

**NATHALIE ZAMARIOLA**

**Resíduos de pesticidas em tecido adiposo associado a  
órgãos reprodutivos: validação de método analítico e  
aplicação a animais de experimentação**

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**

**Araraquara  
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

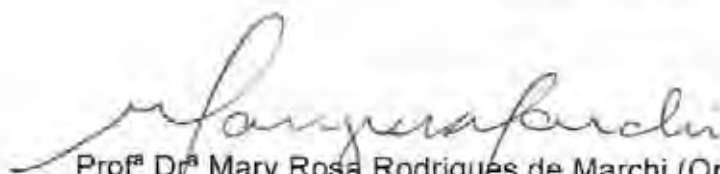
|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Z23r | <p>Zamariola, Nathalie</p> <p>Resíduos de pesticidas em tecido adiposo associado a órgãos reprodutivos : validação de método analítico e aplicação a animais de experimentação / Nathalie Zamariola. - Araraquara : [s.n], 2011</p> <p>91 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi</p> <p>1. Pesticidas. 2. Cromatografia gasosa. 3. Validação.</p> <p>I. Título.</p> |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

NATHALIE ZAMARIOLA

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

Araraquara, 25 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



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



Drª Silvia Helena Govoni Brondi  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, São Carlos



Profª Drª Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – UFV, Viçosa – MG

## **Dedicatória**

Aos meus queridos pais, Carlos e Sônia:

A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,

A vocês que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e com muitas esperanças,

A vocês que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.

A minha querida irmã, Natassia, que sempre esteve presente e me apoiou nos momentos mais difíceis.

Amo vocês de tal forma que não consigo traduzir em palavras.

Muito obrigada por tudo!

## **Agradecimentos**

A Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

Aos meus pais Carlos e Sônia e minha irmã Natassia, pelo carinho, incentivo e paciência.

A minha querida orientadora e amiga Mary por toda dedicação, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e ser um exemplo de profissional que realmente ama o que faz.

Ao Pedro, pela amizade sincera de muitos anos, pela ajuda e orientação em todo o desenvolvimento desse trabalho.

As minhas amigas Débora e Stephane pelo convívio diário, pelo suporte nas horas difíceis, pela ajuda e por alegrarem meus dias.

A todos do Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESKO) que de alguma forma me ajudaram e tornaram mais agradáveis meus dias de trabalho.

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

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

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

Muito obrigada!

## Resumo

Os pesticidas, quando utilizados de forma adequada, protegem as culturas agrícolas contra danos excessivos causados por pragas e doenças. No entanto, segundo a ANVISA, aproximadamente 29% dos alimentos hortifrutícolas consumidos pela população brasileira apresenta alguma irregularidade quanto aos níveis de resíduos de pesticidas, indicando um uso abusivo e indiscriminado. Tendo em vista a preocupação com a saúde humana, foi proposto um estudo com animais de experimentação (ratos Lewis, Wistar e Sprague-Dawley) para avaliar os efeitos da exposição a misturas de pesticidas em baixas doses, simulando o que ocorre com humanos. Para isso foram escolhidos os pesticidas dicofol, dieldrin, endossulfam e permetrina, que foram encontrados em amostras de alimentos de origem vegetal, coletadas em diversas regiões do país pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA. Dentre os efeitos estudados está a alteração endócrina em fêmeas, que pode afetar o sistema reprodutivo, e como estas moléculas apresentam bioacumulação, o tecido alvo é o adiposo. Considerando-se as baixas concentrações previstas para os analitos, a complexidade da matriz (45% de lipídios) e a pequena massa de amostra disponível (cerca de 2 g por animal), houve a necessidade de desenvolver um método que apresentasse confiabilidade para aplicação a este estudo. O método desenvolvido para extração dos analitos é uma modificação do método QuEChERS. O método consiste basicamente de extração com acetonitrila e posterior extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com PSA e C<sub>18</sub>. Na avaliação da confiabilidade analítica do método foram incluídos os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, sensibilidade limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e efeito matriz. Todas as amostras de tecido adiposo associado ao ovário, analisadas apresentaram resíduos de dicofol e diclorobenzofenona (<LQ a 16217 ng g<sup>-1</sup>) dieldrin (<LQ a 1008 ng g<sup>-1</sup>); cis-permetrina (<LQ a 12082 ng g<sup>-1</sup>), trans-permetrina também foi detectada em grande parte das amostras, mas abaixo do limite de quantificação. Considerando-se que os animais receberam misturas destes pesticidas em duas doses: LOEL (Low Observed Effect Level) e NOEL (No-Observed Effect Level), utilizadas para estabelecer os limites máximos permitidos em alimentos, e ainda que estes pesticidas são considerados alteradores endócrinos, os dados obtidos apontam para a necessidade de rever os limites máximos permitidos, considerando a exposição concomitante a diversos pesticidas na dieta humana.

**Palavras-chave:** pesticidas, tecido adiposo, validação, QuEChERS, GC/ECD

## Abstract

Pesticides, when used properly, protect crops against excessive damage caused by pests and diseases. However, according to results published by Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA - *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*), approximately 29% of food consumed by the population (fruits and vegetables) has some irregularity in the levels of pesticide residues, indicating an indiscriminate use. In this context, a multidisciplinary group proposed a study with experimental animals (Lewis, Wistar and Sprague-Dawley rats) to evaluate the effects of exposure to mixtures of pesticides at low doses, simulating what occurs in humans. For this study were chosen the pesticides dicofol, dieldrin, endosulfan and permethrin, which were found irregularly in foods (fruits and vegetables) by ANVISA. Among the possible effects studied is the endocrine disruption, which can affect the reproductive system, and how these molecules exhibit bioaccumulation, the main target is the adipose tissue. Considering the low concentrations predicted for the analytes, the matrix complexity (45% fat) and the sample mass (about 2 grams per animal), was mandatory to develop a reliable method suitable for this study. The method developed is a modification of QuEChERS method. It includes extraction with acetonitrile and subsequent dispersive-SPE with primary secondary amine (PSA) and C<sub>18</sub>. The assessed method reliability parameters comprised: selectivity, sensitivity, linearity, sensitivity, detection limit, quantification limit, accuracy, precision and matrix effects. All analyzed samples (adipose tissue associated to ovary) showed residues of dicofol and dichlorobenzophenone (<LOQ to 16217ng g<sup>-1</sup>) dieldrin (<LOQ to 1008ng g<sup>-1</sup>); cis-permethrin (<LOQ to 12082ng g<sup>-1</sup>), trans-permethrin was also detected in most samples, but below the quantification limit. Considering that the animals received mixtures of this pesticides in two doses: LOEL (Low Observed Effect Level) and NOEL (No-Observed Effect Level), used to set the maximum allowed in food, and that this pesticides are considered endocrine disrupters, the results show the need to revise the maximum allowed limits, due to concomitant exposure to several pesticides in the human diet.

**Keywords:** pesticides, adipose tissue, validation, QuEChERS, GC/ECD

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Sistema endócrino.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| <b>Figura 2</b> - Processo de alteração endócrina: a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista.....                                                                                                                                                                                 | 18 |
| <b>Figura 3</b> - Estrutura química do pesticida organoclorado dieldrin.....                                                                                                                                                                                                                           | 25 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado endossulfam.....                                                                                                                                                                                                           | 26 |
| <b>Figura 5</b> - Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado dicofol e seu principal produto de degradação diclorobenzofenona.....                                                                                                                                                      | 27 |
| <b>Figura 6</b> - Estrutura química dos isômeros do pesticida permetrina.....                                                                                                                                                                                                                          | 29 |
| <b>Figura 7</b> - Perfil dos resultados insatisfatórios PARA 2009.....                                                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| <b>Figura 8</b> - Método de extração de pesticidas em tecido adiposo proposto por Toledo Netto (2009)...                                                                                                                                                                                               | 46 |
| <b>Figura 9</b> - Método de extração QuEChERS modificado de Cunha e colaboradores (2007).....                                                                                                                                                                                                          | 47 |
| <b>Figura 10</b> - Cromatograma (GC/ECD) obtido com as condições iniciais de operação (2:α-endossulfam; 3:Dieldrin; 4:β-endossulfam; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina; 1, 5 e 6 referentes ao padrão do dicofol).....                                                                              | 52 |
| <b>Figura 11</b> - Cromatograma (GC/ECD) referente aos analitos nas condições otimizadas. (2:α-endossulfam; 3:Dieldrin; 4:β-endossulfam; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina; 1, 5 e 6: referentes ao padrão do dicofol).....                                                                         | 53 |
| <b>Figura 12</b> - Cromatogramas (GC/ECD) do dicofol (100 µg L <sup>-1</sup> ): instabilidade do número de picos.....                                                                                                                                                                                  | 54 |
| <b>Figura 13</b> - (A) Cromatograma (GC/MS) para solução padrão de dicofol (100 mg L <sup>-1</sup> ), (B e C) fragmentogramas para os picos obtidos na análise do padrão por GC/MS; (D) fragmentograma do dicofol e (E) fragmentograma da 4,4-diclorobenzofenona. (D) e (E) obtidos na literatura..... | 55 |
| <b>Figura 14</b> - Sobreposição dos cromatogramas (GC/ECD) da diclorobenzofenona 100 µg L <sup>-1</sup> (vermelho) e do dicofol 100 µg L <sup>-1</sup> (preto).....                                                                                                                                    | 56 |
| <b>Figura 15</b> - Cromatogramas (GC/ECD) para uma solução padrão dos analitos: DBP (100 µg L <sup>-1</sup> ), endossulfam (10 µg L <sup>-1</sup> ), dieldrin (10 µg L <sup>-1</sup> ), dicofol (100 µg L <sup>-1</sup> ) e permetrina (100 µg L <sup>-1</sup> ).....                                  | 58 |
| <b>Figura 16</b> - Grafico de linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450) para cada analito.....                                                                                                                                                                                                      | 60 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17</b> - Cromatograma (GC/ECD) do extrato do branco do método da extração SPE.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 62 |
| <b>Figura 18</b> - Cromatograma (GC/ECD) do extrato de amostra do grupo controle negativo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 63 |
| <b>Figura 19</b> - Sobreposição dos cromatogramas (GC/ECD) do extrato de amostra testemunha (preto) e de uma solução contendo uma mistura dos pesticidas (vermelho - 10µg L <sup>-1</sup> para dieldrin e endossulfam e 100µg L <sup>-1</sup> para dicofol e permetrina - 1: DBP; 2:α-endossulfam; 3:Dieldrin; 4:β-endossulfam; 5: Dicofol; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina)..... | 64 |
| <b>Figura 20</b> - Cromatograma (GC/ECD) do branco do método da extração QuEChERS.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 66 |
| <b>Figura 21</b> - Cromatograma (GC/ECD) do extrato de amostra do grupo controle negativo para o método de extração QuEChERS.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 66 |
| <b>Figura 22</b> - Avaliação dos efeitos dos diferentes adsorventes na porcentagem de recuperação dos analitos.....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 68 |
| <b>Figura 23</b> - Avaliação dos efeitos do volume do solvente e massa dos adsorventes e agente secante na porcentagem de recuperação dos analitos.....                                                                                                                                                                                                                                | 69 |
| <b>Figura 24</b> - Curvas analíticas (GC-ECD) no solvente (azul) e na matriz (vermelho) para cada analito.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 72 |
| <b>Figura 25</b> – Cromatograma das amostras GII CX1 W2, GII CX2 SD1, GIII CX1 SD2.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 79 |
| <b>Figura 26</b> - Sumário dos dados obtidos para os pesticidas quantificados nas amostras de tecido adiposo associado a ovários.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 80 |
| <b>Figura 27</b> - Comparação entre os dados das diferentes linhagens em cada dose para cada um dos pesticidas.....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 81 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Propriedades físico-químicas dos pesticidas dicofol, dieldrin, endossulfam e permetrina.....                         | 24 |
| <b>Tabela 2</b> - Métodos de análise de resíduos de pesticidas em diferentes tipos de matrizes com alto teor lipídico.....             | 33 |
| <b>Tabela 3</b> - Condições cromatográficas: GC/ECD e GC/MS.....                                                                       | 43 |
| <b>Tabela 4</b> - Grupos de animais e exposição aos pesticidas através da dieta.....                                                   | 45 |
| <b>Tabela 5</b> - Nível de fortificação empregado para os analitos nos diferentes métodos testados.....                                | 48 |
| <b>Tabela 6</b> - Testes realizados para otimização do método QuEChERS.....                                                            | 48 |
| <b>Tabela 7</b> - Nível de fortificação empregado para os analitos.....                                                                | 50 |
| <b>Tabela 8</b> - Condições iniciais de operação do GC/ECD.....                                                                        | 52 |
| <b>Tabela 9</b> - Tempos de retenção e desvio padrão dos pesticidas estudados (n = 8).....                                             | 57 |
| <b>Tabela 10</b> - Faixa linear, equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos pesticidas analisados por GC/ECD..... | 61 |
| <b>Tabela 11</b> - Valores obtidos para o LD e LQ do equipamento GC/ECD.....                                                           | 61 |
| <b>Tabela 12</b> - Porcentagens de recuperação dos pesticidas obtidos no estudo de recuperação (n=3) para o método SPE.....            | 64 |
| <b>Tabela 13</b> - Porcentagens de recuperação dos pesticidas obtidos no estudo inicial do método QuEChERS.....                        | 67 |
| <b>Tabela 14</b> - Valores de coeficiente angular, linear e de correlação para as curvas obtidas no solvente e na matriz.....          | 70 |
| <b>Tabela 15</b> - Efeito matriz observado na análise por GC/ECD dos analitos extraídos do tecido adiposo pelo método QuEChERS.....    | 71 |
| <b>Tabela 16</b> - Resultados obtidos no estudo de recuperação do método QuEChERS.....                                                 | 73 |
| <b>Tabela 17</b> - Resultados obtidos para o dicofol no estudo de recuperação do método QuEChERS.....                                  | 74 |
| <b>Tabela 18</b> - Resultados encontrados para LD e LQ dos analitos empregando o método QuEChERS.....                                  | 75 |

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 19</b> - Quantidade ( $\text{ng g}^{-1}$ ) de pesticidas encontrados nas amostras de diferentes tecidos de ratos do estudo biológico e estimativa do teor em tecido adiposo associado ao ovário..... | 76 |
| <b>Tabela 20</b> - Quantidade dos analitos ( $\text{ng g}^{-1}$ ) encontrados em tecido adiposo associado ao ovário de ratas submetidas a dietas contendo os pesticidas nas doses NOEL e LOEL .....            | 77 |
| <b>Tabela 21</b> - Sumário dos resultados observados para as análises das amostras, separados por pesticida e linhagem.....                                                                                    | 82 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|                 |                                                                       |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>ACN</b>      | Acetonitrila                                                          |
| <b>ANVISA</b>   | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                              |
| <b>ASE</b>      | Extração Acelerada com Solventes                                      |
| <b>ASTM</b>     | American Society for Testing Materials                                |
| <b>DBP</b>      | Diclorobenzofenona                                                    |
| <b>DDT</b>      | Diclorodifeniltricloroetano                                           |
| <b>DE</b>       | Desregulador Endócrino                                                |
| <b>DMSO</b>     | Dimetilsulfóxido                                                      |
| <b>d-SPE</b>    | Extração em Fase Sólida Dispersiva                                    |
| <b>ECD</b>      | Detector de Captura de Elétrons                                       |
| <b>EURACHEM</b> | Enfoque para Química Analítica na Europa                              |
| <b>GC</b>       | Cromatografia Gasosa                                                  |
| <b>GCB</b>      | Carbono Preto Grafitizado                                             |
| <b>GPC</b>      | Cromatografia de Permeação em Gel                                     |
| <b>HCB</b>      | Hexaclorociclobenzeno                                                 |
| <b>HPLC</b>     | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                              |
| <b>IARC</b>     | Agency for Research on Cancer                                         |
| <b>INMETRO</b>  | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| <b>IUPAC</b>    | International Union of Pure and Applied Chemistry                     |
| <b>LC</b>       | Cromatografia Líquida                                                 |
| <b>LD</b>       | Limite de Detecção                                                    |
| <b>LMR</b>      | Limite Máximo de Resíduo                                              |
| <b>LOEL</b>     | Menor Nível de Efeito Adverso Observável                              |
| <b>LQ</b>       | Limite de Quantificação                                               |
| <b>MAPA</b>     | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                   |
| <b>MS</b>       | Espectrometria de Massas                                              |
| <b>MSPD</b>     | Dispersão da Matriz em Fase Sólida                                    |
| <b>NOEL</b>     | Nível Sem Efeito Observável                                           |
| <b>p.a.</b>     | Grau Analítico                                                        |
| <b>HPAs</b>     | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos                               |
| <b>PARA</b>     | Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos                        |
| <b>PCBs</b>     | Bifenilas Policloradas                                                |
| <b>POPs</b>     | Poluentes Orgânicos Persistentes                                      |
| <b>PSA</b>      | Amina Primária e Secundária                                           |
| <b>QuEChERS</b> | Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe                           |
| <b>SINITOX</b>  | Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas                 |
| <b>SPE</b>      | Extração em Fase Sólida                                               |
| <b>UV</b>       | Ultra Violeta                                                         |
| <b>WAX</b>      | Sorvente de Troca Iônica Fraco                                        |
| <b>WHO</b>      | Organização Mundial da Saúde                                          |

## Sumário

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....                                                                     | 15 |
| 2. INTRODUÇÃO.....                                                                                                  | 17 |
| 2.1 Desreguladores endócrinos.....                                                                                  | 17 |
| 2.2 Pesticidas.....                                                                                                 | 20 |
| 2.2.1 Breve histórico .....                                                                                         | 20 |
| 2.2.2 Benefícios dos pesticidas.....                                                                                | 21 |
| 2.2.3 Malefícios dos pesticidas .....                                                                               | 22 |
| 2.2.4 Pesticidas empregados neste estudo.....                                                                       | 24 |
| 2.2.5 Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA).....                                       | 29 |
| 2.3 Métodos de análise de pesticidas.....                                                                           | 31 |
| 2.4 Validação de métodos analíticos .....                                                                           | 38 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                                                   | 40 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                        | 41 |
| 4.1. Materiais.....                                                                                                 | 41 |
| 4.1.1. Padrões analíticos dos pesticidas .....                                                                      | 41 |
| 4.1.2 Solventes e reagentes .....                                                                                   | 41 |
| 4.1.3. Vidraria e equipamentos .....                                                                                | 41 |
| 4.1.4 Equipamentos.....                                                                                             | 41 |
| 4.2. Métodos .....                                                                                                  | 42 |
| 4.2.1.Limpeza de vidraria.....                                                                                      | 42 |
| 4.2.2 Preparo das soluções dos padrões .....                                                                        | 42 |
| 4.2.3 Condições Cromatográficas.....                                                                                | 43 |
| 4.2.4 Identificação dos pesticidas .....                                                                            | 43 |
| 4.2.5 Determinação da faixa linear e da linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450)<br>.....                       | 43 |
| 4.2.6 Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do<br>equipamento (GC/ECD, Varian 450)..... | 44 |
| 4.2.7 Obtenção das amostras de Tecido Adiposo.....                                                                  | 44 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.8 Preparo inicial das amostras de tecido adiposo .....                                                                  | 45 |
| 4.2.9 Métodos de extração e <i>Clean-up</i> .....                                                                           | 45 |
| 4.2.10 Avaliação dos métodos de extração – Estudo prévio de seletividade e recuperação.....                                 | 47 |
| 4.2.11 Otimização do método de extração QuEChERS .....                                                                      | 48 |
| 4.2.12 Estimativa da quantidade de lipídios .....                                                                           | 49 |
| 4.2.13 Validação do método .....                                                                                            | 49 |
| 4.2.14 Aplicação do método proposto às amostras de tecido adiposo associado aos ovários dos animais de experimentação ..... | 51 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....                                                                                            | 52 |
| 5.1 Condições cromatográficas .....                                                                                         | 52 |
| 5.2 Estudo do dicofol.....                                                                                                  | 54 |
| 5.3 Identificação dos pesticidas.....                                                                                       | 57 |
| 5.4 Determinação da faixa linear e linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450) .....                                       | 59 |
| 5.5 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do equipamento (GC/ECD, Varian 450).....                 | 61 |
| 5.6 Estimativa da quantidade de lipídios .....                                                                              | 62 |
| 5.7 Métodos de extração e <i>Clean-up</i> .....                                                                             | 62 |
| 5.7.1 Extração em fase sólida (SPE) com alumina 4,6% desativada .....                                                       | 62 |
| 5.7.2 Método extração QuEChERS .....                                                                                        | 65 |
| 5.7.3 Otimização do método QuEChERS .....                                                                                   | 67 |
| 5.7.4 Curva analítica e estudo de efeito matriz .....                                                                       | 70 |
| 5.7.5 Estudo de recuperação .....                                                                                           | 73 |
| 5.7.6 Limites de detecção e quantificação do método.....                                                                    | 75 |
| 5.7.6 Análise das amostras provenientes dos ensaios biológicos .....                                                        | 76 |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                                          | 83 |

## 1. APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pesticidas, praguicidas, biocidas, fitossanitários, agrotóxicos ou defensivos agrícolas expressam as várias denominações dadas a um mesmo grupo de substâncias químicas, cuja finalidade central é controlar pragas e doenças presentes na agricultura e pecuária (BRASIL, 2006). Neste trabalho será adotado o termo “pesticida”, uma vez que é o mais utilizado na área da química.

O uso dos pesticidas no Brasil teve início na década de 1940, com a chegada do DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) e, desde então, estas substâncias tem sido utilizadas de maneira gradativa e indiscriminada, uma vez que o consumo a nível nacional dos pesticidas cresceu 700% nos últimos 40 anos, enquanto que a área agrícola aumentou 78% (SPADOTTO, 2006).

Para um maior controle sobre o nível de resíduos de pesticidas que chegam à mesa da população brasileira, a ANVISA iniciou em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). Os resultados divulgados permitem concluir que grande parte das frutas, verduras e legumes apresentam algum tipo de irregularidade quanto ao nível de resíduo ou ao tipo de ingrediente ativo encontrado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008b; 2010).

Tendo em vista esta exposição da população, que ocorre via ingestão de alimentos de origem vegetal, *in natura*, profissionais de diferentes áreas organizaram um projeto temático para avaliar os possíveis efeitos que misturas de pesticidas, em baixas doses podem causar em animais de experimentação (Projeto FAPESP temático nº 2006/60506-1, coordenado pelo Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo da FM-Botucatu). Os pesticidas inseridos neste estudo (dieldrin, dicofol, permetrina, diclorvós e endossulfam) além de terem sido encontrados em amostras de vegetais coletadas em diversas regiões do país (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008a), também são apontados como carcinogênicos e/ou alteradores endócrinos.

No âmbito deste projeto temático, o Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESO), no qual foi desenvolvida esta dissertação, integra o referido projeto temático, tendo como atribuição, desenvolver e validar métodos que sejam adequados à determinação de resíduos dos pesticidas

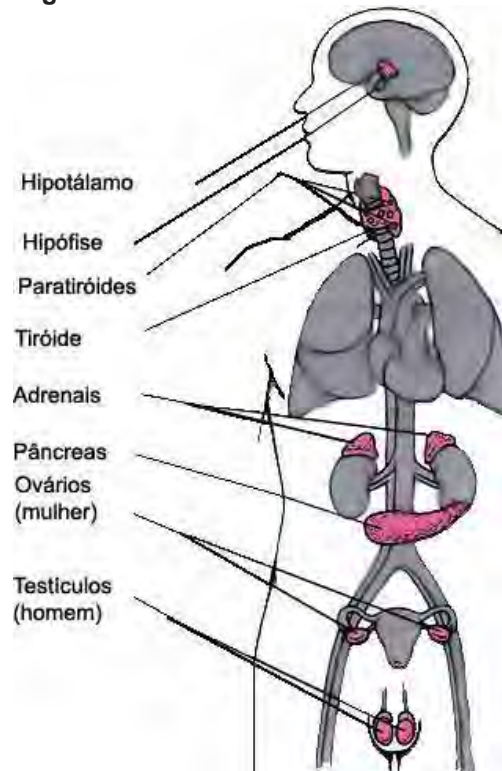
estudados nos tecidos biológicos dos animais de experimentação para que seja possível uma discussão conjunta dos químicos e biólogos. Especificamente quanto ao tema desta dissertação, o estudo biológico visava avaliar a influência da mistura de pesticidas em baixas doses sobre o ciclo menstrual, a capacidade reprodutiva e a prevalência de carcinomas no sistema reprodutivo de ratas expostas via alimentação. Desta maneira, a matriz escolhida para avaliar a bioacumulação dos pesticidas foi o tecido adiposo associado aos ovários. O diclorvós inserido no projeto temático não está presente neste projeto, pois esse composto é rapidamente metabolizado no fígado, e possui um tempo de meia vida em torno de 25 minutos no organismo de mamíferos (TOMLIN, 2004).

