

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENNIFER TEIXEIRA DOS SANTOS

VALIDAÇÃO DE EXTRAÇÃO QuEChERS PARA ANÁLISE DE
RESÍDUOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS EM LEITE
HUMANO POR CG-EM

CURITIBA

2018

JENNIFER TEIXEIRA DOS SANTOS

VALIDAÇÃO DE EXTRAÇÃO QuEChERS PARA ANÁLISE DE
RESÍDUOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS EM LEITE
HUMANO POR CG-EM

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós- Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Eliane Carneiro Gomes.

CURITIBA

2018

Santos, Jennifer Teixeira dos

Validação de extração QuEChERS para análise de resíduos organoclorados e organofosforados em leite humano por CG-EM / Jennifer Teixeira dos Santos – Curitiba, 2018.

115 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Ricardo Wagner

Coorientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Agrotóxico. 2. Leite materno. 3. Inseticidas organoclorados. 4. Inseticidas organofosforados.
I. Wagner, Ricardo. II. Gomes, Eliane Carneiro. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901



TERMO DE APROVAÇÃO

JENNIFER TEIXEIRA DOS SANTOS

Título: "VALIDAÇÃO DE EXTRAÇÃO QuEChERS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS EM LEITE HUMANO POR CG-EM"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Ricardo Wagner
Orientador


Profª. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Co-orientadora


Profª. Dra. Rachel Bulcão
Faculdade Educacional Araucária


Profª. Dra. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 27 de fevereiro de 2018.

*À minha mãe de coração e
alma, a quem devo a vida, dedico a ela mais essa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em seus caminhos e me proporcionar as maiores e melhores conquistas.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Ricardo Wagner e Prof^a. Dr^a. Eliane Carneiro Gomes, pela oportunidade de realizar este mestrado, por toda a confiança atribuída a minha capacidade. Em especial ao professor Ricardo por toda a paciência, atenção e dedicação que ele atribuiu a mim e ao meu projeto. Sua competência, devoção e ética aplicada à profissão é um grande exemplo de vida que me incentivará cada vez mais a persistir nos meus objetivos profissionais.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo e ao Rodrigo Floriano Pimpinato, que prontamente estiveram dispostos a colaborar, disponibilizando recursos essenciais que possibilitassem a realização desse trabalho, sem a parceria deles, nada disso seria possível.

As Prof^{as}. Dr^{as}. Rachel Bulcão e Yanna Dantas Rattmann por gentilmente aceitarem o convite da banca de defesa deste trabalho.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio e dedicação, em especial ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel pela amizade e por sempre me disponibilizar o espaço de estudo de seu laboratório.

Aos amigos e colegas que a UFPR me deu, por estarem sempre do meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos, fazendo com que essa jornada se tornasse uma experiência incrível em minha vida.

A minha mãe de coração Rita e minha avó Diva pelo amor incondicional sendo elas minhas referências de mulher forte e dedicada, meu porto seguro, mulheres que sempre fizeram de tudo por mim, ajudando para que eu alcançasse todas essas conquistas.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade que foi me concedida em ingressar a esse programa de pós-graduação e por fornecer todas as condições estruturais para a realização desse trabalho.

Ao secretário da pós-graduação, Jean, pela paciência e atenção.

Aos bancos de leite da região do Paraná que autorizaram e colaboraram com toda a atenção e dedicação para a coleta das amostras utilizadas para as análises desse trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, por autorizar e fornecer toda a infraestrutura para a realização das análises cromatográficas.

A CAPES, que possibilitou financeiramente a realização desse trabalho.

A todos os mestres que fizeram parte da minha vida, agradeço pela paciência, apoio, carinho, dedicação e pelo interesse, por compartilharem suas experiências de vida, e me ajudarem a trilhar esse caminho. O meu profundo respeito e eterna gratidão.

— “Quando tudo parece dar errado, acontecem coisas boas que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo!”

Renato Russo.

RESUMO

Desde a implantação do modelo de produção agrícola chamado “revolução verde”, os agrotóxicos foram introduzidos na agricultura brasileira com finalidade de combater pragas nas lavouras, e começaram a fazer parte do cotidiano da população exposta tanto ocupacionalmente após aplicações e pulverizações, quanto através da ingestão de resíduos de agrotóxicos remanescentes nos alimentos contaminados. Dentre os compostos químicos utilizados para tal finalidade estão os agrotóxicos organoclorados e organofosforados que são compostos orgânicos de alta toxicidade aos organismos alvo e ao ambiente. Após a exposição, os resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados no sangue, plasma e soro. Além disso, muitos desses compostos químicos se acumulam no tecido adiposo materno, passam do sangue da mãe ao sangue do feto através da placenta, e também são armazenados nas células epiteliais alveolares da mama durante a lactação para serem excretados pelo leite materno. O estado do Paraná, no Brasil, é referência do agronegócio nacional, tendo o agronegócio representando 30% do PIB, e é citado como sendo um dos estados que apresentam altíssimos índices de consumo de agrotóxicos do país. Como as análises de rotina realizadas em leite materno nos bancos de leite humano do estado são compostas somente por procedimentos que visam a qualidade microbiológica do leite como alimento, este trabalho objetivou trazer informações sobre a presença de agrotóxicos no leite materno. Para isso, foi realizada validação de uma metodologia QuEChERS modificada e, posteriormente, avaliação de 13 resíduos diferentes de agrotóxicos organoclorados e organofosforados em 75 amostras de leite materno humano coletados dos municípios de Curitiba, Ponta Grossa, Apucarana, Guarapuava e Toledo do estado do Paraná (Brasil). A metodologia apresentou boa seletividade, alta precisão, com valores de desvio padrão relativo entre 0,79% a 4,59%, e porcentagens de recuperação satisfatórias na faixa entre 60 a 90% para os compostos avaliados. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi empregada para detecção e quantificação dos compostos, o qual demonstrou alta sensibilidade, com valores de limite de detecção e quantificação baixos, possibilitando a detecção e quantificação de pequenas quantidades de analito nas amostras. Das 75 amostras de leite materno humano analisadas, 11 amostras apresentaram evidente contaminação residual, sendo identificados 5 compostos organoclorados: delta-hexaclorociclohexano, lindano, alfa-endossulfan, endossulfan sulfato, e p,p'-DDT, agrotóxicos estes proibidos para comercialização, uso e distribuição pela legislação brasileira. A metodologia QuEChERS demonstrou ser eficiente, tanto na extração quanto na análise cromatográfica possibilitando seu emprego em programas de monitoramento de agrotóxicos em leite. Os resultados mostraram um evidente problema de saúde pública, provocado pelo efeito bioacumulativo desses compostos no meio ambiente, exigindo maior atenção das autoridades competentes quanto à fiscalização do uso e venda desses agrotóxicos.

Palavras-chaves: Agrotóxico. Leite materno. Organoclorado. Organofosforado.

ABSTRACT

Since the implantation of the agricultural production model called "green revolution", the agrochemicals were introduced in Brazilian agriculture to combat pests in crops, and it began to be part of the daily life of the population exposed both occupationally after applications, as well as through ingestion pesticide residues in contaminated food. Among the chemical compounds used for this purpose are the organochlorine and organophosphorus pesticides, which are organic compounds with high toxicity to the target organisms and the environment. After its exposure, pesticide residues can be found in blood, plasma, and serum. In addition, many of these chemicals accumulate in maternal adipose tissue, pass from the mother's blood into the blood of the fetus through the placenta, and are also stored in the alveolar epithelial cells of the breast during lactation to be excreted in breast milk. The state of Paraná, in Brazil, is a reference for the national agrobusiness, with accounting for 30% of GDP, and it is cited as one of the states with the highest rates of consumption of agrochemicals in the country. As the routine analyzes carried out in breast milk in the human milk from the state are composed only of procedures that aim at the microbiological quality of milk as food, this work objectived to bring information about the presence of pesticides in breast milk. For that, the modified QuEChERS methodology Was validated and, later, was evaluated of 13 different residues of pesticides organochlorines and organophosphates in 75 samples of human breast milk collected from the cities of Curitiba, Ponta Grossa, Apucarana, Guarapuava and Toledo in the state of Paraná. The methodology showed good selectivity, high accuracy, with relative standard deviation values between 0.79% and 4.64%, and satisfactory recovery rates in the range of 60 to 90% for the evaluated compounds. Gas chromatography coupled to mass spectrometry was used for the detection and quantification of the compounds, which demonstrated high sensitivity with low detection and quantification limit values, allowing the detection and quantification of small amounts of analyte in the samples. Of the 75 samples of human breast milk analyzed, 11 samples showed evident residual contamination, being identified 5 organochlorine compounds: delta-hexachlorocyclohexane, lindane, alfa-endosulfan, endosulfan sulfate, and p,p'-DDT, pesticides prohibited for marketing, use and distribution by Brazilian legislation. The QuEChERS methodology proved to be efficient in the extraction of this pesticides and the chromatographic analysis conditions was possible identify and quantify analites, making possible its use in pesticide monitoring programs in human milk. The results showed an evident public health problem, caused by the bioaccumulative effect of these compounds on the environment, requiring greater attention of the competent authorities regarding the control of the use of these pesticides.

