
FURUSAWA, 2004	Gordura animal/organoclorados	MSPD: alumina e eluição com heptano	LC/DAD	ND*
HONG et al., 2004	Peixe/24 organoclorados	1) Extração com Acetona/Hexano e secagem 2) Congelamento com acetonitrila 3) Rápida filtração 4) <i>Cleanup</i> com florisil e eluição com acetona/acetato de etila	GC/MS	NA
NARDELI et al., 2004	Peixe/organoclorados	1) MSPD com ENVI-Carb (carbono grafitizado) 2) Adição de ácido sulfúrico concentrado. Centrifuga e Injeta fase orgânica	GC/ECD e GC/MS	5,74 a 15 ng g ⁻¹ (HCB, lindano, DDT e seus derivados)
PETREAS et al., 2004	Tecido adiposo abdominal/PCBs, PBDEs e OCPs	Para OCPs, PCBs, PBDEs: 1) Extração com Diclorometano/hexano 2) SPE: Na ₂ SO ₄ , AX-21 carbon e DCM/hexano (eluente) 3) GPC com DCM/hexano 4) SPE: florisil e DCM/hexano (eluente)	GC/MS	PCBs: 9 a 350 ng g ⁻¹ PBDEs: 1 a 440 ng g ⁻¹ OCPs: 6 a 2700 ng g ⁻¹
		Para PCBs coplanares: 1) Extração com DCM/Hexano		
		2) SPE: Na ₂ SO ₄ , AX-21 carbon e tolueno (eluente) 3) SPE: alumina+sílica acida e tolueno (eluente)		
SAITO et al., 2004	Tecidos orgânico e adiposo/organohalogenados	1) Homogeneização com Hidro-matriz e ASE com diclorometano/acetona (100°C e 1500 psi) 3) LLE com hexano e MTBE 4) GPC (Bio Beads S-X3 e DCM/Hex) 5) SPE: sílica-gel, DCM/hex (fração apolar) e metanol/DCM (fração polar)	GC/MS	NA

*NA (não aplicado em amostras reais); **ND (não detectado)

Tabela 2 – Continuação.

Referências	Matrizes/ analitos	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnicas de análise	Concentração de Contaminantes encontrados
CRIADO et al., 2004	Manteiga, gordura bovina e de aves/PCBs	1) MSPD: florisil e Na ₂ SO ₄ 2) SPE: florisil + sílica acidificada (44% H ₂ SO ₄) e Hexano/DCM (90:10, v/v)	GC/ECD e GC/MS	NA
SUN et al., 2003	Gordura de carne/ 71 pesticidas, organoclorados, organofosforados e piretróides	MSPD: florisil + C18 e acetoneitrila (eluente)	GC/ECD, GC/FPD	NA
YONG et al., 2003	Plasma, músculo, fígado, rim, tecido adiposo de porco/Diazinon	1) SPE: Na ₂ SO ₄ +carvão vegetal e Hexano/Acetona (eluente) 2) LLE com acetoneitrila/éter de petróleo	GC/NPD	NA
FERNANDES et al., 2002	Músculo de peixe/ PCBs e pesticidas organoclorados	1) Tecido + Na ₂ SO ₄ / extração com solvente (hexano:diclorometano), soxhlet, 18 h 2) Troca de solvente - hexano 3) H ₂ SO ₄	GC/ECD e GC/NCI-MS	PCBs: 4,1 a 85,4 ng g ⁻¹ OCs: 0,1 a 15 ng g ⁻¹
VIVES et al., 2002	Fígado de peixe/ PAHs, PCBs e pesticidas organoclorados	Comparação de dois métodos de extração: A) Fígado + Na ₂ SO ₄ ; extração soxhlet; cleanup alumina B) Saponificação; extração com solvente	GC/MS, GC/NCI-MS e GC/ECD	PCBs: 0,38 a 120 ng g ⁻¹ OCs: 0,5 a 52 ng g ⁻¹
ZROSTLÍKOVÁ et al., 2002	Gordura animal/organoclorados e organofosforados	1) Extração com acetato de etila; 2) Extração com ciclopentano; 3) GPC com isoctano	GC/PFPD e ECD	NA

*NA (não aplicado em amostras reais); **ND (não detectado)

Como pode ser observado na Tabela 2, os estudos reportam muitos métodos convencionais para análise de pesticidas em amostras gordurosas. São geralmente procedimentos longos, envolvendo várias etapas de extração e purificação com diversos tipos de adsorventes (alumina, sílicagel, florisil, celite). O processo de extração soxhlet (KUVAREGA; TARU, 2007), extração por líquido pressurizado (PLE) (FERNANDEZ-MORENO et al., 2006), extração assistida por microondas (MAE) (ESKILSSON; BJÖRKLUND, 2000), extração acelerada com solventes (ASE) (SAITO et al., 2004), extração por fluido supercrítico (SFE) (KING; ZHANG, 1998) e extração por sonificação (SE) (SÁNCHEZ-BRUNETE; RODRIGUEZ; TADEO, 2002) têm sido comumente utilizadas. A extração em soxhlet pode requerer longo tempo e consumo de larga quantidade de solventes orgânicos, portanto, está sendo substituída por técnicas mais rápidas como as citadas anteriormente (PLE, MAE, ASE, SFE e SE).

A Tabela 2 apresenta, ainda, diversas técnicas para eliminação de lipídios dos extratos, incluindo partição líquido-líquido (YONG et al, 2003), cromatografia de permeação em gel (GARCIA-REYES et al., 2007), colunas cromatográficas preparativas (FERRER et al., 2005), múltiplos *cleanup* (MUÑOZ-DE-TORO et al., 2006; PETREAS et al., 2004) e tratamento com compostos ácidos ou alcalinos (NAERT et al., 2006). Entretanto, esses métodos também consomem elevado tempo de bancada, larga quantidade de solventes e dependendo da molécula, pode sofrer degradação por ataque ácido ou alcalino.

Os métodos citados na Tabela 2 que mais se destacaram quanto à remoção de lipídios, eficiência de recuperação e simplicidade de execução estão descritas mais detalhadamente a seguir.

Hong et al. (2004) propuseram um método de extração, onde aproximadamente 90% dos lipídios são removidos de amostras de peixe, sem perdas significativas dos pesticidas organoclorados. Trata-se de uma extração sólido – líquido, na qual se utiliza uma mistura de acetona – hexano (5:2, v/v), sendo esta mistura levada ao banho de ultrassom. O extrato obtido é seco, dissolvido em acetonitrila e levado ao *freezer* à -24°C. Esse processo é

chamado de *freezing-lipid filtration*, ou seja, separação dos lipídios pelo congelamento do extrato. Neste processo alguns pesticidas como dicofol, dieldrin, endosulfan, entre outros, são removidos da parte lipídica com boa eficiência, o que ocorre porque os lipídios apresentam baixa solubilidade em acetonitrila, além de solidificarem pelo abaixamento da temperatura, diferentemente dos pesticidas que ficam em solução. Porém, a filtração deve ser realizada rapidamente, para que os lipídios não se dissolvam e retornem a fase solúvel. Os autores obtiveram bons resultados de recuperação com valores entre 78 e 115% e coeficientes de variação de 1 a 15%. Os limites de detecção do método apresentaram valores entre 0,5 e 5 ng g⁻¹, com exceção do endosulfan que foi 20 ng g⁻¹. Os limites de quantificação não foram descritos no estudo.

Esse tipo de extração também foi utilizado por Goulart et al. (2008) para determinação de pesticidas piretróides em amostras de leite. O método apresentou bons valores de exatidão e precisão (84,0 ± 0,3% para deltametrina e 93,0 ± 0,1% para cipermetrina), além de baixos limites de quantificação (0,75 ng g⁻¹).

Nardelli, Palermo e Centonze (2004) desenvolveram um método de extração para análise de resíduos de pesticidas organoclorados em amostras de peixe. O procedimento é baseado na extração sólido – líquido com hexano, seguido da adição de ácido sulfúrico concentrado e carbono grafitizado ao extrato, sendo esta mistura agitada em vortex por alguns minutos e centrifugada para separação das fases aquosa e orgânica. O resíduo final da fase orgânica foi evaporado, dissolvido em isooctano e analisado por GC/ECD e GC/MS. Foram obtidos bons resultados de recuperação e de coeficiente de variação, com valores entre 68 e 124% e de 2 a 20%, respectivamente. O método apresentou boa remoção de lipídios, pois com a adição de ácido sulfúrico concentrado, foram digeridos e transportados para a fase aquosa a ser desprezada. Além disso, foram obtidos baixos limites de detecção (3,0 ng g⁻¹) e sua aplicação em amostras comerciais de peixes, permitiu a detecção de alguns pesticidas organoclorados nas amostras analisadas, entre eles, HCB, lindano, DDT e seus derivados. Os limites de quantificação não foram apresentados no estudo.

Criado et al. (2004) propuseram um método para purificação de extratos obtidos de manteiga, gordura bovina e de aves para análise de bifenilas policloradas. Foi aplicada a técnica de dispersão da matriz em fase sólida, utilizando como adsorventes florissil e sulfato de sódio anidro, seguida da etapa de *cleanup* em cartuchos de extração em fase sólida empacotados com florissil e sílica acidificada (44% ácido sulfúrico concentrado), sendo que os compostos foram eluídos com uma mistura de hexano e diclorometano. O extrato foi evaporado, dissolvido em isooctano e analisado por GC/ECD e GC/MS. Segundo os autores, a porcentagem de lipídios remanescente no extrato após essas etapas foi apenas de 0,06%. Foram obtidos valores de recuperação de 76 a 113% e coeficientes de variação na faixa de 2 a 13% para os compostos nos três tipos de matrizes estudadas. O método apresentou limites de quantificação de 0,4 a 3 ng g⁻¹ por GC/MS e de 0,4 a 1,5 ng g⁻¹ por GC/ECD. Uma característica importante deste procedimento é que não se adicionou ácido sulfúrico concentrado diretamente ao extrato da amostra para ocorrer a digestão dos lipídios, como foi realizado por Nardelli Palermo e Centonze (2004), mas sim sílica acidificada, provavelmente, para evitar que os compostos fossem degradados.

Lopez-Espinosa et al. (2008) e Chen et al. (2007) utilizaram um procedimento de extração com poucas etapas experimentais e foram os que mais se destacaram, quanto à simplicidade de execução, dentre os estudos citados na Tabela 2. Nestes dois trabalhos foram estudados compostos e matrizes lipídicas muito similares ao presente estudo como, por exemplo, os pesticidas dieldrin e endosulfan e amostras de gordura de peixe e tecido adiposo humano. Extração sólido-líquido com hexano, seguida de extração em fase sólida utilizando alumina desativada a 5% e eluição com mistura de hexano com diclorometano foi o procedimento adotado por Lopez-Espinosa et al. (2008). O método validado apresentou valores de recuperação de 83% a 120%, coeficientes de variação menores que 7,3% e limites de quantificação do método no intervalo de 1 a 25 ng g⁻¹. Chen et al. (2007) utilizaram éter de petróleo na extração sólido-líquido e florissil como adsorvente na etapa de extração em fase sólida, sendo os pesticidas eluídos com uma mistura de acetato de etila-

éter de petróleo (9:1, v/v). Uma alíquota do extrato foi analisada por GC/ECD e GC/MS. A porcentagem de recuperação dos pesticidas estiveram entre 81 e 90%, com coeficientes de variação inferiores a 9,8% e limites de quantificação do método entre 0,6 e 0,8 ng g⁻¹.

Apesar dos estudos descritos anteriormente apresentarem matrizes com menor complexidade quanto ao teor de lipídios, eles auxiliaram no desenvolvimento do presente trabalho, pois analisaram pesticidas de classes semelhantes como os organoclorados e piretróides. Além disso, os estudos de Lopez–Espinosa et al. (2008) e Chen et al. (2007) se destacaram por apresentarem métodos simples e rápidos para determinação de pesticidas em matrizes gordurosas e, portanto, também foram investigados neste trabalho.

Quanto às técnicas cromatográficas de análise, a Tabela 2 mostra que a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) são largamente utilizadas para a determinação quali e quantitativa de compostos organoclorados, organofosforados, piretróides entre outros. Observa-se ainda, que em vários casos, os dois tipos de detectores são empregados.

Muitos compostos organoclorados apresentam uma detectabilidade compatível ao ECD, quando analisados por GC/MS com ionização química negativa (NCI). Segundo Primer apud Pizzutti (2006), essa resposta pode ser até dez vezes maior quando comparada aos modos de ionização por impacto eletrônico (EI) e ionização química positiva (PCI). A elevada resposta cromatográfica promovida por NCI é muito bem conhecida para compostos que apresentam em suas estruturas grupos que capturam elétrons. Por exemplo, de acordo com esse mesmo autor, os átomos de halogênio ou enxofre formam ânions muito estáveis no sistema por NCI e, conseqüentemente, promovem uma boa detectabilidade para pesticidas organoclorados e polinitroalcanos, alcanos halogenados, compostos organometálicos e alguns pesticidas organofosforados.

4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Atualmente, existem diversos conceitos e definições elaboradas por pesquisadores, agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, que objetivam responder o que é uma validação analítica e de que forma deve ser realizada. Estão apresentadas a seguir algumas definições:

1. Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992);

2. Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM WORKING GROUP apud RIBANI et al., 2004);

3. Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1999);

4. É a demonstração que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL INMETRO, 2003).

É consenso que existem inúmeras definições dadas ao termo validação, porém, é certo que um método deve ser validado segundo os objetivos do estudo, de forma que se obtenha resultados confiáveis e interpretáveis. Diversos critérios foram elaborados para validação de um método analítico, mas cabe ao pesquisador escolher quais são necessários e relevantes para o propósito do trabalho. Os principais parâmetros de validação estão apresentados a seguir:

✓ Seletividade: a seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação. Especificidade tem sido empregado como sinônimo de

seletividade. O termo específico refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito. Porém, na prática, poucos métodos respondem a apenas um analito, fazendo com que o termo seletividade seja mais apropriado (LANÇAS, 2004);

✓ Linearidade: corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRITO et al., 2003);

✓ Faixa de aplicação: O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear (BRITO et al., 2003);

✓ Sensibilidade: a sensibilidade de um método indica sua capacidade de discriminar, com fidelidade, duas concentrações próximas. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica (BRITO et al., 2003);

✓ Limite de detecção: representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (BRITO et al., 2003);

✓ Limite de quantificação: representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida com exatidão e precisão, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO et al., 2003);

✓ Robustez: é uma medida da capacidade de um método não sofrer alterações decorrentes de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004);

✓ Precisão: é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra. Pode ser expressa como o desvio padrão ou coeficiente

de variação de uma série de medidas e também considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRITO et al., 2003);

Repetitividade: representa a concordância de resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições e em curto intervalo de tempo. Repetitividade também pode ser denominada de precisão intra-ensaio ou intra-corrida (RIBANI et al., 2004)

Precisão intermediária: indica o efeito das variações do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou mesmo a combinação destes fatores.

Reprodutibilidade: expressa a concordância dos resultados obtidos entre diferentes laboratórios em estudos colaborativos, usualmente aplicados para padronização de metodologias.

✓ Exatidão: expressa a concordância entre o valor encontrado pelo processo analítico e o valor real ou de referência (LANÇAS, 2004). Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método estão descritos a seguir:

Materiais de referência certificados (CRMs): são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância. Os valores obtidos pelo laboratório utilizando os CRMs devem ser comparados com os valores certificados para verificar a exatidão do método. Esse procedimento é o mais reconhecido por apresentar padrões internacionais, entretanto, os CRMs apresentam elevado custo e, para certas aplicações, nem existem (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Comparação de métodos: Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método proposto e os resultados do método de referência, avaliando o quanto estão próximos, isto é, o grau de exatidão do método avaliado em relação ao de referência. Porém, nem sempre se encontra um método de referência pré-existente (BRITO et al., 2003);

Estudo de recuperação: a recuperação é definida como porcentagem da substância de interesse que é extraída da amostra após ser fortificada com o analito em uma concentração conhecida. A limitação deste procedimento é de que a substância adicionada não está na mesma forma que a presente na amostra, portanto, é recomendável que o analito seja adicionado na matriz e deixado interagir por algumas horas, antes da aplicação do método de extração. Este procedimento corrige avaliações otimistas na porcentagem de recuperação (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Na maioria dos casos, a variabilidade dos resultados é maior com a diminuição da concentração e a recuperação pode ser diferente em altas e baixas concentrações. Portanto, recomenda-se que a recuperação seja avaliada em três níveis de concentração (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999).

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).

5. OBJETIVOS DO ESTUDO

Considerando os propósitos do projeto temático, citado na apresentação e justificativa deste trabalho, os objetivos do estudo foram:

- ✓ Otimizar e validar um método simples e rápido para determinação de resíduos de dicofol, permetrina, dieldrin e endosulfan em tecido adiposo de ratos e,
- ✓ Aplicar o método validado às amostras de tecido adiposo de ratos provenientes dos ensaios biológicos.
- ✓ Avaliar a relação entre lipossolubilidade e bioacumulação dos pesticidas dicofol, permetrina, dieldrin e endosulfan em tecido adiposo de ratos.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

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 hexano, acetona, isooctano, diclorometano e acetonitrila (grau HPLC, Mallinckrodt). Os reagentes químicos utilizados foram alumina neutra (70 – 230 Mesh ASTM, Sigma Aldrich), florisil (60 – 100 Mesh ASTM, Acros Organics), C18 (40 – 63 µm, Sigma Aldrich), sílica gel 60 (70 – 230 Mesh ASTM, Sigma Aldrich), sulfato de sódio anidro (p.a., Sigma Aldrich), celite (p.a., Reagen) e ácido sulfúrico concentrado (p.a., Synth).

6.1.2. Vidraria e equipamentos

Foi utilizada vidraria comum de laboratório (béquer, pipeta, funil, cadinho, balão, pistilo, vidro de relógio, proveta etc.) além de colunas de vidro, com torneiras de teflon, para extração em fase sólida (12 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro interno), confeccionados no setor de vidraria do Instituto de Química – Unesp/Araraquara.