## **2. INTRODUÇÃO**

### **2.1 Desreguladores endócrinos**

Uma das grandes preocupações mundiais atuais refere-se à contaminação ambiental. Dentre as diversas classes de contaminantes existentes destacam-se as substâncias denominadas poluentes orgânicos persistentes (POPs), que são persistentes no ambiente, tóxicos e por apresentarem alta lipofilicidade se bioacumulam e biomagnificam na cadeia alimentar (ELJARRAT; BARCELÓ, 2003). Outra classe de poluentes que recebe grande atenção são os contaminantes emergentes, que são produtos químicos ou materiais que apresentam alguma ameaça para a saúde humana e meio ambiente, mas que ainda não são legislados (MURNYAK et al., 2011). Existe ainda, uma terceira classe de substâncias orgânicas, alvo de muitas pesquisas, que podem ser POPs ou contaminantes emergentes, e são denominadas desreguladores endócrinos (DEs), por possuírem a capacidade de interferir no sistema endócrino de seres humanos e outros animais.

O sistema endócrino (Figura 1) é constituído por um conjunto de glândulas e pelos hormônios por elas sintetizados, sendo responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo dos seres vivos (BIRKETT; LESTER, 2003).

**Figura 1** - Sistema endócrino

Fonte: Google Imagens

Os DEs podem interferir no sistema endócrino por meio de mecanismos e ações bastante complexos que incluem bloqueio, mimetização, estimulação ou inibição da produção dos hormônios naturais (GRUND et al., 2011). Dentre estes mecanismos de ação, os mais comuns são os efeitos denominados agonista e antagonista (Figura 2).

**Figura 2** - Processo de alteração endócrina: a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista

Fonte: Adaptado de Birkett e Lester (2003)

No primeiro caso, efeito agonista (Figura 2b), a molécula pode se ligar ao receptor e produzir uma resposta, agindo como mimetizador do hormônio. Por outro lado a substância pode ajustar-se ao receptor, mas não produzir nenhuma resposta, impedindo assim, a interação do hormônio natural com o receptor (efeito antagonista, Figura 2c).

Estas substâncias capazes de afetar o sistema endócrino podem ser naturais ou sintéticas. Dentre as naturais destacam-se os estrógenos (17 $\beta$ -estradiol, estrona e estriol) e fitoestrógenos (genisteína e metaresinol). Na classe das substâncias sintéticas estão presentes os PCBs, alquilfenóis, HPAs, ftalatos, bisfenol A, estrógenos sintéticos e os pesticidas (BILA; DEZOTTI, 2007). Dentro dessas classes de substâncias, a que possui maior número moléculas classificadas como DEs são os pesticidas, com 105 substâncias listadas, onde 46% são inseticidas, 21% herbicidas e 31% fungicidas (MNIF et al., 2011).

A exposição aos DEs ocorre principalmente através da ingestão de alimentos contaminados. Estima-se que, para o ser humano, mais de 90% destas substâncias são absorvidas pela via digestiva (REYS, 2001 apud BILA; DEZOTTI, 2007). Esta alta taxa pode ser explicada pela contaminação da água potável, frutas e verduras contaminadas com pesticidas e também devido ao fato de grande parte dos DEs serem lipofílicos e bioacumularem nos diversos estratos da cadeia alimentar, estando presentes em ovos, carne, leite, etc.

Diversas agências governamentais internacionais, especialmente dos EUA, Japão e União Européia, estão desenvolvendo programas de testes e estratégias para avaliar a segurança quanto à desregulação endócrina para seres humanos e animais, causados por produtos químicos usados atualmente. Mesmo com grandes esforços, principalmente nas últimas duas décadas, a respeito de avaliação da segurança química, ainda não existe uma estratégia definida de ensaio e critério para o monitoramento ambiental e avaliação de risco para os DEs (BILA; DEZOTTI, 2007).

## **2.2 Pesticidas**

Segundo a organização mundial da saúde os pesticidas são substâncias químicas utilizadas para controlar as pragas, incluindo insetos, fungos, roedores e plantas indesejáveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Podem ser classificados seguindo dois critérios principais: classe química e organismo alvo. Com relação à estrutura química são divididos em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outras. De acordo com a classificação por organismo alvo podem ser inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, etc. (RIBEIRO et al., 2008).

### **2.2.1 Breve histórico**

O primeiro relato existente sobre o uso de pesticidas é de 2500 a.C., com o uso de compostos de enxofre para controlar insetos e ácaros. Com o passar do tempo muitos outros métodos foram utilizados, principalmente para melhorar a produtividade agrícola. Porém, foi após a descoberta do poder inseticida do diclorodifeniltricloroetano (DDT) em 1939 que os pesticidas tornaram-se mais populares, com baixo custo e elevada eficiência (AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Desde então, numerosos pesticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos) foram desenvolvidos e amplamente utilizados em todo o mundo com poucas restrições e orientações. O uso dos pesticidas apresenta um grande benefício para a saúde humana, pois controlam as pragas agrícolas (incluindo doenças e plantas daninhas) e vetores que causam doenças em plantas. Além disso, seu uso garante o aumento da produção e o fornecimento seguro de alimentos (COOPER; DOBSON, 2007).

Entretanto, muitos pesticidas da primeira geração, apresentaram características prejudiciais à saúde humana e ao ambiente. Alguns deles podem persistir no solo e sedimento aquático, bioacumular-se em tecidos de animais vertebrados e invertebrados, concentrarem-se pela cadeia trófica e afetar os maiores predadores (MNIF et al., 2011). A primeira manifestação ecológica contra o uso indiscriminado do DDT foi a publicação do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel

Carson, em 1962. Neste livro, a autora sugere que o amplo uso do DDT poderia ser o principal responsável pela redução populacional de aves que se encontravam no topo da cadeia alimentar (CARSON, 1969).

Porém, foi apenas em 1970 que o DDT e outros organoclorados começaram a ser proibidos. A Suécia foi o primeiro país do mundo a banir o uso destes pesticidas, sendo seguida por outros países, onde o uso dessas substâncias eram permitidos apenas em programas para controle de doenças (OMS, 1982 apud AMATO; TORRES; MALM, 2002).

No Brasil, as primeiras medidas restritivas ocorreram em 1971, mas foi apenas em 1985 que o uso, comercialização e distribuição de alguns produtos organoclorados destinados a agricultura foram proibidos em todo o território nacional (BRASIL, 1985).

### **2.2.2 Benefícios dos pesticidas**

Quando utilizados de forma adequada e criteriosa os pesticidas podem proteger os alimentos e outras culturas quanto a danos excessivos por pragas e doenças. Também protegem a saúde humana e animal de doenças transmitidas por vetores, garantem a proteção dos produtos frescos durante o transporte em longas distâncias e a preservação dos alimentos a granel (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2010).

O uso dos pesticidas é responsável por inúmeras consequências de caráter positivo, beneficiando em ordem mundial fazendeiros, consumidores, pesquisadores e indivíduos de muitos outros grupos (COOPER; DOBSON, 2007). Estima-se que 70% da população subalimentada (aproximadamente 700 milhões de pessoas) vivem em zonas rurais, onde a agricultura fornece diretamente os alimentos ou é fonte de salário responsável pela alimentação dos trabalhadores (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2010).

Segundo Cooper e Dobson (2007), os benefícios relacionados ao uso dos pesticidas podem ocorrer a curto, médio e longo prazo. Os resultados imediatos podem ser divididos em três categorias:

- 1) Controle de pragas agrícolas e vetores de doenças de plantas

- 2) Controle de vetores de doenças e organismos nocivos a animais e humanos
- 3) Impedir ou controlar os organismos que prejudicam outras atividades humanas ou suas estruturas.

Dos três principais efeitos listados acima, 57 benefícios de ordem primária e secundária foram identificados e vão desde a proteção da relva de lazer até a preservação de vidas humanas e a conservação da biodiversidade. Esses benefícios abrangem três classes: a social, que diz respeito à saúde, qualidade de vida e bem-estar da população; a econômica, tais como rendimentos agrícolas, custos e lucros; e por fim a ambiental, nos compartimentos terrestre, aquático e atmosférico.

### **2.2.3 Malefícios dos pesticidas**

Pesquisas recentes indicam que o Brasil possui o maior mercado de pesticidas do mundo, com 107 empresas aptas a registrar produtos, representando assim 16% do mercado mundial. Durante o ano de 2009, no Brasil, foram vendidas mais de 780 mil toneladas de produtos formulados, para uso como pesticida. A entrada desses produtos em território nacional aumentou 236% entre 2000 e 2007, colocando o Brasil na sexta posição no ranking mundial de importação de pesticidas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2011).

O setor de pesticidas é o que mais investe em pesquisa e desenvolvimento, e graças ao esforço em inovação tecnológica, quando comparados os produtos lançados recentemente com os utilizados na década de 1960 podem ser observadas reduções de cerca de 90% na dose e de 160 vezes na toxicidade aguda, além do surgimento de novos mecanismos de ação e menor impacto ambiental (MENTEN et al., 2011).

Mesmo com todo esse investimento os pesticidas são considerados um problema para a saúde humana e ambiental devido a uma série de fatores como sua ampla utilização somada ao desconhecimento dos riscos associados a ela, o desrespeito às normas básicas de segurança, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras, a livre comercialização e os problemas sociais encontrados no meio rural (BARBOSA et al., 2010).

Os pesticidas podem causar diversos efeitos sobre a saúde humana. Um grande problema relacionado à saúde populacional e ao uso dos pesticidas são os casos de intoxicação, que podem ocorrer de duas maneiras distintas. A intoxicação aguda manifesta-se através de um conjunto de sinais e sintomas que aparecem alguns minutos ou algumas horas após a exposição excessiva a um toxicante. Esta exposição geralmente é única e ocorre num período de até 24 horas, acarretando efeitos rápidos sobre a saúde. Já a intoxicação crônica pode ocorrer devido a uma exposição ocupacional e/ou ambiental, onde os efeitos danosos à saúde surgem no decorrer de repetidas exposições ao toxicante, que normalmente ocorrem durante longos períodos de tempos, onde os casos clínicos são muitas vezes irreversíveis (BRASIL, 2006).

Segundo dados divulgados pelo SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) no ano de 2009, no Brasil, foram registrados mais de 11000 casos de intoxicação causados por pesticidas, com aproximadamente 190 óbitos (BRASIL, 2011a; 2011b).

Além das intoxicações, os pesticidas também podem ser responsáveis por outras doenças como alergias, câncer, distúrbios neurológicos e reprodutivos (MNIF et al., 2011). Muitos desses danos estão diretamente ligados ao fato de que grande parte dos pesticidas possui a capacidade de interferir no sistema endócrino de humanos e animais.

No ambiente, os pesticidas podem contaminar os compartimentos aquático, terrestre e atmosférico (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). Além disso, são muitas vezes persistentes e podem se deslocar até áreas remotas (LACORTE et al., 2009). Com relação à vida selvagem, existe certa vulnerabilidade aos efeitos de desregulação endócrina causada principalmente pelos pesticidas da classe dos organoclorados e que atingem principalmente o sistema reprodutor de pássaros, répteis, invertebrados, peixes e mamíferos (MNIF et al., 2011).

## 2.2.4 Pesticidas empregados neste estudo

Serão estudados os pesticidas dieldrin, endossulfam e dicofol da classe dos organoclorados e a permetrina da classe dos piretróides, cujas propriedades físico-químicas encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** - Propriedades físico-químicas dos pesticidas dicofol, dieldrin, endossulfam e permetrina

| Pesticida        | Nº CAS     | Fórmula Molecular                                              | Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> ) | Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> ) | K <sub>ow</sub> |
|------------------|------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| Dicofol          | 115-32-2   | C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> O               | 370,5                                  | 0,8 (25°C)                                 | 4,30            |
| Dieldrin         | 60-57-1    | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O               | 380,9                                  | 0,186 (20°C)                               |                 |
| Alfa-endossulfam | 959-98-8   | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S | 406,9                                  | 0,32 (22°C)                                | 4,74            |
| Beta-endossulfam | 33213-65-9 |                                                                |                                        | 0,33 (22°C)                                | 4,79            |
| Cis-permetrina   | 54774-45-7 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 391,3                                  | 0,006 (20°C)                               | 6,10            |
| Trans-permetrina | 51877-74-8 |                                                                |                                        |                                            |                 |

### 2.2.4.1 Pesticidas organoclorados

Os pesticidas organoclorados são assim classificados pois apresentam átomos de cloro em sua estrutura química. Suas propriedades físico-químicas conferem a estas substâncias resistência a biodegradação e alta lipossolubilidade e, por este motivo tendem a bioacumular-se nos tecidos dos animais e biomagnificar-se pela cadeia alimentar (HERRERO-MERCADO et al., 2010; MNIF et al., 2011). Dentre os pesticidas organoclorados destacam-se o DDT e derivados, aldrin, dieldrin, endossulfam, dicofol, heptacloro, lindano, mirex, hexaclorobenzeno e o metoxicloro. Alguns desses organoclorados foram proibidos na década de 1970, mas ainda são detectados no ambiente (CHOPRA; SHARMA; CHAMOLI, 2011).

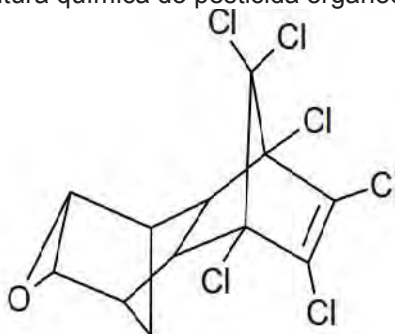
Entre os sintomas da intoxicação aguda causada por estas substâncias encontram-se os tremores, dores de cabeça, irritação dérmica, problemas respiratórios, tonturas, náuseas e convulsões. Os organoclorados também estão associados a várias doenças crônicas, que incluem vários tipos de câncer, danos neurológicos, doença de Parkinson, defeitos congênitos, doença respiratória e disfunção do sistema imunológico (CHOPRA; SHARMA; CHAMOLI, 2011).

Apesar das características indesejáveis dos pesticidas organoclorados, vários deles ainda têm o uso autorizado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e ANVISA, sendo que alguns só estão regulamentados para o combate a vetores de doenças endêmicas, como a dengue e a malária. No entanto, pela falta de controle na comercialização, podem estar sendo utilizados para outros fins.

#### 2.2.4.1.1 Dieldrin

O dieldrin, também denominado dieldrina pela ANVISA (Figura 3 e Tabela 1) foi extensamente utilizado como inseticida, particularmente nas culturas de algodão e milho, de 1950 a 1970. A partir da década de 1970 até final de 1987 seu uso ficou restrito ao controle de cupins e depois foi banido no Brasil. Tem como isômero o pesticida endrin e pode ser formado a partir da degradação do aldrin (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2008).

**Figura 3** – Estrutura química do pesticida organoclorado dieldrin



As propriedades físico-químicas do dieldrin (baixa hidrossolubilidade, elevada estabilidade e semi-volatilidade) favorecem seu transporte a longas distâncias e determinam as condições necessárias para a bioconcentração e biomagnificação. (ATSDR, 2002 apud COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2008).

O dieldrin foi uma das 12 substâncias classificadas como poluente orgânico persistente (POP) pela convenção de Estocolmo em 2001. É considerado obsoleto

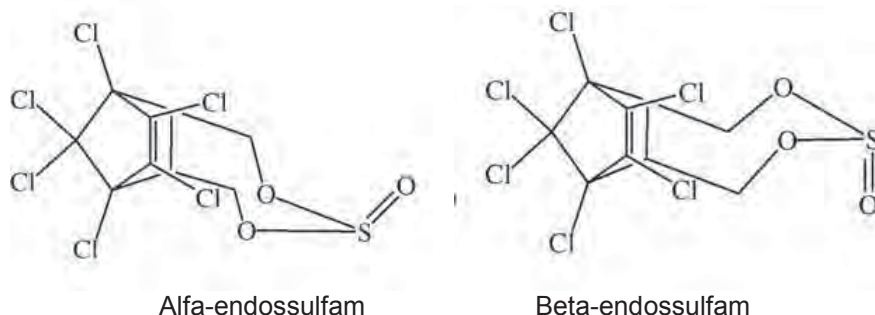
pela Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization) e classificado no Grupo 3 pela Agência Internacional em Pesquisa do Câncer (IARC - Agency for Research on Cancer), que concluiu não haver evidências de carcinogenicidade para o homem e somente evidências limitadas em animais de experimentação (ELJARRAT; BARCELO, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2011). Quanto aos efeitos causados ao sistema endócrino, existem diversos estudos que comprovam diferentes formas de ação deste pesticida (MNIF et al., 2011).

#### 2.2.4.1.2 Endossulfam

O pesticida endossulfam é composto por uma mistura de dois isômeros, alfa-endossulfam e beta-endossulfam (Figura 4 e Tabela 1). Foi amplamente utilizado durante aproximadamente cinco décadas por muitos países por apresentar grande eficácia no combate a insetos e ácaros. É classificado como moderadamente perigoso (Classe II) pela Organização Mundial da Saúde (WEBER et al., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Devido a suas características físicas (semi-volatilidade e elevada persistência) é considerado um contaminante de diferentes compartimentos ambientais e, em abril de 2011 foi adicionado à lista dos POPs da convenção de Estocolmo (WEBER et al., 2010; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2011).

**Figura 4** – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado endossulfam

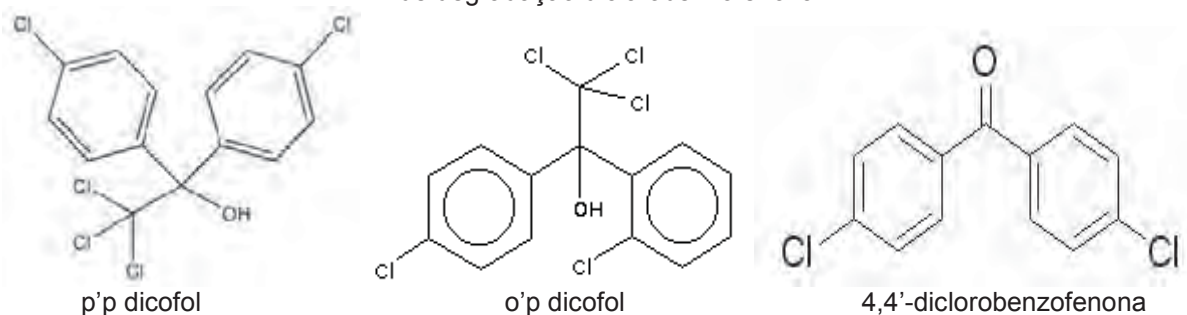


No Brasil, o endossulfam tem seu uso permitido pela ANVISA para as culturas de algodão, café, cana-de-açúcar e soja. Mas apresenta-se em processo de retirada programada em nível nacional até 31 de julho de 2014, devido a uma reavaliação toxicológica que indicou que esta substância apresenta características genotóxicas, neurotóxicas, imunotóxicas e provoca toxicidade endócrina ou hormonal e toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento embriofetal (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011b; BRASIL, 2010).

#### 2.2.4.1.3 Dicofol

O dicofol (Figura 5 e Tabela 1) foi introduzido comercialmente a partir de 1955 e utilizado como acaricida. No Brasil seu uso é permitido nas culturas de algodão, citros e maçã (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011b). É composto por dois isômeros, 80% de p'p dicofol e 20% o'p dicofol e facilmente degradado pela luz para 4,4'-diclorobenzofenona (Figura 5). Também possui em sua composição DDT e seus derivados em pequenas quantidades (menos que 0,1%) (TOMLIN, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

**Figura 5** – Estrutura química dos isômeros do pesticida organoclorado dicofol e seu principal produto de degradação diclorobenzofenona



Assim como o dieldrin e endossulfam, o dicofol apresenta elevada persistência no ambiente, se acumula nos tecidos mais lipídicos do corpo e é capaz de interferir no sistema endócrino (MNIF et al., 2011). É classificado como moderadamente tóxico pela WHO e classificado no Grupo 3 pela IARC, que concluiu

não haver evidências de carcinogenicidade para o homem e somente evidências limitadas em animais de experimentação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2011).

#### **2.2.4.2 Piretróides**

Os pesticidas piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA; MARTÍNEZ, 2009). O uso dos piretróides na agricultura iniciou-se na década de 1970 após a inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e halogênios em suas estruturas para aumentar a estabilidade da molécula (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

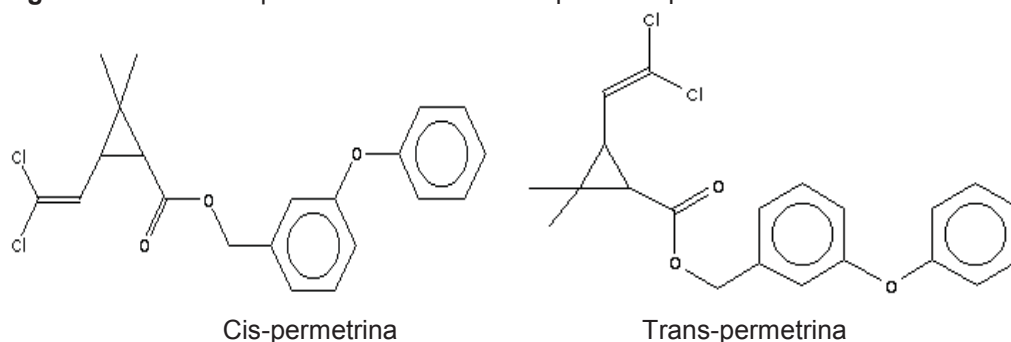
Os piretróides ocorrem naturalmente como mistura de formas estereoisoméricas. A atividade biológica dos piretróides é dependente da estrutura química e configuração estérica. A razão cis/trans é uma das variáveis que determina a toxicidade da mistura racêmica, onde os isômeros cis apresentam maior toxicidade (KANERO, 1981; SODERLUNG, 2002; VALENTINE 1990 apud SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Os inseticidas piretróides surgiram como uma alternativa aos organoclorados mas a exposição crônica e intensa por via oral, como é o caso da exposição a resíduos em alimentos de diversas origens, pode causar danos à saúde humana (SCHETTGEN et al., 2002). Os piretróides também podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais e em tecidos de animais (ALBASEER et al., 2010; RAWN; JUDGE; ROSCOE, 2010).

##### **2.2.4.2.1 Permetrina**

A permetrina (Figura 6 e Tabela 1) é utilizada como inseticida e formicida e apresenta em sua composição a soma dos isômeros cis-permetrina e trans-permetrina (TOMLIN, 2004). No Brasil pode ser utilizada nas culturas de algodão, arroz, café, citros, couve, couve-flor, feijão, fumo, milho, repolho, soja, tomate, trigo, uva e também pode ser utilizada para controle de formigas.

**Figura 6** – Estrutura química dos isômeros do pesticida permetrina



Mesmo sendo um piretróide, recebe a mesma classificação que o endossulfam e o dieldrin quanto à sua toxicidade e carcinogenicidade, sendo classificado como moderadamente tóxico pela WHO e classificado no Grupo 3 pela IARC. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2011). E também é capaz de interferir no sistema endócrino de animais (MNIF et al., 2011).