Keywords: Pesticide. Breast milk. Organochlorine. Organophosphorus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS ISÔMEROS DO HEXACLOROCLICLOHEXANO (HCH).....	31
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO p,p'-DDT E SEUS RESPECTIVOS METABÓLITOS.....	32
FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ALDRIN E SEU METABÓLITO DIELDRIN.	34
FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ENDO ESTEREOISÔMERO DO DIELDRIN, O COMPOSTO ENDRIN.	34
FIGURA 5 - REAÇÃO DIELS-ALDER DO HEXACLOROCICLOPENTADIENO COM O CICLOPENTADIENO, ORIGINANDO O COMPOSTO CLORDANO.....	35
FIGURA 6 - ADIÇÃO DO GÁS CLORO AO CLORDANO, ORIGINANDO ISÔMERO ALFA E GAMA CLORDANO.	36
FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DO HEPTACLORO E SEU PRODUTO DE METABOLIZAÇÃO, O HEPTACLORO EPÓXIDO.	36
FIGURA 8 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ENDOSSULFAN. 37	
FIGURA 9 - BASE ESTRUTURAL MOLECULAR GERAL DOS COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS.	42
FIGURA 10 - ESTRUTURAS FUNDAMENTAIS DOS OF _s FOSFORADOS: ÁCIDO FOSFÓRICO E ÁCIDO PIROFOSFÓRICO.....	43
FIGURA 11 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF PARAOXON ETÍLICO.	44
FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF TETRAETILPIROFOSFATO (TEPP).....	44
FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO DICLORVÓS (DDVP).....	45
FIGURA 14 - ESTRUTURAS FUNDAMENTAIS DOS OF _s TIOFOSFORADOS: ÁCIDO TIONOFOSFÓRICO E ÁCIDO DITIONOFOSFÓRICO... 46	
FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF PARATION ETÍLICO.	47
FIGURA 16 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF FENTION....	47

FIGURA 17 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF DIAZINON. .	48
FIGURA 18 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF MALATION. .	49
FIGURA 19 - DECOMPOSIÇÃO DO COMPOSTO OF MALATION PARA SEUS ANÁLGOS DE MAIOR TOXICIDADE, O MALAOXON E O ISOMALATION.....	50
FIGURA 20 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF DIMETOATO.	50
FIGURA 21 - MAPA DE LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES DE ABRANGÊNCIA DAS UNIDADES DE BANCO DE LEITE HUMANO NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL.	72
FIGURA 22 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS AGROTÓXICOS EM LEITE HUMANO.....	77
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p p' DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, UTILIZADOS NO ESTUDO.....	80
FIGURA 24- CROMATOGRAMA GERAL DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p p'- DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, E CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE BOVINO UTILIZADOS NO ESTUDO.	82
FIGURA 25 - CURVAS ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p'p DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, UTILIZADOS NO ESTUDO.....	83
FIGURA 26 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA TÍPICO CADA AGROTÓXICO ENCONTRADO NAS ANÁLISES DAS 75 AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE AGROTÓXICOS.....	26
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS DE ACORDO COM A TOXICIDADE DL ₅₀ (mg Kg ⁻¹) AGUDA POR VIA ORAL EM RATOS.....	28
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ORGANOCLORADOS.	38
TABELA 4 - CLASSES TOXICOLÓGICAS DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS REGULADOS PELA PORTARIA N° 518/2004.	40
TABELA 5 - CLASSES TOXICOLÓGICAS DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS ORGANOFOFORADOS DEFINIDA PELOS NÍVEIS DE TOXICIDADE DL ₅₀ (mg Kg ⁻¹) AGUDA POR VIA ORAL EM RATOS.....	53
TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO DO LEITE HUMANO DE ACORDO COM PERÍODO DE LACTAÇÃO.	62
TABELA 7 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS AJUSTADOS PARA A ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO.	75
TABELA 8 - ÍONS PRECURSORES, FRAGMENTOS E TEMPO DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM GC-MS. ...	76
TABELA 9 - PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR DOS COMPOSTOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOFORADOS.....	86
TABELA 10 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOFORADOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO.	87
TABELA 11 - PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO (DPR) DOS COMPOSTOS DESSE ESTUDO.....	88
TABELA 12 - AGROTÓXICOS DETECTADOS EM LEITE HUMANO PROVIDO DE NUTRIZES RESIDENTES DA CIDADE DE CURITIBA/PR , 2016.	89

TABELA 13 - AGROTÓXICOS DETECTADOS EM LEITE HUMANO PROVIDO DE NUTRIZES RESIDENTES DA CIDADE DE PONTA GROSSA/PR , 2016.....	89
TABELA 14 - AGROTÓXICOS DETECTADOS EM LEITE HUMANO PROVIDO DE NUTRIZES RESIDENTES DA CIDADE DE APUCARANA/PR , 2016.	90
TABELA 15 - AGROTÓXICOS DETECTADOS EM LEITE HUMANO PROVIDO DE NUTRIZES RESIDENTES DA CIDADE DE GUARAPUAVA/PR , 2016.....	90
TABELA 16 - AGROTÓXICOS DETECTADOS EM LEITE HUMANO PROVIDO DE NUTRIZES RESIDENTES DA CIDADE DE TOLEDO/PR , 2016.	90
TABELA 17 - NÍVEIS DOS AGROTÓXICOS QUANTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE LEITE DO PARANÁ	93
TABELA 18 – TEMPO DE MEIA VIDA DE CADA AGROTÓXICO ENCONTRADO NESSA PESQUISA.	95

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE AMOSTRAS DETECTADAS POR RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.....	91
--	----

LISTA DE SIGLAS

AchE	-	Acetilcolinesterase
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLH	-	Banco de leite humano
C18	-	Octadecyl
CM	-	Concentração Máxima
CQ	-	Controle de Qualidade
CQB	-	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
DDT	-	Diclorodifeniltricloroetano
DDVP	-	Diclorvós
DL	-	Dose Letal
DP	-	Desvio Padrão
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
D-SPE	-	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
FIOCRUZ	-	Fundação Oswaldo Cruz
HCH	-	Hexaclorociclohexano
IAPAR	-	Instituto Agrônômico do Paraná
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IC	-	Inclinação da Curva
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
LHO	-	Leite humano ordenhado
LHOC	-	Leite humano ordenhado cru
LHOP	-	Leite humano ordenhado pasteurizado
LIQ	-	Limite Inferior de Quantificação
LD	-	Limite de detecção
LQ	-	Limite de Quantificação
MAPA	-	Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento.

MgSO₄	-	Sulfato de Magnésio
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NTP	-	National Toxicology Program
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OF	-	Organofosforado
OPAS	-	Organização Panamericana da Saúde
PCLH	-	Posto de coleta de leite humano
PIB	-	Produto interno bruto
PRL	-	Prolactina
PRF	-	Fator de Liberação de Prolactina
PSA	-	<i>Primary Secondary Amine</i>
RT	-	Tempo de retenção
Na₂SO₄	-	Sulfato de Sódio
SPE	-	<i>Solid Phase Extraction</i>
SEAB	-	Secretaria Estadual da Agricultura e do Abastecimento
TEP	-	Trietilpirofosfato
TEPP	-	Tetraetilpirofosfato

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1	AGROTÓXICOS.....	24
3.1.1	Terminologia.....	24
3.1.2	Considerações Gerais.....	24
3.1.3	Classificações.....	25
3.1.3.1	Classificação quanto à finalidade	26
3.1.3.2	Classificação quanto à classe química.....	27
3.1.3.3	Classificação quanto à toxicidade.....	27
3.1.2.4	Quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental.....	28
3.2	AGROTÓXICOS ESTUDADOS.....	28
3.2.1	Agrotóxicos Organoclorados	29
3.2.1.1	Composição Química dos Organoclorados.....	30
3.2.1.1.1	Hexaclorociclohexano (HCH).....	31
3.2.1.1.2	DDT e Análogos.....	32
3.2.1.1.3	Ciclodienos.....	33
3.2.1.1.3.1	Aldrin, Dieldrin e Endrin.....	33
3.2.1.1.3.2	Clordano e Heptacloro.....	34
3.2.1.1.3.3	Endossulfan.....	37
3.2.1.2	Características Físico-químicas dos Organoclorados.....	38
3.2.1.3	Toxicocinética e Toxicodinâmica dos Organoclorados.....	38
3.2.1.4	Toxicidade dos Organoclorados.....	39
3.2.2	Agrotóxicos Organofosforados	41

3.2.2.1	Composição Química dos Organofosforados.....	42
3.2.2.1.1	Fosforados.....	43
3.2.2.1.1.1	Paraoxon Etílico.....	43
3.2.2.1.1.2	TEPP.....	44
3.2.2.1.1.3	Diclorvós.....	45
3.2.2.1.2	Tiofosforados.....	46
3.2.2.1.2.1	Paration Etílico.....	46
3.2.2.1.2.2	Fention.....	47
3.2.2.1.2.3	Diazinon.....	48
3.2.2.1.2.4	Malation.....	49
3.2.2.1.2.5	Dimetoato.....	50
3.2.2.2	Características Físico-químicas dos Organofosforados.....	51
3.2.2.3	Toxicocinética e Toxicodinâmica dos Organofosforados.....	51
3.2.2.4	Toxicidade dos Organofosforados.....	52
3.3	LEGISLAÇÃO VIGENTE.....	53
3.3.1	Quanto aos agrotóxicos Organoclorados.....	53
3.3.2	Quanto aos agrotóxicos Organofosforados.....	54
3.4	LEITE HUMANO.....	55
3.4.1	Características bioquímicas.....	55
3.4.2	Síntese.....	56
3.4.3	Aspecto imunológico e protetor do leite materno.....	56
3.5	REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE.....	57
3.5.1	O Banco de Leite.....	57
3.5.2	Etapas de Processamento do Leite Materno.....	58
3.5.2.1	Coleta.....	58
3.5.2.2	Transporte.....	59