Os equipamentos utilizados foram:

✓ Cromatógrafo a gás Varian (GC), modelo 3800, equipado com detector de captura de elétrons (ECD), com 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, injetor split/splitless (manual) e software para aquisição dos dados Star Workstation Varian e Galaxie Varian;

✓ Cromatógrafo a gás Varian (GC), modelo 3300, equipado com detector de captura de elétrons (ECD), utilizado para os testes preliminares I e II, com 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, injetor split/splitless (manual) e integrador Varian, modelo 4290;

✓ Cromatógrafo a gás (GC), modelo CP 3800, equipado com espectrômetro de massa *ion trap*, modelo Varian Saturn 2000, que opera nos modos MS e MS/MS, utilizado para identificação dos isômeros do pesticida dicofol, com 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, injetor split/splitless;

✓ Evaporador rotatório Tecnal, modelo TE-210;

✓ Ultra-som Cleaner Thornton;

✓ Estufa Fanem, modelo 315 SE;

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

6.2. Métodos

6.2.1. Limpeza de vidraria

O material utilizado foi lavado com acetona, imerso em solução de Extran 2% (MA-02-neutro, Merck) e após 24 horas foi enxaguado em água corrente. A secagem da vidraria foi realizada em estufa à 130°C, sendo o material volumétrico seco à temperatura ambiente.

6.2.2. Purificação da lã de vidro

A lã de vidro, utilizada como suporte na técnica de extração em fase sólida, foi purificada utilizando extração por sonificação com hexano durante 2 horas. Após a secagem à temperatura ambiente, a lã de vidro foi armazenada em frascos de vidro vedados.

6.2.3. Tratamento da alumina

Alumina neutra foi ativada em estufa à 140°C por um período de 12 horas e após atingir a temperatura ambiente, foi desativada a 4,6% (m/m) com água deionizada. Em

seguida, armazenada em frascos de vidro fechados e mantidas por 12 horas em dessecador.

6.2.4. Obtenção das amostras de tecido adiposo

O experimento com os animais foi conduzido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo da Faculdade de Medicina (Unesp/Botucatu). Todos os aspectos éticos envolvidos na experimentação com animais estão disciplinados pela Comissão de ética desta mesma instituição.

Os animais utilizados nesse estudo são ratos isogênicos machos da linhagem Lewis, provenientes do Biotério do CEMIB, Unicamp, com peso médio de 220g e a idade aproximada de oito semanas. Eles foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina 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 contínua de ar.

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno (Figura 8) (04 animais/gaiola), forradas com maravalha de pinho branco, autoclavadas e fechadas com grades de inox, que foram trocadas e limpas três vezes por semana. Durante o período de aclimação de quatro semanas, eles receberam água (em bebedouros de vidro com capacidade de 500 mL, com rolhas de borracha e bicos de aço inoxidável) e ração, isenta de pesticidas, à vontade. O período de exposição foi de 56 dias, cujos animais se alimentaram de ração contendo os pesticidas nas doses NOEL e LOEL em mistura deles, e na dose LOEL, com os pesticidas individualmente. Estas doses estão discriminadas e definidas detalhadamente no Anexo II. Ao final do tratamento, a quantidade média diária de ração consumida por animal foi de 17,9 g.



Figura 8 – Animais utilizados no experimento (ratos isogênicos machos da linhagem Lewis) e gaiolas para acomodação dos animais.

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 foi sacrificado e os dados de necropsia registrados.

Os animais foram sacrificados ao final da 8ª semana por exsanguinação após narcose induzida em câmara de CO₂.

O tecido adiposo (Figura 9), matriz alvo deste estudo, assim como o cérebro e o fígado foram coletados, envoltos em papel alumínio, devidamente identificados e congelados imediatamente em *freezer* a -18°C. A massa de tecido adiposo variou de 0,5 a 2,5 g, sendo elas das regiões perirenal, subcutânea e peritoneal, na qual esta última apresentou a menor massa em todos os animais.



Figura 9 – Amostras de tecido adiposo subcutâneo, peritoneal e perirenal.

6.2.5. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram otimizadas baseando-se nos trabalhos mostrados Tabela 2 e os parâmetros discriminados na Tabela 3. Os estudos iniciais de otimização das condições cromatográficas e início da otimização do método de tratamento da amostra foram efetuados no sistema Varian 3300 e o restante do trabalho no Varian 3800.

Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas na análise dos pesticidas de interesse por GC/ECD

Condições	Varian 3300	Varian 3800
Coluna cromatográfica	ZB-5 (Zebron)	VF-5MS (Varian)
Programação de aquecimento do forno	200°C (4 min), taxa de aquecimento de 5°C min ⁻¹ → 280°C (6 min)	
Temperatura do injetor	250 °C	
Volume injetado/ modo de injeção	1µL / splitless (manual)	
Gas de arraste e <i>makeup</i>	Nitrogênio	
Vazão gás de arraste	1,0 mL min ⁻¹	
Vazão <i>makeup</i>	32 mL.min ⁻¹	
Temperatura do detector	300 °C	

Quanto às condições de operação do GC/MS (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; 15µA de corrente de

emissão; 70-420 m/z de *scanned-mass-range*; a programação de aquecimento coluna foi 90° por 3 min, a 20°C min⁻¹ até 230°C e a 5°C min⁻¹ até 280°C permanecendo por 8 min nesta temperatura.; volume de injeção de 1µL; modo de injeção split (10:1); vazão do gás de arraste (He) 1,0 mL min⁻¹.

6.2.6. Preparo das soluções dos padrões

A solução estoque de cada padrão de pesticida foi preparada em isooctano na concentração de 100 mg L⁻¹. A partir desta, foram preparadas soluções intermediárias na concentração de 10 mg L⁻¹. As soluções mistas dos compostos (dicofol, endosulfan, dieldrin e permetrina) foram preparadas por diluição das soluções intermediárias na concentração de 1 mg L⁻¹. As soluções de trabalho, utilizadas para construção das curvas analíticas, foram preparadas a partir das soluções mistas. As soluções estoque, intermediária e mista foram armazenadas em frascos âmbar, vedadas com *parafilm* e matindas à -18°C por um período de 6, 3 e 2 meses respectivamente.

6.2.7. Determinação da linearidade do detector (GC/ECD, Varian 3800) e construção das curvas analíticas

Nove diferentes soluções de padrões mistas dos pesticidas (endosulfan, dieldrin, dicofol e permetrina) com concentrações entre 2 e 1200 pg µL⁻¹ foram injetadas no mínimo duas vezes. Gráficos para avaliar a linearidade foram construídos para cada composto, relacionando-se o valor de concentração da solução no eixo das abcissas com a área do pico cromatográfico, correspondente ao sinal do ECD, dividida pela respectiva concentração daquela área, no eixo das ordenadas.

As curvas analíticas (área do analito versus concentração) foram construídas, utilizando no mínimo cinco soluções diferentes para cada pesticida, respeitando a linearidade da resposta do detector. As injeções foram realizadas em ordem crescente de concentração e em triplicata.

Os pesticidas foram identificados segundo os tempos de retenção obtidos pela análise da solução de cada padrão individual.

6.2.8. Determinação dos limites de detecção (LDe) e quantificação (LQe) do equipamento (GC/ECD, Varian 3800)

Foi aplicado o método da relação sinal-ruído, já que o software, que controla o cromatógrafo gasoso (Star Varian e Galaxie Varian), possuem um sistema que mostra o ruído da linha de base gerado pelo detector de captura de elétrons. A relação sinal-ruído utilizada para o limite de detecção foi de 3:1 e para o limite de quantificação 10:1 (ICH apud BRITO et al., 2003).

6.2.9. Preparo inicial das amostras de tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo foram recebidas no Laboratório do IQ/UNESP envoltas em papel alumínio, sendo que as amostras de cada indivíduo estavam separadas e identificadas nas diferentes porções de tecido adiposo: perirenal, subcutânea e peritoneal.

As amostras foram retiradas do *freezer*, abertas sobre placas de Petri e homogeneizadas por fragmentação utilizando espátula e lâmina cortante de inox. Todo o procedimento foi efetuado rapidamente, para evitar o derretimento e, após a homogeneização, envoltas novamente em papel alumínio e retornadas ao *freezer* à -18°C. A figura 10 ilustra o aspecto das amostras antes e após a homogeneização.

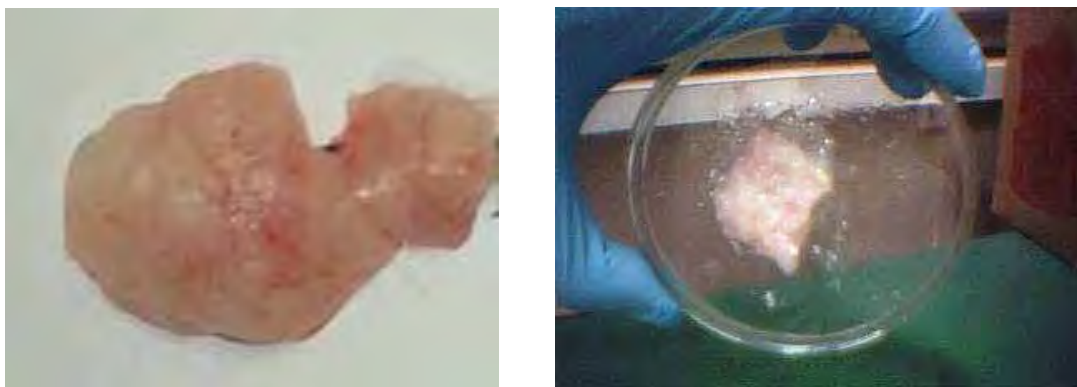
AntesApós

Figura 10 – Amostras de tecido adiposo de ratos antes e após a homogeneização

Essa etapa é de grande importância pois ajuda a diminuir a variabilidade biológica, obtendo-se cromatogramas com perfis similares para diferentes amostras de tecido adiposo, além de ser uma porção mais significativa do todo.

6.2.10. Otimização do método para determinação de resíduos dos pesticidas dicofol, dieldrin, endosulfan e permetrina em tecido adiposo de ratos

Quando se utiliza solventes ou mistura deles, como por exemplo, acetona:hexano em etapas de extração tipo sólido-líquido, elevada quantidade de lipídios podem ser co-extraídas e adsorverem nas colunas capilares, no sistema de injeção, contaminando o *liner* do injetor, além de danificar o detector, durante a análise por cromatografia gasosa. Por isso, normalmente, inúmeros procedimentos de *cleanup* são utilizados para remover o material lipídico, porém envolvem muitas etapas experimentais e são demasiadamente longos.

Em muitos casos, a eliminação efetiva dos lipídios pode ser realizada por saponificação. Entretanto, muitos dos pesticidas organoclorados sofrem degradação durante as etapas de hidrólise básica ou ácida. Segundo Tunistra apud Hong et al. (2004), em torno de 40% dos compostos α -endosulfan e β -endosulfan perdem o grupo sulfato quando na hidrólise ácida. O pesticida dieldrin também é significativamente degradado, podendo dar origem a compostos desclorados quando em condições ácidas. Além destes pesticidas,

outros organoclorados são lentamente hidrolizados em condições básicas. Portanto, as etapas que envolvem tratamento ácido ou básico devem ser evitadas quando se trabalha com análise multirresíduo.

Por isso, outros métodos de purificação de extratos lipídicos devem ser estudados a fim de diminuir o número de etapas experimentais, relacionadas basicamente aos *cleanup* e, também, evitar os ensaios que utilizam reações químicas com ácidos ou bases, devido alguns compostos serem susceptíveis à degradação. Nesse sentido, foram testados diferentes métodos de extração explicitados a seguir:

Teste Preliminar I: trata-se de um método de extração modificado baseado no estudo de Hong et al. (2004), que também trabalhou com matriz lipídica (ilustração Figura 11).

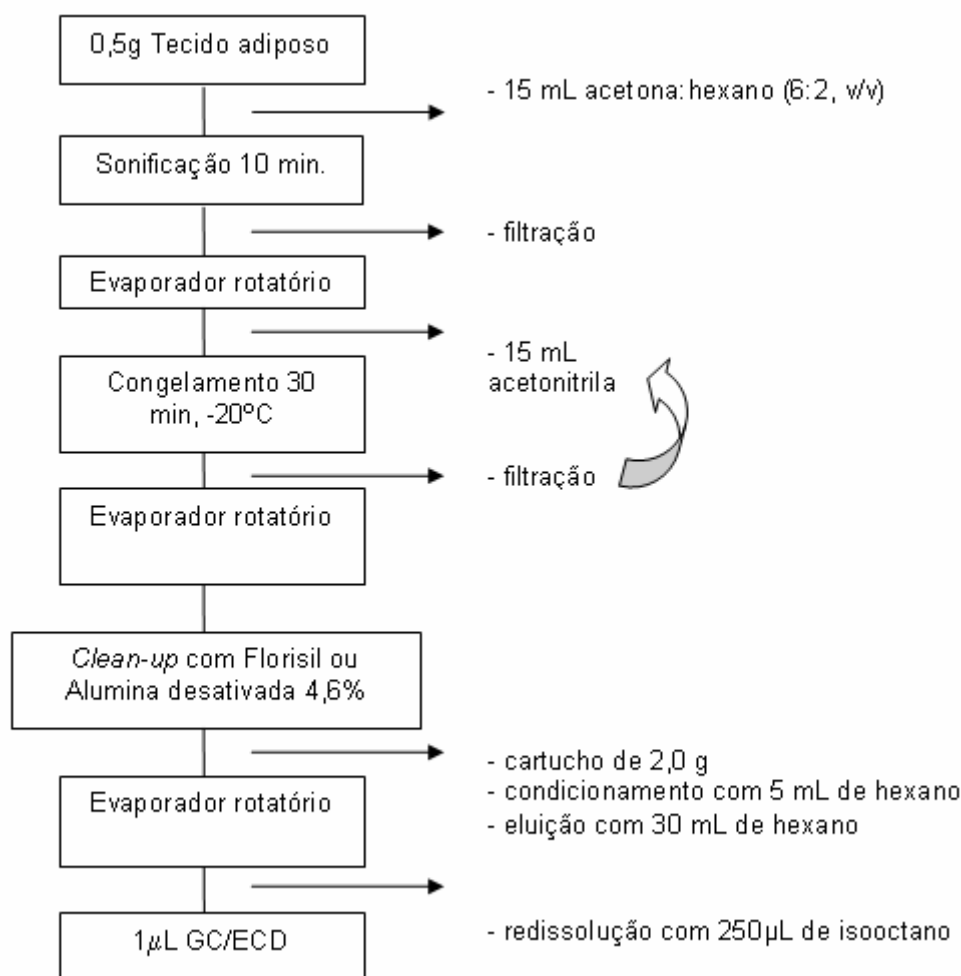


Figura 11 – Fluxograma do teste preliminar I para extração das amostras de tecido adiposo

Teste Preliminar II: método de extração modificado baseado em Nardelli, Palermo e Centonze (2004) e Criado et al. (2004), cujas amostras apresentam elevado teor de lipídios como peixe, gordura bovina e de aves. O procedimento é mais rápido quando comparado aos mostrados na revisão bibliográfica desta dissertação e está ilustrado na Figura 12.

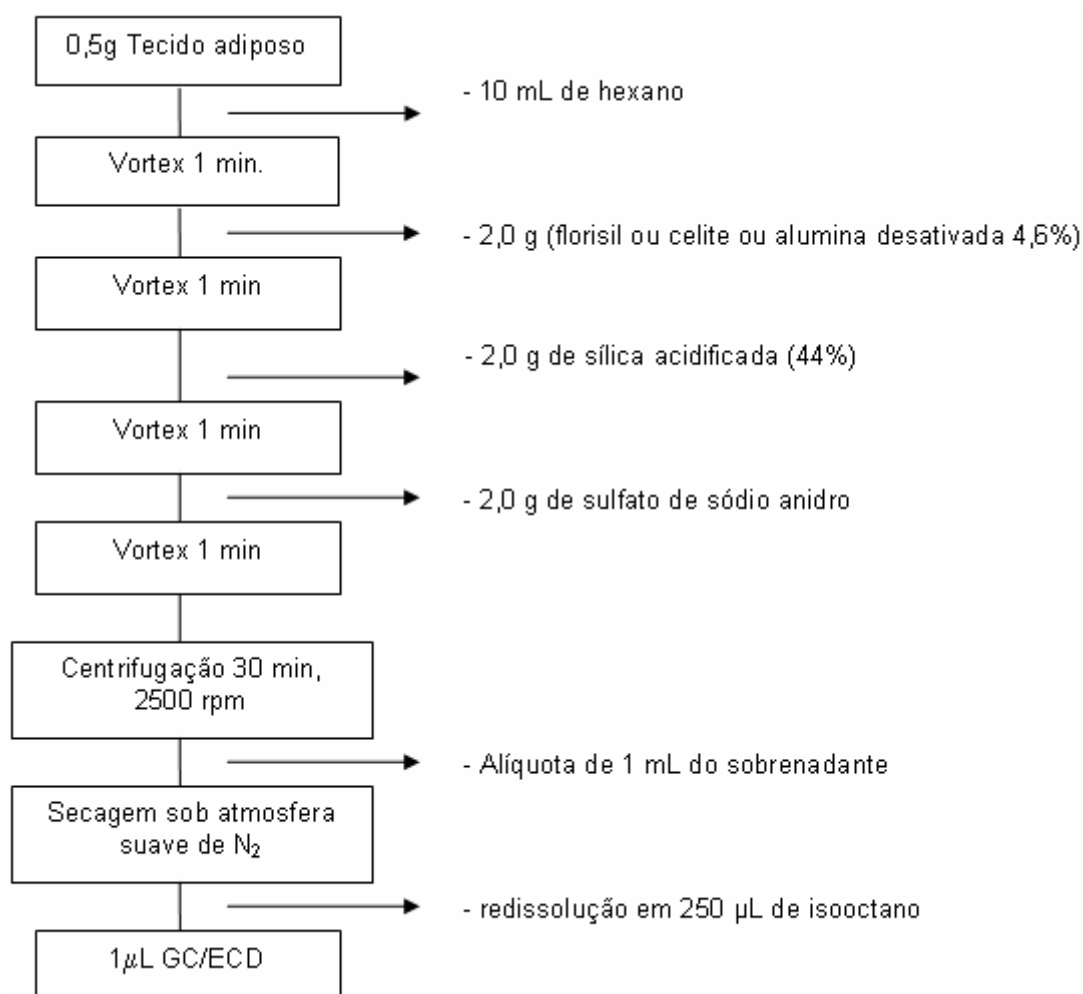


Figura 12 – Fluxograma do teste preliminar II para extração das amostras de tecido adiposo

Nas etapas de agitação do extrato utilizando vortex foram testados florissil, alumina e celite separadamente, seguida de sílica acidificada. O sulfato de sódio foi adicionado para remover traços de água presentes na sílica acidificada, já que seu preparo foi realizado com solução de ácido sulfúrico concentrado. A utilização desta sílica ácida foi destacada por Criado et al. (2004) na oxidação de material lipídico em amostras de gordura animal.