### 2.2.5 Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)

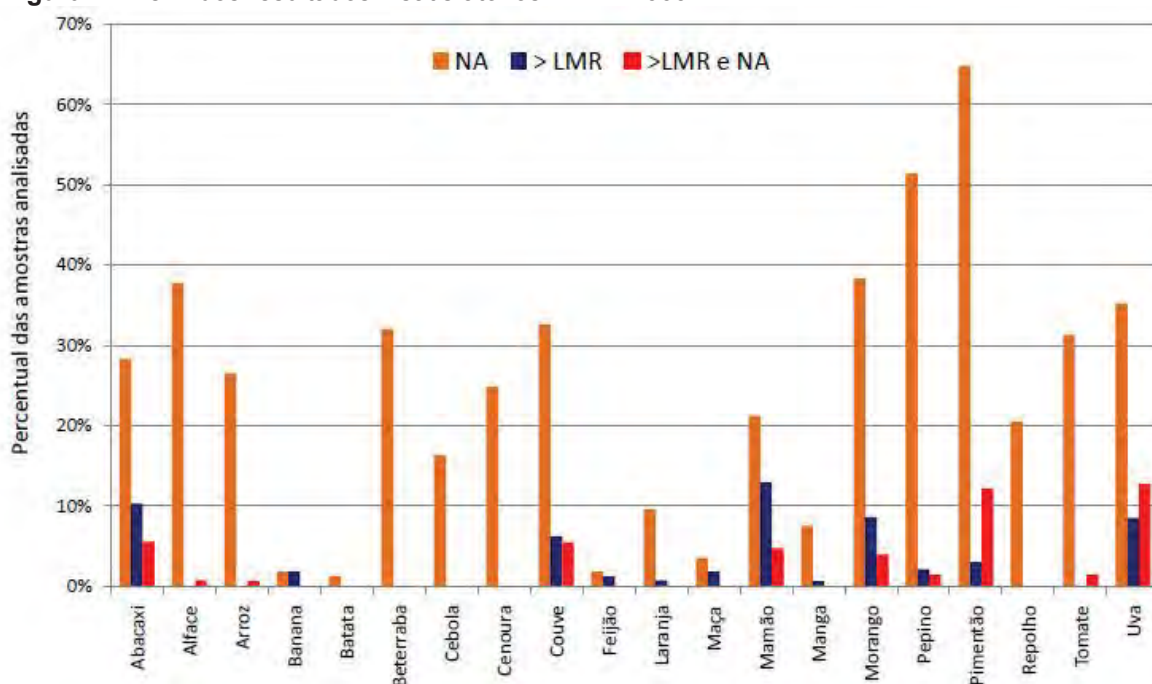
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2001, iniciou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do governo em atender a segurança alimentar e evitar possíveis agravos a saúde da população (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008b).

Para a escolha dos alimentos a serem amostrados e analisados pelos laboratórios foram utilizados os dados de consumo anual e suas disponibilidades no comércio dos diferentes estados que fazem parte do programa. Já para a escolha dos ingredientes ativos pesquisados foram levados em consideração os dados referentes à utilização dos agrotóxicos no país, e as informações existentes nos laboratórios quanto aos resíduos de pesticidas que são usualmente detectados em alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008b).

O PARA iniciou-se analisando 92 ingredientes ativos em nove culturas de 16 estados do Brasil. No último relatório divulgado (2009) foram avaliados 234 ingredientes ativos em praticamente todos os estados do país (o estado de Alagoas foi adicionado ao programa apenas em 2010). As culturas avaliadas foram abacaxi, alface, arroz, banana, batata, beterraba, cenoura, cebola, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho, tomate e uva (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Neste programa são classificados como resultados insatisfatórios as amostras que apresentam o ingrediente ativo acima do limite máximo permitido e as amostras que apresentaram resíduos de pesticidas que não são autorizados para seu tipo de cultura. Neste último relatório foram analisadas um total de 3130 amostras, onde 907 amostras apresentaram resultados insatisfatórios, ou seja, 29% das amostras analisadas (Figura 7) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

**Figura 7** - Perfil dos resultados insatisfatórios PARA 2009



NA = não autorizado LMR = Limite Máximo de Resíduo

Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010

Analisando os resultados insatisfatórios (Figura 7) pode-se observar que o maior problema encontrado está relacionado ao uso de ingredientes ativos em culturas onde não são permitidos. Dentre os pesticidas envolvidos no presente projeto todos apresentaram resultados insatisfatórios, dando destaque ao dieldrin, que foi banido no Brasil há mais de 20 anos e foi encontrado em uma amostra de feijão e principalmente ao endossulfam, que se encontra em processo de retirada e foi encontrado de forma irregular em amostras de 13 diferentes culturas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

### 2.3 Métodos de análise de pesticidas

A determinação de resíduos de pesticidas em matrizes ambientais (ar, solo, água) e em matrizes biológicas (alimentos e tecidos) é de extrema importância para avaliar a ocorrência e a exposição humana a essas substâncias.

Embora existam inúmeros métodos desenvolvidos para determinação de pesticidas e um grande avanço quanto à detectabilidade da instrumentação analítica, esta atividade ainda é considerada um desafio devido às baixas concentrações esperadas, as diferentes propriedades químicas das moléculas e a complexidade das matrizes (PICÓ; BLASCO; FONT, 2003; GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009).

Os métodos de análise de resíduos de pesticidas envolvem duas etapas principais: o isolamento dos pesticidas da matriz (tratamento da amostra) e o método analítico para sua determinação. A etapa de tratamento da amostra inclui a extração dos analitos, a purificação do extrato (*clean-up*), a concentração e o preparo dos analitos para quantificação.

Na literatura dos últimos dez anos, os pesticidas mais estudados têm sido os piretróides, por sua ampla utilização, e os organoclorados, pela sua persistência e toxicidade, apesar de oficialmente terem uso mais restrito. Estes estudos enfocam as mais diversas matrizes, com destaque para aquelas com alto teor lipídico uma vez que pelas propriedades físico-químicas destas classes de compostos, são lipossolúveis, sendo, portanto, estas as preferidas em estudos ambientais ou para

determinação da dose corpórea de organismos. Porém, no ponto de vista analítico são as mais complexas (TOLEDO NETTO, 2009).

Na Tabela 2 está apresentado um resumo dos métodos utilizados recentemente para quantificação dos pesticidas organoclorados e piretróides em matrizes com elevado teor lipídico.

**Tabela 2** - Métodos de análise de resíduos de pesticidas em diferentes tipos de matrizes com alto teor lipídico

| Referência                          | Matriz/ analitos                                                             | Tratamento da amostra (simplificado)                                                                                                                                                                                            | Técnica de análise | Concentração encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )                                                 |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LEHOTAY;<br>MASTOVSKA;<br>YUN, 2005 | Alimentos gordurosos (leite, abacate, etc) / pesticidas multiclasse          | método - QuEChERS<br>1) Extração com acetonitrila acidificada<br>2) SPE dispersiva com PSA e C18<br>método – MSPD<br>1) MSPD: C18 e sulfato de sódio anidro<br>2) SPE: Florisil e mistura, eluição com acetonitrila acidificada | GC/MS e LC/MS      | NA                                                                                             |
| MUÑOZ-DE-TORO et al., 2006          | Tecido adiposo de mulheres/ pesticidas organoclorados                        | 1) Extração com éter de petróleo<br>2) SPE: alumina e éter de petróleo (eluente)<br>3) SPE: florisil e éter de petróleo/éter etílico (eluente)                                                                                  | GC/ECD             | Valores máximos entre 0,2 e 4,8                                                                |
| PANG et al., 2006                   | Tecido animal/ pesticidas multiclasse                                        | 1) Extração com ciclohexano/acetato de etila<br>3) Clean up: GPC                                                                                                                                                                | GC/MS e LC/MS-MS   | NA                                                                                             |
| CHEN et al., 2007                   | Tecido adiposo humano e gordura de peixe/ pesticidas organoclorados          | 1) Extração com éter de petróleo (ultrassom)<br>2) SPE: florisil. Eluição com acetato de etila/éter de petróleo                                                                                                                 | GC/ECD             | Valores médios (tecido adiposo humano)<br>DDT=3,800 e HCH=0,898                                |
| CUNHA et al., 2007                  | Óleo de oliva/pesticidas multiclasse                                         | QuEChERS<br>1) Extração sólido-líquido com acetonitrila<br>2) SPE dispersiva com PSA, GCB e C18                                                                                                                                 | GC/MS e LC/MS      | NA                                                                                             |
| KODBA;<br>VONCINA, 2007             | Alimentos gordurosos/ pesticidas piretróides e organoclorados                | 1) MSPD: celite e eluição com DMSO<br>2) SPE: florisil desativado (15%). Eluição Hexano/éter dietílico                                                                                                                          | GC/ECD             | NA                                                                                             |
| KUVAREGA;<br>TARU, 2007             | Fígado, músculo e tecido adiposo de ratos/ Endossulfam e endossulfam sulfato | 1) MSPD: alumina<br>2) Extração com solvente: hexano<br>3) Soxhlet: utilizando sólido e sobrenadante do item 2<br>4) SPE- sílica<br>4) SPE-florisil e hexano (eluente)                                                          | GC/ECD             | Valores máximos para endossulfam<br>Fígado: 5810<br>Músculo: 5110<br>Tecido adiposo: 4790      |
| GOULART et al., 2008                | Leite/pesticidas piretróides                                                 | 1) Extração com acetonitrila<br>2) Partição em baixa temperatura                                                                                                                                                                | GC/ECD             | Deltametrina <LD a 1,45 (µg L <sup>-1</sup> )<br>Cipermetrina <LD a 3,68 (µg L <sup>-1</sup> ) |

\*NA (não aplicado em amostras reais)

Tabela 2 (continuação)

| Referência                  | Matriz/ analitos                                                                 | Tratamento da amostra (simplificado)                                                                                           | Técnica de análise | Concentração encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )                                                  |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LOPEZ-ESPINOSA et al., 2008 | Tecido adiposo humano/pesticidas organoclorados                                  | 1) Extração sólido-líquido com hexano<br>2) SPE: alumina desativada (5%). Eluição com hexano                                   | GC/ECD e HPLC/UV   | Média<br>Dieldrin: 130<br>Endossulfam:<br>Alfa: =8 ; Beta = 220                                 |
| BEHROOZ et al., 2009        | Leite humano / pesticidas organoclorados                                         | 1) Extração com hexano:diclorometano<br>2) SPE: alumina 44% acidificada. Eluição hexano:diclorometano                          | GC/ECD             | ΣDDTs<br>Médias entre 1570 e 3560                                                               |
| GUAN; BREWER; MORGAN, 2009  | Alimentos gordurosos / Pesticidas organoclorados e fosforados                    | 1) Extração com acetonitrila<br>2) Extração com pipeta descartável - sorvente de troca aniônica fraca (WAX) e solução item 1.  | GC/MS              | NA                                                                                              |
| TOLEDO NETTO, 2009          | Tecido adiposo de rato / Pesticidas organoclorados e piretróides                 | 1) Extração em ultrassom com hexano<br>2) SPE: alumina 4,6% desativada. Eluição com hexano: diclorometano                      | GC/ECD             | Valores máximos<br>Dicofol: 12000 Dieldrin: 2000<br>Beta-endossulfan: 63                        |
| ALLÉ et al., 2009           | Tecido adiposo humano e leite / pesticidas organoclorados                        | 1) Mistura com sulfato de sódio anidro<br>2) SPE com mistura do item 1 e florisil. Eluição petróleo de benzeno e diclorometano | GC/ECD             | Valore máximo<br>Endossulfam (alfa + beta)<br>13792                                             |
| CARVALHO, 2010              | Fígado de rato / pesticidas organoclorados e piretróides                         | 1) Extração com acetato de etila em ultrassom<br>2) SPE: florisil . Eluição acetato de etila                                   | GC/ECD             | Valores máximos<br>Dicofol = 1280<br>Dieldrin = 5380<br>Endossulfan<br>Alfa = 7970; Beta = 9590 |
| PETRO et al., 2010          | Tecido adiposo, fígado, rim músculo e ovário de vaca / pesticidas organoclorados | 1) Extração com hexano:acetona –Soxhlet<br>2) SPE: Sílica 44% acidificada. Eluição com Hexano: diclorometano                   | GC/MS              | Valores máximos (tecido adiposo):<br>p,p'-DDE = 13,5<br>p,p'-DDT = 1,1                          |

\*NA (não aplicado em amostras reais)

Tabela 2 (continuação)

| Referência                         | Matriz/ analitos                                  | Tratamento da amostra (simplificado)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Técnica de análise | Concentração encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )               |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------|
| GILBERT-LOPEZ et al., 2010         | Óleo de oliva / pesticidas multiclasse            | <u>método – QuEChERS</u><br>1) Extração sólido-líquido com acetonitrila<br>2) SPE dispersiva com PSA, GCB e C <sub>18</sub><br><u>método – MSPD e SPE</u><br>1) MSPD com Bondesil-NH <sub>2</sub><br>2) SPE: Mistura item 1 e florisil. Eluição com Acetonitrila<br>QuEChERS modificado                                                                                                                                                           | LC/MS              | NA                                                           |
| RAWN; JUDGE; ROSCOE, 2010          | Tecido de peixe/ pesticidas piretróides           | 1) Extração sólido-líquido com acetonitrila acidificada em ultrasson<br>2) SPE dispersiva com PSA e C <sub>18</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | GC/MS              | Cipermetrina 0,3 a 6,5                                       |
| WALISZEWSKI et al., 2010           | Tecido adiposo humano / pesticidas organoclorados | 1) Mistura com sulfato de sódio anidro<br>2) SPE com mistura do item 1. Eluição com hexano<br>3) Adição de ácido sulfúrico e separação das fases<br>4) Secagem do sobrenadante com sulfato de sódio                                                                                                                                                                                                                                               | GC/ECD e GC/MS     | Médias máximas<br>ΣDDTs = 2589<br>HCB = 16                   |
| CASTILLO; GONZÁLES; MIRALLES, 2011 | Gordura animal / pesticidas não polares           | <u>método – QuEChERS</u><br>1) Extração com n-hexano: acetonitrila<br>2) Fase acetonitrila: Precipitação gordura – overnight 4°C<br>3) SPE-dispersiva: PSA e C <sub>18</sub><br><u>método – GPC</u><br>1) Extração com diclorometano<br>2) GPC<br><u>método – oxidação dos lipídios</u><br>1) Dissolução em n-hexano + sulfato de sódio anidro<br>2) lavagem com n-hexano + ácido sulfúrico<br>3) Fase hexânica – SPE Sílica e eluição c n-hexano | GC/MS              | NA                                                           |
| WANG et al., 2011                  | Tecido adiposo humano / pesticidas multiclasse    | 1) Extração com acetonitrila<br>2) secagem, redissolução em éter acético: hexametileno<br>2) GPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | GC/MS              | Valores máximos<br>Endossulfam:<br>Alfa = 2,02 ; Beta = 5,56 |

\*NA (não aplicado em amostras reais)

A análise de pesticidas em baixas concentrações, particularmente em matrizes com alto teor de lipídios, requer além da etapa de extração, uma etapa de *clean-up* para eliminação dos interferentes da matriz antes da análise cromatográfica.

Como a grande maioria das amostras com alto teor de lipídios é sólida, o método de remoção dos analitos mais utilizado (Tabela 2) é a extração sólido-líquido. Nesta etapa do trabalho a escolha do solvente é de extrema importância, uma vez que está diretamente relacionada a recuperação dos analitos. Dentre os solventes apolares mais utilizados destacam-se o hexano, éter de petróleo e diclorometano.

Devido ao fato de que a maioria dos pesticidas analisados é não-polar a escolha de um solvente apolar garante alta recuperação, porém aumenta a co-extração de interferentes da matriz, e nesse caso, existe a necessidade de acrescentar uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato. Para a remoção dos interferentes, os métodos mais utilizados são dispersão da matriz em fase sólida (MSPD – matrix solid phase dispersion), extração em fase sólida (SPE – solid phase extraction) e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE - dispersive solid phase extraction). Dos três métodos citados, a SPE é a mais antiga. Nesta técnica o adsorvente está inserido em uma coluna pela qual o extrato da amostra é percolado. A limpeza pode ser alcançada por dois procedimentos. No primeiro, após o carregamento do extrato, os interferentes são eluídos com um solvente, enquanto que um segundo solvente elui os analitos de interesse. Este método também é utilizado como etapa de concentração no caso de amostras líquidas. A outra forma de separação, mais comum para amostras sólidas, ocorre pela utilização de um eluente capaz de retirar apenas os analitos de interesse, deixando os interferentes retidos na fase sólida.

Dentre os métodos que incluem SPE citados na Tabela 2 destaca-se o desenvolvido por Toledo Netto (2009) para determinação dos pesticidas dicofol, dieldrin, endossulfam e permetrina em tecido adiposo de ratos. O método desenvolvido neste trabalho inclui a extração sólido-líquido com uma mistura de hexano e diclorometano em ultrassom e posterior *clean-up* utilizando a técnica de SPE, com alumina 4,6% desativada (adsorvente) e hexano como eluente,

apresentando bons resultados de recuperação (75% -119%) e de coeficiente de variação (3% -19%) para todos os analitos.

Outro método com elevada utilização é a MSPD. Trata-se de uma técnica introduzida como aperfeiçoamento da SPE, utilizada para preparação, extração e fracionamento de amostras sólidas e semi-sólidas (BEZERRA, 2009). Nesta técnica é realizado um contato físico entre a amostra e o adsorvente, por meio de uma maceração, e posteriormente é realizada a eluição do analito com um pequeno volume de solvente.

No entanto, a técnica de maior destaque atualmente para análise multirresíduo de pesticidas é a d-SPE, inserida no método denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), proposto em 2003 por Anastassiades e colaboradores que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (PRESTES et al., 2009). A princípio, o método foi proposto para matrizes alimentícias com baixo teor de lipídios como maçã, alface e laranja. Hoje, diversos são os trabalhos que utilizam este método, com algumas modificações, para as mais diferentes matrizes (CASTILLO; GONZÁLEZ; MIRALLES, 2011; GILBERT-LÓPEZ et al., 2010).

Este tratamento de amostra consiste primeiramente em uma extração com acetonitrila na presença de água, sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Desta forma, devido a hidratação do sulfato de magnésio ocorre um aumento na temperatura do extrato que ajuda na extração dos analitos e a adição do cloreto de sódio faz com que haja a separação das fases (acetonitrila e água) (ANASTASSIADES et al., 2003). Após a extração é realizado o *clean-up* denominado d-SPE com uma porção do extrato, onde o principal adsorvente é a PSA (amina primária secundária), que é uma sílica modificada com uma pequena cadeia carbônica e dois agrupamentos amínicos. Nesta técnica os adsorventes são apenas agitados com o extrato. Para as matrizes mais lipídicas é comum a utilização de outros adsorventes, capazes de reter os interferentes apolares, como o C<sub>18</sub> (CUNHA et al., 2007; LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005).

Quanto às técnicas cromatográficas de análise tanto a cromatografia líquida de alta eficiência quanto a cromatografia gasosa são amplamente utilizadas. Para a cromatografia gasosa destacam-se dois tipos de detectores, o detector de captura de elétrons (ECD – electron capture detector) e o espectrômetro de massas (MS –

mass spectrometry), onde o primeiro (ECD) é muito seletivo e apresenta alta detectabilidade a compostos halogenados, já o segundo (MS) é considerado universal, e muito utilizado para correta identificação dos analitos.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, pode-se dizer que o detector de espectrometria de massas é o mais utilizado. Em alguns estudos, dependendo da diversidade dos analitos é utilizada mais de uma técnica cromatográfica de análise.

## **2.4 Validação de métodos analíticos**

A validação de um método analítico é um processo de avaliação utilizado para provar que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão, garantindo assim, que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos foram atendidos (LANÇAS, 2004).

Existem diversos grupos de trabalho e organizações nacionais e internacionais que definem os parâmetros utilizados no processo de validação, existindo uma grande divergência quanto às definições desses parâmetros (RIBANI et al., 2004). Porém, é consenso que os procedimentos a serem validados diferem de acordo com os requisitos da análise a ser efetuada, e cabe ao pesquisador escolher quais parâmetros são necessários e relevantes ao propósito do trabalho. Os principais parâmetros de validação são: seletividade, linearidade, intervalo de aplicação, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, precisão e exatidão. A seguir encontram-se as definições destes parâmetros:

Seletividade: “corresponde à capacidade de um método em determinar o analito, de maneira inequívoca, na presença de outras substâncias que poderiam interferir em sua determinação” (LANÇAS, 2004).

Linearidade: “corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação” (RIBANI et al., 2004).

Intervalo de aplicação: “corresponde ao intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista da exatidão, fidelidade e linearidade” (LANÇAS, 2004).

Sensibilidade: “indica a capacidade do método em discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito” (LANÇAS, 2004).

Limite de detecção: “corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato” (LANÇAS, 2004).

Limite de quantificação: “corresponde a menor quantidade de uma analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada” (LANÇAS, 2004).

Robustez: “é a 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” (LANÇAS, 2004). Pode ser expressa como o desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas e é também considerada em três níveis: repetitividade (ou repetibilidade), precisão intermediária e reprodutibilidade (BRITO et al., 2003).

Exatidão: “expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência” (LANÇAS, 2004).

### 3. OBJETIVOS

Tendo em vista o objetivo do projeto temático que é avaliar os efeitos da exposição de animais a uma mistura de pesticidas em baixas concentrações, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Otimizar e validar um método rápido e de fácil aplicação para determinação de resíduos de dicofol, permetrina, dieldrin e endossulfam em tecido adiposo associado ao ovário de ratas
- ✓ Aplicar o método validado às amostras de tecido adiposo dos animais provenientes dos ensaios biológicos para posterior avaliação da bioacumulação dos mesmos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais**

#### **4.1.1. Padrões analíticos dos pesticidas**

Os padrões dos pesticidas dieldrin (97,9%), endossulfam (alfa + beta = 2 + 1) (99,9%), permetrina (40% cis + 60% trans) (98%) e dicofol (97,6%) foram adquiridos do laboratório Riedel-de-Haën (Alemanha). Para o dicofol foram adquiridos também o padrão analítico da empresa Ultra (97,3; EUA) e o padrão certificado fornecido pelo Laboratório Dr. Ehrenstorfer GmbH (96,5%  $\pm$  1%; Alemanha).

#### **4.1.2 Solventes e reagentes**

Os solventes utilizados foram isooctano, n-hexano (95%), diclorometano e acetonitrila (grau HPLC, Mallinckrodt). Os reagentes químicos utilizados foram alumina neutra (70 – 230 mesh ASTM, Sigma Aldrich), C<sub>18</sub> (45  $\mu$ m, Sigma Aldrich), PSA (47-60  $\mu$ m, Varian; 45  $\mu$ m, Agilent), sulfato de magnésio anidro (Sigma Aldrich) e cloreto de sódio (p.a., Sigma Aldrich).

#### **4.1.3. Vidraria e equipamentos**

Material volumétrico de vidro: balões classe A, 5,00  $\pm$  0,02mL; 10,00  $\pm$  0,02mL; 25,00  $\pm$  0,03mL; 50,00  $\pm$  0,06mL e 100,00  $\pm$  0,08mL; pipeta classe A, 10,00 mL  $\pm$  0,02mL.

#### **4.1.4 Equipamentos**

✓ Cromatógrafo a gás Varian (GC), modelo 450, 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  $\mu$ m de espessura do filme recoberta com fase 5% fenil 95% metilpolisiloxano, injetor split/splitless e software para aquisição dos dados Galaxie Varian;

✓ 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, com coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (Phenomenex), 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 e software para aquisição dos dados Galaxie Varian.

- ✓ Ultra-som Cleaner Thornton (40 Hz, 20 L);
- ✓ Estufa Fanem, modelo 315 SE;
- ✓ Balança, precisão de  $\pm 0,01$  mg, Mettler Toledo, modelo AG 245.
- ✓ Centrífuga Revan (600W)
- ✓ Centrífuga Quimis (440W)
- ✓ Agitador de tubos Phoenix (Vortex)
- ✓ Micropipetas: Tedia Pet (20-200 µL; 100-1000 µL); Eppendorf (10-100 µL)

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Limpeza de vidraria

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

### 4.2.2 Preparo das soluções dos padrões

A solução estoque de cada padrão de pesticida foi preparada em isooctano na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. A partir desta, foram preparadas soluções intermediárias na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> e 1 mg L<sup>-1</sup>. As soluções mistas dos compostos foram preparadas por diluição das soluções intermediárias. As soluções estoque, intermediária e mista foram armazenadas em frascos âmbar, vedadas com *parafilm* e mantidas à -18°C por um período de 6, 3 e 2 meses respectivamente.