3.5.2.3	Estocagem.....	59
3.5.2.4	Processamento.....	60
3.5.2.4.1	Verificação de sujidades.....	60
3.5.2.4.2	Avaliação da cor.....	60
3.5.2.4.3	Verificação de off-flavor.....	61
3.5.2.4.4	Determinação da acidez Dornic.....	61
3.5.2.4.5	Período de lactação.....	62
3.5.2.4.6	Crematócrito.....	62
3.5.2.4.7	Pasteurização.....	63
3.6	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	63
3.6.1	Especificidade/Seletividade.....	64
3.6.2	Curva de Calibração.....	64
3.6.3	Linearidade.....	65
3.6.4	Sensibilidade.....	65
3.6.5	Limite de Detecção (LD).....	66
3.6.6	Limite de Quantificação (LQ).....	66
3.6.7	Precisão.....	67
3.6.8	Exatidão.....	67
3.7	ANÁLISES MULTIRESÍDUOS.....	68
3.7.1	Método QuEChERS.....	69
3.7.1.1	Quantidade da amostra.....	69
3.7.1.2	Seleção do tipo de solvente - Extração.....	69
3.7.1.3	Sais – Partição (separação de fases).....	70
3.7.1.4	Clean-up (Purificação do extrato).....	70
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1	LOCAL DE ESTUDO.....	71
4.2	LOCAIS DE COLETA DO LEITE MATERNO HUMANO.....	71

4.3	AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.....	72
4.3.1	Quantidade de amostras	73
4.3.2	Data de coleta	73
4.3.3	Coleta	73
4.3.4	Transporte	73
4.4	SUBSTÂNCIAS ANALISADAS NO LEITE	73
4.5	MATERIAL UTILIZADO.....	74
4.5.1	Amostra branco	74
4.5.2	Padrões e Reagentes.....	74
4.5.3	Solução Padrão	74
4.6	INSTRUMENTAÇÃO.....	75
4.7	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	76
4.7.1	Extração QuEChERS	76
4.7.2	Clean-up.....	77
4.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	78
4.8.1	Seletividade.....	78
4.8.2	Linearidade.....	78
4.8.3	Sensibilidade	79
4.8.4	Limite de Detecção e Quantificação	79
4.8.5	Precisão e Exatidão.....	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	80
5.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	80
5.1.1	Seletividade.....	80
5.1.2	Linearidade.....	83
5.1.3	Sensibilidade	86
5.1.4	Limites de Detecção e de Quantificação do método.	87
5.1.5	Precisão e Exatidão.....	87

5.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NO LEITE HUMANO	89
5.2.1	Detecção de agrotóxicos por região de coleta	89
5.2.2	Detecção de resíduos de agrotóxicos no leite materno humano	91
5.3	FATORES DE ASSOCIAÇÃO	93
5.3.1	Culturas predominantes no estado do Paraná	93
5.3.2	Análise do tempo de meia vida	95
5.3.3	Outros Fatores.....	95
5.4	RESULTADOS DE PESQUISAS DE CONTAMINAÇÃO EM LEITE.	96
6	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXO 01 – Carta de Aceite do Hospital Evangélico de CURITIBA.	109
	ANEXO 02 - Carta de Aceite do Hospital da Criança Prefeito João Vargas de Oliveira de PONTA GROSSA.	110
	ANEXO 03 – Carta de aceite do Hospital da Providência DE APUCARANA. ...	111
	ANEXO 04 – Carta de Aceite do Hospital São Vicente de Paulo, da cidade de GUARAPUAVA.....	112
	ANEXO 05 – Carta de aceite do hospital bom jesus - banco de leite dr. Jorge nisiide de TOLEDO.....	113
	ANEXO 06 – Aprovação do Comitê de ÉTICA do Setor de Ciências da Saúde/SD da UFPR	114

1 INTRODUÇÃO

Em meados da década de 1970, um moderno modelo de produção agrícola imposto pela chamada “revolução verde” começou a ser implantado em todo território brasileiro. Esse modelo baseava-se em elaborações de um conjunto de estratégias de desenvolvimento e utilização de novas tecnologias, implicando predominantemente nas culturas de ciclo curto, que tinham como objetivo aumentar significativamente a produtividade, com maior eficiência no controle de pragas e um maior retorno econômico, principalmente através do uso em larga escala de agroquímicos e fertilizantes sintéticos na agricultura. (SERRA et al., 2016).

Assim, os agrotóxicos foram introduzidos fortemente no mercado agrícola brasileiro devido ao grande poder inseticida que esses compostos apresentavam, atingindo diretamente o organismo alvo, conseguindo combater com maior facilidade as pragas. E até hoje esse modelo se encontra presente no cenário agrícola brasileiro, onde a utilização desses produtos químicos está sendo cada vez mais presente no cotidiano de trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente por exposição direta através do contato dérmico e inalatório após aplicações e pulverizações. Além dessa exposição ocupacional, a população em geral está exposta aos agrotóxicos por contaminação química ambiental, principalmente por via oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados, de origem vegetal como frutas, verduras e legumes, contaminados com resíduos de agrotóxicos remanescentes da sua produção, e de origem animal como peixes, carnes, ovos, leite e seus derivados, contaminados através da alimentação dos animais, ou que acumularam resíduos de agrotóxicos através das sucessivas cadeias tróficas. (LEVIGARD; ROZEMBERG, 2004; MELLO, 1999; NAKAGAWA et al., 1999).

Dentre esses compostos formulados para combate de pragas nas lavouras, tivemos inicialmente o desenvolvimento dos compostos organoclorados, que são compostos orgânicos de carbono, hidrogênio e cloro, agentes químicos com alta absorção tecidual devido sua baixa solubilidade em água e a alta solubilidade em lipídios, além de possuírem alta absorção tecidual, com grande capacidade de se acumular no tecido adiposo. (BRASIL/MS, 2003; TORRES, 1998). Sua eliminação se dá pela urina. Porém, durante a lactação, o leite materno também passa a ser uma importante via de excreção de substâncias lipofílicas, colocando bebês lactentes em exposição. (BRASIL, 1996a; SIM; MC'NEIL, 1992).

O Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), agrotóxico organoclorado, popularizado durante a segunda guerra mundial devido ao seu sucesso na eficiência do controle de pragas na agricultura, foi o estopim para que fossem produzidos diversos compostos organossintéticos, garantindo a consolidação da grande indústria agroquímica até hoje. (BULL; HATHAWAY, 1986).

Posteriormente a indústria agroquímica foi estimulada a produzir compostos organofosforados, que são compostos orgânicos formados por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo, na tentativa de substituir compostos organoclorados no controle de insetos. Quando comparados com os agrotóxicos clorados, são igualmente tóxicos, mas se degradam rapidamente e não se acumulam nos tecidos adiposos. Com exceção de clorpirifós, dimetoato, etion, paration e triazofós, pois são compostos bastante lipofílicos e possuem potencial para se depositar nos tecidos adiposos, incluindo o leite materno, expondo lactentes a essas substâncias através da amamentação. (PARÁIBA et al., 2009; WELDON et al., 2011).

Vários desses inseticidas estão classificados como medianamente ou pouco tóxicos baseados somente nos seus efeitos agudos. É preocupante quando pensamos nos efeitos crônicos, os quais podem vir a aparecer após algum tempo de exposição, se manifestando como distúrbios endócrinos, neurológicos e mentais, câncer e má formação congênita. (OPAS/OMS, 1996).

Após a exposição, os resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados no sangue, plasma e soro. (OLIVEIRA et al., 1995). Muitos desses compostos químicos se acumulam no tecido adiposo materno, passam do sangue da mãe ao sangue do feto através da placenta, atingindo um valor médio no sangue do feto de um terço do valor encontrado no sangue materno, e também são armazenados nas células epiteliais alveolares da mama durante a lactação para serem excretados pelo leite materno, este com teores mais elevados por ser uma importante via de excreção. (NUNEZ; TAJARA, 1998; MELLO, 1999; FRUCHTENGARTEN; SILVA, 2005).

As técnicas analíticas tradicionais, como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), utilizadas para extração de resíduos de agrotóxicos em fontes alimentares, vieram sendo aperfeiçoadas nos últimos anos com o intuito de superar suas desvantagens e limitações. (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011). Dentre as atuais técnicas analíticas desenvolvidas, a metodologia QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap,*

Effective, Rugged and Safe) é a que tem se destacado por sua elevada eficiência, extração de um elevado número de agrotóxicos, altas recuperações, baixo custo, rápido processamento, utilização de pequenos volumes de amostra e solventes, excelente remoção de substâncias interferentes da matriz, facilidade e segurança. (MARTINS et al., 2013; HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007).

Visando a eficiência da metodologia QuEChERS na análise de multiresíduos de agrotóxicos em fontes alimentares, a proposta deste trabalho é a otimização e a validação de uma metodologia QuEChERS para a avaliação da presença de agrotóxicos organoclorados e organofosforados em leite materno. Já que as análises de rotina realizadas em leite materno doados aos bancos de leite humano são compostas apenas por procedimentos que visam à qualidade microbiológica do leite como alimento.