Método proposto

Trata-se de um método de extração modificado baseado em dois trabalhos citados na Tabela 2 (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2008; CHEN et al., 2007), cujo procedimento é mais rápido quando comparado aos demais apresentados nesta mesma tabela. Estes estudos também englobam matrizes com alto teor de lipídios como gordura de peixe e tecido adiposo humano. O procedimento está ilustrado na Figura 13.

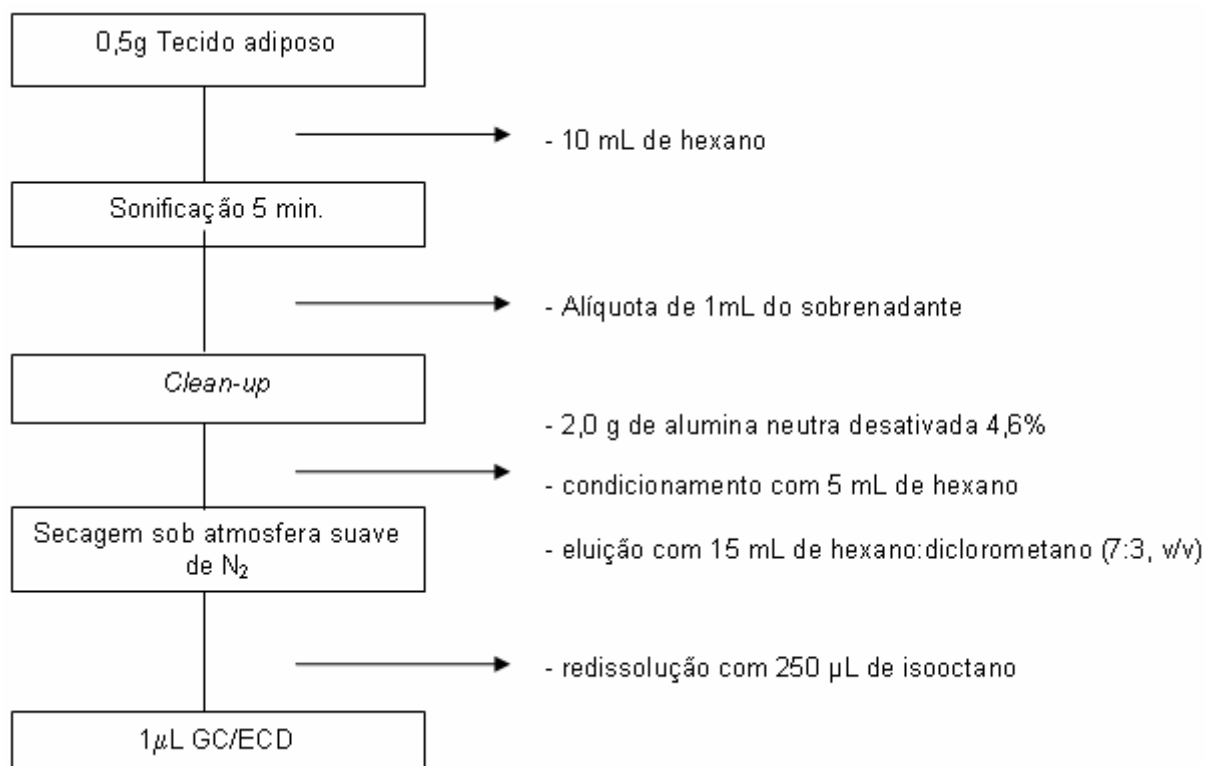


Figura 13 – Fluxograma do procedimento de extração proposto para determinação de resíduo de pesticidas em amostras de tecido adiposo de ratos.

6.2.11. Estimativa da quantidade de lipídios extraíveis das amostras de tecido adiposo de ratos.

A determinação de lipídios foi realizada utilizando método gravimétrico, baseado no procedimento proposto por Alonso (2008). Foi retirada uma alíquota de 0,1 mL do extrato hexânico do método proposto no item 6.2.10 (Figura 13) e colocada em um pequeno frasco de vidro, previamente pesado. Após a total evaporação do solvente, o frasco foi novamente

pesado e a diferença entre as pesagens inicial e final foram utilizadas para calcular a porcentagem de lipídios, conforme a equação a seguir:

$$\%lipídios = \frac{\text{massa resíduo (g)} \times \text{volume total do extrato (ml)}}{\text{massa amostra (g)} \times \text{vol. da alíquota (ml)}} \times 100$$

6.2.12 Avaliação do método proposto (estudo de recuperação)

Em análise de resíduos de pesticidas, a validação do método analítico é realizada, usualmente, por meio de ensaios de recuperação, uma vez que esse procedimento gera informações necessárias para avaliação do procedimento como exatidão e precisão. A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência e a precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). Esses dois itens foram determinados utilizando os valores da porcentagem de recuperação e do coeficiente de variação do método.

Para o estudo de recuperação, as amostras testemunhas, provenientes de animais que não ingeriram ração contendo pesticidas, foram fortificadas com soluções de mistura dos compostos dieldrin, endosulfan, dicofol e permetrina em três diferentes concentrações 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 3 horas, assim como realizado em estudos similares (FERRER et al., 2005; YAGUE et al., 2005; GARCINUNO et al., 2004; CRIADO et al., 2004; KRISTENSON et al., 2004). A Tabela 4 apresenta os níveis de fortificação avaliados.

Tabela 4 – Níveis de fortificação das amostras testemunhas de tecido adiposo de ratos

Pesticidas	Nível 1 (mg kg ⁻¹)	Nível 2 (mg kg ⁻¹)	Nível 3 (mg kg ⁻¹)
Dicofol	0,5	1,0	5,0
Dieldrin	0,05	0,1	0,5
Endosulfan	0,05	0,1	0,5
Permetrina	0,5	1,0	5,0

6.2.13. Avaliação de efeito de matriz

O efeito de matriz ou efeito da resposta cromatográfica induzida pela matriz pode causar um aumento ou diminuição da resposta cromatográfica de um analito quando presente no extrato da amostra comparada ao mesmo analito em um determinado solvente. Esse fenômeno foi investigado para os todos os pesticidas estudados nas amostras testemunhas de tecido adiposo de ratos. O efeito de matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na matriz com os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em solvente, de acordo com Thompson, Ellison e Wood (2002). O cálculo para avaliar essa diferença foi efetuado utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ efeito de matriz} = \frac{X1 - X2}{X2} \times 100$$

Sendo:

- X1 o coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz e,
- X2 o coeficiente angular da curva analítica preparada em solvente.

Dessa forma, é verificado se a matriz exerce efeito positivo (aumento da sensibilidade) ou negativo (decréscimo da sensibilidade) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10%, considera-se que existe o efeito de matriz, podendo influenciar nos dados analíticos quantitativos da amostra.

6.2.14. Determinação dos limites de detecção (LDm) e quantificação (LQm) do método

De acordo com Thier e Zeumer (1987), em análise de resíduos de pesticidas, o limite de quantificação do método é definido como o menor valor de concentração da substância estudada, que ao ser fortificada na matriz, apresenta valores de recuperação entre 70 e 120%, com coeficiente de variação menor que 20% e valor maior ou igual ao LDm. O limite de detecção do método pode ser estimado utilizando os resultados obtidos para o menor nível de recuperação conforme as equações a seguir:

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times s_{com}}{S} \quad s_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)s_A^2 + (n-1)s_B^2}{m+n-2}}$$

Sendo:

- $t_{n,95\%}$ o valor tabelado em função do número de análises;
- s_{com} a estimativa do desvio padrão combinado;
- S a sensibilidade do equipamento para o analito;
- m o número de determinações do menor nível de fortificação;
- n o número de determinações do branco;
- s_a a estimativa do desvio padrão no menor nível de fortificação;
- s_b a estimativa do desvio padrão do branco.

Esse procedimento é o mais adequado para obtenção do limite de detecção do método, pois corrige variações do branco e da amostra no menor nível de fortificação, como por exemplo, impurezas de solventes e reagentes, ruídos do instrumento e resíduos co-extraídos. Além disso, reproduz as mesmas condições que o analito está sujeito durante a análise.

6.2.15. Aplicação do método proposto às amostras de tecido adiposo de ratos

Foram analisadas as amostras de tecido adiposo peritoneal dos ratos pertencentes aos grupos G2 e G3, referente aos animais que se alimentaram da ração que contém

mistura dos quatro pesticidas (permetrina, dicofol, dieldrin e endosulfan) nas doses NOEL e LOEL, respectivamente. Além destas, o método foi aplicado às amostras dos grupos G4, G5, G6 e G7, cujos animais se alimentaram da ração contendo os pesticidas dicofol, permetrina, dieldrin e endosulfan, individualmente e na dose LOEL, respectivamente. As concentrações dos pesticidas na ração oferecida a estes grupos de animais estão explicitadas no Anexo II.

A concentração dos pesticidas (em $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$), quando presentes nas amostras, foi obtida interpolando o valor da área cromatográfica nas equações das curvas analíticas de cada composto, preparadas na matriz. Em seguida, foram efetuados os cálculos necessários, provenientes do método proposto para determinar a concentração em nanograma de pesticida por grama de tecido adiposo (ng g^{-1}).

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1. Condições cromatográficas

A primeira etapa do estudo foi desenvolver um método cromatográfico para separação dos compostos selecionados. A otimização das condições de análise no GC/ECD foi baseada em trabalhos da literatura, citados na Tabela 2, que apresentam pesticidas e matrizes comuns a este estudo.

Soluções contendo os quatro padrões de pesticidas dicofol, dieldrin, endosulfan e permetrina foram preparadas e analisadas por GC/ECD, cujo sistema de detecção é altamente sensível a moléculas que possuem átomos de cloro em sua estrutura. O tempo total de análise foi de 26 minutos com boa resolução cromatográfica, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 14.

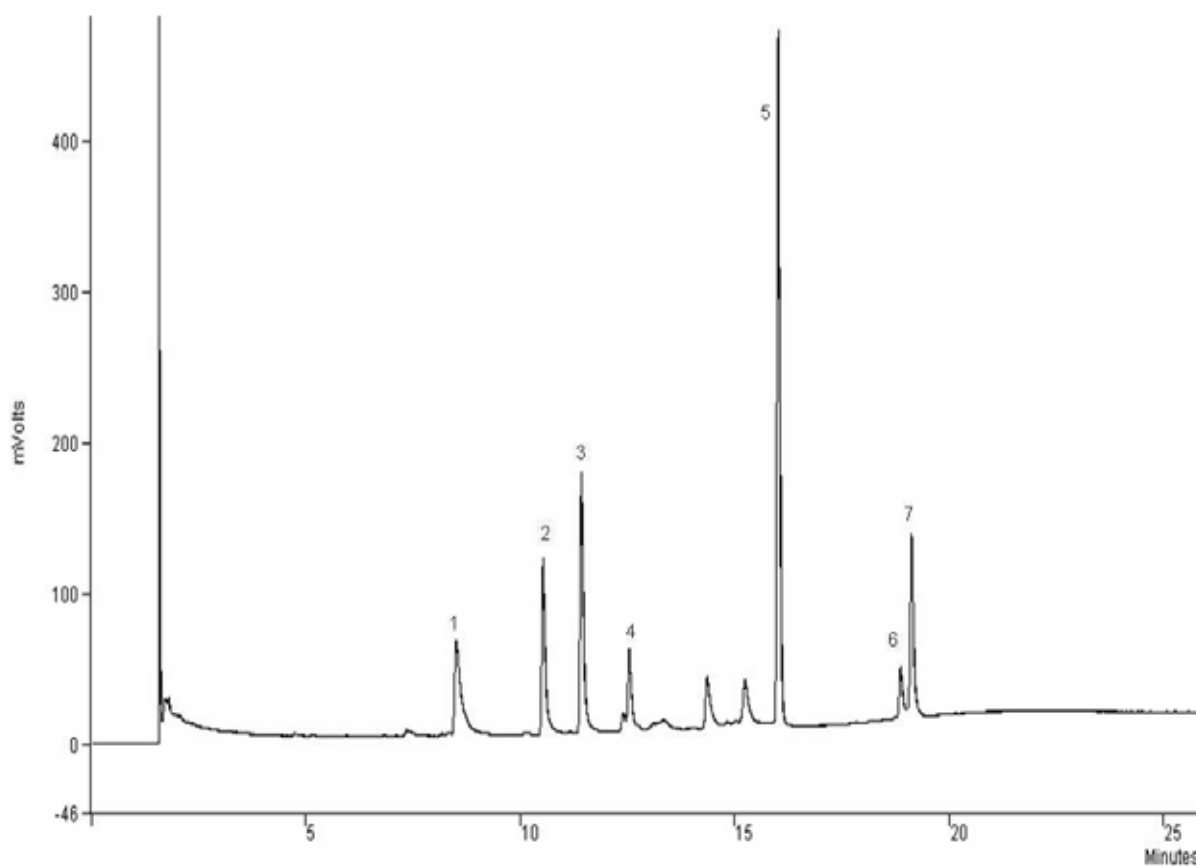


Figura 14 – Cromatograma (GC/ECD, Varian 3800) dos pesticidas: (1) dicofol I $650 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, (2) α -endosulfan $65 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, (3) dieldrin $65 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, (4) β -endosulfan $65 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, (5) dicofol II $650 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, (6) cis-permetrina $650 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ e (7) trans-permetrina $650 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$.

Os picos observados entre os compostos 4 e 5 (Figura 14) são referentes as impurezas do dicofol (96,5%) originados de sua síntese, podendo ser resíduos de DDT, DDE e DDD, e também diclorobenzofenona, principal metabólito deste composto (TOMLIN, 2004; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009c). O importante salientar é que esses picos não co-eluem com os picos 1 e 5 dos isômeros do dicofol. E a identidade destes compostos foi confirmada quando analisados pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), pois ambos apresentaram o mesmo espectro de massa, apresentados no Anexo III.

A Tabela 5 apresenta os tempos de retenção dos pesticidas estudados por GC/ECD (Varian 3800). Esses valores correspondem à média de três injeções da mistura contendo os pesticidas.

Tabela 5 – Tempos de retenção e desvio padrão dos pesticidas estudados

Pesticidas	t _R (min.)	DP
Dicofol I	8,48	0,01
α-endosulfan	10,50	0,01
Dieldrin	11,39	0,01
β-endosulfan	12,51	0,01
Dicofol II	15,98	0,01
cis-permetrina	18,83	0,01
trans-permetrina	19,092	0,004

t_R: tempo de retenção; DP: estimativa do desvio padrão

Os valores da estimativa do desvio padrão demonstram que os tempos de retenção foram repetitivos, indicando uma boa precisão instrumental das injeções nas mesmas condições de operação, sob um curto espaço de tempo. Além disso, a variação percentual das áreas cromatográficas, para replicatas de solução, não foi maior que 8% para todos os pesticidas estudados, nas concentrações analisadas.

O modo de injeção utilizado no GC/ECD foi o splitless. Nesse modo, a válvula split permanece fechada durante o período de injeção, resultando em maior resposta do detector, pois maior quantidade do analito entra na coluna.

7.2. Linearidade da resposta do detector (GC/ECD, Varian 3800)

Linearidade é região do sistema de detecção no qual o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração. Para determinar a região linear do detector para o endosulfan, dieldrin, dicofol e permetrina construíram-se gráficos conforme está descrito no item 6.2.7.

A Figura 15 apresenta os gráficos de linearidade de resposta do detector de captura de elétrons para o dieldrin e endosulfan na faixa de trabalho de 2 – 120 pg μL^{-1} e para a permetrina e dicofol no intervalo de 80 – 1200 pg μL^{-1} .

Para avaliação da região linear, foi utilizado o teste de Huber para excluir pontos anômalos (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO, 2009). Dessa forma, a faixa de trabalho para o dicofol, cis e trans-permetrina situou-se entre 80 e 1200 pg μL^{-1} , enquanto para o α e β -endosulfan e dieldrin foi de 5 a 120 pg μL^{-1} , pois o primeiro ponto da curva (concentração de 2 pg μL^{-1}) ficou fora da região linear para esses dois pesticidas.

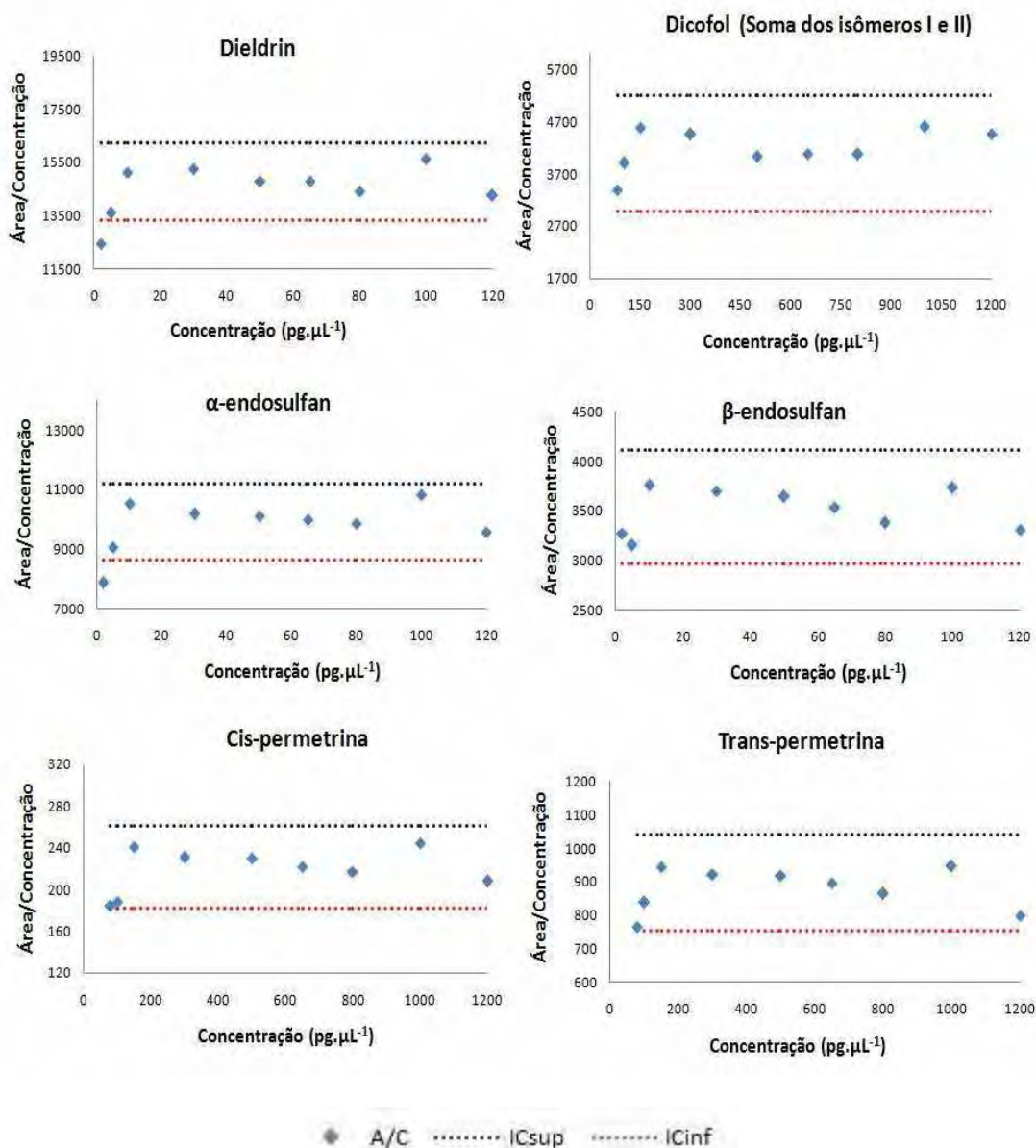


Figura 15 – Curvas de linearidade dos pesticidas obtidas por GC/ECD, Varian 3800

7.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento (GC/ECD, Varian 3800)

A Tabela 6 apresenta os limites de detecção (LDe) e quantificação (LQe) do equipamento, calculados utilizando o método descrito no item 6.2.8.

Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação do equipamento GC/ECD (Varian 3800) para os pesticidas estudados

Pesticidas	LDe (pg μL^{-1})	LQe (pg μL^{-1})
Dicofol I	11,3	37,5
α -endosulfan	0,4	1,2
Dieldrin	0,2	0,7
β -endosulfan	0,6	1,9
Dicofol II	3,6	12,0
Cis-permetrina	6,7	22,2
Trans-permetrina	4,6	15,4

7.4. Resultados do teor de lipídios e preparo das amostras de tecido adiposo

O teor de lipídios encontrado nas amostras de tecido adiposo de ratos foi em média de 90%. Este valor é expressivo quando comparado aos resultados encontrados por Valsamaki et al. (2006), Nardelli, Palermo e Centonze (2004) e Criado et al. (2004), que foram respectivamente 21, 23 e 85%. Esta elevada porcentagem de lipídios presente nas amostras evidencia a complexidade da matriz em estudo e justifica a necessidade de um método de extração eficaz que resulte em um bom desempenho cromatográfico e que seja seletivo.

7.5. Resultados dos testes preliminares de extração

Os testes preliminares I e II foram realizados no GC/ECD, Varian 3300, utilizando um integrador, cujo os registros cromatográficos são impressos em papel termosensível, o que de certa forma diminui a qualidade e nitidez das imagens dos cromatogramas apresentados a seguir (Figuras 16 e 17).

Teste Preliminar I

Essa primeira tentativa resultou em uma boa remoção de lipídios: em torno de 47% dessas macromoléculas foram removidas do extrato na etapa de congelamento. O cromatograma apresentou muitos interferentes para o florisil, porém, se mostrou seletivo para alumina (Figura 16).

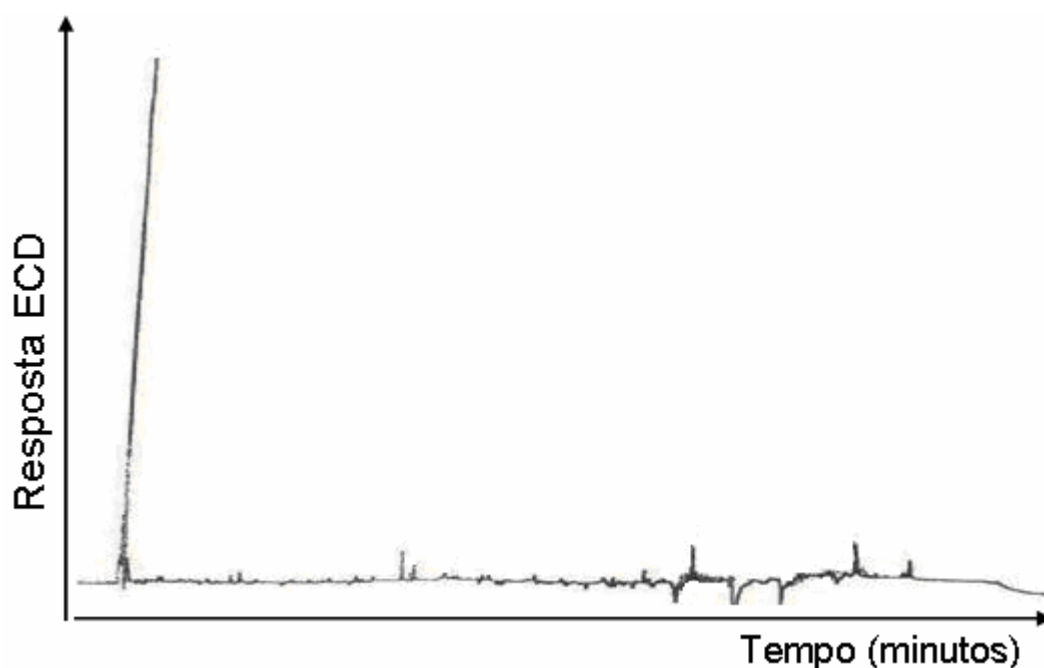


Figura 16 – Cromatograma da amostra testemunha submetida ao tratamento descrito no teste preliminar I, utilizando alumina (GC/ECD, Varian 3300)

Porém, ao realizar os testes de eficiência para este último adsorvente, foram obtidos baixos valores de recuperação (<53%) para todos os pesticidas estudados.

Teste Preliminar II

A remoção de lipídios por este método de extração foi avaliada utilizando dois critérios: a presença de gordura no extrato final pode ser observada visualmente quando este foi resfriado à -20°C, através da turvação da solução. O segundo critério foi a análise dos cromatogramas, observando o número de picos interferentes. A Figura 17 ilustra um desses resultados, e a menor presença de interferentes, quando florisil foi utilizado.

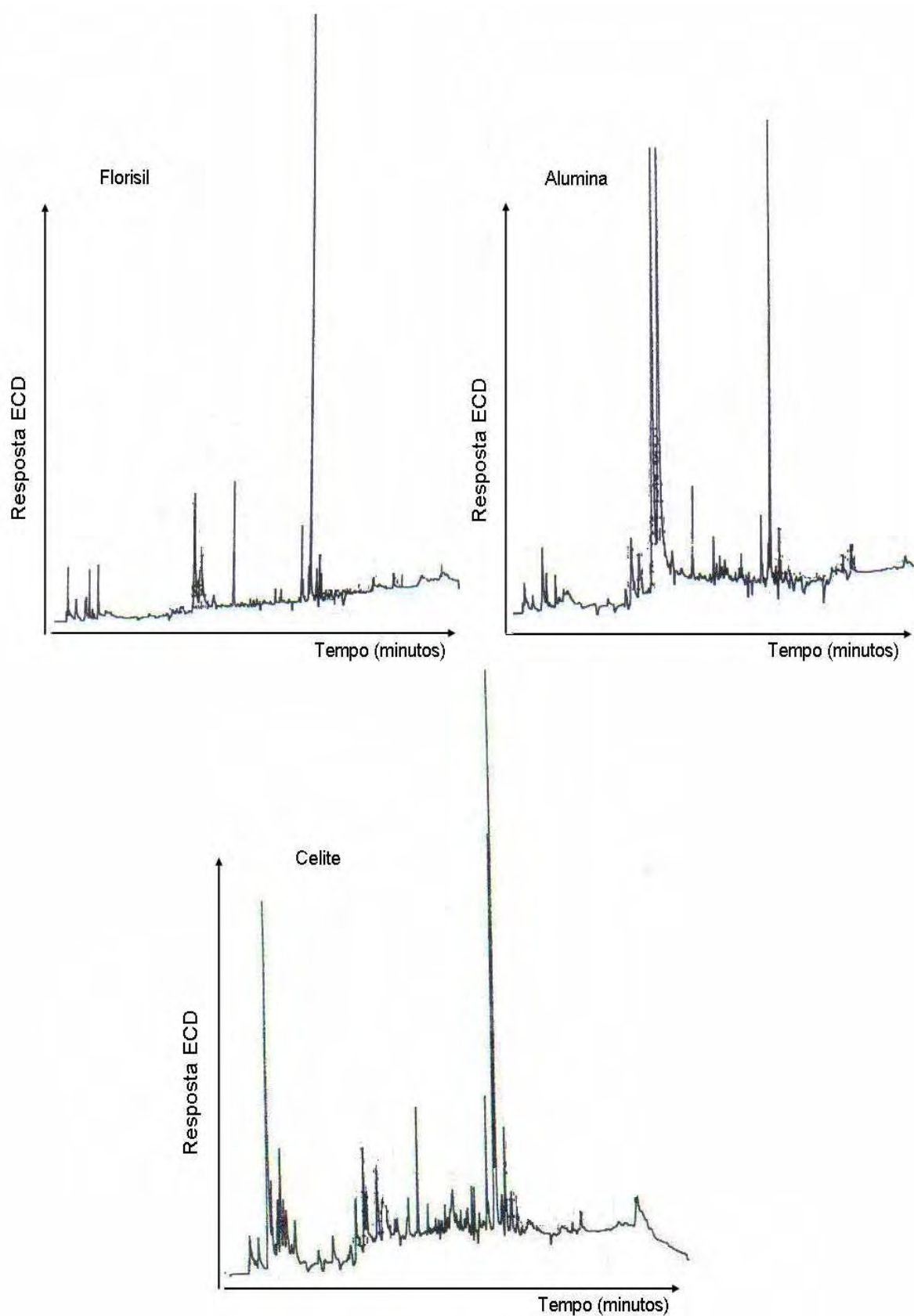


Figura 17 – Cromatogramas das amostras testemunhas submetidas ao tratamento descrito no teste preliminar II, utilizando florisil, alumina e celite (GC/ECD, Varian 3300).

Devido a melhor remoção de lipídios com florisil, observado na Figura 17, foram realizados os ensaios de recuperação do método utilizando este adsorvente. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios, pois todos pesticidas apresentaram baixa recuperação (<5%). Por outro lado, utilizando-se alumina, ocorreu um aumento da recuperação, mas ainda insignificante (<15%). O estudo de recuperação utilizando celite se mostrou inviável, visto o elevado número de interferentes.

Para avaliar em qual etapa estaria ocorrendo as perdas do analito, optou-se por trabalhar apenas com os adsorventes (florisil e alumina) aplicando este método, até porque não existia massa suficiente de tecido adiposo para realização de muitos ensaios.

Primeiramente, trocou-se o solvente de extração por uma mistura de hexano:diclorometano (9:1, v/v). Houve um ligeiro aumento na recuperação de alguns pesticidas no método com florisil e um bom resultado (até 40%) quando se trabalhou com alumina. Porém, para o pesticida dicofol não houve recuperação. Aumentando a porcentagem de diclorometano na mistura de solventes (hexano:diclorometano, 7:3, v/v), ocorreu um aumento da recuperação, principalmente utilizando alumina como adsorvente. Porém, aumentou também a quantidade de gordura no extrato final, impossibilitando a continuação dos testes. O pesticida dicofol apresentou boa recuperação (>50%) quando foi utilizado acetato de etila como solvente de extração, exceto os demais. Porém, com este solvente elevada quantidade de lipídios foi extraída, observada pelo aumento de picos nos cromatogramas e através da turvação da solução quando o extrato foi resfriado à -20°C.

Com estes testes foi possível concluir que com o aumento da polaridade dos solventes de extração, há um aumento da porcentagem de recuperação. Porém, eleva-se também a quantidade de lipídios extraída, o que inviabiliza sua aplicação. Portanto, tentou-se um terceiro procedimento para extração das amostras de tecido adiposo e os resultados estão disctuidos a seguir (item 7.6).

7.6. Método proposto: determinação de resíduos dos pesticidas organolcorados dicofol, dieldrin e endosulfan e do piretróide permetrina em amostras de tecido adiposo de ratos

Este procedimento foi baseado nos trabalhos de Lopez-Espinosa et al (2008) e Chen et al (2007), cujas matrizes estudadas possuem elevado conteúdo lipídico, tais como tecido adiposo humano e gordura de peixe. É mais simples e rápido do que aqueles descritos na literatura (Tabela 2) para matrizes ricas em lipídios.

Branco do Método

O cromatograma apresentado na Figura 18, referente ao branco do método (reagentes e solventes, com exceção da amostra) indica que não existem picos interferentes nos tempos de retenção dos pesticidas estudados, estando adequado as análises.

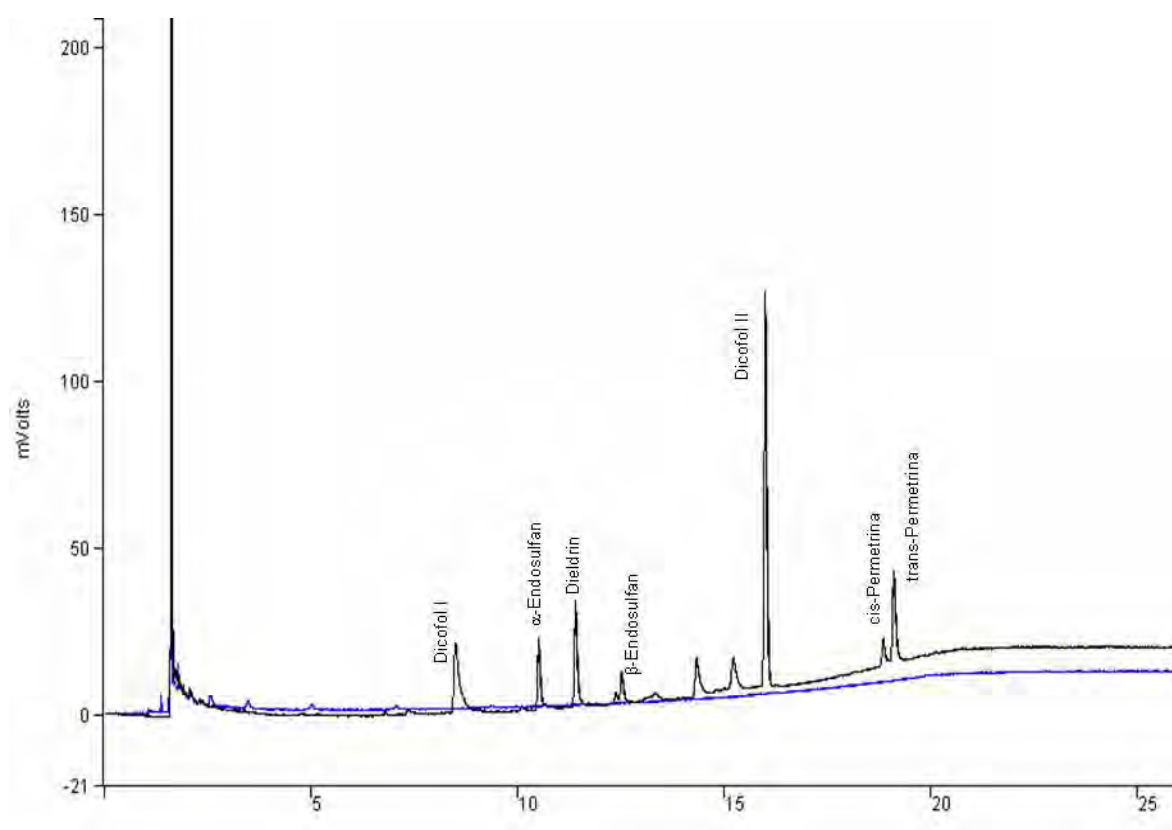


Figura 18 – Cromatogramas sobrepostos (GC/ECD, Varian 3800) referente ao branco do método e mistura dos pesticidas dicofol I ($100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), α -Endosulfan ($10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), dieldrin ($10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), β -Endosulfan ($10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), dicofol II ($100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), cis-Permetrina ($100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$) e trans-Permetrina ($100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$).

Avaliação da Amostra Testemunha

O método proposto (Figura 13, item 6.2.10), envolve uma etapa de extração com pequeno volume de hexano e outra de *cleanup*, utilizando uma alíquota do extrato, etapa que permitiu um bom desempenho quanto à remoção de lipídios. O cromatograma da Figura 19 ilustra esse resultado.

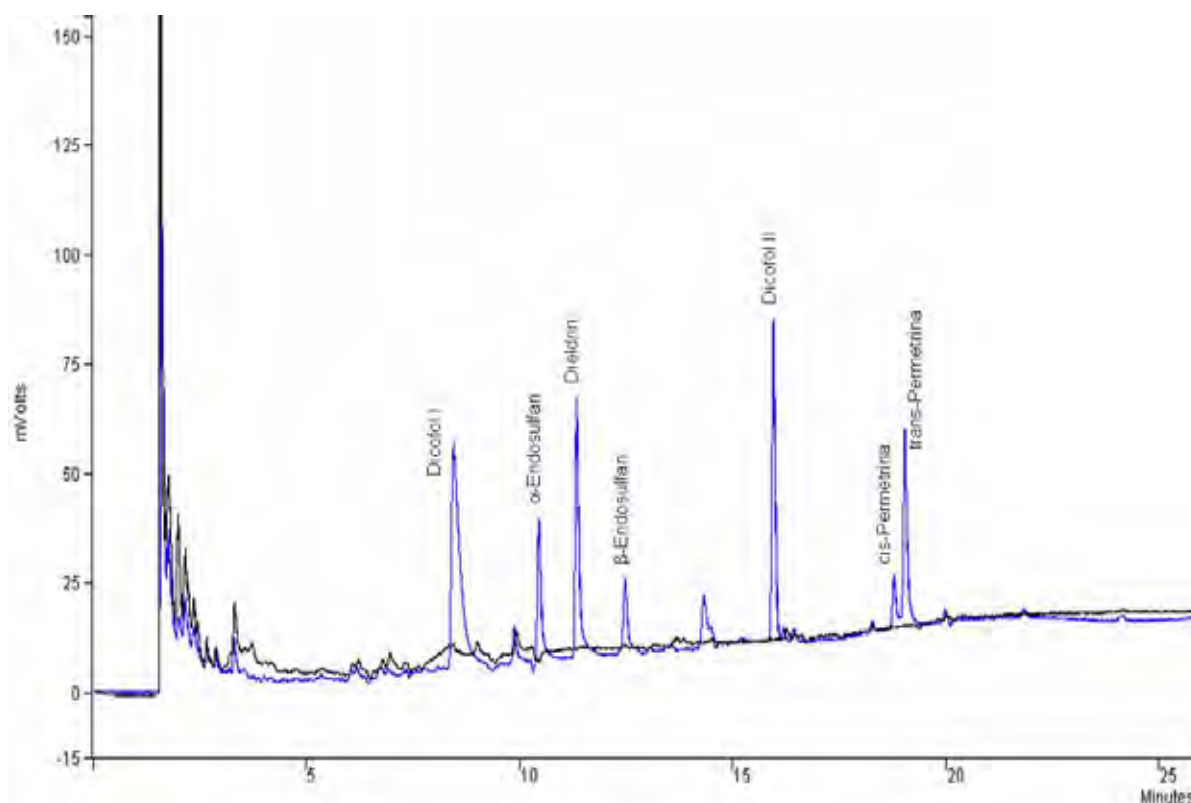


Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos (GC/ECD, Varian 3800) referente à amostra testemunha obtida pelo método proposto e uma mistura dos pesticidas dicofol I (400 pg μL^{-1}), α -Endosulfan (40 pg μL^{-1}), dieldrin (40 pg μL^{-1}), β -Endosulfan (40 pg μL^{-1}), dicofol II (400 pg μL^{-1}), cis-Permetrina (400 pg μL^{-1}) e trans-Permetrina (400 pg μL^{-1}) preparada no extrato da amostra testemunha.