### 4.2.3 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas foram otimizadas baseando-se no trabalho de Toledo Netto (2009) para determinação dos mesmos analitos em tecido adiposo abdominal de ratos. A Tabela 3 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

**Tabela 3** - Condições cromatográficas: GC/ECD e GC/MS

|                            | GC/ECD, Varian 450                                                                                      | GC/MS, Varian Saturno 2000                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Temperatura injetor</b> | 250 °C                                                                                                  | 270°C                                                                                                                                                                                              |
| <b>Temperatura coluna</b>  | 200°C (4 min) $-(5^{\circ}\text{C min}^{-1}) \rightarrow 280^{\circ}\text{C}$ (6min)                    | 90°C (3 min) $-(20^{\circ}\text{C min}^{-1}) \rightarrow 230^{\circ}\text{C}$ $-(5^{\circ}\text{C min}^{-1}) \rightarrow 280^{\circ}\text{C}$ (8min)                                               |
| <b>Gases</b>               | Arraste: N <sub>2</sub> , 1,0 mL min <sup>-1</sup><br>Makeup (N <sub>2</sub> ), 29 mL min <sup>-1</sup> | Arraste: He; 1,0 mL min <sup>-1</sup>                                                                                                                                                              |
| <b>Injeção</b>             | 1µL, splitless/split<br>(splitless 30 s e split 1:50)                                                   | 1µL, split<br>split 1:10/ Solvent delay                                                                                                                                                            |
| <b>Detector</b>            | 300 °C                                                                                                  | Linha de transferência : 200°C<br>manifold :50°C<br>Íon trap : 180°C<br>Impacto eletrônico 70 eV<br>Eletromultiplicadora: 1800 V<br>15µA de corrente de emissão<br>Modo Scan, faixa: 70-420 u.m.a. |

### 4.2.4 Identificação dos pesticidas

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

### 4.2.5 Determinação da faixa linear e da linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450)

Para avaliar a faixa linear foram construídos gráficos para cada analito, relacionando-se o valor de concentração da solução no eixo das abscissas com a média das áreas do pico cromatográfico, correspondente ao sinal do ECD, dividida pela respectiva concentração daquela área, no eixo das ordenadas. O intervalo de

confiança foi calculado seguindo-se o Teste de Huber para exclusão dos pontos anômalos, conforme descrito por Valente, Augusto e Riedo (2011).

A linearidade do detector foi determinada a partir do gráfico relacionando-se o valor da concentração da solução (eixo das abscissas) com o valor médio das áreas encontradas. Com esses valores foi realizada uma regressão linear, a qual apresentou os coeficientes angular (que indica a sensibilidade do método cromatográfico), linear e de correlação ( $r^2$ ). O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

Para a realização desses testes foram preparadas dezesseis diferentes soluções de padrões mistas dos pesticidas com concentrações entre 1,5 e 1300  $\mu\text{g L}^{-1}$  e injetadas em ordem crescente de concentração, em triplicata.

#### **4.2.6 Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento (GC/ECD, Varian 450)**

O LD do equipamento foi determinado pelo método visual, ou seja, a menor concentração na qual foi possível sua distinção do ruído, já o LQ é encontrado a partir do teste que define a faixa linear de trabalho (item 4.2.5) sendo a menor concentração encontrada dentro desta faixa (RIBANI et al., 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).

#### **4.2.7 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).

Os animais (ratas das linhagens Lewis, Wistar e Sprague-Dawley) permaneceram em gaiolas de polipropileno (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.

Para a formação dos grupos experimentais, os animais foram selecionados ao acaso. Nesta etapa experimental foram utilizadas 90 ratas, distribuídas em três

grupos. Cada grupo experimental era constituído por 30 animais de cada linhagem. O delineamento teve duração de 10 semanas, com início do tratamento das fêmeas na sexta semana de vida (42 dias). O tempo do tratamento abrangeu o período de atividade plena dos ovários e o sacrifício foi realizado com aproximadamente 16 semanas ou 98 dias de vida.

A Tabela 4 apresenta o detalhamento da dieta dos animais de experimentação, quanto aos pesticidas em estudo.

**Tabela 4** - Grupos de animais e exposição aos pesticidas através da dieta

| Grupo                 | Concentração dos pesticidas na alimentação (mg kg <sup>-1</sup> ) |             |          |            |           |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------|----------|------------|-----------|
|                       | Dicofol                                                           | Endossulfam | Dieldrin | Permetrina | Diclorvos |
| 1 (controle negativo) | Ração basal, semipurificada, sem adição de pesticidas             |             |          |            |           |
| 2 (NOEL) <sup>a</sup> | 0,5                                                               | 0,7         | 0,025    | 5,0        | 0,23      |
| 3 (LOEL) <sup>b</sup> | 2,1                                                               | 3,8         | 0,05     | 25         | 2,3       |

<sup>a</sup> NOEL = no-observed effect level, <sup>b</sup> LOEL = lowest observed effect level

Os animais foram sacrificados por narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub>, seguida de abertura da cavidade abdominal e torácica para exame necroscópico e coleta dos órgãos. O tecido adiposo de cada animal foi coletado, envolto em papel alumínio, devidamente identificado e congelado imediatamente em *freezer* a -18°C.

#### 4.2.8 Preparo inicial das amostras de tecido adiposo

As amostras individuais foram retiradas do *freezer*, abertas sobre placas de Petri e homogeneizadas por fragmentação utilizando espátula e lâmina cortante de inox, envolto novamente em papel alumínio e retornadas ao *freezer* à -18°C.

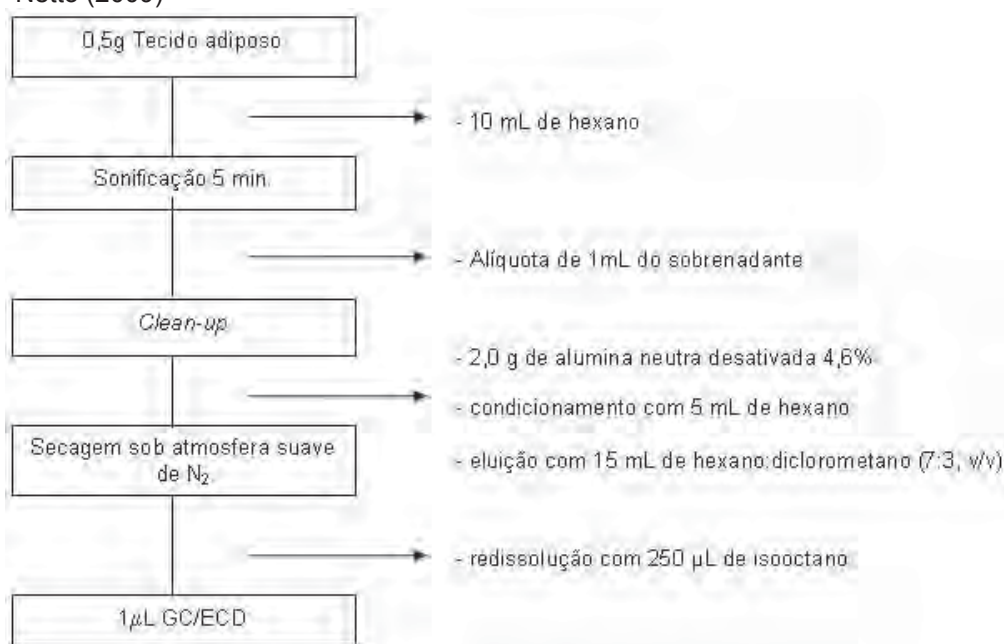
#### 4.2.9 Métodos de extração e *Clean-up*

##### 4.2.9.1 Extração em fase sólida (SPE) com alumina 4,6% desativada

Foi testado para as amostras de tecido adiposo associado ao ovário o método de extração desenvolvido por Toledo Netto (2009) para determinação de pesticidas em tecido adiposo de ratos, que apresentou bons resultados de remoção de lipídios e de recuperação. O procedimento (Figura 8) inclui basicamente, a extração com

hexano em ultrassom, seguida da extração em fase sólida (SPE) com alumina 4,6% desativada e eluição com hexano:diclorometano (7:3, v/v). O tratamento da alumina neutra consiste, primeiramente, por uma ativação em estufa à 110°C por um período de 12 horas e, após atingir a temperatura ambiente, é desativada a 4,6% (m/m) com água deionizada. Em seguida, armazenada em frascos de vidro fechados e mantidas por 12 horas em dessecador.

**Figura 8** - Método de extração de pesticidas em tecido adiposo proposto por Toledo Netto (2009)

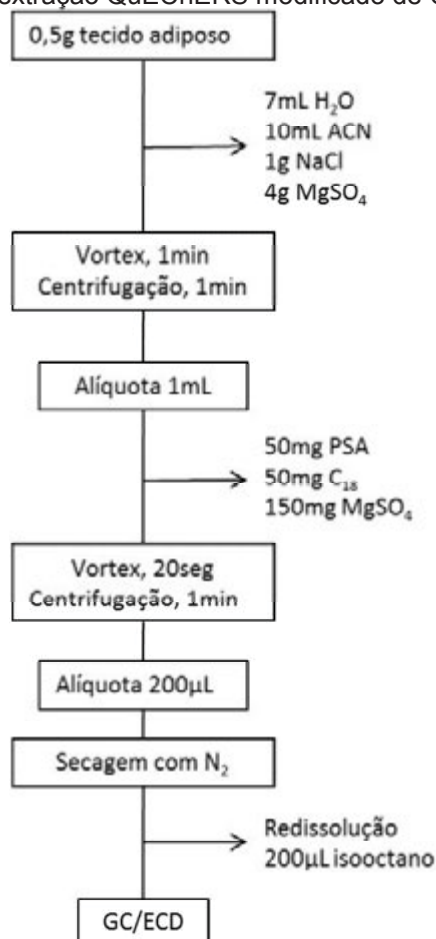


#### 4.2.9.2 Método extração QuEChERS

O método testado e descrito a seguir (Figura 9) é uma modificação do método desenvolvido por Cunha e colaboradores (2007) para determinação de 16 pesticidas multiclasse em azeite de oliva. Este método consiste basicamente em extração com acetonitrila e posterior extração em fase sólida dispersiva com PSA e C<sub>18</sub>. As modificações realizadas foram primeiramente a redução da massa da amostra, pois no método original foram utilizados 3g de azeite de oliva, e como a massa de tecido adiposo associado ao ovário é bem menor teve de ser miniaturizada. Também foi retirado o carbono preto grafitizado da d-SPE, pois é utilizado para remoção de

pigmentos do extrato, e portanto, não será necessário para esta matriz. No método original não havia a necessidade de troca do solvente de eluição pelo de injeção, pois a análise foi efetuada por GC/MS e LC/MS. No presente trabalho foi necessário proceder a secagem do extrato para troca do solvente para isooctano.

**Figura 9** - Método de extração QuEChERS modificado de Cunha e colaboradores (2007)



#### 4.2.10 Avaliação dos métodos de extração – Estudo prévio de seletividade e recuperação

Para avaliar a seletividade dos métodos de extração foram realizadas as extrações com amostras de animais não expostos aos pesticidas.

Para o estudo de recuperação, as amostras testemunhas, provenientes de animais que ingeriram ração que não continha os pesticidas, foram fortificadas com

soluções de mistura dos compostos nas concentrações indicadas na Tabela 5. O estudo para o método SPE foi realizado em triplicata e o tempo de contato entre a matriz e as soluções dos pesticidas foi de 4 horas.

**Tabela 5** - Nível de fortificação empregado para os analitos nos diferentes métodos testados

| Analito     | SPE (ng g <sup>-1</sup> ) | QuEChERS (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|
| Dicofol     | 500                       | 2000                           |
| Dieldrin    | 50                        | 200                            |
| Endossulfam | 50                        | 200                            |
| Permetrina  | 500                       | 2000                           |

#### 4.2.11 Otimização do método de extração QuEChERS

Foram avaliados os seguintes parâmetros: volume de ACN (5 e 10 mL) e adsorventes utilizados no processo de *clean-up* (PSA Varian; PSA Agilent; C<sub>18</sub>; alumina neutra; alumina 4,6% desativada e celite). A Tabela 6 apresenta as variações nos testes realizados, onde os demais parâmetros (Figura 9) permaneceram constantes.

**Tabela 6** - Testes realizados para otimização do método QuEChERS

| Teste | Volume de ACN (mL) | Adsorvente 1/ massa (mg)    | Adsorvente 2/ massa (mg) | Massa de MgSO <sub>4</sub> (mg) |
|-------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 1     | 10                 | PSA Varian/ 50              | C18/ 50                  | 150                             |
| 2     | 10                 | PSA Agilent/ 50             | C18/ 50                  | 150                             |
| 3     | 10                 | Alumina 4,6% desativada/ 50 | C18/ 50                  | 150                             |
| 4     | 10                 | Alumina neutra/ 50          | C18/ 50                  | 150                             |
| 5     | 10                 | PSA Varian/ 50              | Celite/50                | 150                             |
| 6     | 10                 | PSA Agilent/ 50             | Celite/50                | 150                             |
| 7     | 10                 | Alumina 4,6% desativada/ 50 | Celite/50                | 150                             |
| 8     | 10                 | Alumina neutra/ 50          | Celite/50                | 150                             |
| 9     | 5                  | C18/ 50                     | PSA Varian/ 50           | 150                             |
| 10    | 5                  | C18/ 100                    | PSA Varian/ 100          | 150                             |
| 11    | 5                  | C18/ 50                     | PSA Varian/ 50           | 75                              |
| 12    | 5                  | C18/ 100                    | PSA Varian/ 100          | 75                              |

#### 4.2.12 Estimativa da quantidade de lipídios

A estimativa do teor de lipídios foi realizada por método gravimétrico, baseada no trabalho de Alonso (2008). Foi retirada uma alíquota de 0,1 mL do extrato hexânico do item 4.2.9.1 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:

$$\% \text{lipídios} = \frac{\text{massa residuo (g)} \times \text{volume total do extrato (mL)}}{\text{massa amostra (g)} \times \text{volume da alíquota (mL)}} \times 100$$

#### 4.2.13 Validação do método

##### 4.2.13.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foi realizada a extração descrita no item 4.2.9.2 com uma amostra dos animais do grupo controle, chamada de amostra testemunha para avaliar a presença de possíveis interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

##### 4.2.13.2 Estudo de efeito matriz

A presença do efeito matriz é um parâmetro extremamente importante na avaliação do método, mas dentre as principais fontes de referência para realização da validação do método (EURACHEM, INMETRO e IUPAC) apenas a IUPAC cita a avaliação do efeito matriz, mas não especifica como deve ser feita (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Neste trabalho, este parâmetro foi avaliado comparando-se as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz, para tanto foi realizada a extração com a amostra testemunha, onde o extrato, após secagem, foi redissolvido em uma solução contendo os analitos em concentração conhecida.

O cálculo para avaliar a diferença entre os coeficientes angulares das curvas foi efetuado utilizando a equação a seguir:

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

Onde:

- X1: coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz
- X2: coeficiente angular da curva analítica preparada em solvente

#### 4.2.13.3 Estudo de recuperação

Para o estudo de recuperação, as amostras testemunhas, provenientes de animais que não ingeriram ração contendo pesticidas, foram fortificadas (em três níveis diferentes) com soluções contendo os pesticidas. Foram realizadas três extrações para cada nível de fortificação, seguindo as recomendações da literatura (GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 1999).

Para a fortificação das amostras pesou-se 0,5 g de amostra homogeneizada em tubo de vidro (âmbar), a esta amostra foi adicionada a solução padrão de fortificação. A amostra fortificada permaneceu por 4 horas em *freezer*, e foi retirada 10 minutos antes da extração.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de fortificação utilizados no estudo de recuperação. Para a diclorobenzofenona foi necessário refazer as extrações, com a fortificação da matriz com soluções dos pesticidas sem o padrão de dicofol.

**Tabela 7** - Nível de fortificação empregado para os analitos

| Fortificação<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Dicofol | DBP  | Dieldrin | Endossulfam |          |          | Permetrina |            |              |
|---------------------------------------|---------|------|----------|-------------|----------|----------|------------|------------|--------------|
|                                       |         |      |          | Total       | α<br>67% | β<br>33% | Total      | cis<br>40% | trans<br>60% |
| 1º nível                              | 500     | 200  | 50       | 50          | 33,5     | 16,5     | 500        | 200        | 300          |
| 2º nível                              | 3000    | 3000 | 300      | 300         | 201      | 99       | 3000       | 1200       | 1800         |
| 3º nível                              | 7000    | 7000 | 700      | 700         | 469      | 231      | 7000       | 2800       | 4200         |

#### 4.2.13.4 Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método

De acordo com Thier e Zeumer (1987), 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%. O limite de detecção do método pode ser estimado utilizando os resultados obtidos para o menor nível de recuperação e para a extração realizada com a amostra testemunha 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, reproduzindo as mesmas condições que o analito está sujeito durante a análise.

#### 4.2.14 Aplicação do método proposto às amostras de tecido adiposo associado aos ovários dos animais de experimentação

Para análise das amostras foram construídas curvas analíticas no extrato da matriz. A partir das curvas foram encontradas as concentração dos pesticidas em  $\mu\text{g L}^{-1}$  (quando presentes nas amostras), interpolando-se o valor da área cromatográfica nas equações das curvas analíticas de cada composto. Em seguida, foram efetuados os cálculos necessários, provenientes do método proposto para determinar a concentração em nanograma de pesticida por grama de tecido adiposo ( $\text{ng g}^{-1}$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

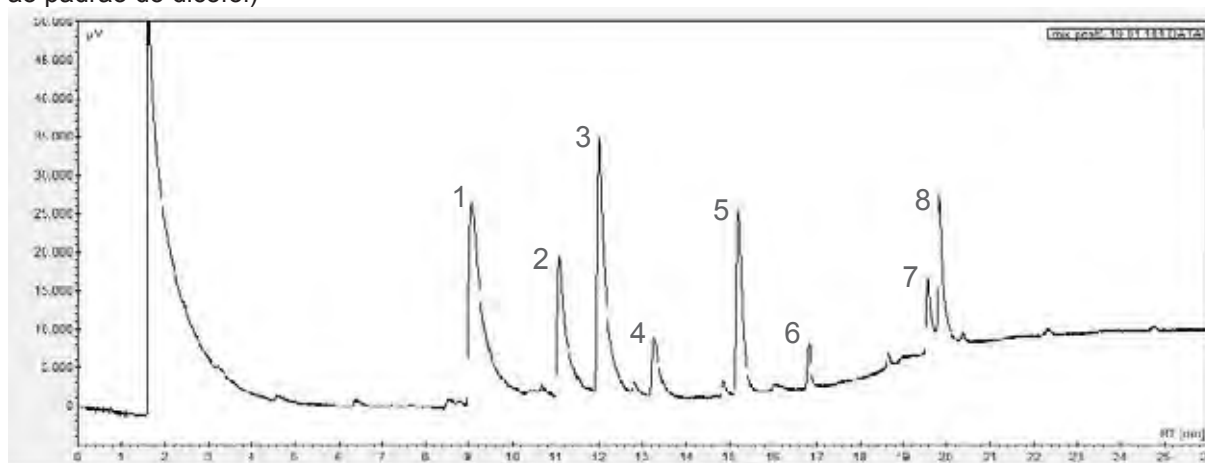
### 5.1 Condições cromatográficas

Para a otimização das condições cromatográficas foi utilizado, como base, o trabalho de Toledo Netto (2009), que investigou a presença dos mesmos analitos em tecido adiposo abdominal de ratos. As condições iniciais estão apresentadas na Tabela 8 e a Figura 10 apresenta o cromatograma referente à injeção de uma mistura dos quatro analitos (dicofol e permetrina 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; dieldrin e endossulfam 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nestas condições iniciais de operação.

**Tabela 8** - Condições iniciais de operação do GC/ECD

| GC-ECD                                 | Condições iniciais de operação                       |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Programação de aquecimento do forno    | 200°C (4 min), 5°C min <sup>-1</sup> → 280°C (6 min) |
| Temperatura do injetor                 | 250 °C                                               |
| Volume injetado                        | 1 $\mu\text{L}$                                      |
| modo de injeção                        | splitless                                            |
| Vazão gás de arraste (N <sub>2</sub> ) | 1,0 mL min <sup>-1</sup>                             |
| Vazão <i>makeup</i> (N <sub>2</sub> )  | 32 mL min <sup>-1</sup>                              |
| Temperatura do detector                | 300 °C                                               |

**Figura 10** - Cromatograma (GC/ECD) obtido com as condições iniciais de operação (2: $\alpha$ -endossulfam; 3:Dieldrin; 4: $\beta$ -endossulfam; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina; 1, 5 e 6 referentes ao padrão do dicofol)



Como pode ser observado no cromatograma da Figura 10 os picos 1 a 4 apresentam cauda, o que não é desejável em cromatografia gasosa, pois devem ser

o mais simétricos possível. A fim de melhorar a simetria dos picos foram testadas as seguintes modificações em alguns parâmetros:

- 1) Temperatura do detector: 320°C e 330°C
- 2) Vazão gás de arraste: 1,5 mL min<sup>-1</sup>
- 3) *Makeup*: 29 mL min<sup>-1</sup>

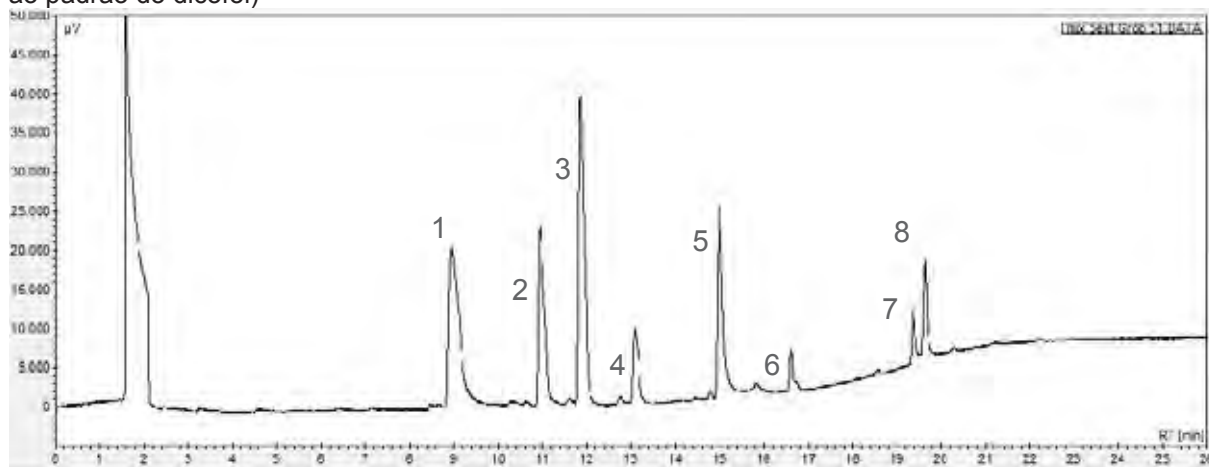
Estas modificações citadas acima foram testadas individualmente e posteriormente combinadas, porém não houve melhoria significativa na simetria dos picos.

Além destes parâmetros também foi testado o método de injeção splitless/split nas seguintes condições:

- 1) splitless por 60 s e split 1:10
- 2) splitless por 60 s e split 1:50
- 3) splitless por 40 s e split 1:10
- 4) splitless por 40 s e split 1:50
- 5) splitless por 30 s e split 1:50

Dentre as diferentes condições testadas, a de número 5 foi a que apresentou melhor resultado sendo, portanto, o método de injeção proposto. Neste modo de injeção, a válvula split permanece fechada por 30 segundos, e quando aberta, deixa entrar no sistema apenas uma parte de cinquenta da solução injetada. O cromatograma da Figura 11 apresenta a resposta do sistema cromatográfico para uma solução com a mistura dos analitos com este novo método de injeção proposto.