A metodologia apresentada nesse trabalho possibilitará fomento para uma melhoria das análises de leite em laboratórios oficiais, e as informações obtidas sobre a presença destes agrotóxicos no leite materno contribuirá no âmbito da saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validação e aplicação de metodologia QuEChERS para detectar e quantificar agrotóxicos organoclorados e organofosforados em 75 amostras de leite materno humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar amostras de leite humano doados dos bancos de leite das cidades de Curitiba, Ponta Grossa, Guarapuava, Apucarana e Toledo localizadas no Estado do Paraná, para detectar e mensurar os níveis dos agrotóxicos estudados;
- Validar método analítico para a determinação destes agrotóxicos em leite humano;
- Correlacionar os possíveis resíduos de agrotóxicos encontrados com os prováveis fatores da presença destes compostos;
- Fazer pesquisa bibliográfica para comparar os possíveis resíduos de agrotóxicos encontrados no leite humano com os encontrados em trabalhos similares nacionais e internacionais, tanto em leite humano quanto em leite bovino.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGROTÓXICOS

3.1.1 Terminologia

São inúmeras nomenclaturas dadas às substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças de planta, como agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta e veneno. (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Desde a Portaria 3.214 de 8 de junho de 1978, mais especificamente a Norma Regulamentadora Rural no 5 (NRR 5), esse grupo de produtos químicos rurais era denominado por “defensivos agrícolas”, termo que mascava os efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente, trazendo uma conotação errônea de que as plantas são completamente vulneráveis a pragas e doenças. A partir da Constituição de 1988, essa mesma norma passa a tratar esse grupo de produtos químicos, antes denominados “defensivos agrícolas”, pelo termo “agrotóxicos”, através da Lei Federal Nº 7.802/89, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 2, Inciso I, o qual define agrotóxicos da seguinte maneira:

“Agrotóxicos e afins são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.” (BRASIL, 1989).

O termo “agrotóxico” foi empregado com intuito de evidenciar o caráter prejudicial que o uso desses agentes químicos causa ao meio ambiente, através do radical “tóxico” contido no termo. Na literatura internacional da língua inglesa agrotóxicos são denominados “pesticidas” (*pesticide*) e tal termo é comumente adotado pela indústria química, pois remete uma imagem positiva do produto (pesticida, produto que mata – somente – as pestes), sendo esse termo muito utilizado para “influenciar” o produtor a utilizar esses produtos como insumos

indispensáveis ao processo de produção rural. O termo agroquímico (*agrochemicals*) também é utilizado, porém este termo engloba e refere a uma gama de produtos, como os fertilizantes e adubos inorgânicos não representando o real sentido do termo agrotóxico. Já na literatura internacional de língua espanhola, agrotóxicos são denominados “praguicidas” (*plaguicidas*) tendo a mesma associação de “pesticidas”. (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

3.1.2 Considerações Gerais

Segundo o INCA – Instituto Nacional do Câncer - em relatório divulgado em 2015, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde o ano de 2009, sendo o responsável pela aplicação e consumo de aproximadamente 1 milhão de toneladas ao ano, o que equivale a um consumo médio de 5,2 kg de agrotóxicos por habitante, movimentando anualmente um mercado de 8,5 bilhões de dólares. (INCA, 2015). No atual cenário agrícola brasileiro, o agronegócio é responsável por cerca de 30% do produto interno bruto (PIB) do estado do Paraná, segundo o Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES), sendo referência no agronegócio nacional, principalmente na produção e exportação de soja. Dentre desse cenário, o estado do Paraná representa também um dos estados com maiores índices de consumo de agrotóxicos do país. (FAEP, 2017).

3.1.3 Classificações

O Decreto 4.074/02, que regulamenta a lei Nº 7.802/89 dos agrotóxicos, dá as competências aos órgãos responsáveis pela liberação de registros de agroquímicos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável por realizar a avaliação da eficácia agronômica dos agrotóxicos. O Ministério da Saúde, por realizar a avaliação e classificação toxicológica, e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) em realizar a avaliação e classificar o potencial de periculosidade ambiental.

3.1.3.1 Classificação quanto à finalidade

Os agrotóxicos podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias químicas introduzidas deliberadamente no ambiente com propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital para os organismos para os quais são tóxicos, com a intenção de prevenir, matar, ou controlar o processo reprodutivo de pragas. São classificados de acordo com o alvo sobre o qual o produto atua com o intuito de controle e eliminação, como inseticidas (controle de insetos), herbicidas (eliminação a ervas daninhas), nematicidas (eliminação a nematoides), fungicidas (destruição de fungos), rodenticidas (controle de roedores), acaricidas (eliminação de ácaros), moluscicidas (controle de caracóis e outros moluscos), larvicidas (controle de larvas), dentre outros. (KLASSEN, 2001).

O Ministério da Saúde (2010) apresenta os principais grupos químicos das três principais classes de agrotóxicos (TABELA 1).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE AGROTÓXICOS.

CLASSE – FINALIDADE	GRUPOS QUÍMICOS
Inseticidas	Organofosforados Organoclorados Carbamatos Piretróides
Fungicidas	Ditiocarbamatos Organoestânicos Dicarboximidas
Herbicidas	Bipiridílios Glicina substituída Derivados do ácido fenoxiacético Dinitrofenóis Triazina

FONTE: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010).

3.1.3.2 Classificação quanto à classe química

A primeira grande divisão dos agrotóxicos se dá entre compostos inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos contêm em sua formulação elementos tóxicos, como chumbo, cobre, arsênio ou mercúrio, os quais apresentam longa persistência no meio ambiente pela característica de não serem facilmente biodegradáveis. Já os compostos orgânicos são uma gama de compostos químicos que contêm em sua estrutura átomos de carbono e podem ser subdivididos em sintéticos e naturais. (BAIRD, 2002).

3.1.3.3 Classificação quanto à toxicidade

Os agrotóxicos são classificados pelo Ministério da Saúde em quatro classes distintas, estabelecidas por testes realizados em laboratório que estabeleceram a Dose Letal 50% (DL₅₀) - que é a dose do agrotóxico que leva à morte de 50% dos animais utilizados no estudo (TABELA 2), fundamentais para o conhecimento dos efeitos tóxicos agudos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012), e são identificadas de acordo com as cores das faixas contidas nos rótulos definidas por lei:

Classe I Faixa de cor Vermelha – São os compostos químicos extremamente tóxicos, que apresentam grande risco a saúde humana e ao meio ambiente.

Classe II: Faixa de cor Amarela – São compostos que apresentam toxicidade alta para os seres humanos.

Classe III: Faixa de cor Azul – São compostos considerados de toxicidade mediana para a saúde humana.

Classe IV: Faixa de cor Verde – São os compostos pouco tóxicos para os seres humanos.

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS DE ACORDO COM A TOXICIDADE DL₅₀ (mg Kg⁻¹) AGUDA POR VIA ORAL EM RATOS

CLASSE TOXICOLÓGICA	TOXICIDADE	DL ₅₀ (mg Kg ⁻¹)	FAIXA COLORIDA
I	Extremamente Tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente Tóxico	Entre 5 a 50	Amarela
III	Mediamente Tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco Toxicó	Entre 500 e 5000	Verde
-	Muito Pouco Tóxico	Acima de 5000	-

FONTE: Adaptado de PERES (1999).

A DL₅₀ é um indicador de efeito de morte e não de saúde, além do que não diz respeito ao efeito crônico, mas sim ao efeito agudo.

3.1.3.4 Quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental

A avaliação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico é realizada através de estudos físicos e químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos, de acordo com as metodologias validadas do Manual de Testes para Avaliação de Ecotoxicidade de Agentes Químico do IBAMA. Este que se baseia nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. (BRASIL, 1996b).

Segundo a Portaria N° 84/96 (1996), do IBAMA o potencial de periculosidade ambiental dos agrotóxicos (Art.3°) são classificado em:

Classe I - produtos altamente perigosos ao meio ambiente

Classe II - produtos muito perigosos ao meio ambiente

Classe III - produtos perigosos ao meio ambiente

Classe IV - produtos pouco perigosos ao meio ambiente.

3.2 AGROTÓXICOS ESTUDADOS

Nesta pesquisa focamos em dois grupos de agrotóxicos da classe inseticida, os organoclorados, que foram amplamente utilizados no passado e estão proibidos no Brasil desde 1986, e os organofosforados que ainda se encontram liberados em território nacional.

3.2.1 Agrotóxicos Organoclorados

No ano de 1940, pela primeira vez, Paul Müller Geisy, químico que trabalhava para os laboratórios da Companhia Suíça J.R. Geisy S.A., descobriu potentes propriedades inseticidas, a partir de um composto clorado sintetizado em 1874 pelo alemão Othmar Zeidler, o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano). Este inseticida, durante a Segunda Guerra Mundial, foi pulverizado tanto na pele das tropas quanto da população, em forma de pó, com objetivo de prevenir epidemias de tifo, que era transmitida através de piolhos, responsáveis pela alta mortalidade da população afetada em Nápoles - Itália, evitando que a epidemia se espalhasse por toda a Europa. (VETORAZZI; RADAELLI-BENVENUTTI, 1982). Visto a sua grande eficácia inseticida aliada com suas características físico-químicas desconhecidas até o momento, fez com que o uso do DDT rapidamente se expandisse na agricultura, principalmente em campanhas públicas de controle do mosquito transmissor da malária pelo mundo e no controle do inseto barbeiro, transmissor da doença de Chagas, em grandes áreas do Brasil. (KONRADSEN et al., 2004).