O cromatograma da amostra testemunha (Figura 19) mostra que o método é seletivo, pois não apresenta picos interferentes nos tempos de retenção dos pesticidas estudados, evidenciando, também, a boa remoção de lipídios do extrato do tecido adiposo.

O solvente de eluição utilizado na etapa de *cleanup* foi hexano:diclorometano (7:3, v/v) e como adsorvente a alumina, visto que essa combinação apresentou bons resultados de recuperação. Um fator importante na etapa de purificação é a otimização da vazão e do

volume de solvente de eluição. Os melhores valores de recuperação dos pesticidas foram obtidos utilizando 15 mL de eluente à 5 mL min⁻¹.

Curvas Analíticas (GC/ECD, Varian 3800)

As curvas analíticas preparadas em isooctano e na matriz foram construídas para todos os pesticidas na região linear determinada no item 7.2 (80 a 1200 pg µL⁻¹ para permetrina e dicofol e de 5 a 120 pg µL⁻¹ para o dieldrin e endosulfan). A Tabela 7 apresenta as equações das curvas analíticas ($y = bx + a$) e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2). Bons coeficientes de correlação foram obtidos para os pesticidas analisados e estão de acordo com a literatura (ANVISA apud RIBANI et al., 2004,).

Tabela 7 – Equações das curvas analíticas dos pesticidas e respectivos coeficientes de correlação (GC/ECD, Varian 3800).

Pesticidas	Curva analítica em isooctano*	R^2	Curva analítica em tecido adiposo**	R^2
Dicofol	$y = 4471 x - 90312$	0,993	$y = 2852 x - 13898$	0,997
α-endosulfan	$y = 9585 x + 13400$	0,998	$y = 5638 x - 12466$	0,997
Dieldrin	$y = 14691 x + 5066$	0,995	$y = 8563 x + 7422$	0,998
β-endosulfan	$y = 3423 x + 5212$	0,991	$y = 2519 x - 1312$	0,998
Cis-permetrina	$y = 210,6 x + 3051$	0,996	$y = 106,9 x + 6402$	0,991
Trans-permetrina	$y = 813 x + 22516$	0,993	$y = 541,2 x + 18039$	0,990

*Sete soluções padrão dos pesticidas

**Cinco soluções padrão dos pesticidas

Efeito de Matriz

Um dos parâmetros de desempenho que deve ser avaliado cuidadosamente, antes dos cálculos da porcentagem de recuperação, para avaliar a exatidão do método, e análise das amostras reais, refere-se ao efeito de matriz ou efeito da resposta cromatográfica induzida pela matriz. Em outras palavras, o efeito de matriz pode causar um aumento ou

diminuição da resposta do detector de um determinado analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico.

Uma das possibilidades para corrigir esse efeito é preparar as curvas analíticas, utilizando o próprio extrato da matriz. Dessa forma, o extrato da amostra testemunha de tecido adiposo de ratos, obtido pelo método de extração proposto (Figura 13, item 6.2.10), foi evaporado sob suave atmosfera de N_2 e, após secar, o resíduo dissolvido em 250 μL da mistura dos pesticidas preparadas em isooctano com concentrações correspondente aos diferentes pontos da curvas analíticas, conforme está ilustrado na Figura 20.

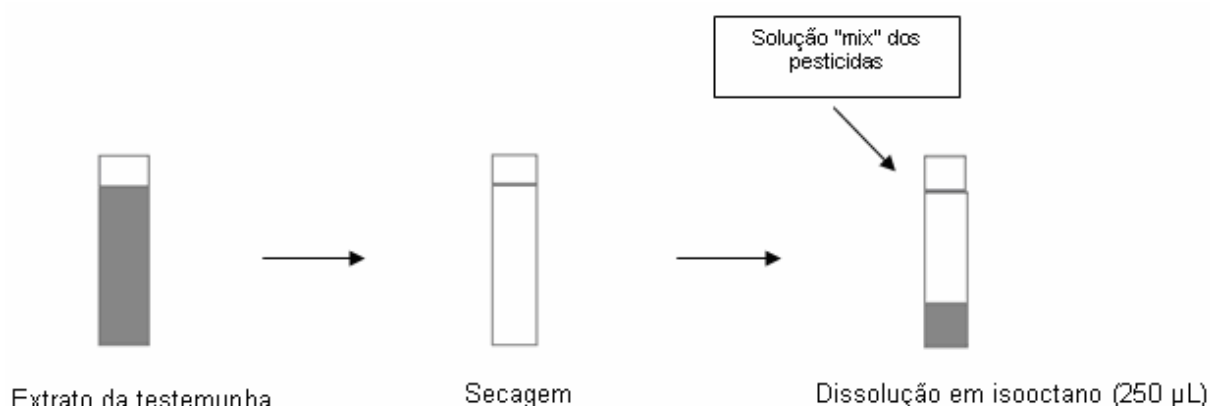


Figura 20 – Procedimento de preparo das soluções dos pesticidas na matriz

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da avaliação do efeito de matriz obtidos comparando-se os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na matriz e em solvente, conforme descrito no item 6.2.13.

Tabela 8 – Resultado do efeito de matriz de tecido adiposo de ratos

Pesticidas	% efeito de matriz
Dicofol	- 36
α -endosulfan	- 41
Dieldrin	- 42
β -endosulfan	- 26
Cis-permetrina	- 49
Trans-permetrina	- 33

O efeito de matriz foi pronunciado para todos os pesticidas estudados, pois a relação entre os coeficientes angulares foi significativa com valores acima dos 10% aceitáveis (THOMPSON; ELLISON; EWOOD, 2002) e a Figura 21 mostra, com clareza, essas diferenças.

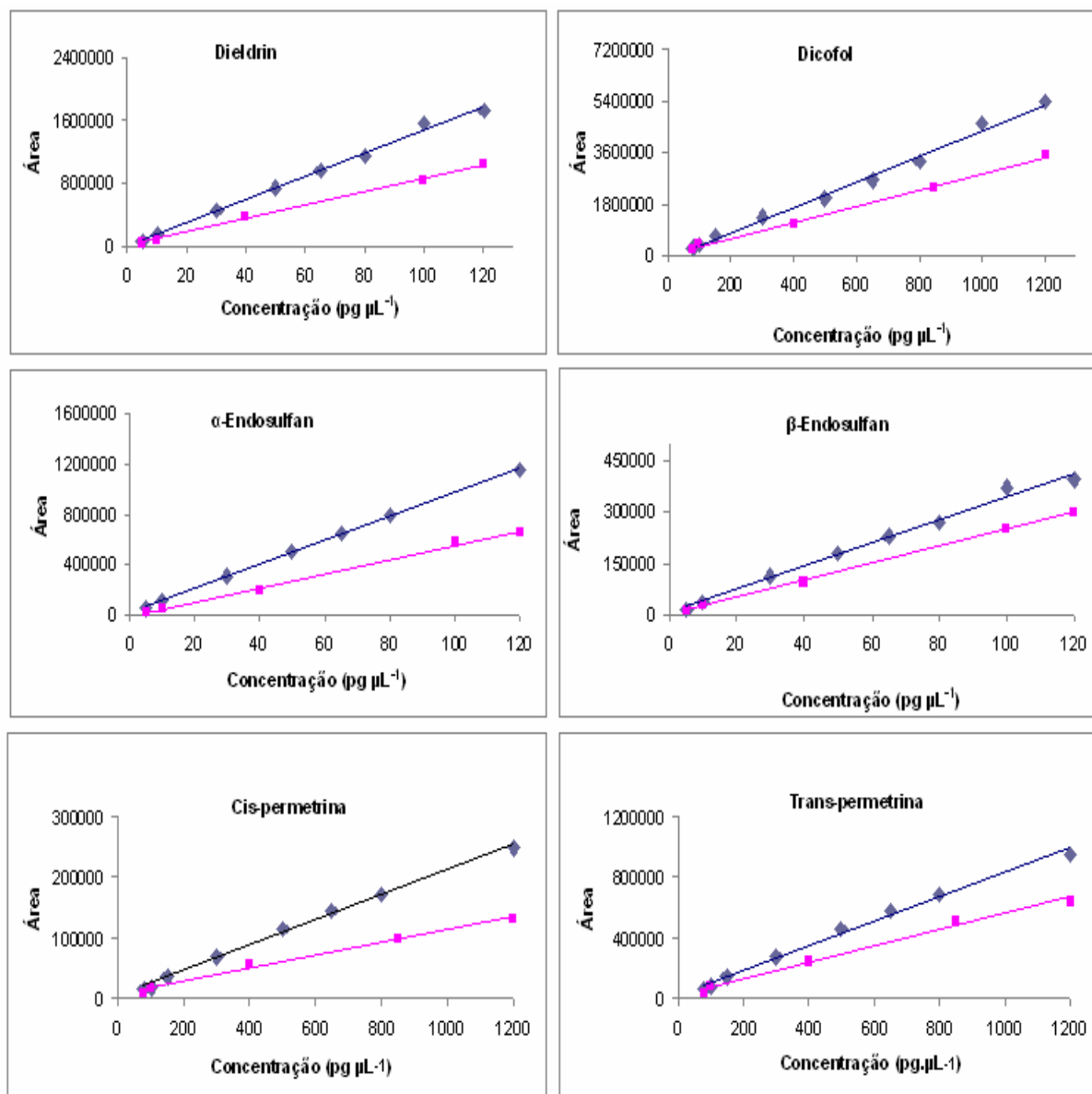


Figura 21 – Curvas analíticas na matriz (destaque em magenta) e em solvente (destaque em azul) para os pesticidas em estudo.

Esse acentuado efeito de matriz pode ser justificado devido à complexidade do tecido adiposo, que é formado basicamente por lipídios. Mesmo com as etapas de

purificação do método proposto (Figura 13, item 6.2.10), certa quantidade destas macromoléculas pode ter sido extraída junto com os pesticidas e, durante a análise por cromatografia gasosa, pode ter atrapalhado a captação das partículas β , emitidas pelo detector (^{63}Ni), pelos analitos de interesse e, conseqüentemente, atenuando a resposta do detector, que foi observada pelos menores coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na matriz comparados aos coeficientes angulares das curvas analíticas em isooctano (Tabela 7 e Figura 21) e pelo sinal negativo para a relação entre eles (Tabela 8).

É de extrema importância salientar que a curva analítica elaborada na matriz corrige os efeitos observados, além de incorporar uma correção nos resultados de recuperação, demonstrando assim um valor mais próximo do real. Portanto, as etapas de quantificação para avaliação da recuperação e aplicação do método às amostras de tecido adiposo foram realizadas utilizando as curvas analíticas preparadas no extrato matriz.

Escolha dos Níveis de Fortificação

Os níveis de fortificação mostrados na Tabela 4 (item 6.2.12) foram escolhidos levando-se em consideração o consumo médio de ração, peso médio e tempo de exposição dos animais aos pesticidas nas doses NOEL e LOEL. Os cálculos a seguir e a Tabela 9 mostram uma estimativa da concentração de pesticidas bioacumulada, utilizando os dados descritos no item 6.2.4 e Anexo II:

Exemplo para o Dieldrin:

1 dia ----- 20 g de ração são consumidas
56 dias ----- x

x = 1120 g de ração são consumidas

Se 3,5 mg de dieldrin estão presentes em 12580 g de ração, então:

3,5 mg ----- 12580 g ração
y ----- 1120 g ração

y = 0,312 mg de dieldrin consumidos durante todo o período de exposição

Portanto, a concentração estimada (C_e) é:

$$C_e = 0,312 \text{ mg dieldrin} / 0,220 \text{ kg (peso do animal)} = 1,42 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ou } 1420 \text{ ppb}$$

Tabela 9 – Estimativa da concentração de pesticidas nos animais

Pesticidas	Dose NOEL (mg kg ⁻¹)	Dose LOEL (mg kg ⁻¹)
Dieldrin	1,42	2,84
Dicofol	12,5	141,6
Endosulfan	3,40	164,3
Permetrina	283,3	1416,4

Foi considerado que o pesticida se distribuiu igualmente por todo o corpo do animal, que não houve excreção ou qualquer tipo de degradação e/ou metabolização. Esses dados são teóricos, mas foram úteis para escolha dos níveis de fortificação mais adequados ao estudo e serviram de subsídios para estimar a quantidade que poderia bioacumular no organismo do animal.

Exatidão e Precisão Obtidos

Para avaliação do exatidão utilizou-se um teste de significância, o teste “t” de Student, de acordo com a seguinte equação (VAN DER VOET apud BRITO et al., 2003):

$$t = \frac{(Rec - 100)}{\frac{S_{Rec}}{\sqrt{n - 1}}}$$

Sendo:

- Rec a média das recuperações para n replicatas;
- 100 a porcentagem de recuperação ideal;
- n o número de ensaios para cada nível;
- S_{Rec} a estimativa do desvio padrão das recuperações

A Tabela 10 apresenta as recuperações percentuais e os coeficientes de variação do método proposto para os pesticidas.

Tabela 10 – Recuperações percentuais e coeficientes de variação dos pesticidas estudados

Pesticidas	Nível de Fortificação (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	CV* (%)	t _{calculado}
Dicofol	0,5	87	18	-1,18
	1,0	76	10	-4,36
	5,0	88	3	-6,50
α - Endosulfan	0,05	92	12	-1,07
	0,1	113	11	1,43
	0,5	111	6	2,54
Dieldrin	0,05	94	10	-0,89
	0,1	96	7	-0,83
	0,5	116	4	4,56
β - Endosulfan	0,05	75	7	-5,21
	0,1	94	14	-0,61
	0,5	106	7	1,19
cis - Permetrina	0,5	86	8	-2,87
	1,0	89	10	-1,70
	5,0	119	14	1,66
trans - Permetrina	0,5	82	19	-1,62
	1,0	94	18	-0,50
	5,0	101	12	0,12

*Coeficiente de variação (n = 3 para cada nível)

Para o método ser extato, o valor de t obtido por esta equação, deve estar dentro do intervalo tabelado, para $n - 1$ graus de liberdade, em um determinado nível de confiança. Nesse sentido, considerou-se como hipótese nula $Rec = 100\%$ e como hipótese alternativa $Rec \neq 100\%$ com um nível de confiança de 95%. Os valores de $t_{\text{calculado}}$ ficaram dentro do intervalo tabelado, com exceção apenas do dicofol, nos níveis 1,0 e 5,0 mg kg⁻¹, dieldrin à 0,5 mg kg⁻¹ e β-Endosulfan em seu menor nível de fortificação.

Por outro lado, ao realizar o teste t com 98% de confiança, todos os valores calculados ficaram dentro do intervalo aceito como método exato, pois se trata de um teste menos restritivo. Embora, o teste t a 95% de confiança não tenha sido satisfatório para todos os níveis de fortificação, o método é considerado exato, pois as recuperações obtidas

(75 a 119%) estão inseridas na faixa de 70 a 120%, que é estabelecida como adequada pela literatura na análise de resíduos de pesticidas (THIER; ZEUMER, 1987; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999).

Segundo Wood apud Brito et al. (2003), o coeficiente de variação máximo aceitável depende do nível de concentração em que o analito se encontra, segundo a equação:

$$CV (\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Sendo C a concentração do analito.

No presente estudo, o menor nível de concentração foi de 0,05 mg kg⁻¹, portanto o CV máximo aceitável por essa relação seria de 25%. Assim sendo, o método proposto pode ser considerado preciso, pois os coeficientes de variação obtidos (3 a 19%) estão abaixo deste valor. A precisão do método também é atestada quando utiliza-se o critério recomendado por THIER e ZEUMER (1987), segundo o qual valores de CV iguais ou inferiores a 20% são adequados para análise de resíduos de pesticidas.

7.7. Limite de detecção (LDm) e quantificação (LQm) do método (GC/ECD, Varian 3800)

Os resultados para os limites de detecção e quantificação do método obtidos, estimados segundo o modelo estatístico descrito no item 6.2.14, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Limites de detecção e quantificação do método (GC/ECD, Varian 3800) dos pesticidas estudados

Pesticidas	LDm (mg kg ⁻¹)	LQm (mg kg ⁻¹)
Dicofol I	0,352	0,5
α-endosulfan	0,025	0,05
Dieldrin	0,023	0,05
β-endosulfan	0,05	0,05
Dicofol II	0,351	0,5
Cis-permetrina	0,374	0,5
Trans-permetrina	0,354	0,5

Os limites de detecção e quantificação do método estão adequados para aplicação das amostras reais de tecido adiposo, pois os valores encontrados estão abaixo da concentração estimada no item anterior 7.6 (Tabela 9).

7.8. Aplicação do método proposto às amostras provenientes dos ensaios biológicos

Após desenvolvido e validado, o método proposto foi utilizado para avaliar a presença dos pesticidas estudados na amostras de tecido adiposo de ratos Lewis oriundas dos ensaios biológicos realizados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu.

A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos para amostras de tecido adiposo peritoneal de um animal alimentado com ração contendo mistura dos pesticidas na dose LOEL e de um animal sem exposição aos pesticidas, para evidenciar a seletividade do método proposto. Os demais cromatogramas das amostras analisadas se encontram no Anexo IV deste texto.