**Figura 11** - Cromatograma (GC/ECD) referente aos analitos nas condições otimizadas (2:α-endossulfam; 3:Dieldrin; 4:β-endossulfam; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina; 1, 5 e 6: referentes ao padrão do dicofol)



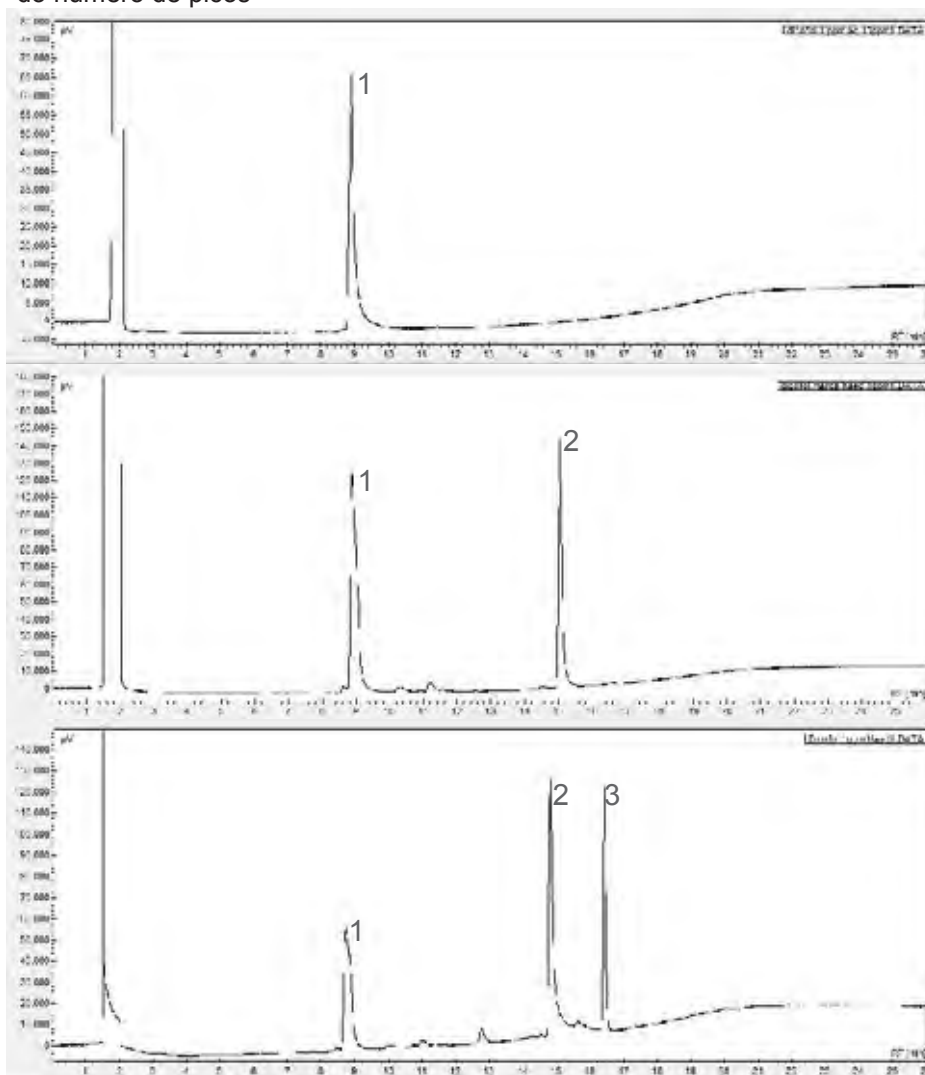
## 5.2 Estudo do dicofol

Nos testes realizados para a otimização do método cromatográfico o pesticida dicofol apresentou instabilidade quanto ao número de picos, cromatogramas com um, dois ou três picos foram obtidos (Figura 12).

Além do padrão Riedel-de-Haën outras duas marcas de dicofol foram avaliadas: Dr. Ehrenstorfer GmbH e Ultra e cromatogramas similares foram obtidos com as três marcas testadas.

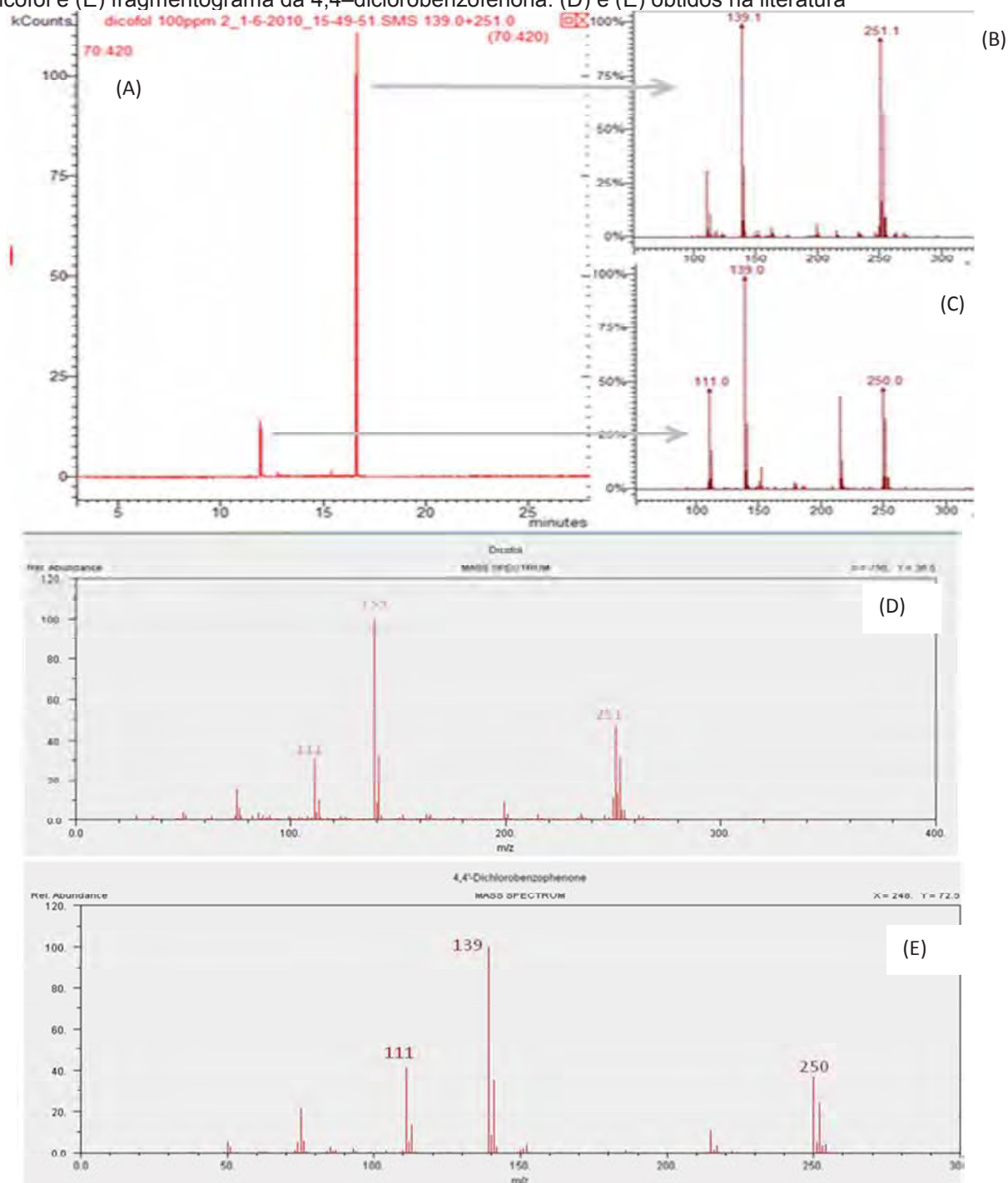
Segundo Tomlin (2004) o pesticida dicofol apresenta dois isômeros e pode formar o produto de degradação, a 4,4-diclorobenzofenona (Figura 12), indicando assim, a possível origem dos três picos.

**Figura 12** - Cromatogramas (GC/ECD) do dicofol ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ): instabilidade do número de picos



A fim de investigar a identidade dos picos, uma solução de dicofol ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ) foi analisada por GC/MS, nas condições indicadas no item 4.2.3. O cromatograma, os espectros de massas obtidos e o espectro referente ao dicofol e a 4,4-diclorobenzofenona obtidos na literatura estão representados na Figura 13 (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2010).

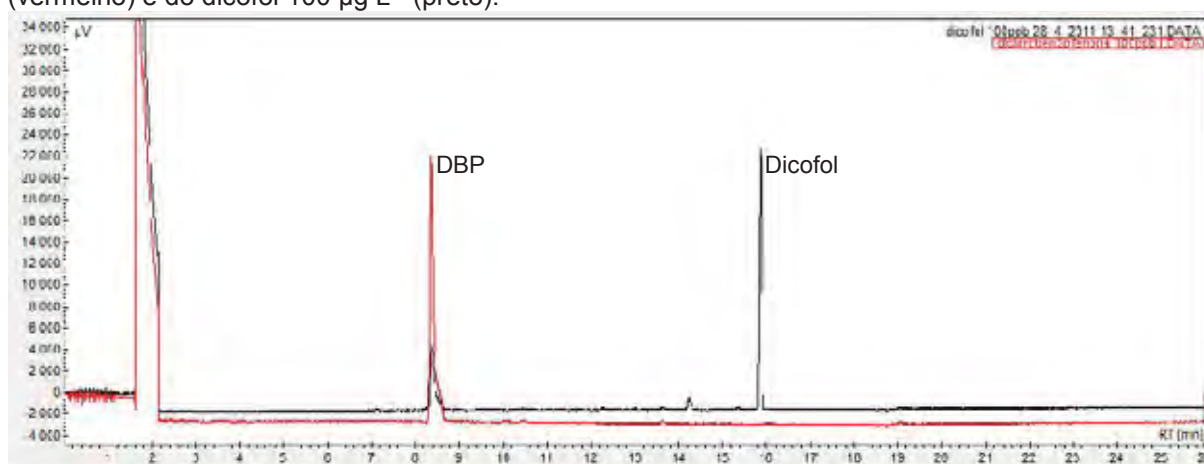
**Figura 13** - (A) Cromatograma (GC/MS) para solução padrão de dicofol ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ), (B e C) fragmentogramas para os picos obtidos na análise do padrão por GC/MS; (D) fragmentograma do dicofol e (E) fragmentograma da 4,4-diclorobenzofenona. (D) e (E) obtidos na literatura



O cromatograma GC/MS apresentou dois picos, com fragmentogramas muito similares. Uma análise dos fragmentogramas obtidos na literatura indica a presença de três íons característicos do dicofol ( $m/z$  111, 139 e 251), porém o fragmentograma da 4,4–diclorobenzofenona apresenta basicamente os mesmos íons ( $m/z$  111, 139 e 250). Existe apenas a diferença de uma unidade de massa ( $m/z$  250 e 251), essa diferença mesmo não sendo tão expressiva é utilizada para quantificar os analitos dicofol ( $m/z$  251) e diclorobenzofenona ( $m/z$  250) em GC/MS (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

Além do teste em GC/MS foi adquirido o padrão da diclorobenzofenona para verificar seu tempo de retenção ( $t_R$ ) no GC/ECD utilizando as condições otimizadas. A Figura 14 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das soluções de dicofol (preto) e diclorobenzofenona (vermelho).

**Figura 14** - Sobreposição dos cromatogramas (GC/ECD) da diclorobenzofenona  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (vermelho) e do dicofol  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (preto).



Como pode ser observado, o padrão de dicofol (em preto) apresenta um pico no mesmo tempo de retenção que a diclorobenzofenona (vermelho), indicando a presença do produto de degradação do dicofol em sua análise. Segundo Tomlin (2004) o pesticida dicofol pode ser fotodegradado a 4,4–diclorobenzofenona, a qual também é um dos principais metabólitos encontrado em animais (ratos). A causa da degradação observada neste estudo é de difícil explicação, e pode ocorrer tanto no preparo das soluções do padrão quanto no próprio sistema cromatográfico (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005). Devido a essa degradação e ao

fato de a diclorobenzofenona ser indicada como metabólito do dicofol em animais (TOMLIN, 2004), optou-se por avaliar a presença tanto do analito ( $t_R = 15,87$ ) quanto do seu produto de degradação ( $t_R = 8,35$ ). Por não apresentar estabilidade, e na maioria das análises cromatográficas não aparecer, o terceiro pico (Figura 12) foi desconsiderado.

### 5.3 Identificação dos pesticidas

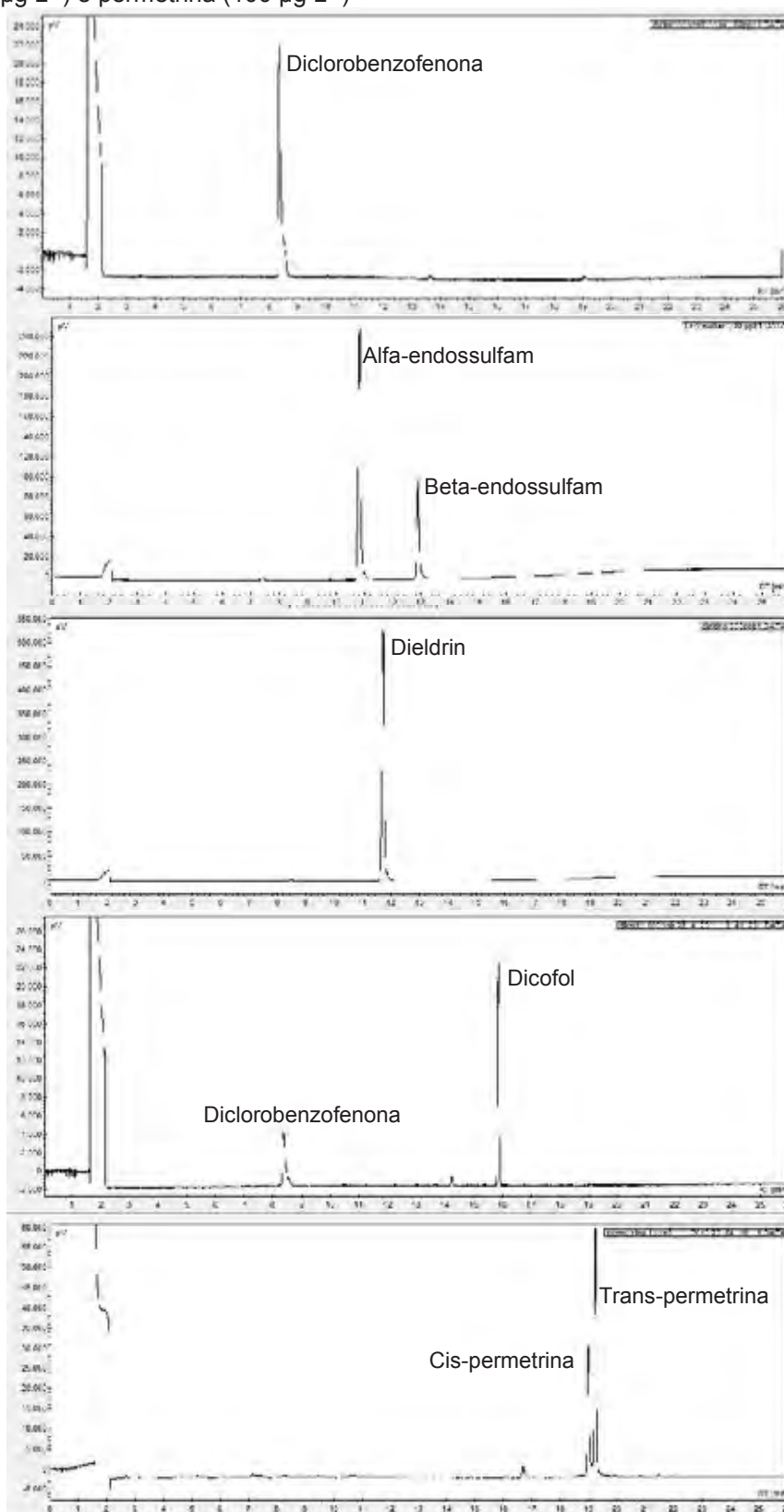
Como a identificação dos pesticidas foi efetuada pela comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões em soluções padrão, é importante apresentar a resolução cromatográfica obtida (Figura 15) e a precisão do tempo de retenção (Tabela 9)

**Tabela 9** - Tempos de retenção e desvio padrão dos pesticidas estudados (n = 8)

| Analito          | Precisão intra-dia |        |      |
|------------------|--------------------|--------|------|
|                  | $t_R$ (min)        | Desvio | CV   |
| DBP              | 8,352              | 0,005  | 0,06 |
| Alfa-endossulfam | 10,540             | 0,002  | 0,02 |
| Dieldrin         | 11,377             | 0,005  | 0,04 |
| Beta-endossulfam | 12,389             | 0,003  | 0,03 |
| Dicofol          | 15,874             | 0,005  | 0,03 |
| Cis-permetrina   | 18,943             | 0,005  | 0,03 |
| Trans-permetrina | 19,184             | 0,005  | 0,03 |

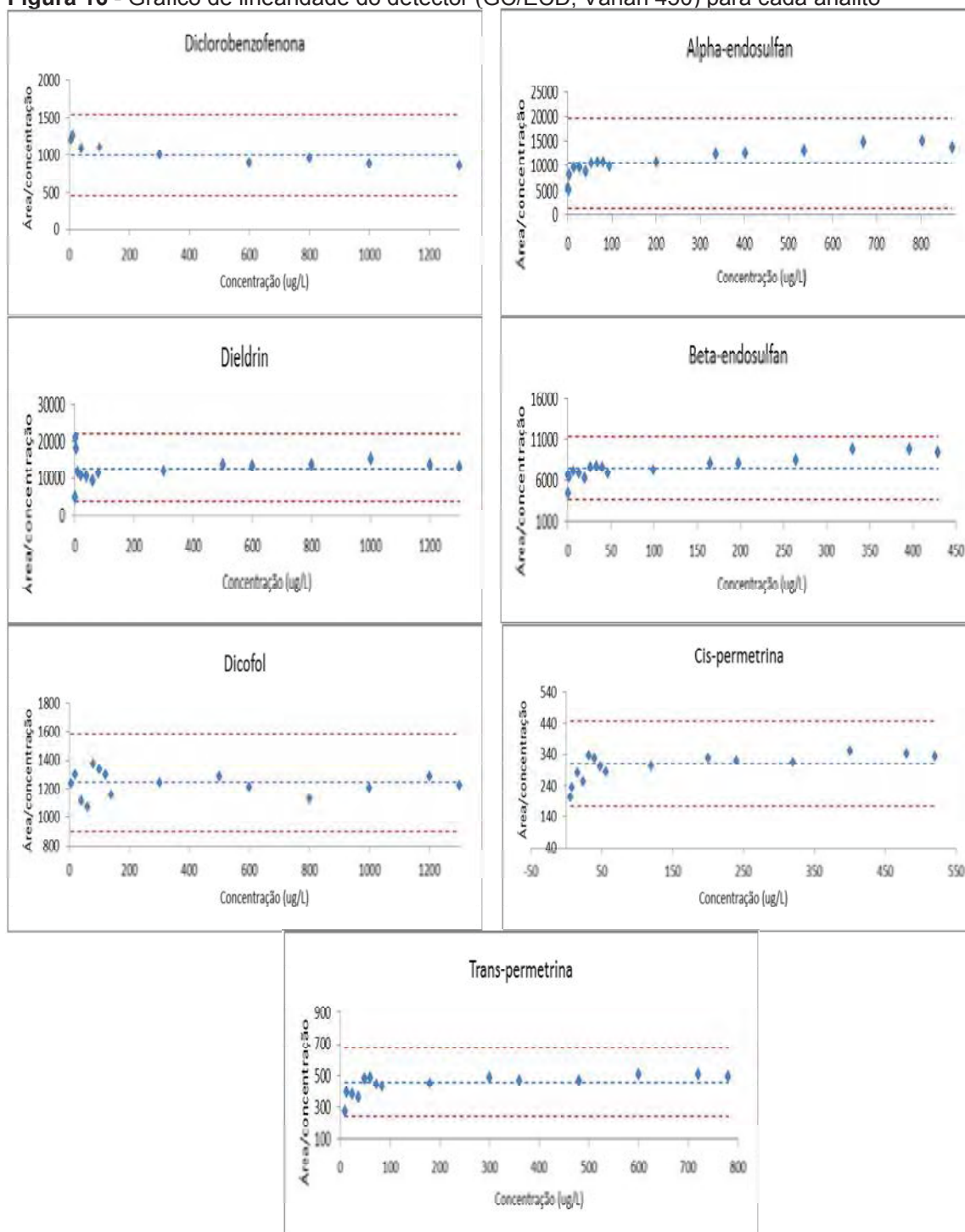
Os valores do coeficiente de variação (CV) demonstram que os tempos de retenção foram precisos, indicando uma repetibilidade das injeções nas mesmas condições de operação, em um curto espaço de tempo (intra-dia).

**Figura 15** - Cromatogramas (GC/ECD) para uma solução padrão dos analitos: DBP ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), endossulfam ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), dieldrin ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), dicofol ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e permetrina ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ )



#### **5.4 Determinação da faixa linear e linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450)**

Para a determinação da faixa linear seguiu-se conforme descrito no item 4.2.5. O Teste de Huber, que se baseia em medianas para exclusão dos pontos anômalos, apresentando um intervalo de confiança superior e um inferior foi realizado com a média das áreas obtidas para cada concentração de cada um dos analitos. Os gráficos obtidos para cada analito, mostrando os limites de confiança (em vermelho), estão apresentados na Figura 16.

**Figura 16** - Gráfico de linearidade do detector (GC/ECD, Varian 450) para cada analito

Como os gráficos de linearidade (Figura 16) indicaram que todos os pontos estavam dentro do intervalo linear, todos foram utilizados para a construção das curvas analíticas, cujos parâmetros estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Faixa linear, equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação dos pesticidas analisados por GC/ECD

| Pesticida        | Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Equação da reta       | $r^2$ |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------|
| DBP              | 6 – 1300                              | $y = 864x + 18284$    | 0,997 |
| Alfa-endossulfam | 1 – 870                               | $y = 14445x - 246956$ | 0,993 |
| Dieldrin         | 1,5 – 1300                            | $y = 14039x - 103941$ | 0,995 |
| Beta-endossulfam | 0,5 – 430                             | $y = 9651x - 77823$   | 0,994 |
| Dicofol          | 5,0 – 1300                            | $y = 1228x - 95$      | 0,997 |
| Cis-permetrina   | 6,0 – 520                             | $y = 339x - 1785$     | 0,998 |
| Trans-permetrina | 9,0 – 780                             | $y = 503x - 4079$     | 0,998 |

Os valores encontrados para o coeficiente de correlação (Tabela 10) acima de 0,99 indicam que há apenas uma pequena dispersão dos valores avaliados, e que estão dentro dos valores estipulados pela ANVISA (RIBANI et al., 2004).

### 5.5 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do equipamento (GC/ECD, Varian 450)

Os Limites de detecção e de quantificação do equipamento foram obtidos conforme descrito no item 4.2.6 e estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Valores obtidos para o LD e LQ do equipamento GC/ECD

| Analito          | LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| DBP              | 2,5                         | 6,0                         |
| Alfa-endossulfam | 0,3                         | 1,0                         |
| Dieldrin         | 0,5                         | 1,5                         |
| Beta-endossulfam | 0,2                         | 0,5                         |
| Dicofol          | 2,5                         | 5,0                         |
| Cis-permetrina   | 2,6                         | 6,0                         |
| Trans-permetrina | 3,9                         | 9,0                         |

Os valores encontrados permitem concluir que o equipamento é capaz de detectar e quantificar os analitos em concentrações muito baixas. Esta característica do equipamento pode ajudar no desenvolvimento do método de extração e *clean-up* das amostras de tecido adiposo, uma vez que, pode não ser necessário uma etapa de concentração no método analítico.