Mais tarde, década de 1950, este composto clorado começou a ser utilizado no controle de pragas na agricultura, particularmente em colheitas de grande rendimento econômico e nas monoculturas. O problema surgiu quando o DDT perdeu sua eficácia, obrigando o uso de dosagens cada vez maiores sem a obtenção de resultados desejados. A partir dessa época, a indústria química procurou desenvolver novos agrotóxicos, com fórmulas que propiciassem maior eficácia e biodegradabilidade. (MARICONI, 1985; TURK, 1989).

O poder residual dos organoclorados, considerado a princípio apenas por sua alta qualidade, passou a ser considerado um sério problema para as gerações futuras, por dois fatores: a forte estabilidade química do composto, e pelos solos argilosos ou com alta matéria orgânica terem maior facilidade em absorver resíduos de agrotóxicos por longos períodos, conduzindo assim, ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar, especialmente nos tecidos ricos em gorduras dos seres vivos. (MATUO et al., 1992).

Por meio de diversos estudos na década de 70, foi comprovada a alta toxicidade desses agrotóxicos organoclorados, o que levou a proibição desses produtos em diversos países. Porém, no Brasil, apenas no ano de 1985 foi proibida a comercialização e a utilização de alguns agrotóxicos organoclorados, como os isômeros do Hexaclorociclohexano, Aldrin, DDT, Endossulfan tanto na agricultura quanto para uso doméstico, em todo o território nacional, conforme a Portaria Nº 329/85 do Ministério da Agricultura.

3.2.1.1 Composição Química dos Organoclorados

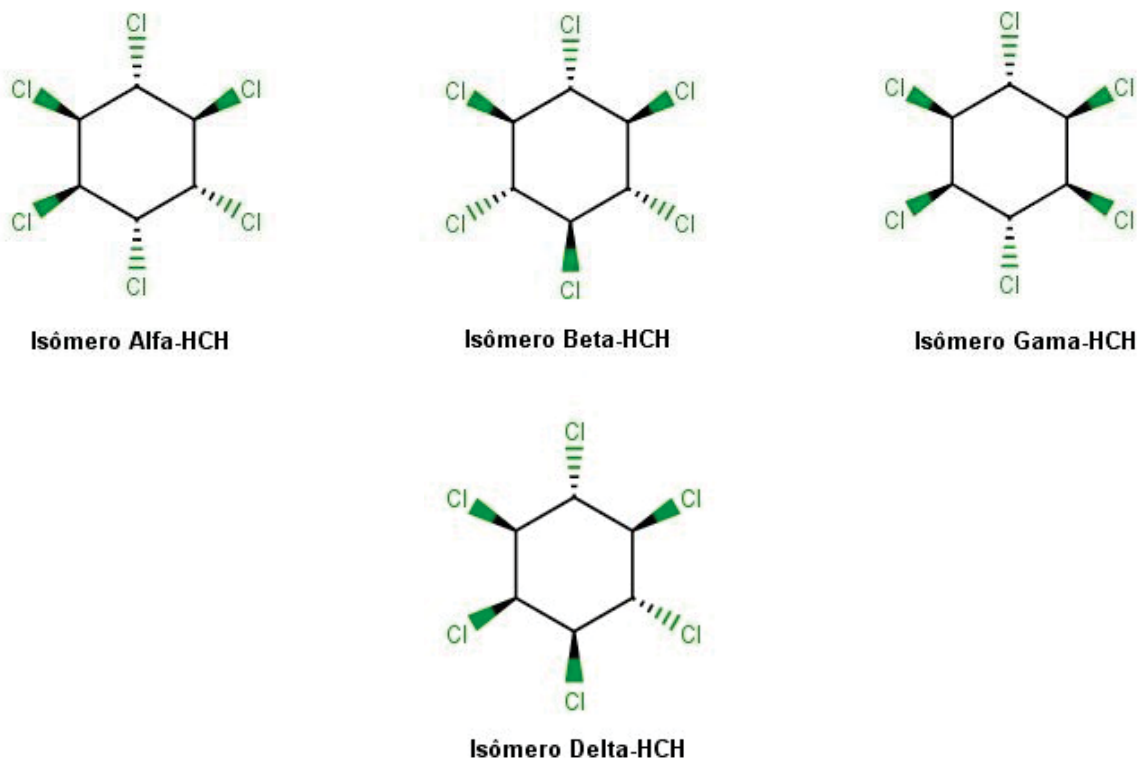
Os organoclorados são compostos orgânicos que contém na sua composição química Carbono, Hidrogênio e Cloro, e são constituídos por inúmeros isômeros do hexaclorociclohexano e dos ciclodienos. Um ou vários átomos de hidrogênio são substituídos por cloro, e a ligação Carbono-Cloro caracteriza-se por ser muito estável e difícil de ser rompida. A presença do Cloro reduz a reatividade de outras moléculas orgânicas, bloqueando a oxidação da cadeia carbônica, tornando esses compostos extremamente estáveis quimicamente, diminuindo a velocidade de degradação do agrotóxico e estimulando a bioacumulação no ecossistema. (LARINI, 1997; BLUMBERG, 1994).

Entre os principais compostos organoclorados que apresentam propriedades inseticidas estão incluídos os seguintes grupos: hexaclorociclohexano (BHC e lindano); DDT e análogos; Ciclodienos (Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Clordano e Endossulfan) (RICHARDSON; GONGOLLI, 1994), representados pelas fórmulas químicas a seguir.

3.2.1.1.1 Hexaclorociclohexano (HCH)

O HCH (hexaclorociclohexano), erroneamente chamado de BHC (hexacloreto de benzeno), foi sintetizado por Michael Faraday em 1825, com uma mistura isomérica de ciclohexanos organoclorados que compreendiam uma série de isômeros na sua formulação, os principais: α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-15%), δ (6-10%), representados na (FIGURA 1), podendo apresentar variações na proporção de acordo com a fabricação. Em 1942, Dupaire e Rancourt descobriram que, entre todos os isômeros, o único que apresentava propriedades inseticidas era o γ -HCH, que era também comercializado (purificado) com o nome Lindano. O HCH foi muito usado no Brasil como fumigante em culturas de café, algodão e soja, na fruticultura e na produção de tabaco, assim como também no combate contra pulgas e piolhos e de vetores de várias doenças. (WARE; WHITACRE, 2004; BARRA et al., 2006).

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS ISÔMEROS DO HEXACLOROCLICLOHEXANO (HCH).



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

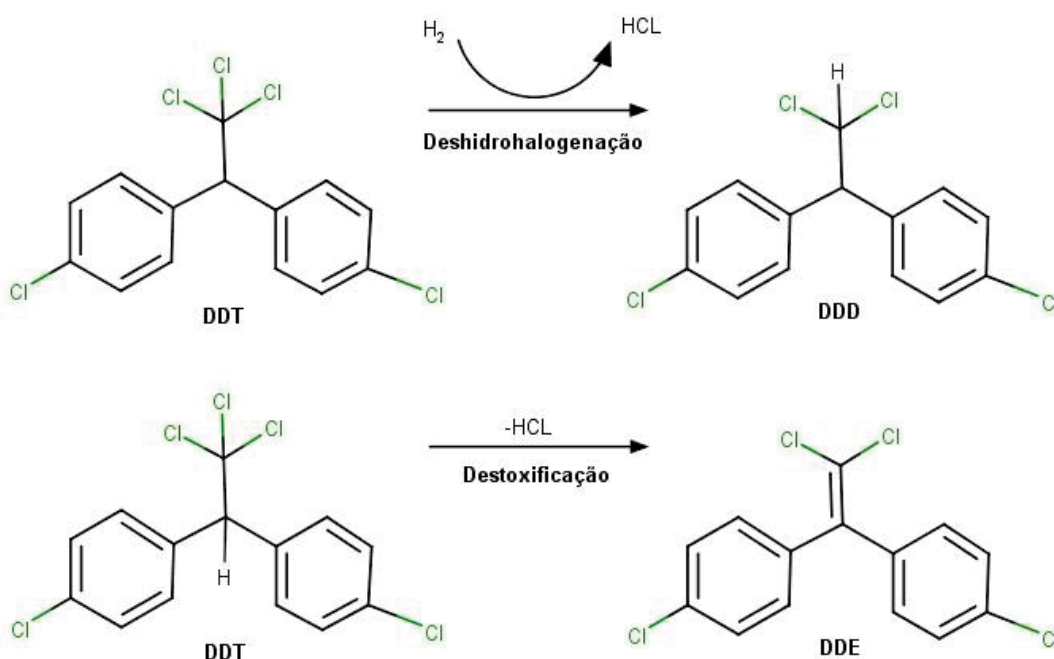
NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.1.1.2 DDT e Análogos

O DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), agrotóxico largamente utilizado para controle de insetos em áreas agrícolas e controle de insetos vetores das doenças malária e tifo. O DDT de grau técnico pode conter os produtos DDE e DDD, que são produtos derivados da degradação do DDT através de duas vias: uma oxidativa e outra redutiva. Pela via redutiva há apenas a perda de um átomo de cloro, reação de deshidrohalogenação, com conseqüente formação do metabólito Dicloro Difenil Dicloroetano, conhecido como DDD. (YOGUI, 2002; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Já na via oxidativa, a molécula do p,p'- DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio, reação de destoxificação, ocasionado por degradação biológica ou ambiental do DDT, transformando-se no metabólito Dicloro Difenil Etileno, conhecido como DDE. (YOGUI, 2002; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Os principais metabólitos do p,p'-DDT estão representados na (FIGURA 2).