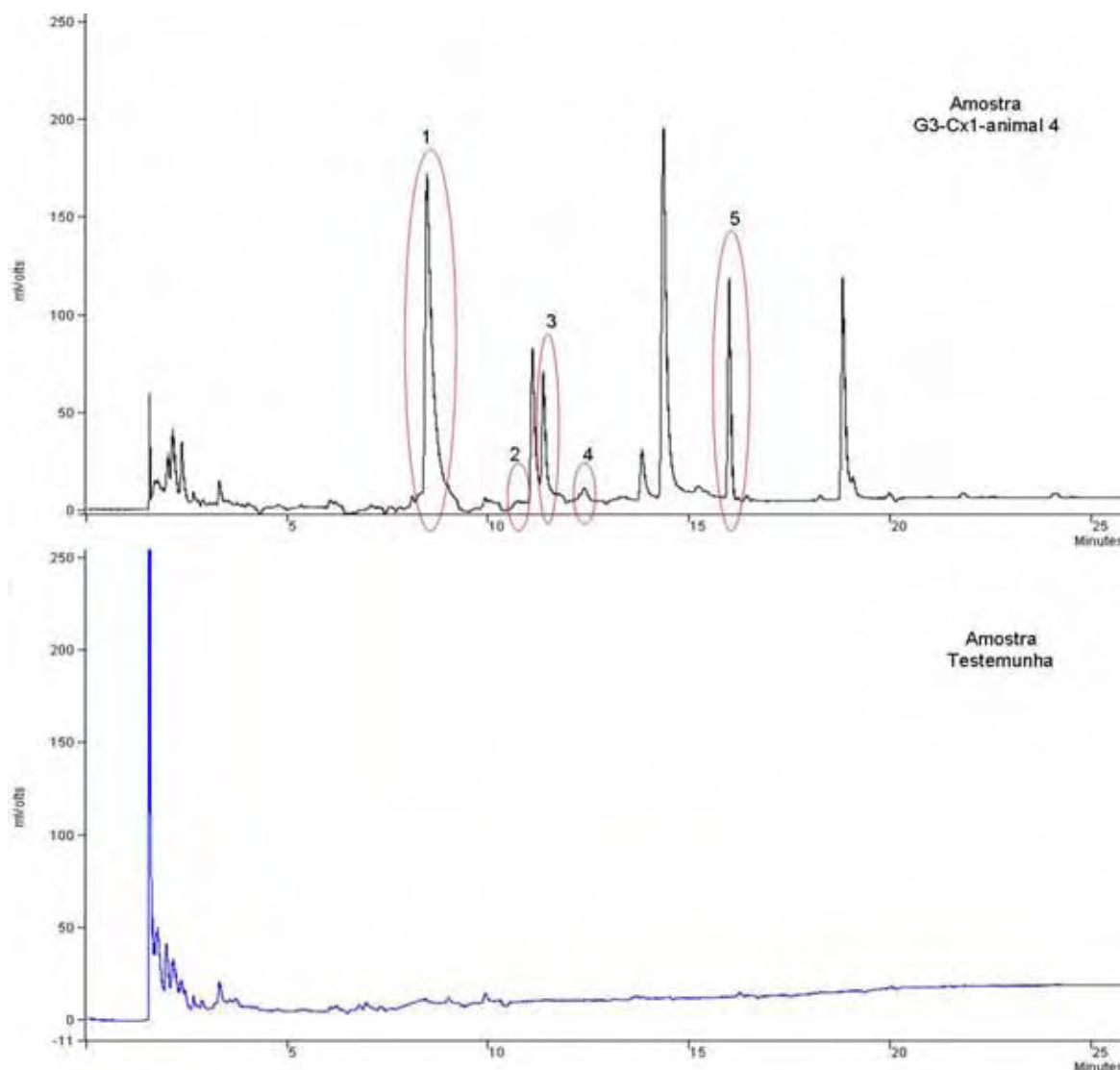


Figura 22 – Cromatogramas (GC/ECD, Varian 3800) da amostra de tecido adiposo peritoneal G3-Cx1-animal 4, sendo (1) dicofol I, (2) α -endossulfan, (3) dieldrin, (4) β -endossulfan e (5) dicofol II e da amostra testemunha.

A Tabela 12 apresenta a concentração encontrada dos pesticidas nas amostras analisadas, em duplicata da etapa de *cleanup* do método de extração proposto (Figura 13, item 6.2.10). Para quantificação dos pesticidas foram utilizadas as curvas analíticas preparadas na matriz, conforme descrito no item 7.6 (Figura 20), sendo G2, G3 animais alimentados com ração em mistura dos pesticidas, nas doses NOEL e LOEL, respectivamente; G4, G5, G6, G7 animais alimentados com os pesticidas dicofol, permetrina, dieldrin e endossulfan individualmente e, nesta ordem; Cx a caixa que o animal permaneceu durante o período de exposição aos pesticidas.

Tabela 12 – Concentração dos pesticidas nas amostras de tecido adiposo peritoneal de ratos.

Amostras	Concentração dos pesticidas em ng por g de tecido adiposo					
	Dicofol	α -endosulfan	Dieldrin	β -endosulfan	Cis-Permetrina	Trans-Permetrina
G2-Cx1-animal 1 (dose NOEL)	2524	ND	757	ND	ND	ND
G2-Cx1-animal 3 (dose NOEL)	872	ND	449	ND	ND	ND
G2-Cx2-animal 2 (dose NOEL)	885	ND	377	ND	ND	ND
G2-Cx2-animal 3 (dose NOEL)	872	ND	498	ND	ND	ND
G2-Cx2-animal 4 (dose NOEL)	939	ND	695	ND	ND	ND
G3-Cx1-animal 4 (dose LOEL)	4270	+	178	63	ND	ND
G3-Cx1-animal 5 (dose LOEL)	9413	ND	271	ND	ND	ND
G3-Cx2-animal 4 (dose LOEL)	2800	+	82	+	ND	ND
G3-Cx2-animal 5 (dose LOEL)	12000	+	274	+	ND	ND
G3-Cx3-animal 2 (dose LOEL)	4100	+	148	+	ND	ND

* n = 2 para etapa de *cleanup*; ND = não detectado, abaixo do LDm; + = abaixo do LQm, mas acima do LDm

Tabela 12 – Continuação

Amostras	Concentração dos pesticidas em ng por g de tecido adiposo					
	Dicofol	α -endosulfan	Dieldrin	β -endosulfan	Cis-Permetrina	Trans-Permetrina
G4-Cx1-animal 2 (dose LOEL – Dicofol)	7043	ND	+	ND	ND	ND
G4-Cx3-animal 1 (dose LOEL – Dicofol)	9355	ND	ND	ND	ND	ND
G5-Cx1-animal 3 (dose LOEL – Permetrina)	+	ND	+	ND	ND	ND
G5-Cx2-animal 1 (dose LOEL – Permetrina)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G6-Cx1-animal 2 (dose LOEL – Dieldrin)	ND	ND	+	ND	ND	ND
G6-Cx2-animal 3 (dose LOEL – Dieldrin)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G7-Cx1-animal 1 (dose LOEL – Endosulfan)	ND	ND	1417	ND	ND	ND
G7-Cx2-animal 2 (dose LOEL – Endosulfan)	ND	ND	2045	ND	ND	ND

* n = 2 para etapa de *cleanup*; ND = não detectado, abaixo do LDm; + = abaixo do LQm, mas acima do LDm

Como pode ser observado na Tabela 12, o pesticida dicofol foi encontrado em praticamente todos os grupos de amostras, com exceção dos animais pertencentes aos grupos G6 e G7, dieldrin e endosulfan respectivamente. Concentrações maiores de dicofol foram determinadas nas amostras de tecido adiposo do grupo G3 quando comparado ao G2, o que já era esperado pois a dose LOEL é maior que a dose NOEL. Além disso, os valores de concentração obtidos para esse pesticida (872 a 12000 ng g⁻¹) estão absolutamente coerentes quanto aos valores estimados (12500 a 141600 ng g⁻¹). Estes resultados confirmam os adequados procedimentos de alimentação dos ratos, coleta das amostras e eficiência do método desenvolvido.

O pesticida dieldrin apresentou a mesma persistência que o dicofol, porém em concentrações menores (82 a 2045 ng g⁻¹). Foi possível observar, também, contaminação cruzada entre os grupos, pois dieldrin foi encontrado em elevada concentração no grupo G7 referente ao endosulfan. Uma explicação para esse fato é que foi utilizado o mesmo peletizador para preparo da ração de todos os grupos de pesticidas. Caso o sistema de preparo da ração não tenha sido adequadamente limpo entre o preparo das diversas rações, a contaminação cruzada é plenamente plausível.

O isômero β -endosulfan foi quantificado em apenas uma das amostras (G3-Cx1-animal 4), na concentração de 63 ng g⁻¹ referente ao animal que se alimentou da maior dose da mistura (LOEL). Além disso, foi detectado α e β -endosulfan em três amostras de tecido adiposo dos animais pertencentes ao grupo G3, porém, seus valores estão abaixo do LQm (limite de quantificação do método), impossibilitando a sua quantificação.

Os valores de concentração de dicofol, dieldrin e endosulfan encontrados nas amostras de tecido adiposo indicam que estes pesticidas possuem capacidade de bioacumulação no organismo. Portanto, além de serem lipossolúveis, devido aos elevados valores do coeficiente de partição octanol-água (Kow), também são bioacumulados. Entretanto, nem todo composto que apresenta valores consideráveis para este coeficiente, tem tendência para bioacumular, como é o caso da permetrina que não foi detectada em nenhuma das amostras. Segundo algumas referências, esse composto é eficiente e rapidamente metabolizado e excretado pelo organismo (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 2009b)

A etapa de *cleanup*, realizada em duplicata para as amostras, forneceu os seguintes intervalos de coeficiente de variação para os pesticidas em estudo: dicofol (2 a 19%), dieldrin (2 a 15%) e β -endossulfan (8 a 17%).

Como foi discutido na introdução deste trabalho, é reportado que os pesticidas em estudo possuem metabólitos e podem dar origem a produtos de degradação, o que de certa forma poderia explicar a presença dos demais picos observados nos cromatogramas das amostras analisadas (Anexo IV). Uma tentativa para identificar esses picos adicionais seria utilizar a técnica de GC/MS com ionização química negativa (NCI), pois tais metabólitos são muito provavelmente clorados, e estes compostos são detectados em baixíssimas concentrações nesta técnica de ionização, além de ser possível no espectro de massa obter o pico do íon molecular (PRIMER apud PIZZUTTI, 2006). A identificação destes compostos desconhecidos pode contribuir significativamente para os estudos biológicos, avaliando se esses metabólitos juntamente com seus precursores podem causar algum efeito adverso ao animal, como alteração endócrina e atividade carcinogênica.

8. CONCLUSÕES

As condições cromatográficas otimizadas permitem análise simultânea dos pesticidas em um tempo relativamente curto quando comparado aos descritos na literatura, em estudos que envolvem matrizes gordurosas, viabilizando sua aplicação em estudos que exigem um elevado número de amostras.

O método proposto está adequado aos objetivos deste trabalho, por ser eficiente, devido aos bons parâmetros de validação obtidos, por ser rápido e simples (baixo consumo de reagentes e solventes) e por requerer pequena massa de amostra, dada a pequena disponibilidade de tecido adiposo neste estudo.

Foram determinados os seguintes critérios de validação: intervalo de trabalho, linearidade do detector, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação do equipamento e do método.

Os valores dos limites de quantificação do método foram adequados aos objetivos do trabalho, pois trata-se de um estudo de caso, em que os animais foram expostos diretamente à mistura de pesticidas. Diferentemente de outros trabalhos encontrados na literatura em que se estuda a exposição a esses compostos por meio de alimentos e pelo ambiente (solo, ar, água).

A aplicação do método às amostras de tecido adiposo provenientes dos ensaios biológicos possibilitou a quantificação de alguns dos pesticidas organoclorados, entre eles, dicofol, dieldrin e β -endosulfan. Os resultados indicaram que tais compostos são lipossolúveis e também bioacumulativos neste tecido. O piretróide permetrina não foi detectado em nenhuma das amostras e, embora a ANVISA tenha encontrado este pesticida em matrizes vegetais, tende a ser metabolizado e excretado rapidamente pelo organismo, mesmo apresentando elevado coeficiente de partição octanol-água.

Até pouco mais de uma década acreditava-se que o tecido adiposo era um compartimento inerte do organismo, responsável por um gasto energético inexpressivo e que tinha basicamente a função de armazenar energia. No entanto, trata-se de um complexo reservatório energético regulado funcionalmente por nervos, hormônios e nutrientes (FRÜHLBECK et al., 2001). Além disso, o tecido

adiposo é considerado um importante órgão endócrino com funções reguladoras no balanço energético e outras funções neuroendócrinas (FRÜLHBECK et al., 2001).

E a aplicação do método às amostras de tecido adiposo forneceu valores de concentração elevados para os pesticidas organoclorados dicofol e dieldrin e, em menor quantidade, para o endosulfan. Esses dados indicam o acúmulo destes compostos no tecido, comparados ao que foi consumido durante o experimento biológico, mesmo quando expostos à baixas doses. Esses resultados, portanto, podem subsidiar estudos biológicos em que são avaliados os efeitos ao tecido adiposo, assim como alterações de suas funções neuroendócrinas. Cabe aos estudos biológicos avaliar a relação entre os dados obtidos neste trabalho e sua interferência no funcionamento normal do organismo.

REFERÊNCIAS

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>. Acesso em: 04 jun. 2009a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**: programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Nota técnica-Resultados PARA 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados_PARA_2008.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2009b.

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: 04 jun. 2009c.

ALONSO, M. B. **Organoclorados em toninhas, *Pontoporia blainvillei* (MAMMALIA: CETACEA) da região costeira do Estado de São Paulo, Brasil**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil**: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume, 2002.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, N. L. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**. London: CRC Press, 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; 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.

CARRO, A. M.; LORENZO, A.; FERNÁNDEZ, F.; RODIL, R.; CELA, R. Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, n. 1-2, p. 93-85, 2005.

CHEN, S.; SHI, L.; SHAN, Z.; HU, Q. Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1315-1319, 2007.

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, n.1-2, p. 201-210, 2005.

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>. Acesso em: 30 jul. 2009.

CRIADO, M. R.; FERNÁNDEZ, D. H.; PEREIRO, I. R.; TORRIJOS, R. C. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of polychlorinated biphenyls in fat by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1056, n. 1-2, p. 187-194, 2004.

DALSENTER, P. R.; FAQI, A. S.; WEBB, J.; MERKER, H-J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 146-153, 1997.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. Geneva: International Programme on Chemical Safety, 2002.

ESKILSSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 227-250, 2000.

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.

FERNANDES, D.; POTRYKUS, J.; MORSIANI, C.; RALDUA, D.; LAVADO, R.; PORTE, C. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). **Environmental Research**, v. 90, n. 2, p. 169-178, 2002.

FERNÁNDEZ MORENO, J. L.; ARREBOLA LIEBANAS, F. J.; GARRIDO FRENICH, A.; MARTINEZ VIDAL, J. L. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n.1, p. 97-105, 2006.

FERRER, C.; GÓMEZ, M. J.; GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, I.; THURMAN, E. M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 2, p. 183-194, 2005.

FREITAS, S. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação multirresíduo de pesticidas em frutas brasileiras**. 2005. 181 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

FRENICH, A. G.; BOLANOS, P. P.; VIDAL, J. L. M. Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: application to simple and complex food samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, p. 229-238, 2008.

FRÜHLBECK, G.; GOMEZ-AMBROZI, J.; MURUZÁBEL, F. J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy and metabolic regulation. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. 827-847, 2001.

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.

GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, C.; GÓMEZ-RAMOS, M. J.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 239-251, 2007.

GARCINUNO, R. M.; RAMOS, L.; FERNANDEZ-HERNANDO, P.; CAMARA, C. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. **Journal Chromatography A**, v. 1041, n. 1-2, p. 35-41, 2004.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

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.

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 enantiomer-specific implications. **Chemosphere**, v. 64, p. 174-177, 2006.

HONG, J.; KIM, H-Y.; KIM, D-G.; SEO, J.; KIM, K-J. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 1038, n. 1-2, p. 27-35, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2003.

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

JARDIM, S. F. L. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água**: desenvolvimento e validação de metodologia. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KING, J. W.; ZHANG, Z. Selective extraction of pesticides from lipid-containing matrixes using supercritical binary gas mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 1431-1436, 1998.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 435-445, 2002.

KRISTENSON, E. M.; SHAHMIRI, S.; SLOOTEN, C. J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis. **Chromatographia**, v. 59, p. 315-320, 2004.

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.

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

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of Association of Analytical Communities International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LOPEZ-ESPINOSA, M. J.; LOPEZ-NAVARRETE, E.; RIVASC, A.; FERNANDEZ, M. F.; NOGUERAS, M.; CAMPOY, C.; OLEA-SERRANO, F.; LARDELLI, P.; OLEA, N. Organochlorine pesticide exposure in children living in southern Spain. **Environmental Research**, v. 106, p. 1-6, 2008.

MUÑOZ-DE-TORO, M.; BELDOMÉNICO, H. R.; GARCÍA, S. R.; STOKER, C.; JESUS, J. J.; BELDOMÉNICO, P. M.; RAMOS, J. G.; LUQUE, E. H. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a litoral region of Argentina. **Environmental Research**, v. 102, n. 1, p. 107-112, 2006.

NAERT, C.; PIETTE, M.; BRUNEEL, N.; PETEGHEM, C. V. Occurrence of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Belgian human adipose tissue samples. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 290-296, 2006.

NARDELLI, V.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Rapid multiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1034, n. 1-2, p. 33-40, 2004.

PAULÍNIA .Secretaria de Saúde. **2º Relatório de avaliação do impacto na saúde dos moradores do bairro Recanto dos Pássaros**: contaminação ambiental do antigo site da Shell-Química. Disponível em: <<http://www.acpo.org.br/paulinia/paulinia05.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2009.

PETREAS, M.; SMITH, D.; HURLEY, S.; JEFFREY, S. S.; GILLISS, D.; REYNOLDS, P. Distribution of persistent, lipid-soluble chemicals in breast and abdominal adipose tissues: lessons learned from a breast cancer study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 3, p. 416-424, 2004.

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) – 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. 771-80, 2004.

RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2003. p. 217-265.