## 5.6 Estimativa da quantidade de lipídios

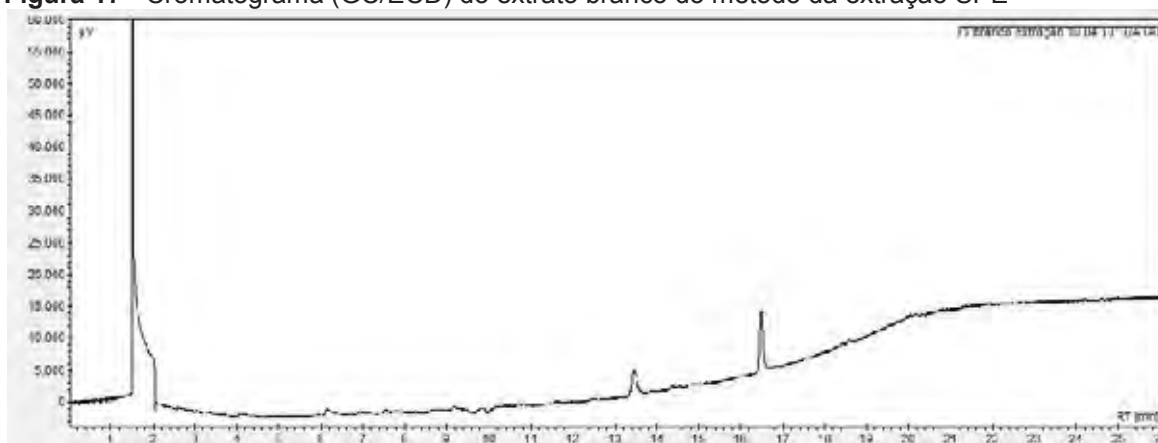
De acordo com o cálculo apresentado no item 4.2.12, a quantidade de lipídios presente no tecido adiposo associado ao ovário é de 45%. Esta elevada porcentagem de lipídios presente nas amostras evidencia a complexidade da matriz em estudo e justifica a necessidade de um método de extração eficaz que remova a maior quantidade possível de lipídios e outros constituintes da matriz.

## 5.7 Métodos de extração e *Clean-up*

### 5.7.1 Extração em fase sólida (SPE) com alumina 4,6% desativada

A primeira etapa foi avaliar possíveis interferentes provenientes dos reagentes. Para isto, foi realizada uma extração, conforme descrito no item 4.2.9.1, sem a presença da matriz, chamada de branco do método. A Figura 17 corresponde ao cromatograma do teste descrito.

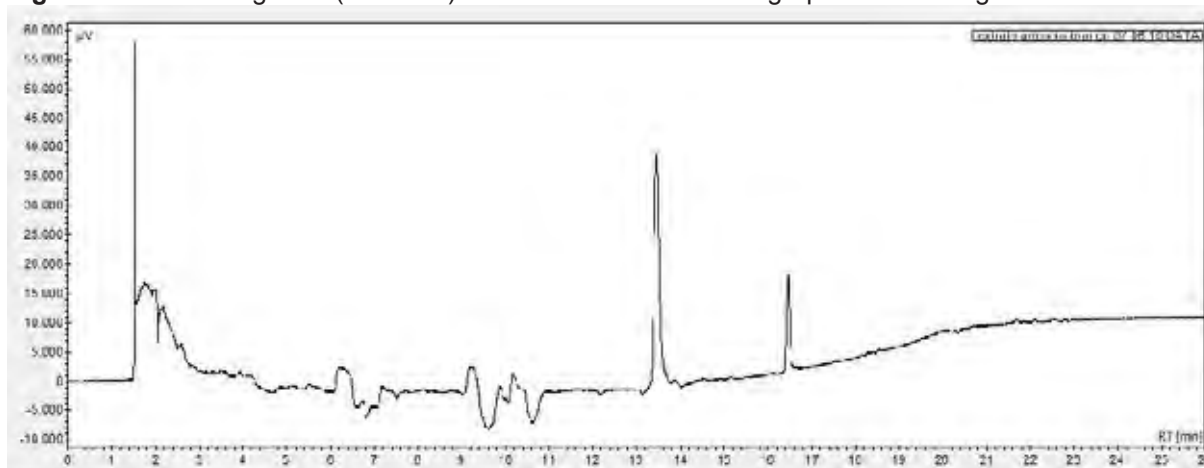
**Figura 17** - Cromatograma (GC/ECD) do extrato branco do método da extração SPE



Como pode ser observado na Figura 17 existe a presença de dois picos nos tempos de retenção 13,47 e 16,49min, e portanto, não coincidem com os tempos de retenção dos analitos (Tabela 9).

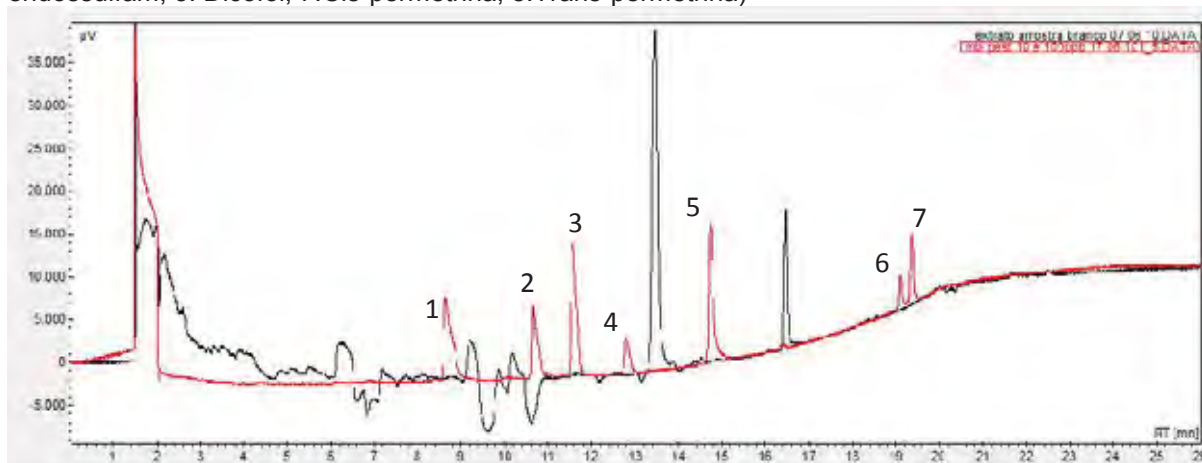
Após verificar a não existência de interferentes provenientes dos reagentes foi realizada uma segunda extração, desta vez com a presença da matriz que não contém os analitos, ou seja, uma amostra dos animais que não foram alimentados com os pesticidas, chamada amostra testemunha. O cromatograma referente a injeção do extrato com a amostra testemunha está representado na Figura 18.

**Figura 18** - Cromatograma (GC/ECD) do extrato de amostra do grupo controle negativo



Pode-se observar que o cromatograma com a amostra testemunha (Figura 18) apresenta os mesmos picos (com maior intensidade) do cromatograma do branco do método (Figura 17) além de picos que eluem em até 11 min. A Figura 19 apresenta o cromatograma do extrato com a amostra testemunha (igual ao da Figura 18) em preto, sobreposto a um cromatograma (vermelho) contendo a mistura dos pesticidas nas concentrações  $10\mu\text{g L}^{-1}$  para dieldrin e endossulfam e  $100\mu\text{g L}^{-1}$  para dicofol e permetrina.

**Figura 19** - Sobreposição dos cromatogramas (GC/ECD) do extrato de amostra testemunha (preto) e de uma solução contendo uma mistura dos pesticidas (vermelho - 10µg L<sup>-1</sup> para dieldrin e endossulfam e 100µg L<sup>-1</sup> para dicofol e permetrina - 1: DBP; 2:α-endossulfam; 3:Dieldrin; 4:β-endossulfam; 5: Dicofol; 7:Cis-permetrina; 8:Trans-permetrina)



Com a sobreposição dos cromatogramas (figura 19) é possível verificar que o único interferente encontra-se no alfa-endossulfam, onde aparece um pico negativo no mesmo tempo de retenção. Mesmo com a presença deste pico negativo foi realizado o teste de recuperação dos analitos, conforme descrito no item 4.2.10.

O cálculo dos valores de recuperação foi realizado comparando-se a área obtida para cada analito no cromatograma do estudo de recuperação com a área encontrada na injeção de uma mistura dos pesticidas com a concentração final esperada, seguindo a equação abaixo:

$$rec(\%) = \frac{\text{área do extrato} \times 100}{\text{área do padrão em solvente}}$$

O ensaio foi realizado em triplicada, e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** – Porcentagens de recuperação dos pesticidas obtidos no estudo de recuperação (n=3) para o método SPE

| Pesticida                  | Recuperação (%), máximo e mínimo |
|----------------------------|----------------------------------|
| DBP (do padrão do dicofol) | 52-20                            |
| Endossulfam                | 77-34                            |
| Dieldrin                   | 74-52                            |
| Permetrina                 | 75-25                            |

Para a extração em fase sólida testada, o intervalo de recuperação encontrado é muito amplo, sendo que os maiores valores (máximos) foram registrados nas primeiras injeções. Isso pode indicar a presença do efeito matriz, que é o aumento ou diminuição da resposta cromatográfica e ocorre devido a presença de compostos, extraídos da matriz, que não são detectados pelo ECD, mas podem prejudicar na detecção dos analitos.

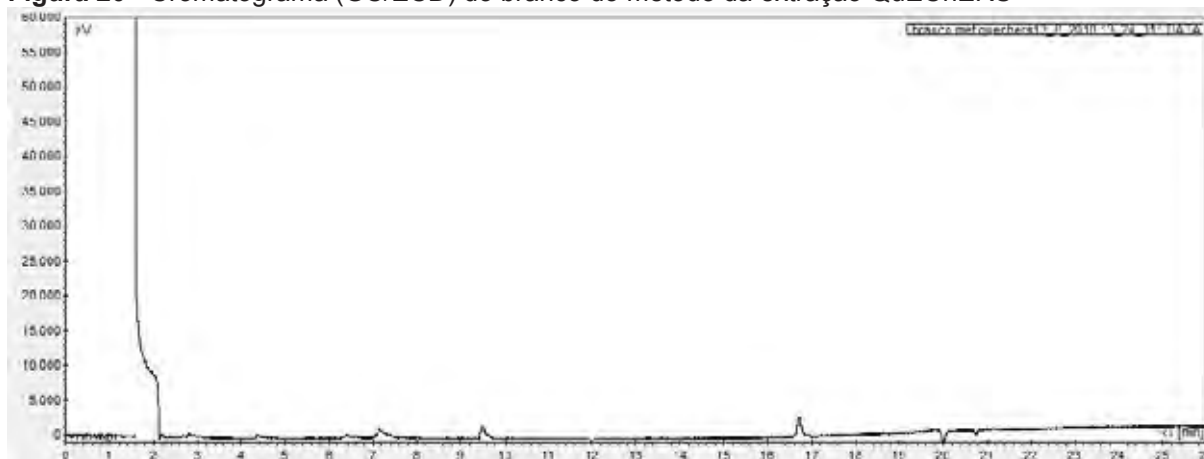
Embora o método de preparo de amostra utilizado nesta primeira etapa do trabalho, tenha sido utilizado com sucesso em outro trabalho deste mesmo grupo de pesquisa (TOLEDO NETTO, 2009), o fato de que para a matriz em estudo os resultados não tenham sido adequados, principalmente quanto à precisão, pode ser explicado por dois fatores. O primeiro deles, refere-se a quantidade de lipídios presentes na matriz. No estudo anterior, o teor de lipídios era maior do que 90% (tecido adiposo abdominal) e no presente trabalho é de 45% (tecido adiposo associado ao ovário), podendo-se inferir que embora o método tenha sido eficiente na eliminação de lipídios, pode não ter a mesma eficiência em relação a outros constituintes da matriz, que alcançam maior importância, quando o teor de lipídios é menor. Outro fator que pode explicar as observações coletadas é que os estudos foram efetuados empregando-se sistemas GC/ECD distintos.

Como o método SPE testado não apresentou resultados satisfatórios, principalmente quanto à precisão, foi avaliado um segundo método de extração.

### **5.7.2 Método extração QuEChERS**

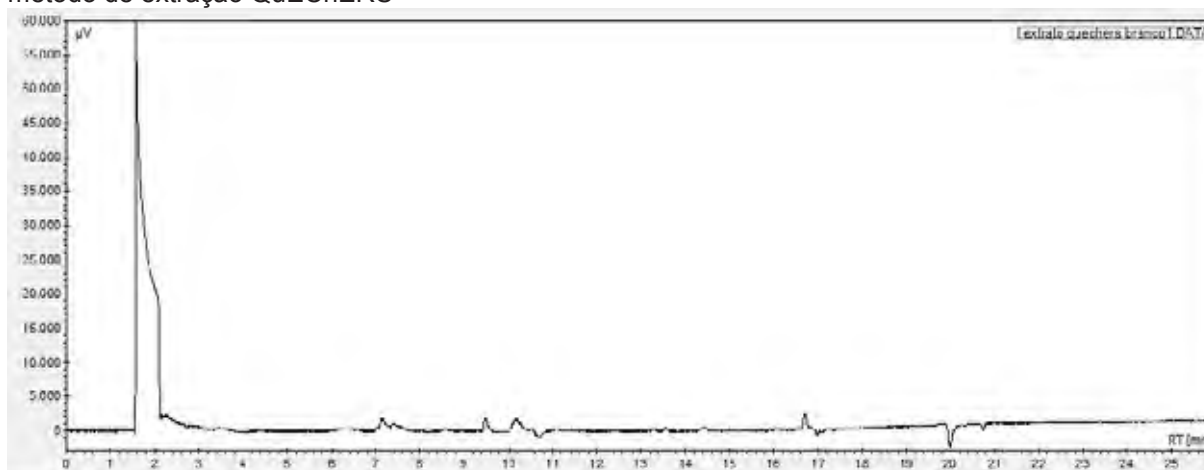
O método de extração QuEChERS, foi testado inicialmente para verificar a possível presença de interferentes provenientes dos reagentes. A extração foi realizada, conforme descrito no item 4.2.9.2 sem a presença da matriz. O cromatograma referente a injeção do extrato sem a matriz está apresentado na Figura 20.

**Figura 20** - Cromatograma (GC/ECD) do branco do método da extração QuEChERS



Como o cromatograma referente ao branco do método não apresentou possíveis interferentes foi realizada uma segunda extração, desta vez com o tecido adiposo do grupo controle negativo (Figura 21), para verificar as impurezas presentes na amostra.

**Figura 21** - Cromatograma (GC/ECD) do extrato de amostra do grupo controle negativo para o método de extração QuEChERS



O cromatograma apresentado na Figura 21 indica que o método de extração é seletivo, uma vez que não apresenta possíveis interferentes. Comparando-se os cromatogramas das Figuras 18 e 21 (que estão na mesma escala), pode-se dizer que o método de extração QuEChERS é capaz de extrair menos compostos

indesejáveis que o método SPE avaliado. Esta característica do método QuEChERS é de extrema importância, uma vez que um extrato mais limpo apresenta menor probabilidade de efeito matriz, e possivelmente, menos danos ao equipamento, devido a presença de compostos coextraídos da amostra.

Para avaliar a extração dos analitos foi realizado um teste de recuperação conforme descrito no item 4.2.10. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 13.

**Tabela 13** - Porcentagens de recuperação dos pesticidas obtidos no estudo inicial do método QuEChERS

| <b>Pesticida</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
|------------------|------------------------|
| DBP              | 117                    |
| Alfa-endossulfam | 45                     |
| Dieldrin         | 74                     |
| Beta-endossulfam | 85                     |
| Dicofol          | 61                     |
| Cis-Permetrina   | 78                     |
| Trans-Permetrina | 87                     |

De acordo com Thier e Zeumer (1987), os resultados de recuperação devem ficar entre 70 e 120%. Como pode ser observado na Tabela 13 apenas o alfa-endossulfam não apresentou o nível de recuperação ideal.

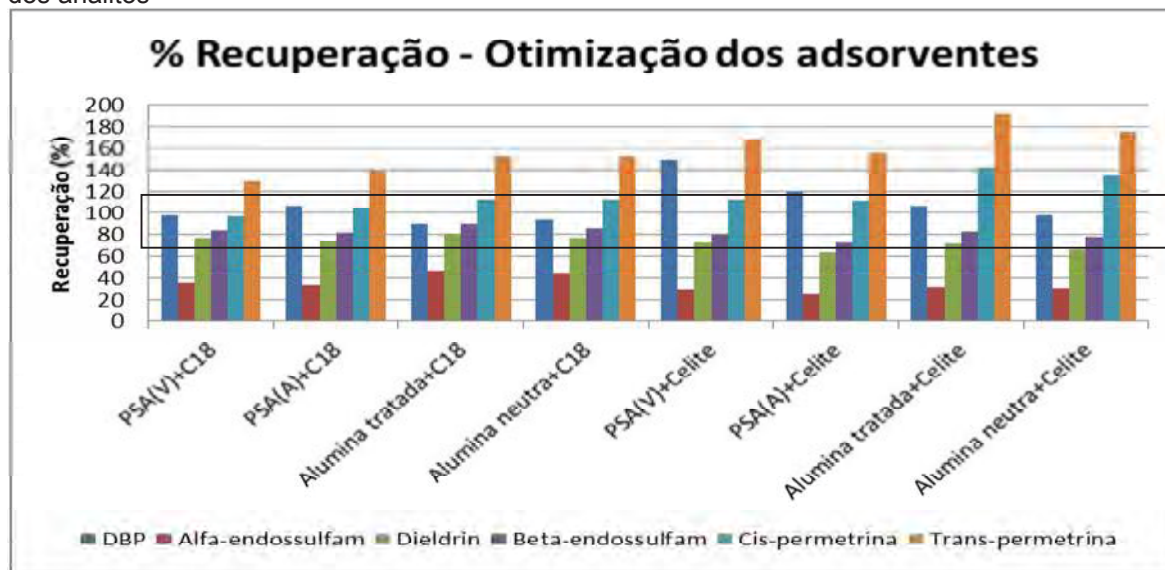
Por apresentar bons resultados neste teste de recuperação (exceto para o alfa-endossulfam) o método foi otimizado.

### 5.7.3 Otimização do método QuEChERS

Para otimização do método QuEChERS foram avaliadas modificações quanto aos adsorventes utilizados na etapa de *clean-up* e posteriormente, ao volume de solvente extrator (ACN), conforme descrito no item 4.2.11.

A Figura 22 apresenta o gráfico com os valores de recuperação (em porcentagem) calculados para cada analito, em cada um dos testes realizados.

**Figura 22** – Avaliação dos efeitos dos diferentes adsorventes na porcentagem de recuperação dos analitos



Como os valores de recuperação devem ficar entre 70 e 120% (faixa preta indicada no gráfico da Figura 22) pode-se verificar que os testes que mais apresentam analitos com valores de recuperação fora da faixa indicada são os realizados com o adsorvente celite, e por este motivo os testes em que a celite foi utilizada foram descartados.

Dentre os testes restantes (os quatro primeiros apresentados no gráfico) têm-se duas situações distintas. A primeira é a menor recuperação do alfa-endossulfam para os testes realizados com a PSA, e a segunda é o maior valor recuperação da trans-permetrina nos testes com a alumina.

Nesta etapa do trabalho optou-se por continuar os estudos com a PSA, uma vez que é uma característica do método QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003) e de demais métodos QuEChERS modificados (Tabela 2). Também pode-se verificar que no primeiro estudo de recuperação realizado (Tabela 13) o valor encontrado para recuperação da trans-permetrina estava dentro da faixa esperada, e que o resultado encontrado neste segundo teste (Figura 22) pode ter sido comprometido por algum fator ocorrido no dia desta segunda análise. De qualquer forma o coeficiente de correlação para estes valores encontrados não ultrapassou o valor de 20%, conforme indicado pela literatura (THIER; ZEUMER, 1987).

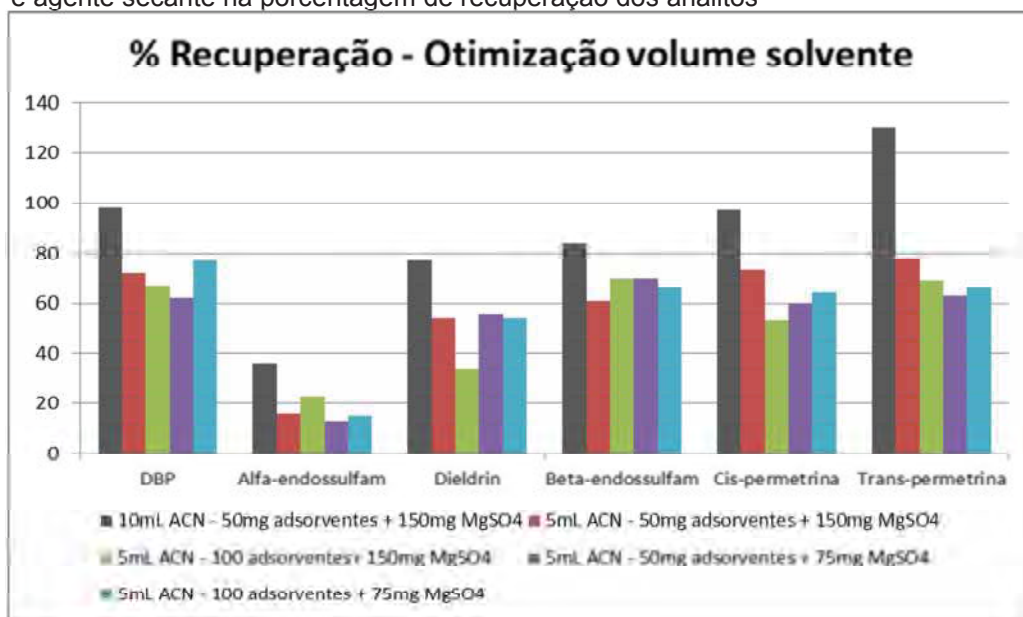
Dentre as duas marcas de PSA utilizadas optou-se por seguir os estudos com o adsorvente da Varian, que apresentou maior valor de recuperação para o

alfa-endossulfam, e menor valor para a trans-permetrina (Figura 22), ou seja, que apresentou os melhores resultados de recuperação.

Após a escolha dos adsorventes da etapa de *clean-up* foi avaliado se seria possível diminuir o volume de solvente extrator de 10 para 5 mL, em diferentes quantidades de PSA(V), C<sub>18</sub> e MgSO<sub>4</sub>, conforme indicado na Tabela 6 do item 4.2.11. O gráfico apresentado na Figura 23 indica os valores de recuperação obtidos para cada teste.

Pode-se observar que os valores de recuperação encontrados para os testes realizados com 5 mL de ACN (em vermelho, verde, roxo e azul) foram inferiores aos valores obtidos na extração com 10 mL (em preto) para todos os analitos, o que indica que 5 mL de ACN não é capaz de extrair grande parte dos pesticidas.

**Figura 23** - Avaliação dos efeitos do volume do solvente e massa dos adsorventes e agente secante na porcentagem de recuperação dos analitos



A diferença na massa de adsorvente utilizadas não resultou em melhora significativa nos valores de recuperação (comparação entre as colunas vermelha e verde e entre as colunas roxa e azul). Outra diferença avaliada foi quanto a massa de MgSO<sub>4</sub> utilizada (comparação entre as colunas vermelha e roxa e entre as colunas verde e azul) onde também não apresentou resultados significativos.

Por estes motivos, optou-se por continuar os estudos com o método com 10mL de ACN, 50mg de cada adsorvente (PSA e C<sub>18</sub>) e 150 mg de MgSO<sub>4</sub>, indicado como teste 1 na Tabela 6 do item 4.2.11.

#### 5.7.4 Curva analítica e estudo de efeito matriz

Para realização destes estudos foram preparadas soluções contendo a mistura de pesticidas em diferentes concentrações. A investigação do dicofol teve de ser realizada separadamente da diclorobenzofenona, uma vez que o padrão de dicofol já apresenta o pico referente a DBP.