O DDE não possui atividade inseticida, porém apresenta maior resistência às degradações, tendo maior tendência acumulativa em organismos vivos que o DDT, sendo um ótimo indicador de exposição. (YOGUI, 2002; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO p,p'-DDT E SEUS RESPECTIVOS METABÓLITOS.



FONTE: Adaptado de QUENSEN et al. (1998).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.1.1.3 Ciclodienos

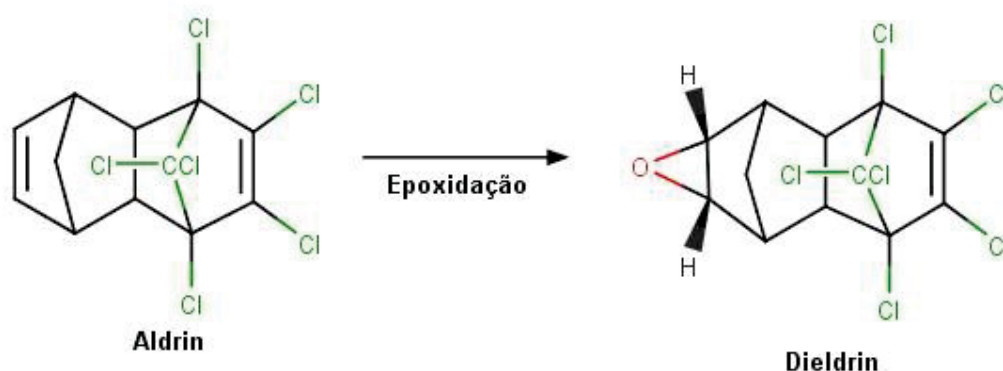
No grupo dos ciclodienos (derivados dos hexaclorociclopentadieno), estão os hidrocarbonetos cíclicos clorados, os quais surgiram após a segunda guerra mundial e foram muito utilizados como inseticidas para controle de pragas e insetos que prejudicam as raízes das plantas. São compostos que apresentam um maior potencial de toxicidade, e seus principais representantes são: aldrin, dieldrin, endrin, clordano, heptacloro e heptacloro epóxido. (YOGUI, 2002; WARE; WHITACRE, 2004).

3.2.1.1.3.1 Aldrin, Dieldrin e Endrin

Aldrin e Dieldrin são agrotóxicos muito similares entre si, sintetizados pelo processo químico conhecido como reação de Diels-Alder, que é uma reação de condensação, onde há adição conjugada de um dieno conjugado com um alceno, que sob ação do calor ou bactérias produzem um ciclohexeno. O composto aldrin quando entra em contato com o ambiente (luz solar) ou organismo (bactérias), sofre epoxidação e é rapidamente convertido no metabólito dieldrin, composto mais tóxico (FIGURA 3). Desse modo, o dieldrin pode estar presente no ambiente, mesmo quando a substância utilizada foi o aldrin. São substâncias que entre as décadas de 50 a 70 foram muito utilizadas como inseticida, principalmente nas culturas de algodão e milho, mas devido à sua capacidade de bioacumulação e ao longo período de persistência, seu uso foi restrito. (YOGUI, 2002; RITTER; SOLOMON; FORGET, 1995).

Já o Endrin (FIGURA 4), endo-estereoisômero do dieldrin, é um inseticida de amplo espectro que foi muito utilizado nas culturas de algodão, arroz e cana-de-açúcar, assim como também teve seu uso como rodenticida no controle de camundongos. (ATSDR, 1996; WHO, 1992).

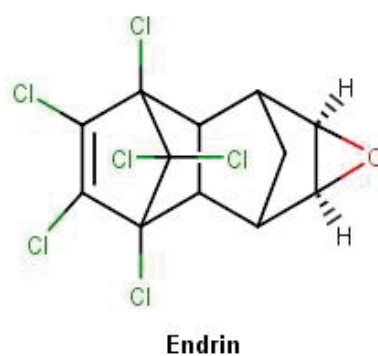
FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ALDRIN E SEU METABÓLITO DIELDRIN.



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ENDO ESTEREOISÔMERO DO DIELDRIN, O COMPOSTO ENDRIN.



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

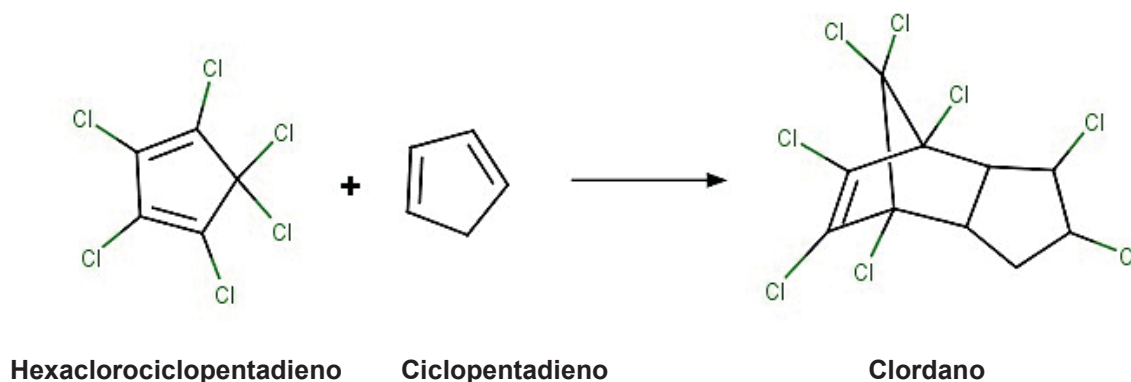
NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.1.1.3.2 Clordano e Heptacloro

O Clordano é um produto originado da reação de Diels-Alder do hexaclorociclopentadieno com o ciclopentadieno (FIGURA 5), produto que com a adição de gás cloro forma isômeros α e γ clordano (FIGURA 6) e também os compostos trans-nonacloro e o heptacloro. (METCALF, 2002). O Clordano é um inseticida de amplo espectro muito usado no combate de pragas nas plantações de legumes, milho, cana-de-açúcar, frutas, algodão e juta, e também no combate a cupins. (RITTER; SOLOMON; FORGET, 1995).

O Heptacloro é um inseticida provindo da reação de Diels-Alder já descrita acima, seguido de tratamento com cloreto de hidrogênio em nitrometano na presença de tricloreto de alumínio ou com monocloreto de iodo. (PLIMMER, GAMMON; RAGSDALE, 2003). Esse inseticida altamente estável teve seu maior uso contra pragas nas plantações de algodão, contra gafanhotos, e no combate ao vetor da malária. Tanto no ambiente quanto em organismos, cerca de 20% do heptacloro sofre transformação por reação de epoxidação, sendo convertido em heptacloro epóxido (FIGURA 7), tornando-se mais reativo e com maior toxicidade devido a sua alta lipossolubilidade e grande persistência no ambiente. (ATSDR, 2007). Comparado ao inseticida clordano, sua toxicidade é 3 a 5 vezes maior e mais estável a degradação. (PLIMMER, GAMMON; RAGSDALE, 2003).

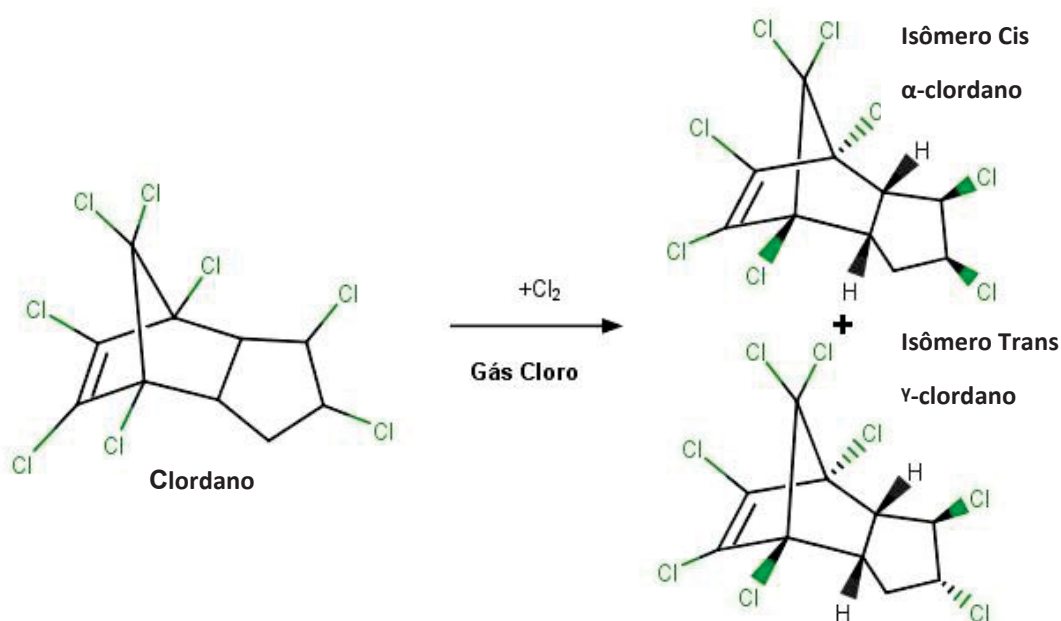
FIGURA 5 - REAÇÃO DIELS-ALDER DO HEXACLOROCICLOPENTADIENO COM O CICLOPENTADIENO, ORIGINANDO O COMPOSTO CLORDANO.