SAITO, K.; SJÖDIN, A.; SANDAU, C. D.; DAVIS, M. D.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; PATTERSON, D. G. Jr. Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. **Chemosphere**, v. 54, n. 5, p. 373-381, 2004.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; RODRIGUEZ, A.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1007, n. 1-2, p. 85-91, 2002.

SCHETTGEN, T.; HEUDORF, U.; DREXLER, H.; ANGERER, J. Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet. **Toxicology Letters**, v. 134, p. 141-145, 2002.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonist. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1-6, p. 143-150, 1998.

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.

THIBAUT, R.; PORTE, C. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 92, p. 485-494, 2004.

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

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

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

VALENTE, L. P. V.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/artigo/12/152/>>. Acesso em: 10 maio. 2009.

VALSAMAKI, V. I.; BOTI, V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. **Analytica Chimica Acta**, n. 573-574, p. 195-201, 2006.

VIVES, I.; GRIMALT, J. O. Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. **Journal of Chromatography B**, v. 768, n. 2, p. 247-254, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations**. Geneva, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues**. Geneva, 1962. v. 240.

YAGUE, C.; BAYARRI, S.; CONCHELLO, P.; LAZARO, R.; PEREZ-ARQUILLUÉ, C.; HERRERA, A.; ARINO, A. Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by Ion-Trap GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5105-5109, 2005.

YONG, R.; ZHENLING, Z.; DIJIE, L.; ZHANGLIU, C. Residue determination of diazinon in pigs tissues by GC-NPD. **Journal Written in Chinese**, v. 23, n. 4, p. 385-387, 2003.

ZROSTLÍKOVA, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1-2, p. 73-86, 2001.

ANEXOS

Anexo I – Resumo do projeto temático

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

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) em alimentos consumidos pela população brasileira nos últimos anos.

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 dos praguicidas estudados:

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 Diclorvós 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 – Preparo da ração

As amostras de ração, que alimentaram os animais, foram preparadas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, conduzido pelo Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo, segundo um protocolo específico para este tipo de estudo em forma de peletes, envolvidas em papel alumínio e armazenadas a -18° C. Sua composição é basicamente formada por amido, açúcares, vitaminas, óleos e proteínas e foi denominada de dieta padrão. As amostras de ração foram transportadas ao Instituto de Química de Araraquara, devidamente refrigeradas, para execução das análises químicas.

As análises das amostras de ração foram efetuadas pelo aluno de iniciação científica Alex Domingues, sob a co-orientação da doutoranda Adriana Pimentel de Almeida Carvalho, também envolvida no projeto temático, que trabalhou com outras matrizes: fígado e cérebro.

A ração isenta de pesticidas, denominada de ração basal, constituída da dieta padrão, 100mL de etanol e 480 g de óleo de soja, foi denominada de G1. As amostras de ração G2 e G3, que contém os pesticidas, foram preparadas pela adição dos mesmos em mistura de acordo com a dose NOEL (nível sem efeito observável) e LOEL (menor nível de efeito adverso observável) respectivamente. Estes níveis foram estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde a partir dos índices de ingestão diária aceitável (ADIs). Os ADIs são valores limites que, baseados em conhecimento atualizado sobre os aspectos toxicológicos de determinado agente químico, indicam que é improvável que a exposição a seus resíduos represente qualquer risco à saúde humana se forem ingeridos dentro daqueles limites durante toda a vida do indivíduo. O ADI de determinado pesticida é geralmente obtido a partir de doses críticas, como a NOEL e a LOEL, verificadas em estudos de toxicidade com animais de laboratório e corrigidos por fatores de segurança, que podem variar de 10 a 2.000 vezes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1962).

Os valores de NOEL e LOEL podem ser estabelecidos por diferentes organismos, ou mesmo grupos de pesquisa e podendo apresentar valores diferentes para uma mesma substância, dependendo do efeito em estudo e da espécie utilizada nos testes biológicos.

Os valores que foram utilizados neste estudo foram os estabelecidos pela U.S.FDA (United States Food and Drug Administration), para ratos Lewis, tendo como efeito alvo neoplasias.

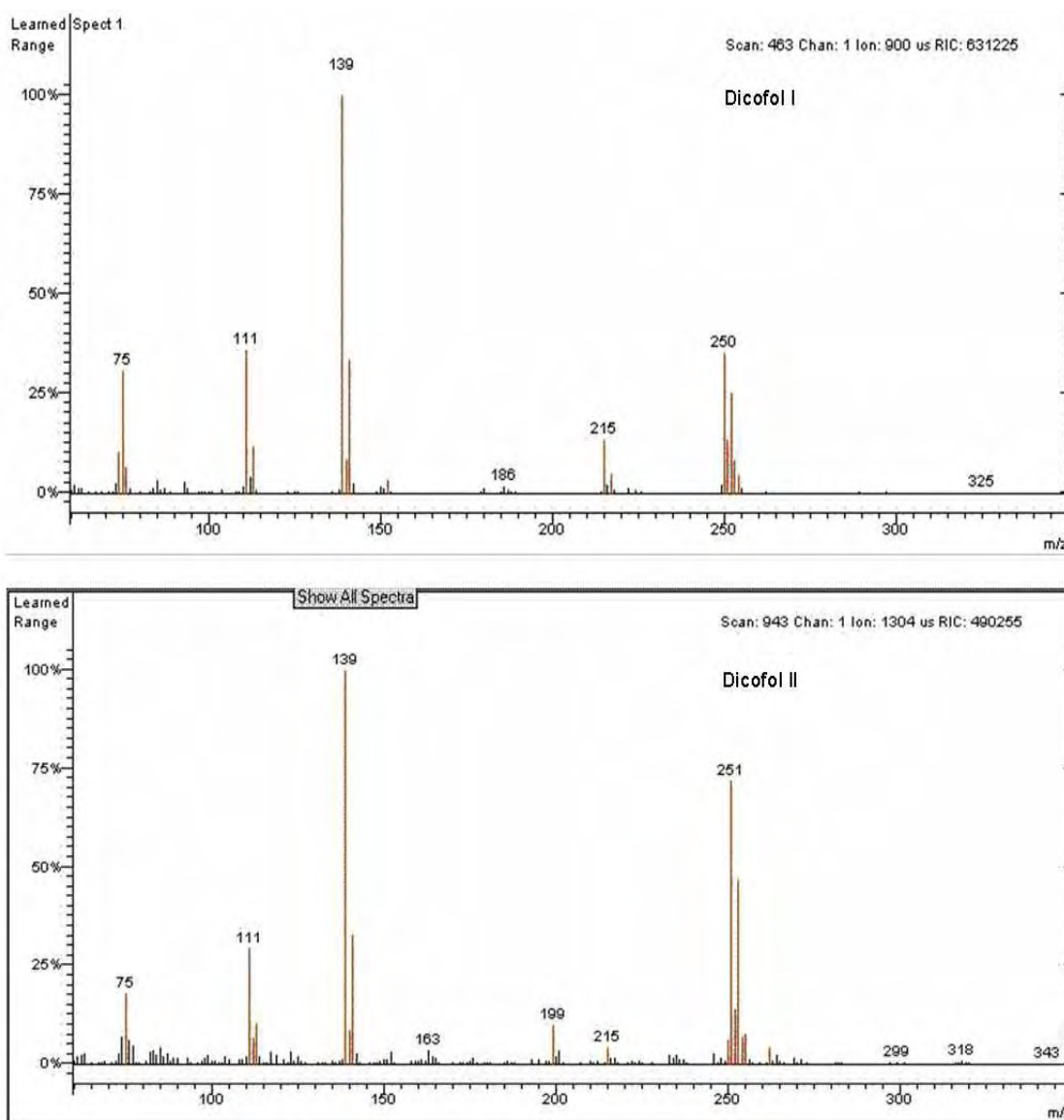
Durante o experimento, os animais foram alimentados com a ração G2 e outros com a ração G3, e a composição de cada nível está detalhada na tabela abaixo:

Composição da Ração nas concentrações NOEL e LOEL

Composição	Mistura NOEL G2	Mistura LOEL G3
Dieta Padrão	12 x 10 ³ g	
Etanol	100 mL	
Óleo de Soja	4,8 x 10 ² g	
Dieldrin	3,5 mg	7,0 mg
Permetrina	700,0 mg	3500 mg
Endosulfan	8,4 mg	406,0 mg
Dicofol	30,8 mg	350,0 mg

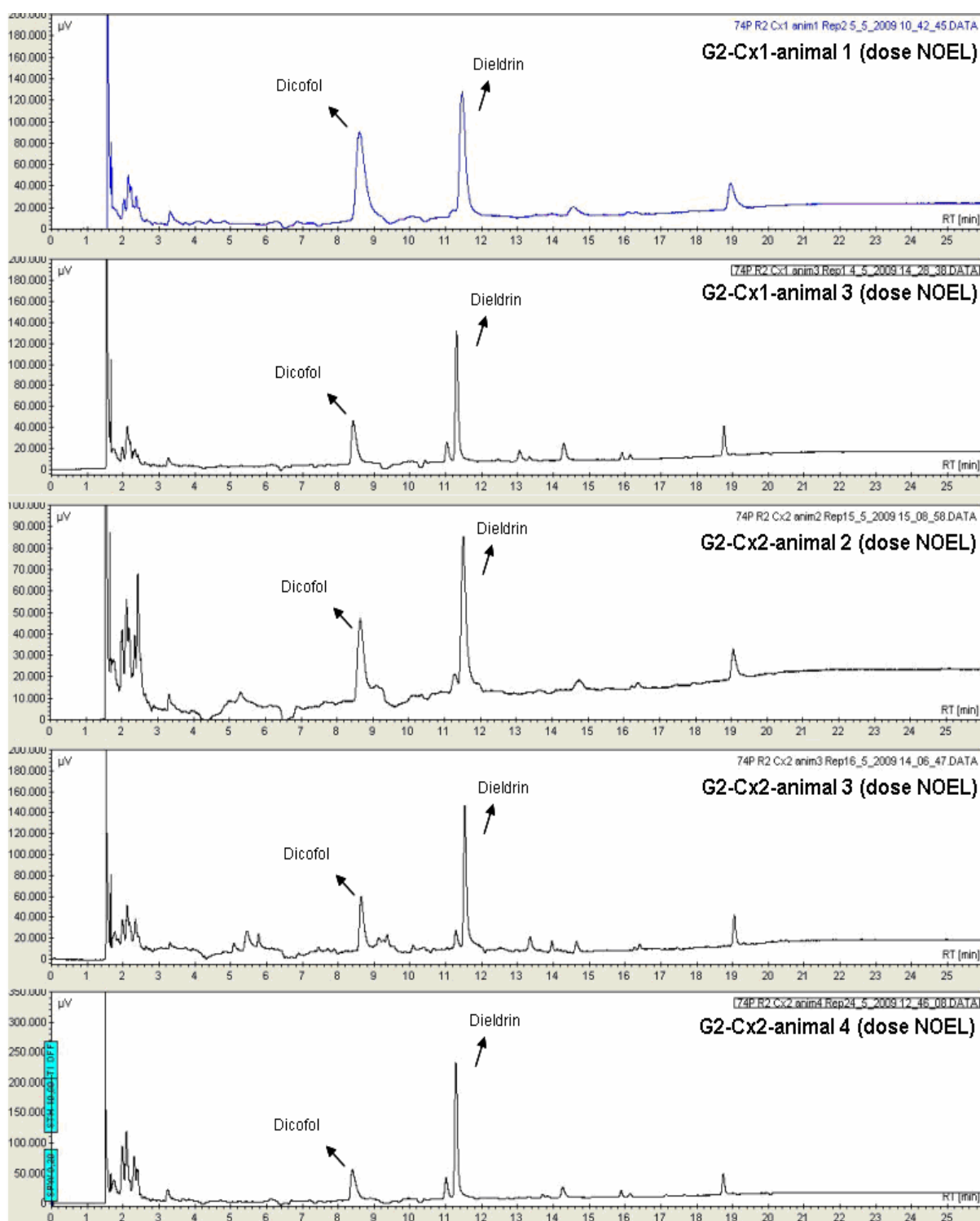
Foram preparadas também amostras de ração contendo os pesticidas individualmente e na dose LOEL. Essas amostras de ração foram denominadas de G4, G5, G6, G7 e contém os seguintes pesticidas, respectivamente: dicofol, permetrina, dieldrin e endosulfan. As amostras de ração foram preparadas com mistura dos pesticidas para avaliação de efeito de sinergismo e, individualmente, para uma ligação direta com possível alteração biológica.

Anexo III – Espectro de massas do dicofol

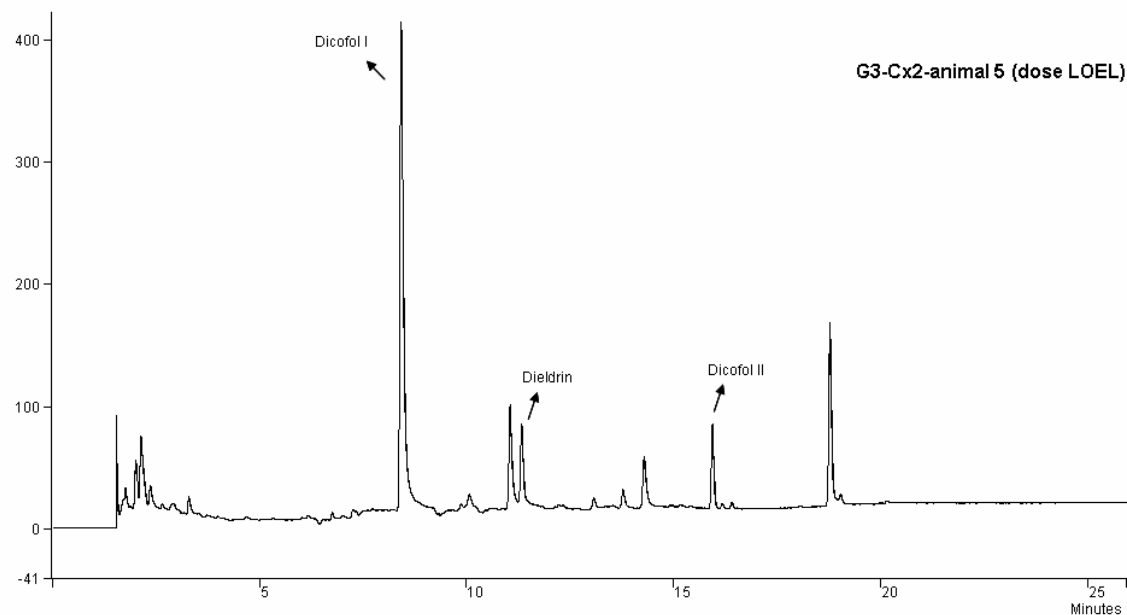
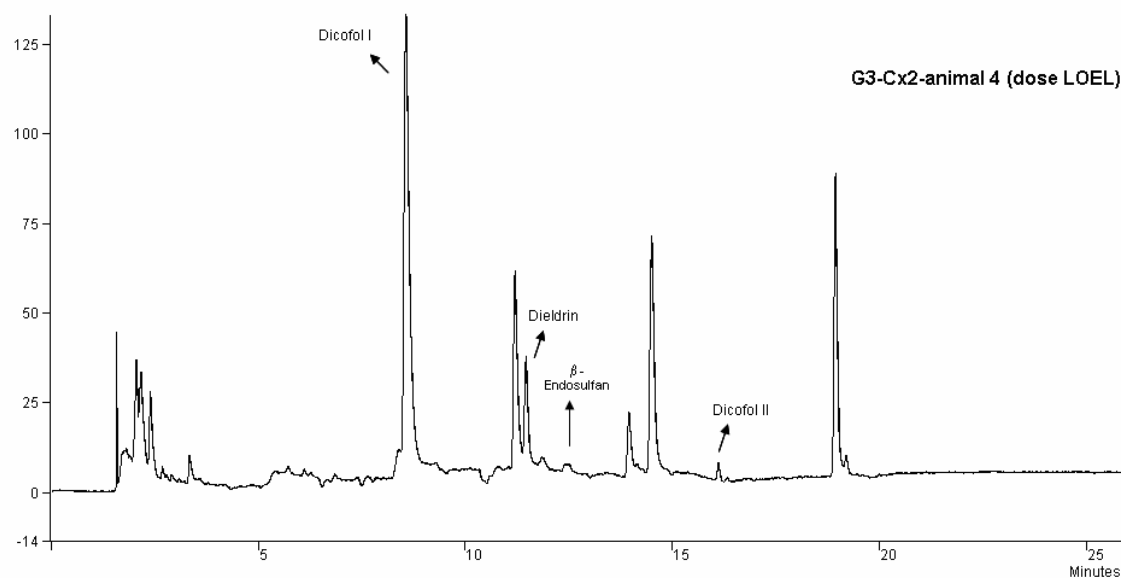
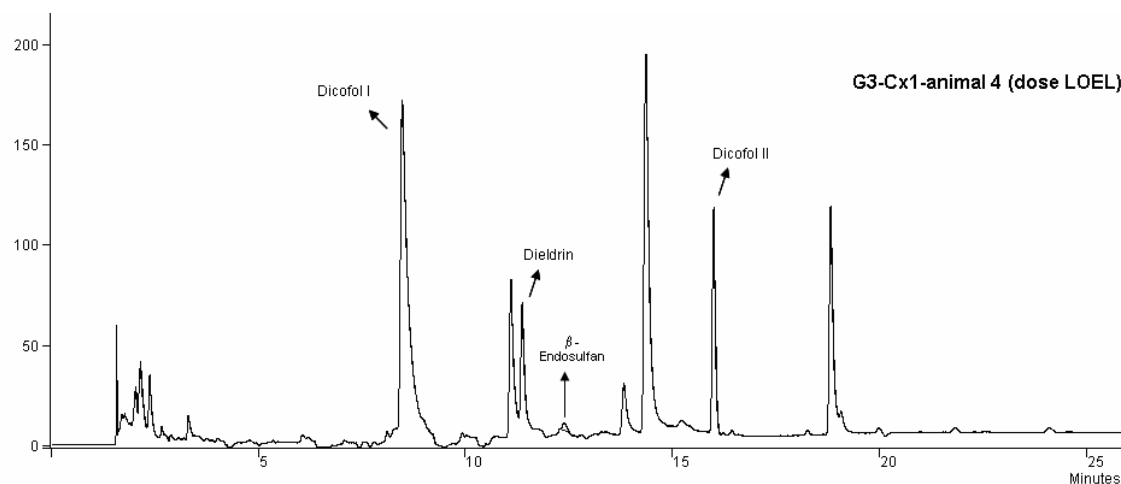


Fragmentogramas no modo *Scan* dos isômeros I e II do pesticida dicofol.