O preparo das curvas analíticas na matriz seguiu-se conforme descrito no item 4.2.9.2 com o tecido sem a presença dos pesticidas (amostra testemunha). Após a etapa de secagem com N<sub>2</sub> os extratos foram redissolvidos nas soluções contendo diferentes concentrações dos analitos.

Para construção das curvas analíticas foram injetadas, primeiramente as soluções das misturas dos pesticidas (em triplicada, e em ordem crescente de concentração) e em seguida os extratos obtidos para as diferentes concentrações, também em triplicada e ordem crescente de concentração. Os valores de coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para as curvas em solvente e na matriz estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** - Valores de coeficiente angular, linear e de correlação para as curvas obtidas no solvente e na matriz

|                  | Curva em solvente |             |                  | Curva na matriz |             |                  |
|------------------|-------------------|-------------|------------------|-----------------|-------------|------------------|
|                  | Coef. Angular     | Coef linear | Coef. Correlação | Coef. Angular   | Coef linear | Coef. Correlação |
| DBP              | 797               | 3422        | 0,997            | 1008            | 19201       | 0,990            |
| Alfa-endossulfam | 4051              | 3774        | 0,996            | 3212            | -705        | 0,997            |
| Dieldrin         | 4200              | 4455        | 0,996            | 3951            | 7746        | 0,992            |
| Beta-endossulfam | 3551              | 1144        | 0,997            | 3371            | 2377        | 0,991            |
| Dicofol          | 1109              | -2143       | 0,995            | 2255            | -10439      | 0,998            |
| Cis-permetrina   | 245               | -272        | 0,997            | 253             | 1453        | 0,991            |
| Trans-permetrina | 230               | -535        | 0,997            | 263             | 3052        | 0,993            |

Os valores de coeficiente de correlação encontrados  $\geq 0,99$  indicam que a dispersão do conjunto de pontos experimentais está dentro da faixa recomendada pelo INMETRO (que é acima de 0,90) e também pela ANVISA (que é de 0,99) (RIBANI, 2004).

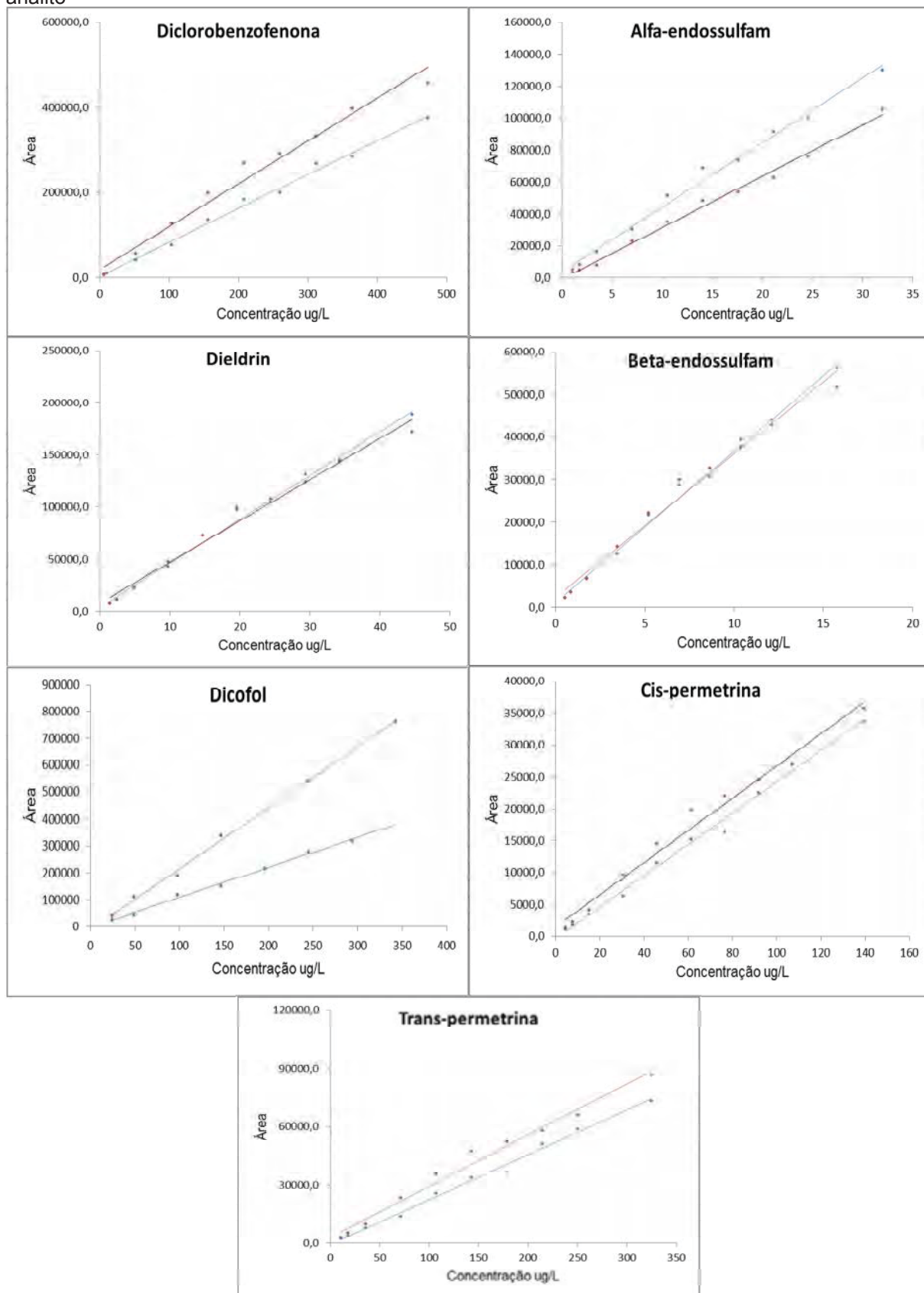
O estudo de efeito matriz foi realizado conforme descrito no item 4.2.13.2. A Figura 24 apresenta as curvas analíticas obtidas no solvente (em azul) e na matriz (vermelho) para cada analito, e os valores encontrados para a % de efeito matriz encontram-se na Tabela 15.

**Tabela 15** - Efeito matriz observado na análise por GC/ECD dos analitos extraídos do tecido adiposo pelo método QuEChERS

| <b>Analito</b>           | <b>% Efeito Matriz</b> |
|--------------------------|------------------------|
| Diclorobenzofenona (DBP) | +26                    |
| Alfa - Endossulfam       | -21                    |
| Dieldrin                 | -6*                    |
| Beta – Endossulfam       | -5*                    |
| Dicofol                  | +103                   |
| Cis- Permetrina          | + 3*                   |
| Trans- Permetrina        | +14                    |

\*efeito matriz < 10% é considerado não significativo

**Figura 24** - Curvas analíticas (GC-ECD) no solvente (azul) e na matriz (vermelho) para cada analito



Analisando os resultados obtidos (Tabela 15) com as curvas apresentadas na Figura 24 podemos verificar diferentes efeitos causados pela matriz:

- ✓ Alfa-endossulfam apresenta a diminuição da resposta cromatográfica, podendo afetar o estudo de recuperação com resultados inferiores a 100%.
- ✓ O dicofol, assim como DBP e a trans-permetrina apresenta um aumento na resposta cromatográfica, isto possivelmente causado pela presença de componentes da matriz que diminuem a degradação do analito no injetor do cromatógrafo, aumentando sua resposta.
- ✓ No caso da cis-permetrina o efeito não altera o coeficiente angular da curva analítica, mas altera o coeficiente linear, apresentando assim, duas curvas paralelas.

Mesmo com um efeito muito pequeno para o dieldrin e beta-endossulfam, optou-se por utilizar a quantificação pela curva analítica preparada no extrato da matriz para todos os analitos.

### 5.7.5 Estudo de recuperação

O estudo de recuperação foi realizado conforme descrito no item 4.2.13.3. O cálculo dos valores de recuperação foi realizado comparando-se a área obtida para cada analito no cromatograma do estudo de recuperação com a área encontrada na injeção de uma mistura dos pesticidas, no extrato da matriz, com a concentração final esperada para cada nível de fortificação. Na Tabela 16 são representados os resultados de recuperação e coeficiente de variação encontrados para as três extrações realizadas, para cada uma das concentrações, sendo um total de nove extrações.

**Tabela 16** - Resultados obtidos no estudo de recuperação do método QuEChERS

| Nível de fortificação | DBP   |    | Alfa - Endossulfam |    | Dieldrin |    | Beta – Endossulfam |    | Cis - Permetrina |    | Trans – Permetrina |    |
|-----------------------|-------|----|--------------------|----|----------|----|--------------------|----|------------------|----|--------------------|----|
|                       | % rec | CV | % rec              | CV | % rec    | CV | % rec              | CV | % rec            | CV | % rec              | CV |
| Primeiro              | 87    | 13 | 85                 | 5  | 79       | 6  | 81                 | 7  | 93               | 10 | 90                 | 8  |
| Segundo               | 76    | 12 | 85                 | 7  | 85       | 10 | 83                 | 7  | 91               | 15 | 76                 | 8  |
| Terceiro              | 76    | 5  | 80                 | 5  | 81       | 5  | 86                 | 5  | 84               | 6  | 75                 | 5  |

Os valores obtidos para DBP, alfa-endossulfam, dieldrin, beta-endossulfam, cis-permetrina e trans-permetrina estão dentro da faixa determinada de recuperação (70 a 120%) e de coeficiente de variação (<20%) por Thier e Zeumer (1987), indicando assim, uma boa precisão e exatidão do método desenvolvido.

O estudo de recuperação do dicofol foi realizado separadamente, pois conforme mencionado anteriormente, apresenta em seu padrão um produto de degradação (DBP). Na Tabela 17 estão os valores de recuperação encontrados, também com a comparação com o extrato da matriz, para a DBP (presente no padrão do dicofol), o próprio dicofol e o valor encontrado com a soma das áreas dos dois picos (DBP + dicofol).

**Tabela 17** - Resultados obtidos para o dicofol no estudo de recuperação do método QuEChERS

| Nível de fortificação | DBP (Presente no padrão do dicofol) |    | Dicofol |    | DBP (Presente no padrão do dicofol) + Dicofol |    |
|-----------------------|-------------------------------------|----|---------|----|-----------------------------------------------|----|
|                       | % rec                               | CV | % rec   | CV | % rec                                         | CV |
| Primeiro              | 73                                  | 10 | 86      | 3  | 82                                            | 5  |
| Segundo               | 133                                 | 19 | 30      | 38 | 58                                            | 10 |
| Terceiro              | 170                                 | 14 | 27      | 34 | 53                                            | 12 |

Para o dicofol os valores encontrados de recuperação para o segundo e terceiro nível de fortificação (30 e 27%) estão muito abaixo do indicado pela literatura, outro fator negativo encontra-se no coeficiente de variação acima de 20%. Analisando os mesmos níveis de fortificação (segundo e terceiro), agora para a DBP podemos concluir que houve a degradação do dicofol, formando DBP, uma vez que ao diminuir a recuperação do dicofol, houve o aumento da resposta da DBP.

Esta degradação do dicofol já foi abordada em outro estudo realizado com o método QuEChERS, e de acordo com Lehotay, Mastovska e Lightfield (2005) este problema de degradação é dificilmente controlado, devido aos diversos fatores que podem afetá-lo, como o pH, tipo de solvente, intensidade da luz, componentes da matriz e suas concentrações, temperatura, quantidade de água presente e concentração do analito. Em seu estudo, Lehotay, Mastovska e Lightfield (2005) resolveram o problema de degradação do dicofol com a utilização de acetonitrila acidificada com ácido acético e acetato de sódio no lugar de cloreto de sódio, fazendo-se assim, um tampão para controlar o pH da extração. Este método não

pode ser testado pois o número de amostra testemunha era insuficiente para uma nova validação do método analítico.

Com a soma dos dois picos presentes no padrão do dicofol foram obtidos valores mais adequados (e fidedignos) para a recuperação e CV, indicando que mesmo que haja uma degradação, está havendo uma boa extração dos compostos, considerando-se a complexidade da matriz.

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

O limite de quantificação do método corresponde ao primeiro nível de fortificação das amostras para o ensaio de recuperação. Já o limite de detecção é calculado conforme indicado no item 4.2.13.4. Os valores obtidos para LD e LQ do método estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18** - Resultados encontrados para LD e LQ dos analitos empregando o método QuEChERS

| <b>Analito</b>     | <b>LD (ng g<sup>-1</sup>)</b> | <b>LQ (ng g<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Diclorobenzofenona | 124                           | 200                           |
| Alfa-endossulfam   | 3                             | 34                            |
| Dieldrin           | 27                            | 50                            |
| Beta-endossulfam   | 3                             | 17                            |
| Dicofol            | 64                            | 500                           |
| Cis-permetrina     | 61                            | 200                           |
| Trans-permetrina   | 110                           | 300                           |

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação do método são coerentes com os valores estimados para as amostras. Na Tabela 19 estão os valores encontrados nos estudos realizados anteriormente para determinação dos mesmos analitos em ensaios biológicos do mesmo projeto temático (TOLEDO NETTO, 2009; CARVALHO, 2010) e o valor teórico calculado esperado para os analitos no tecido adiposo associado ao ovário, referente aos animais de experimentação do presente projeto. O cálculo foi realizado considerando o consumo médio de ração, peso médio e tempo de exposição dos animais aos pesticidas nas doses NOEL (*No Observed Effects Level* - *Nível de efeito não observado*) e LOEL (*Lowest Observed Level* - *Nível mais baixo de efeito observado*).

**Tabela 19** - Quantidade ( $\text{ng g}^{-1}$ ) de pesticidas encontrados nas amostras de diferentes tecidos de ratos do estudo biológico e estimativa do teor em tecido adiposo associado ao ovário

| Matriz                  | Valor de analito encontrado (ng g <sup>-1</sup> ) |           |               |                 |              | Referência         |
|-------------------------|---------------------------------------------------|-----------|---------------|-----------------|--------------|--------------------|
|                         | Dicofol                                           | Dieldrin  | Endossulfam   |                 | Permetrina   |                    |
|                         |                                                   |           | β-endossulfam | α - endossulfam |              |                    |
| Tecido adiposo          | 870-12000                                         | 80-2000   | 63            | ND              | ND           | TOLEDO NETTO, 2009 |
| Cérebro                 | 210-51640                                         | 40-5820   | 60-43720      | 40-8960         | ND           | CARVALHO, 2010     |
| Fígado                  | 460-1280                                          | 1570-5380 | 2980-9590     | 1900-7970       | ND           | CARVALHO, 2010     |
| Valor teórico calculado | 2000-9000                                         | 100-200   | 3000-17000    |                 | 22000-112000 | -                  |

\*ND = não detectado

Tendo em vista os valores encontrados nos estudos anteriores e os estimados para este estudo, pode-se dizer que os limites de detecção e quantificação encontram-se abaixo dos valores esperados, garantindo a detecção e a quantificação dos analitos.

#### 5.7.6 Análise das amostras provenientes dos ensaios biológicos

Após a validação do método analítico desenvolvido no presente estudo foi possível analisar as amostras do ensaio biológico, conforme indicado no item 4.2.14. As análises foram realizadas em duplicata para as amostras com massa disponível, porém, para as amostras com massa inferior a 1,0 g foi realizado apenas a duplicata da etapa de *clean-up*, resultando assim, em dois extratos para cada amostra analisada. Para menor variação dos resultados entre as replicatas, o dicofol foi somado ao seu produto de degradação, a diclorobenzofenona (DBP), uma vez que sua degradação não é sistemática.

Os valores encontrados para cada amostra (em nanograma por grama), assim como o coeficiente de variação estão dispostos na Tabela 20.

**Tabela 20** – Quantidade dos analitos (ng g<sup>-1</sup>) encontrados em tecido adiposo associado ao ovário de ratas submetidas a dietas contendo os pesticidas nas doses NOEL e LOEL

| Amostra      | Concentração dos pesticidas em ng por g de tecido adiposo (ng g <sup>-1</sup> ) |    |                  |               |    |                  |                |    |                  |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|----|------------------|---------------|----|------------------|----------------|----|------------------|
|              | DBP + Dicofof                                                                   |    | Alfa-Endossulfam | Dieldrin      |    | Beta-Endossulfam | Cis-Permetrina |    | Trans-Permetrina |
|              | Concen-tração                                                                   | CV |                  | Concen-tração | CV |                  | Concen-tração  | CV |                  |
| GII CX1 W2   | 2005                                                                            | 2  | ND               | 213           | <1 | ND               | 1725           | 1  | ND               |
| GII CX1 W3   | 3651                                                                            | 5  | ND               | 508           | 2  | ND               | 2509           | 2  | ND               |
| GII CX1 W4   | 1532                                                                            | 14 | ND               | 269           | 16 | ND               | 1369           | 11 | ND               |
| GII CX1 SD1  | 5440                                                                            | 10 | ND               | 490           | 5  | ND               | 6798           | 3  | +                |
| GII CX1 SD2  | 4014                                                                            | 3  | ND               | 406           | 4  | ND               | 5255           | 2  | +                |
| GII CX1 SD3  | 5697                                                                            | 36 | ND               | 400           | 34 | ND               | 8613           | 25 | +                |
| GII CX1 SD4  | 8520                                                                            | 27 | ND               | 713           | 33 | ND               | 12082          | 28 | +                |
| GII CX1 L1   | 7269                                                                            | 5  | ND               | 986           | <1 | ND               | 1784           | 4  | ND               |
| GII CX1 L2   | 4812                                                                            | 9  | ND               | 671           | 7  | ND               | 2123           | 3  | ND               |
| GII CX1 L3   | 4172                                                                            | 11 | ND               | 466           | 2  | ND               | 2322           | 4  | ND               |
| GII CX1 L4   | 5459                                                                            | 1  | ND               | 804           | 11 | ND               | 1677           | 7  | ND               |
| GII CX2 W1   | 5649                                                                            | 6  | ND               | 598           | 11 | ND               | 3826           | 13 | ND               |
| GII CX2 W2   | 6132                                                                            | 9  | ND               | 666           | 3  | ND               | 2431           | 5  | ND               |
| GII CX2 W3   | 4022                                                                            | 8  | ND               | 388           | 7  | ND               | 2902           | 6  | ND               |
| GII CX2 SD1  | 5525                                                                            | 32 | ND               | 534           | 38 | ND               | 4513           | 34 | ND               |
| GII CX2 SD2  | 6352                                                                            | 2  | ND               | 420           | 4  | ND               | 7630           | 4  | +                |
| GII CX2 SD3  | 4924                                                                            | 14 | ND               | 386           | 11 | ND               | 3169           | 1  | ND               |
| GII CX2 L1   | 11308                                                                           | 21 | ND               | 1008          | 11 | ND               | 4710           | 12 | ND               |
| GII CX2 L2   | 2211                                                                            | 4  | ND               | 136           | 5  | ND               | 803            | 7  | ND               |
| GII CX2 L3   | 7672                                                                            | 10 | ND               | 752           | 5  | ND               | 3398           | 8  | ND               |
| GII CX3 W1   | 4511                                                                            | 19 | ND               | 291           | 21 | ND               | 2325           | 16 | ND               |
| GII CX3 W2   | 2880                                                                            | 14 | ND               | 173           | 25 | ND               | 1413           | 11 | ND               |
| GII CX3 W3   | 2763                                                                            | 14 | ND               | 144           | 7  | ND               | 2035           | <1 | ND               |
| GII CX3 SD1  | 5490                                                                            | 3  | ND               | 585           | 6  | ND               | 4344           | 6  | ND               |
| GII CX3 SD2  | 11349                                                                           | 3  | ND               | 925           | 9  | ND               | 8983           | 10 | +                |
| GII CX3 SD3  | 5260                                                                            | 2  | ND               | 353           | 6  | ND               | 3053           | 2  | ND               |
| GII CX3 L1   | 3852                                                                            | <1 | ND               | 327           | 2  | ND               | 1575           | 3  | ND               |
| GII CX3 L2   | 3923                                                                            | 11 | ND               | 295           | 10 | ND               | 2376           | 6  | ND               |
| GII CX3 L3   | 9825                                                                            | 8  | ND               | 1008          | 3  | ND               | 3886           | 5  | ND               |
| GIII CX1 W1  | 16217                                                                           | 4  | ND               | 807           | 1  | ND               | 6063           | 3  | +                |
| GIII CX1 W2  | 12515                                                                           | 14 | ND               | 888           | 19 | ND               | 5077           | 14 | +                |
| GIII CX1 W3  | 8040                                                                            | 10 | ND               | 135           | 4  | ND               | 3015           | 6  | +                |
| GIII CX1 W4  | 4704                                                                            | 5  | ND               | +             | -  | ND               | 1347           | 3  | ND               |
| GIII CX1 SD1 | 2823                                                                            | 2  | ND               | 371           | 3  | ND               | 3538           | <1 | +                |

ND = não detectado; + = detectado abaixo do Limite de quantificação (LQ) do método.