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

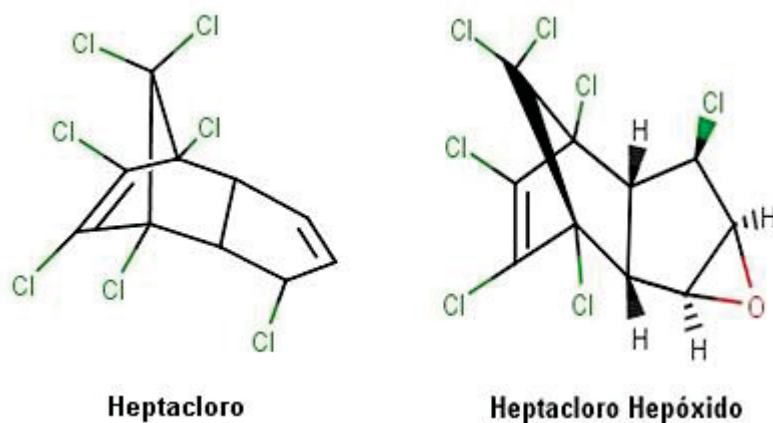
FIGURA 6 - ADIÇÃO DO GÁS CLORO AO CLORDANO, ORIGINANDO ISÔMERO ALFA E GAMA CLORDANO.



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DO HEPTACLORO E SEU PRODUTO DE METABOLIZAÇÃO, O HEPTACLORO EPÓXIDO.



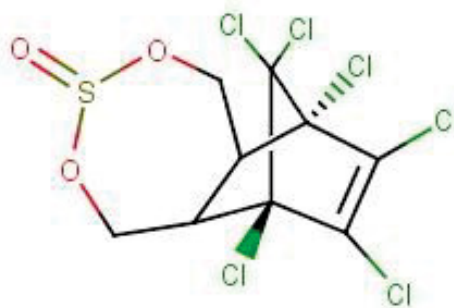
FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.1.1.3.3 Endossulfan

O Endossulfan é um produto derivado da reação de Diels-Alder de hexaclorociclopentadieno com cis-buteno-1,4-diol e subsequente reação com cloreto de tionila, tornando-se assim um produto de oxidação contendo um átomo extra de oxigênio ligado ao átomo de enxofre (FIGURA 8). O Endossulfan técnico é uma mistura de estereoisômeros α e β , onde o isômero α -endossulfan é o mais estável, e o β -endossulfan, para atingir essa estabilidade, tende a converter-se irreversivelmente de forma lenta no isômero α . (METCALF, 2002; SCHMIDT et al., 2001). O endossulfan foi utilizado no controle de pragas de insetos nas plantações de frutas, verduras, tabaco e algodão e também no combate de vetores de doenças como a mosca tsé-tsé. (LI; MACDONALD, 2005). Tornou-se um composto químico altamente restrito, devido à sua elevada toxicidade e potencial de bioacumulação. (METCALF, 2002).

FIGURA 8 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO ENDOSSULFAN.



Endossulfan

FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich (2017).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.1.2 Características Físico-químicas dos Organoclorados

Os agrotóxicos organoclorados possuem como principais propriedades físico-químicas alta lipossolubilidade, altos valores de pressão de vapor e estabilidade química, baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em solventes orgânicos e alta persistência no ambiente, devido ao seu elevado tempo de meia-vida (TABELA 3). Estas características conferem a estes compostos a capacidade de se depositarem nos tecidos lipídicos dos seres vivos, sofrendo biomagnificação. (SANTOS et al., 2006). Os organoclorados com propriedades inseticidas são, em sua maioria, hidrocarbonetos com átomos de cloro como substituintes, que de certa forma bloqueiam a oxidação do esqueleto carbônico tornando os compostos extremamente estáveis quimicamente e resistentes à degradação, fazendo com que ocorra o aumento do seu potencial de bioacumulação no meio ambiente e nos organismos vivos, assim tornando-se presentes e sendo detectados em toda a cadeia trófica. (RICHARDSON; GONGOLLI, 1994; LARINI, 1997; NUNES; TAJARA, 1998; RITTER et al., 1992; BLUMBERG, 1994, MARONI et al., 2000).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ORGANOCORADOS.

COMPOSTOS	MASSA MOLECULAR (g mol ⁻¹)	PONTO DE FUSÃO (°C)	PONTO DE EBULIÇÃO (°C)	VOLATILIDADE mmHG A 20°C
p.p' – DDT	354,49	108,5-190	185-187	1,90 x 10 ⁻⁷
p.p'- DDE	318,03	88-90	316,5	6,50 x 10 ⁻⁶
p.p'- DDD	320,05	109-111	193	1,02 x 10 ⁻⁵
Endossulfan	406,93	70-100	106	9,00 x 10 ⁻³
β endossulfan	406,93	213,3	213,3	9,00 x 10 ⁻⁵
Aldrin	364,9	104-104,5	145	6,45 x 10 ⁻⁵
Dieldrin	380,91	175-176	-	3,10 x 10 ⁻⁶
α – clordano	409,78	106-107	175	1,00 x 10 ⁻⁵

FONTE: Adaptado de RICHARDSON; GONGOLLI (1994).

3.2.1.3 Toxicocinética e Toxicodinâmica dos Organoclorados

Os agrotóxicos organoclorados são absorvidos pelo organismo humano através da via dérmica, respiratória, pulmonar ou pela via gástrica. Após absorvidos, os compostos clorados são transportados na corrente sanguínea, ligados a proteínas plasmáticas como as lipoproteínas e a albumina. (SKALSKY; GUTHRIE, 1978).

Sendo lipossolúveis, o armazenamento destes agentes químicos ocorre principalmente em tecidos com alto teor lipídico. Sua biotransformação é lenta devido à complexidade da estrutura química e à extensão da cloração, sendo extremamente difíceis de serem removidos. Tal processo ocorre no fígado por desalogenação enzimática ou epoxidação, podendo formar produtos inativos, ou mais tóxicos. São desclorados, oxidados e então conjugados. A maioria dos organoclorados são indutores das enzimas do sistema microsossomial hepático, interferindo no seu próprio metabolismo e no de outras substâncias. Sua eliminação se dá pelas fezes de forma inalterada, os metabólitos são eliminados pela urina, sendo o leite materno também uma importante via de eliminação por excreção do composto pela gordura do leite, colocando em exposição elevada bebês lactentes. (BRASIL, 1989; SANTOS et al., 2006).

A toxicodinâmica dos organoclorados não é totalmente esclarecida. Baseia-se no aumento excessivo do estímulo da sensibilidade à despolarização, na excitabilidade dos neurônios, alterando as propriedades eletrofisiológicas das membranas dos neurônios e das enzimas $\text{Na}^+/\text{ATPase}$ e K^+/ATPase e promovem distúrbios no transporte de cálcio e na atividade da enzima $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}\text{-ATPase}$. (SANTOS et al., 2006).

3.2.1.4 Toxicidade dos Organoclorados

No organismo humano os compostos organoclorados atuam diretamente no sistema nervoso central, agindo nas transmissões dos impulsos nervosos dos neurônios motores e sensoriais, apresentando diversas alterações na homeostase do indivíduo. (OPAS/OMS, 1996).

Os casos de exposição a um composto químico em uma única dose num curto período de tempo é classificado como intoxicação aguda, onde o agente químico é rapidamente absorvido e produz efeitos imediatos. Podendo ocorrer de forma leve, moderada ou grave. O gravidade da intoxicação vai depender da concentração absorvida, da toxicidade do produto (determinada pela DL_{50}), levando em consideração o coeficiente de partição (K), hidrossolubilidade, lipossolubilidade e pH do composto e do tempo decorrido entre a exposição e o atendimento médico. (BRASIL, 2006).

O quadro clínico de exposição aguda ao organoclorado normalmente está associado a aparecimentos de sintomas inibitórios do sistema neurológico, causando cefaleia intensa, náuseas, parestesia, hiperexcitabilidade, alterações do equilíbrio, tremores, ataxia, convulsões, depressão central severa, insuficiência respiratória, desorientações, alterações na consciência, coma, podendo evoluir para óbito. (BRASIL, 2006; OPAS/OMS, 1996).

Quando se tem uma exposição crônica, a qual se caracteriza por alterações no estado de saúde de um indivíduo silenciosamente causadas por longos períodos de tempo em contato com concentrações baixas do agente tóxico, tem-se um quadro clínico diverso, com patologias neurológicas, imunológicas, hematológicas, aplasia medular, lesões hepáticas e renais, malformações congênitas e tumores. (BRASIL, 2006; OPAS/OMS, 1996).