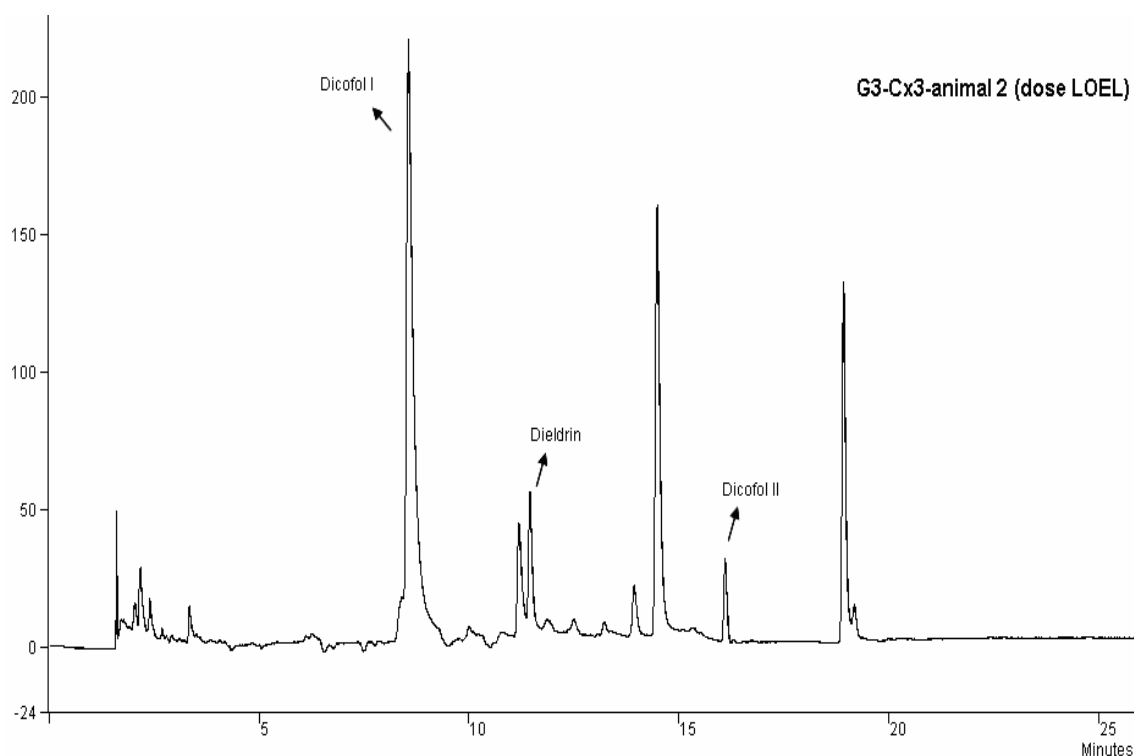
Anexo IV – Cromatogramas das amostras analisadas



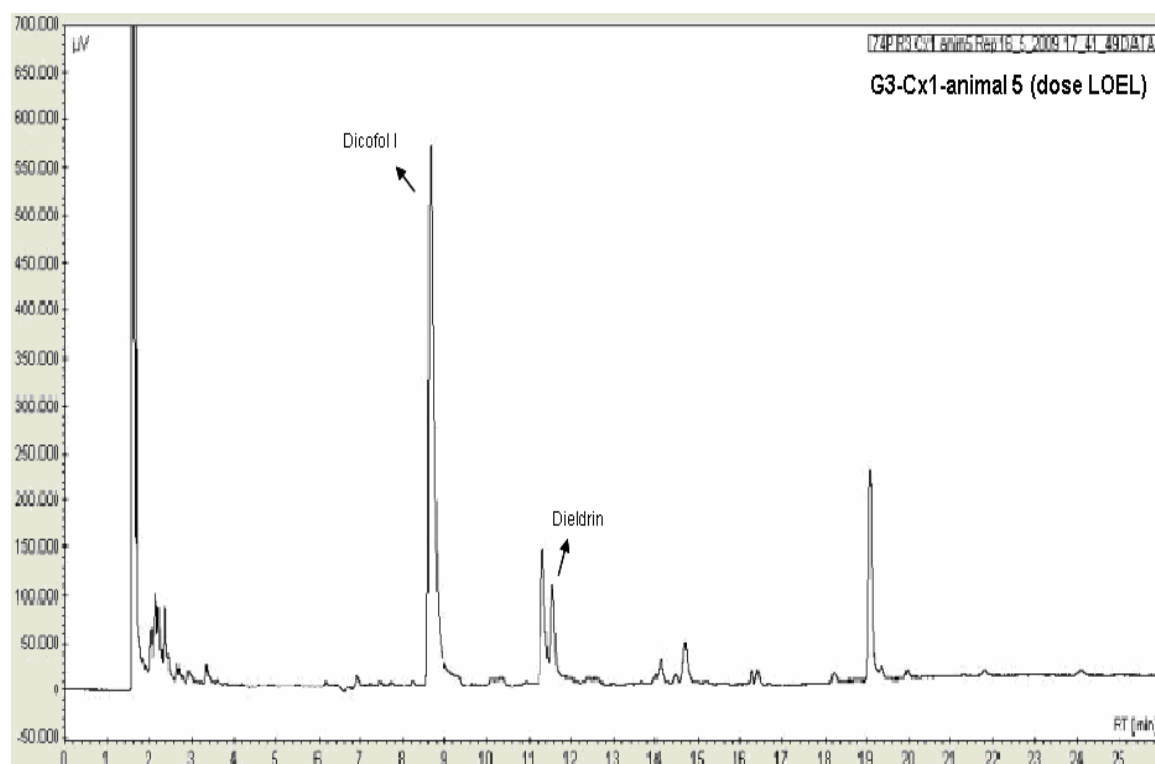
Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G2 (mistura dos pesticidas na dose NOEL)



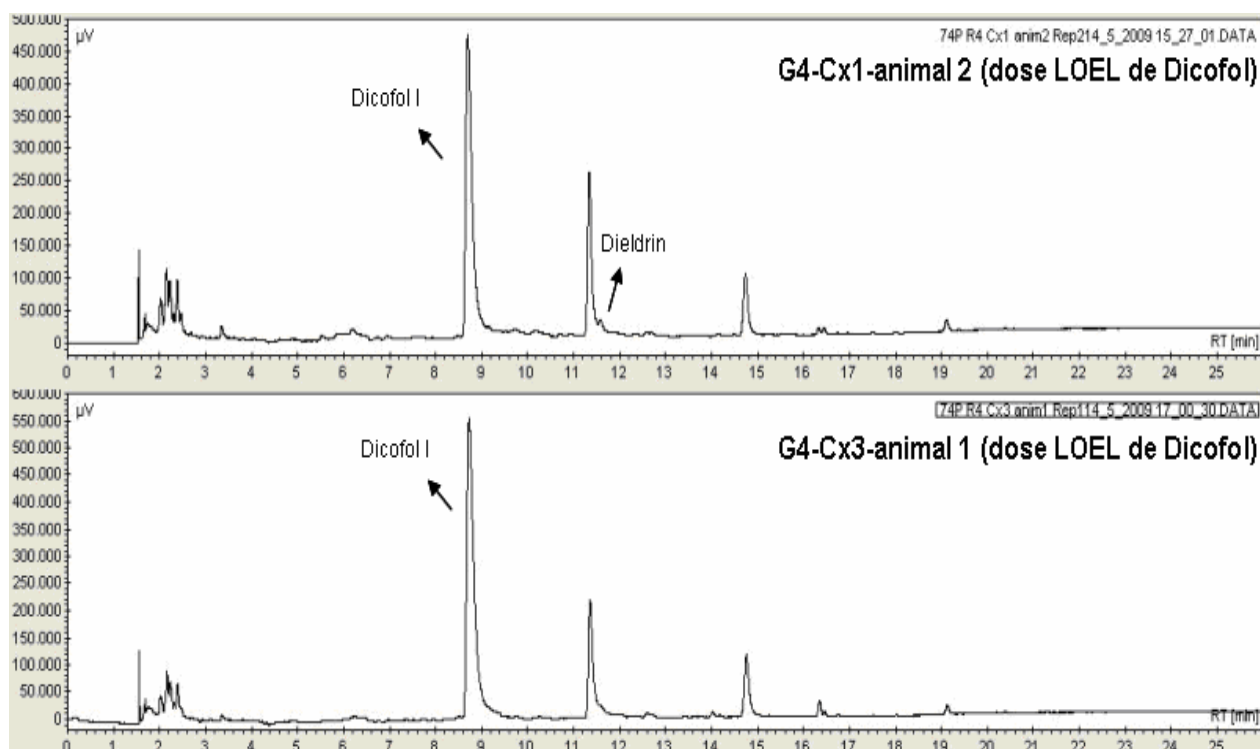
Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Star Workstation Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G3 (mistura dos pesticidas na dose LOEL)



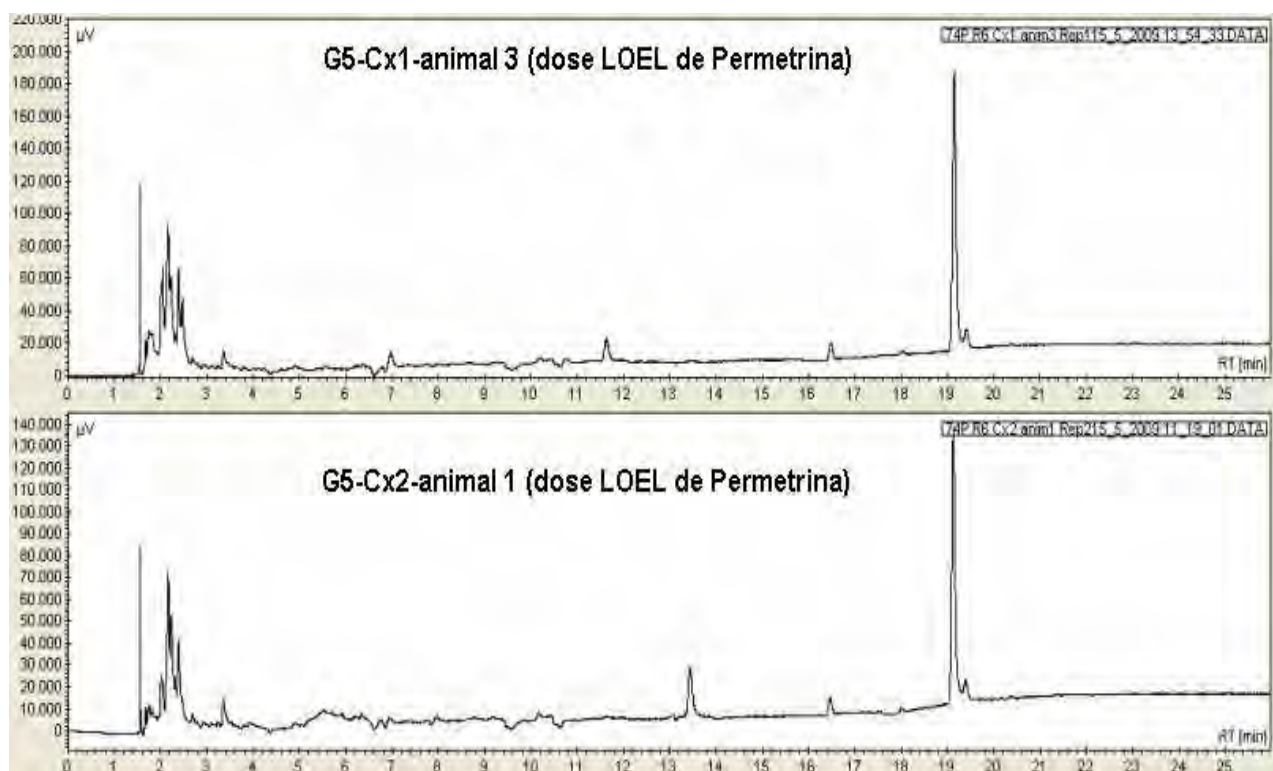
Cromatograma (GC/ECD, software de aquisição Star Workstation Varian) da amostra de tecido adiposo peritoneal referente ao animal que se alimentou da ração do grupo G3 (mistura dos pesticidas na dose LOEL)



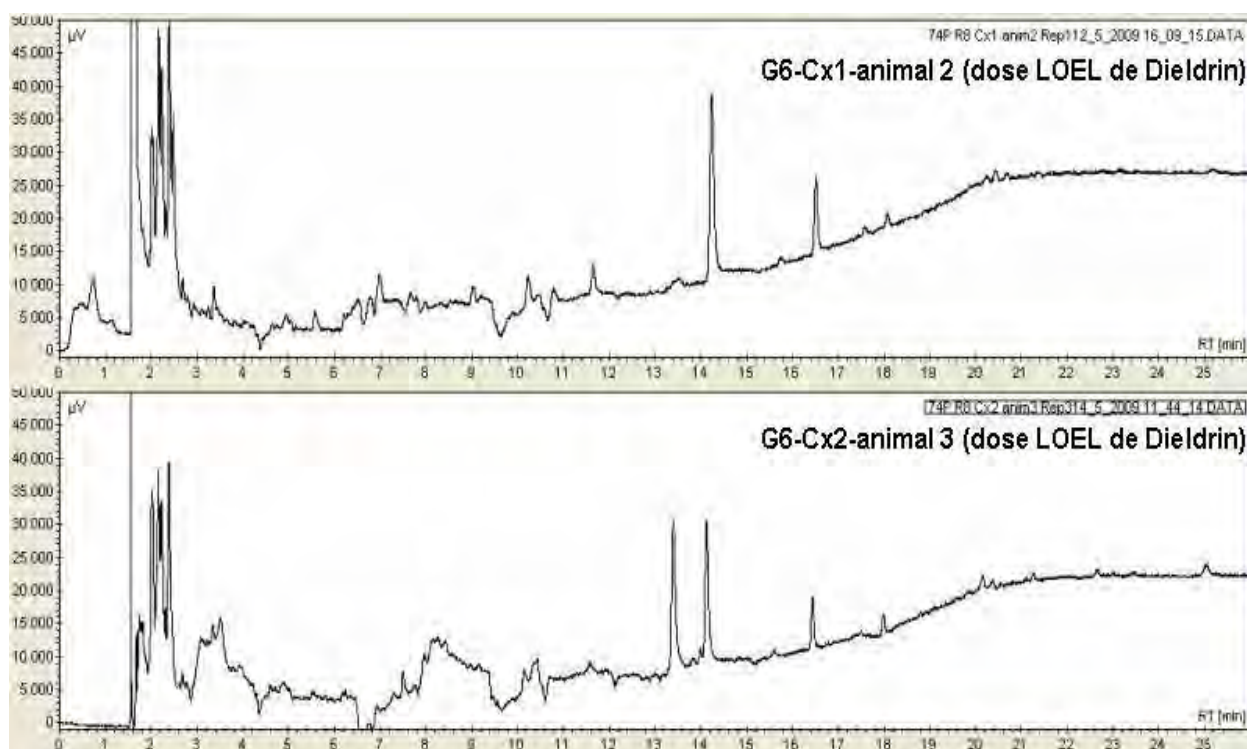
Cromatograma (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) da amostra de tecido adiposo peritoneal referente ao animal que se alimentou da ração do grupo G3 (mistura dos pesticidas na dose LOEL)



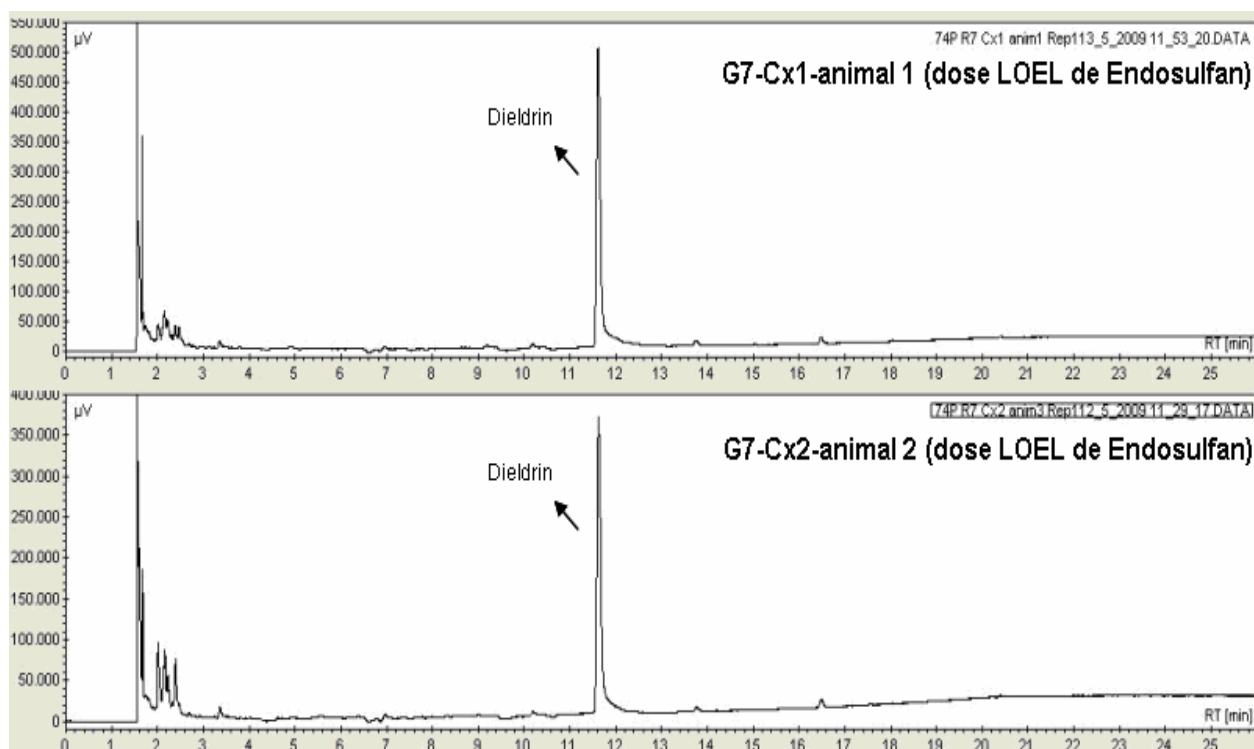
Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G4 (dicofof individual e na dose LOEL)



Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G5 (permetrina individual e na dose LOEL)



Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G6 (dieldrin individual e na dose LOEL)



Cromatogramas (GC/ECD, software de aquisição Galaxie Varian) das amostras de tecido adiposo peritoneal referente aos animais que se alimentaram da ração do grupo G7 (endosulfan individual e na dose LOEL).