GII – Grupo NOEL; GIII – Grupo LOEL; W – Wistar; SD - Sprague-Dawley; L - Lewis

**Tabela 20** (continuação)

| Amostra      | Concentração dos pesticidas em ng por g de tecido adiposo (ng g <sup>-1</sup> ) |    |                  |                   |    |                  |                   |    |                  |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|----|------------------|-------------------|----|------------------|-------------------|----|------------------|
|              | DBP + Dicofol                                                                   |    | Alfa-Endossulfam | Dieldrin          |    | Beta-Endossulfam | Cis-Permetrina    |    | Trans-Permetrina |
|              | Concen-<br>tração                                                               | CV |                  | Concen-<br>tração | CV |                  | Concen-<br>tração | CV |                  |
| GIII CX1 SD2 | 6806                                                                            | 5  | ND               | 677               | 5  | ND               | 7036              | 9  | +                |
| GIII CX1 SD3 | 3929                                                                            | 2  | ND               | 526               | 4  | ND               | 3817              | 1  | +                |
| GIII CX1 SD4 | 0                                                                               | -  | ND               | +                 | -  | ND               | +                 | -  | ND               |
| GIII CX1 1L1 | 13242                                                                           | 18 | ND               | 175               | 7  | ND               | 3978              | 7  | +                |
| GIII CX1 1L3 | 11626                                                                           | 18 | ND               | 127               | 2  | ND               | 3427              | 2  | +                |
| GIII CX1 2L1 | 6299                                                                            | 19 | ND               | +                 | -  | ND               | 2648              | <1 | ND               |
| GIII CX1 2L3 | 10337                                                                           | 9  | ND               | 9                 | 39 | ND               | 3169              | 7  | +                |
| GIII CX1 2L4 | 6799                                                                            | 5  | ND               | +                 | -  | ND               | 1852              | 6  | ND               |
| GIII CX2 W1  | 9134                                                                            | 19 | ND               | 394               | 23 | ND               | 3308              | 19 | ND               |
| GIII CX2 W2  | 5904                                                                            | 6  | ND               | 304               | <1 | ND               | 2986              | 4  | ND               |
| GIII CX2 W3  | 6007                                                                            | 24 | ND               | 256               | 13 | ND               | 2731              | 10 | ND               |
| GIII CX2 SD1 | 5320                                                                            | 13 | ND               | 846               | 1  | ND               | 6991              | 2  | +                |
| GIII CX2 SD2 | 3738                                                                            | 2  | ND               | 677               | 5  | ND               | 5922              | 7  | +                |
| GIII CX2 SD3 | 3763                                                                            | 10 | ND               | 650               | 11 | ND               | 6121              | 17 | +                |
| GIII CX3 W1  | 5442                                                                            | 4  | ND               | 198               | 4  | ND               | 1995              | 3  | ND               |
| GIII CX3 W2  | 3957                                                                            | 2  | ND               | 51                | 2  | ND               | 996               | 3  | ND               |
| GIII CX3 SD1 | 4457                                                                            | 13 | ND               | 410               | 11 | ND               | 4132              | 10 | +                |
| GIII CX3 SD2 | 9219                                                                            | 15 | ND               | 135               | 23 | ND               | 5063              | 12 | +                |
| GIII CX3 SD3 | 2525                                                                            | 23 | ND               | 160               | 40 | ND               | 2350              | 21 | +                |

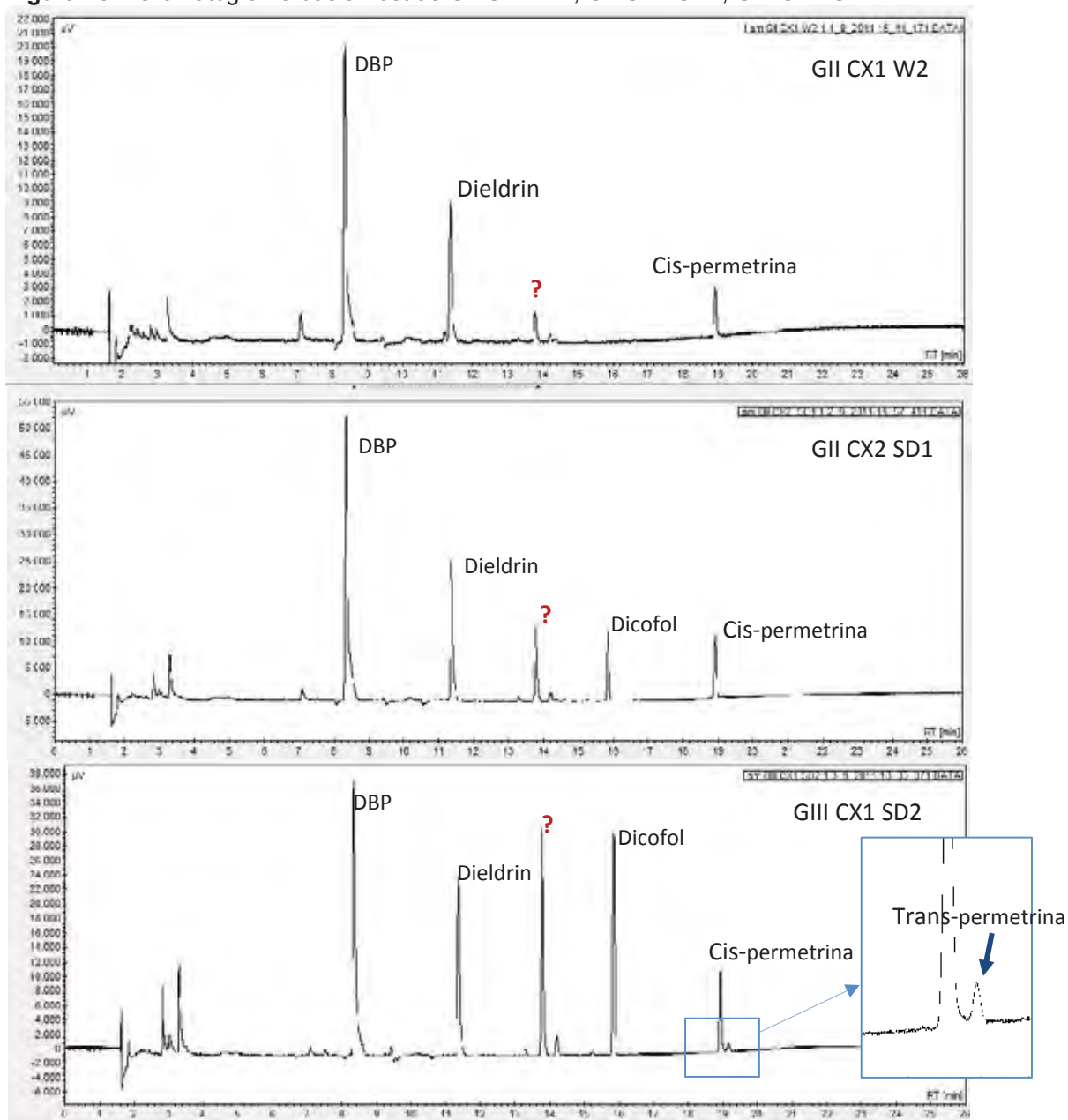
ND = não detectado; + = detectado abaixo do Limite de quantificação (LQ) do método.

GII – Grupo NOEL; GIII – Grupo LOEL; W – Wistar; SD – Sprague-Dawley; L – Lewis

Os dados obtidos demonstram maior acúmulo de DBP, dieldrin e cis-permetrina, evidenciada pela presença dos mesmos em todas as análises. O pesticida dicofol foi detectado e quantificado em grande parte das amostras, enquanto que a trans-permetrina foi detectada em diversas amostras, mas não pode ser quantificada, uma vez que a concentração estava abaixo do limite de

quantificação do método. Já o endossulfam (alfa e beta) não foi detectado em nenhum tecido. A Figura 25 ilustra o perfil cromatográfico obtido nas análises de três amostras.

**Figura 25** – Cromatograma das amostras GII CX1 W2, GII CX2 SD1, GIII CX1 SD2

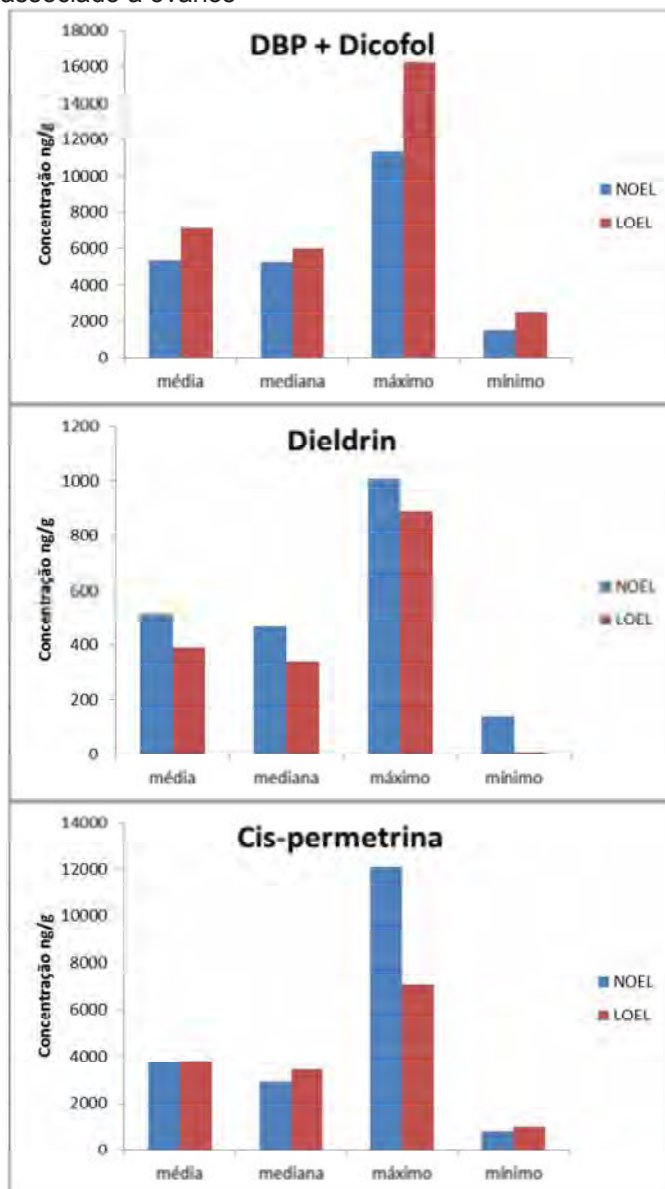


Além dos picos dos analitos, também foi evidenciado a presença de um pico (com diferentes intensidades) no  $t_R = 13,80$  em praticamente todas as amostras, o

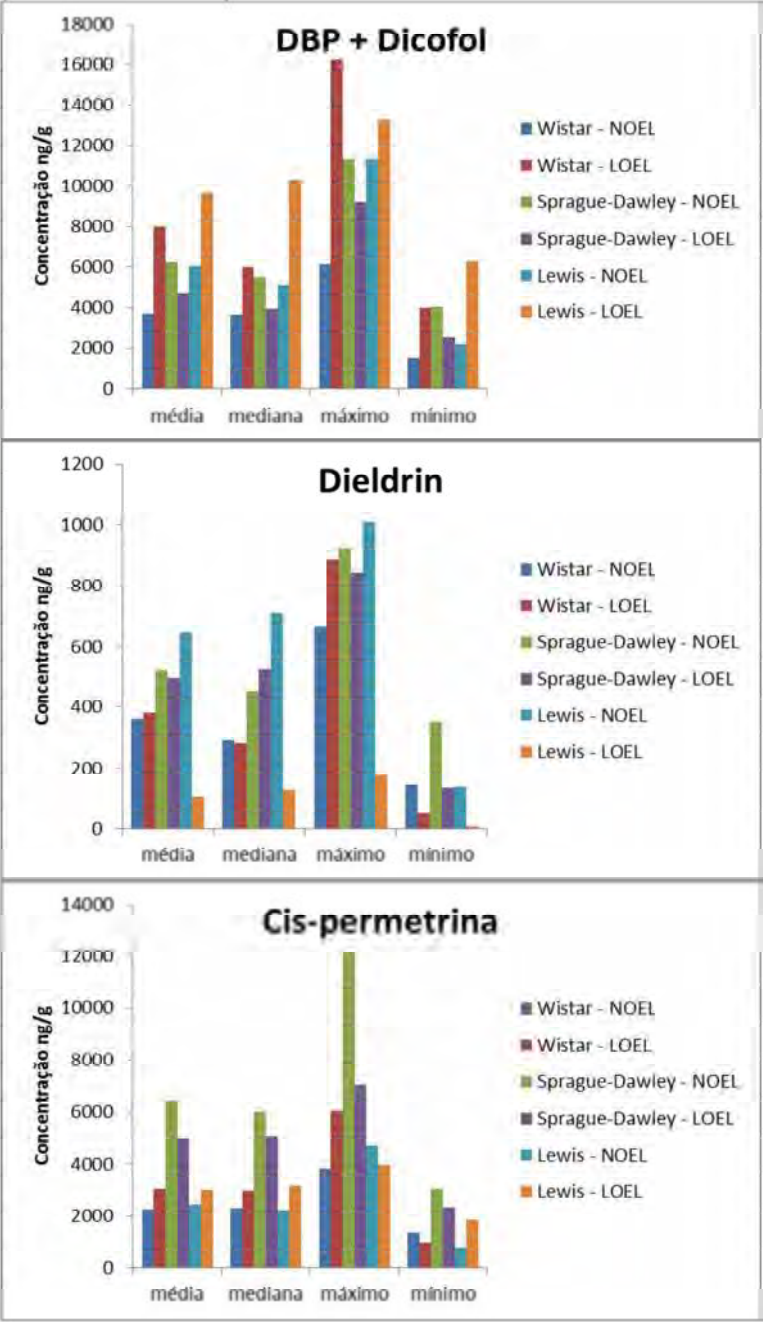
que pode indicar a presença de algum metabólito ou produto de degradação dos pesticidas em estudo.

Ainda considerando os resultados das análises, as Figuras 26 e 27 bem como a Tabela 21 resumizam os dados para os pesticidas que foram quantificados (DBP + dicofol, dieldrin e endossulfam).

**Figura 26** - Sumário dos dados obtidos para os pesticidas quantificados nas amostras tecido adiposo associado a ovários



**Figura 27** - Comparação entre os dados das diferentes linhagens em cada dose para cada um dos pesticidas.



**Tabela 21** - Sumário dos resultados observados para as análises das amostras, separados por pesticida e linhagem

| Pesticida      | Linhagem       | Maior acúmulo |
|----------------|----------------|---------------|
| DBP + Dicofol  | Wistar         | LOEL          |
|                | Sprague-dawley | NOEL          |
|                | Lewis          | LOEL          |
| Dieldrin       | Wistar         | Similares     |
|                | Sprague-dawley | Similares     |
|                | Lewis          | NOEL          |
| Cis-permetrina | Wistar         | LOEL          |
|                | Sprague-dawley | NOEL          |
|                | Lewis          | LOEL          |

Como pode ser observado na Figura 26, a soma DBP + Dicofol apresentou maior acúmulo nos animais expostos à dose LOEL, como esperado, já que estes animais foram alimentados com uma quantidade maior dos pesticidas. Já para o dieldrin, o encontrado foi o oposto: animais que se alimentaram com menor quantidade dessas substâncias tiveram maior acúmulo. Enquanto que para a cis-permetrina, tanto a média quanto a mediana apresentaram resultados similares para as diferentes doses.

Quando consideradas as diferenças entre as linhagens (Tabela 21 e Figura 27), a Wistar apresentou acúmulo compatível à dose ingerida para a DBP + dicofol e para a permetrina, uma vez que os valores obtidos foram mais elevados nos animais expostos à LOEL, porém para o dieldrin os resultados foram similares. A linhagem Sprague-Dawley também apresentou resultados similares para o dieldrin, porém para DBP + dicofol para a cis-permetrina foram encontrados maiores acúmulos em animais expostos a menores doses. Já a linhagem Lewis apresentou bastante discrepância entre os valores obtidos para o dieldrin, tendo maior acúmulo nos animais que ingeriram a dose NOEL, enquanto que o DBP+dicofol e para cis-permetrina tiveram maior acúmulo em animais expostos à LOEL.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho apresenta um método cromatográfico capaz de separar os analitos, com boa resolução em um intervalo curto de tempo (26 minutos). Também apresenta o desenvolvimento de um novo método para determinação de DBP, dieldrin, dicofol, alfa-endossulfam, beta-endossulfam, cis-permetrina e trans-permetrina, que é uma modificação do método QuEChERS e que possui como grande vantagem ser simples e rápido, uma vez que é constituído de apenas duas etapas: extração com ACN e posterior *clean-up* com uma d-SPE, muito mais simples que os métodos convencionais (SPE e MSPD).

O método desenvolvido foi validado segundo os parâmetros: seletividade, exatidão, precisão, efeito matriz, faixa linear, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, mostrando-se adequado ao estudo pretendido.

As amostras do estudo biológico foram analisadas pelo método desenvolvido e todas apresentaram resíduos de DBP, dieldrin e cis-permetrina, além destes, grande parte delas apresentou dicofol, indicando assim, a característica bioacumulativa destas substâncias. Outro pesticida detectado em diversas amostras foi a trans-permetrina, mas sua quantificação não foi realizada pois as concentrações observadas estavam abaixo do LQ do método. As possíveis relações existentes entre os valores (de bioacumulação) encontrados e os efeitos causados serão avaliados pelos pesquisadores da área biológica.

Considerando-se que os animais receberam misturas destes pesticidas em duas doses: LOEL e NOEL, utilizadas para estabelecer os limites máximos permitidos em alimentos, e ainda que estes pesticidas são considerados alteradores endócrinos, os dados obtidos apontam para a necessidade de rever os limites máximos permitidos, considerando a exposição concomitante a diversos pesticidas na dieta humana.

## Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Anexo relatório 2001-2007, 2008a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d0eeda80474595359d07dd3fbc4c6735/anexo+relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 out. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório 2001-2007, 2008b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/587f64804745787985d4d53fbc4c6735/relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 out. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório 2009, 2010. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f95ba780481aa0dd85a19570623c4ce6/Resultados\\_2009\\_PARA.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f95ba780481aa0dd85a19570623c4ce6/Resultados_2009_PARA.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 10 out. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** monografias de agrotóxicos - Endossulfam. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af90f080474580548c47dc3fbc4c6735/E02++Endossulfam\\_FINAL.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af90f080474580548c47dc3fbc4c6735/E02++Endossulfam_FINAL.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0)>. Acesso em: 10 out. 2011a.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** monografias de agrotóxicos - Dicofol. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e770c10047458f8c98c5dc3fbc4c6735/d14.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>>. Acesso em: 10 out. 2011b.
- ALBASSER, S. S.; RAO, R. N.; SWAMY, Y. V.; MUKKANTI, K. An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5537-5554, 2010.
- ALLÉ, A.; DEMBELLÉ, B.; YAO, B.; ADO, G. Distribution of organochlorine pesticides in human breast milk and adipose tissue from two locations in Côte d'Ivoire. **Asian Journal of Applied Sciences** 2, v. 5, p. 456-463, 2009.
- ALONSO, M. B. **Organoclorados em Toninhas, *Pontoporia blainvillei* (MAMMALIA CETACEA) da região costeira do estado de São Paulo, Brasil.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- AMATO, C. D.; 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.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 7-20, 2009.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHERD, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

BARBOSA, C. F.; SANTOS, E. C. D.; SANTOS, V. L.; FILGUEIRAS, L. A. **O uso de agrotóxicos nas áreas de cultivo de hortaliças no município de Cametá-Pará**. 2010. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/simpequi/2010/trabalhos/232-7625.htm>>. Acesso em: 9 out. 2011.

BEHROOZ, R. D.; SARI, A. E.; BAHRAMIFAR, N.; GHASEMPOURI, S. M. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human milk from the Southern Coast of Caspian Sea, Iran. **Chemosphere**, v. 74, p. 931-937, 2009.

BEZERRA, D. S. S. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis Mellifera***. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

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. Scope of the problem. In: BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. London: Lewis Publishers, 2003. p. 9-43.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Resolução nº 28, de 9 de agosto de 2010. Regulamento técnico para o ingrediente ativo Endossulfam em decorrência da reavaliação toxicológica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 ago. 2010. Seção 1, p. 64. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/resolucoes/105067-28.html>>. Acesso em: 10 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria 329. Proíbe, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária dentre outros. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 set. 1985. Seção 1, p. 12941. Disponível em: <<http://www.vieiracastro.com.br/legislacao/Portaria%20MA%20n%C2%BA%20329-85.pdf>>. Acesso em 11 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de intoxicação por agrotóxicos em geral por unidade federada, segundo circunstância registrado em 2009**. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/tab01\\_agro\\_geral\\_2009.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab01_agro_geral_2009.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Óbitos de intoxicação por agrotóxicos em geral por unidade federada, segundo circunstância registrado em 2009**. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/tab06\\_agro\\_geral\\_2009.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab06_agro_geral_2009.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos**. 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/integra\\_agrotoxicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/integra_agrotoxicos.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2011.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 113, p. 129-146, 2003.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. 2. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1969. 305 p.

CARVALHO, A. P. A. **Otimização e validação de método para análise simultânea de dicofol, permetrina, dieldrin, endosulfan e diclorvos em ração animal, fígado e cérebro de ratos**. 2010. 135 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CASTILLO, M.; GONZÁLES, C.; MIRALLES, A. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 1315-1328, 2011.

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.

CHOPRA, A. K.; SHARMA, M. K.; CHAMOLI, S. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system – an overview. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 173, p. 905-916, 2011.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Valores de referência de toxicidade para a saúde humana, 1 – Aldrin, Dieldrin, Endrin**. 2008. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp>>. Acesso em: 8 out. 2011.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1337-1348, 2007.

CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 620-632, 2007.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticides exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 1402-1419, 2011.

ELJARRAT, E.; BARCELO, D. Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 655-665, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Estudo traça mapa sobre uso do agrotóxico no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/blog/?p=233>>. Acesso em: 11 out. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Pesticidas**: equilíbrio entre a proteção das culturas e o uso responsável. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt16.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review. **Talanta**, v. 79, p. 109-128, 2009.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; LOZANO, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; MOLINA-DÍAZ, A. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample reparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6022-6035, 2010.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; HUMBERTO DE QUEIROZ, J. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.

GRUND, S.; HIGLEY, E.; SCHONENBERGER, R.; SUTER, M. J. F.; GEISY, J. P.; BRAUNBECK, T.; HECKER, M.; HOULLERT, H. The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by *in vitro* bioassays and chemical analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 3, p. 446-460, 2011.

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

GUAN, H.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10531-10538, 2009.

HERRERO-MERCADO, M.; WALISZEWSKI, S. M.; VALENCIA-QUINTANA, R.; CABA, M.; FERNÁNDEZ-CHALATE, F.; GARCIA-AGUILAR, E.; VILLALBA, R. Organochlorine pesticide levels in adipose tissue of pregnant women in veracruz, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 652-656, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2010. Disponível em: <[http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao\\_inmetro.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents Classified by the IARC monographs, volumes 1-102**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2011.

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

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

LACORTE, S.; QUINTANA, J.; TAULER, R.; VENTURA, F.; TOVAR-SÁNCHEZ, A.; DUARTE, C. M. Ultra-trace determination of persistent organic pollutants in arctic ice using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8581-8589, 2009.

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

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

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

LOPEZ-ESPINOSA, M. J.; LOPEZ-NAVARRETE, E.; RIVAS, 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.

MENTEN, J. O. M.; SAMPAIO, I. A.; MOREIRA, H.; FLÔRES, D.; MENTEN, M. **O setor de defensivos agrícolas no Brasil**. Disponível em: <[http://www.cultivarnet.com.br/site/index.php?view=article&catid=31%3Ageneral&id=435%3Ao-setor-de-defensivos-agricolas-no-brasil-&format=pdf&option=com\\_content&Itemid=46](http://www.cultivarnet.com.br/site/index.php?view=article&catid=31%3Ageneral&id=435%3Ao-setor-de-defensivos-agricolas-no-brasil-&format=pdf&option=com_content&Itemid=46)>. Acesso em: 14 out. 2011.

MNIF, W.; HASSINE, A. J. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2265-2303, 2011.

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

MURNYAK, G.; VANDERBERG, J.; YAROSCHAK, P. J.; WILLIAMS, L.; PRABHAKARAN, K.; HINZ, J. Emerging contaminants: presentations at the 2009 toxicology and risk assessment conference. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 167-169, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Espectro de massa**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>>. Acesso em: 25 nov. 2010.

PANG, G. F.; CAO, Y. Z.; ZHANG, J. J.; FAN, C. L.; LIU, Y. M.; LI, X. M.; JIA, G. Q.; LI, Z. Y.; SHI, Y. Q.; WU, Y. P.; GUO, T. T. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/ gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 1-30, 2006.

PETRO, E. M. L.; COVACI, A.; LEROY, J. L. M. R.; DIRTU, A. C.; WIM, D. C.; BOLS, P. E. J. Occurrence of endocrine disrupting compounds in tissues and body fluids of Belgian dairy cows and its implications for the use of the cow as a model to study endocrine disruption. **Journal of Total Environment**, v. 408, p. 5423-5428, 2010.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 1, p. 45-85, 2003.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAWN, D. F. K.; JUDGE, J.; ROSCOE, V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2525-2531, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

RIBEIRO, M. L.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L. C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS Environment**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2008.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. Piretróides: uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

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

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, 2006. Disponível em: <<http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2011.

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). **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOLEDO NETTO, P. **Exposição à mistura de pesticidas em baixas doses: validação de método e aplicação a tecido adiposo de animais de experimentação (ratos Lewis)**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

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

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Stockholm Convention**. COP 5. Endosulfan included under the convention. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/COP/Meetings/COP5/tabid/1267/mctl/ViewDetails/EventModID/870/EventID/109/xmid/4351/Default.aspx>>. Acesso em: 9 out. 2011.

VALENTE, L. P. V.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGI0YXRpdmEtcG9yLWNyY21hdG9ncmFmaWE=>>>. Acesso em: 10 out. 2011.

WALISZEWSKI, S. M.; QUINTANA, R. V.; CORONA, C. A.; HERRERO, M.; SÁNCHEZ, K.; AGURRE, H.; ALDOVE, I. A.; ARROYO, S. G.; PIETRINI, R. V. Comparison of organochlorine pesticide levels in human adipose tissue of inhabitants from Veracruz and Puebla, Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 230-236, 2010.

WANG, N.; SHI, L.; KONG, D.; CAI, D.; CAO, Y.; LIU, Y.; PANG, G.; YU, R. Accumulation levels and characteristics of some pesticides in human adipose tissue samples from Southeast China. **Chemosphere**, v. 84, p. 964-971, 2011.

WEBER, J.; HALSALL, C. J.; MUIR, D.; TEIXEIRA, C.; SMALL, J.; SOLOMON, K.; HERMANSON, M.; HUNG, H.; BIDLÉMAN, T. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2966-2984, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **IPCS INCHEM**: dicofol, 1996. Disponível em: <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest81\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest81_e.htm)>. Acesso em 10 out. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Realth topics**: pesticides. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 10 out. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**. 2009. Disponível em: <[http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class\\_2009.pdf](http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2011.