A característica de alta lipossolubilidade permite a esses compostos uma maior taxa de penetração através das membranas celulares dos tecidos, penetrando e acumulando-se principalmente naqueles tecidos com maior porcentagem de gordura. (KLAASSEN; ROZMAM, 1991). A (TABELA 4) compara a toxicidade definida pelos níveis de DL_{50} ($mg\ kg^{-1}$) dos agrotóxicos organoclorados apresentados nesse estudo.

TABELA 4 - CLASSES TOXICOLÓGICAS DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS REGULADOS PELA PORTARIA Nº 518/2004.

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA		AGROTÓXICOS
Classe I	Extremamente tóxico	β HCH, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, isômeros do clordano, Heptaclo e Heptaclo Epóxido.
Classe II	Altamente tóxico	Lindano (γ -HCH), Endossulfan.
Classe III	Mediamente tóxico	-
Classe IV	Pouco tóxico	-

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

3.2.2 Agrotóxicos Organofosforados

Os primeiros compostos organofosforados (OFs) foram preparados por alquimistas na Idade Média, mas somente no século XIX houve maiores estudos sobre essas substâncias (TOY; WALSH, 1987), que partiram com a produção do primeiro éster de ácido fosfórico, o trietilfosfato (TEP) por Voegeli em 1848. Já em 1854, o químico Philippe de Clermont desenvolveu o tetraetilpirofosfato (TEPP), como um substituto para o inseticida nicotina. Embora TEPP não fosse o primeiro OF sintetizado, foi o primeiro OF inibidor da enzima colinesterase, causando efeitos no sistema nervoso colinérgico, dos quais só em 1932, foram esclarecidos através de estudos feitos por Lange e Krueger que relataram sensação de asfixia e visão turva após a inalação de fosforofluoridatos de dimetila e dietila. (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014).

Com a descoberta das propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos de fósforo, em 1934 o químico alemão Gerhard Schrader, que trabalhava na I. G. Farbenindustrie AG, desenvolveu um projeto onde ele se dedicou, dentre os anos de 1938 a 1944, a sintetizar centenas de novos compostos OFs (STODDART, 1979), alguns incluindo flúor como di-isopropilfluorofosfato e sarin, ésteres derivados do ácido pirofosfórico, incluindo TEPP e octametilpirofosforotetramida, e ésteres derivados dos ácidos tio e ditionofósforico incluindo o paration e seu análogo o paraoxon. (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014).

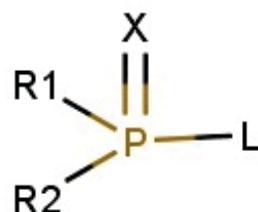
Durante o projeto de Schrader, foram realizados estudos farmacológicos e toxicológicos desses compostos em diversos laboratórios industriais e militares, e a partir disso, Schrader tomou conhecimento sobre os elevados efeitos tóxicos de alguns desses compostos, como tabun (Fosforoamidocyanidato de dimetilo), sarin (isopropil metilfosfonofluoridato) e somano (O-Pinacolil metilfosfonofluoridato), impedindo a sua utilização como inseticidas. Porém, foram considerados para serem utilizados como armas químicas de guerra. (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014).

A partir da década de 90 até hoje, os OFs têm sido amplamente usados como alternativa para substituir compostos organoclorados no controle de insetos, principalmente devido ao baixo custo, a rápida síntese, por apresentar menor tempo para degradação, uma menor bioacumulação e pela menor toxicidade para os organismos não-alvo. (SIMÕES et al., 2010).

3.2.2.1 Composição Química dos Organofosforados

Os inseticidas organofosforados (OFs) são compostos de ésteres de amido ou tióis derivados das estruturas fundamentais do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico (MEERDINK, 1989) e tem sua base estrutural geral representada na (FIGURA 9), onde **R1** e **R2** são grupos arilas ou alquilas, ligados diretamente ao átomo de fósforo, ou, dependendo do composto, **R1** pode estar diretamente ligado ao átomo de fósforo e **R2** pode estar ligado a um átomo de oxigênio ou de enxofre. O grupamento **-L** pode pertencer a uma variedade de grupos, tais como halogênios, alquila, arila ou heterocíclicos, e este grupamento é ligado ao átomo de fósforo pelo átomo representado por **X** (oxigênio ou enxofre), sendo caracterizado como grupo de saída, o qual é liberado pelo átomo de fósforo quando o mesmo é hidrolisado pela fosfodiesterase, ou pela interação com o sítio esterásico da enzima acetilcolinesterase (AChE). (HOLLINGWORTH, 1976; CHAMBERS; CARR, 1995).

FIGURA 9 - BASE ESTRUTURAL MOLECULAR GERAL DOS COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS.



FONTE: Adaptado de SANTOS et al. (2007).

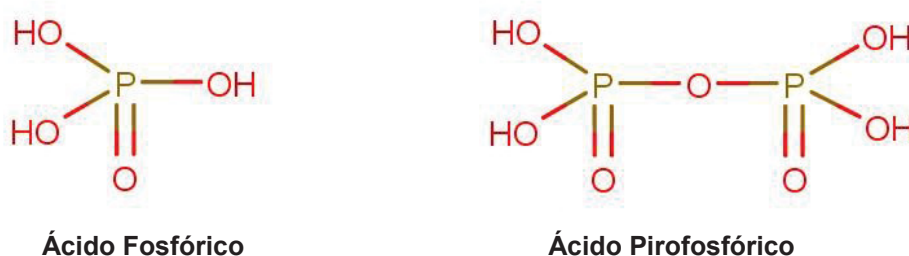
NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

Os agrotóxicos organofosforados que apresentam propriedades inseticidas mais populares foram escolhidos para representação nesse estudo e são os da classe dos Fosforados (Paraoxon etílico, TEPP, Diclorvós), e dos Tiofosforados (Monotiofosforados - Paration etílico, Fention e Diazinon, e Ditiofosforados - Malation e Dimetoato).

3.2.2.1.1 Fosforados

São os derivados do ácido fosfórico e do ácido pirofosfórico (FIGURA 10). São substâncias de comercialização e uso restrito pelo fato de apresentar elevada toxicidade devido às ligações P=O. O oxigênio por ser muito eletronegativo faz com que haja maior transferência de elétrons do fósforo para ele, resultando em uma diferença de polaridade mais intensa entre dois átomos, realizando fortes ligações dos compostos OF com o centro esterásico da enzima acetilcolinesterase, por isso possuem uma maior potência toxicológica. (LARINI, 1997).

FIGURA 10 - ESTRUTURAS FUNDAMENTAIS DOS OFs FOSFORADOS: ÁCIDO FOSFÓRICO E ÁCIDO PIROFOSFÓRICO.



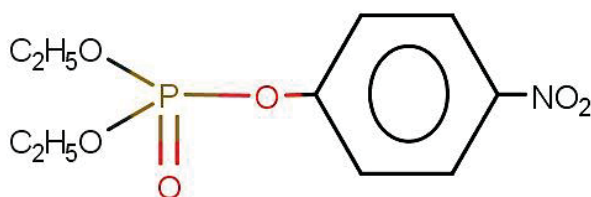
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.1.1 Paraoxon Etilico

O Paraoxon (O,O-dietil O-(4-nitrofenil) fosfato), derivado do ácido fosfórico, é um produto de biotransformação do paration etílico, transformado em sua forma ativa, Oxon (FIGURA 11). Caracterizado pela ligação P=O, é um dos mais potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, cerca de 70% tão potente como o agente OF Sarin, e por ser tão tóxico aos seres vivos, é restrito o seu uso como inseticida. (DESHPANDE et al., 2014; LARINI, 1997).

FIGURA 11 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF PARAOXON ETÍLICO.

**Paraoxon etílico**

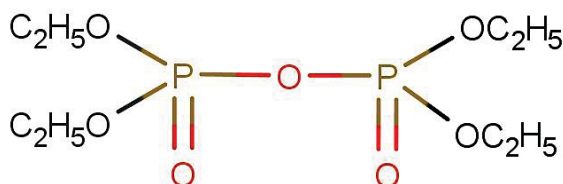
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.1.2 TEPP

O Tetraetilpirofosfato (TEPP) representado pela (FIGURA 12), composto também nomeado como Bladan, é um inseticida derivado do ácido pirofosfórico, que foi muito utilizado devido a sua alta eficácia e baixo impacto ambiental. Foi o primeiro OF empregado para as atividades inseticidas, muito utilizado na Alemanha como substituto da nicotina para matar pulgões. Porém o TEPP tinha desvantagens por ser altamente tóxico para mamíferos, e se degradar facilmente em compostos solúveis em água, se decompondo em ambientes úmidos, então, por esse motivo ele foi sendo substituído pelo Paration. (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014; ETO; SAKATA; SASAYAMA, 1972).

FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF TETRAETILPIROFOSFATO (TEPP).

**Tetraetilpirofosfato**

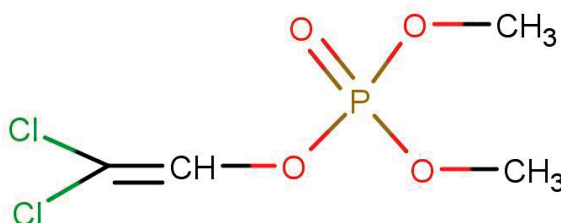
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.1.3 Diclorvós

Diclorvós (O,O-dimetil-2,2-diclorovinilfosfato), comumente abreviado como DDVP, é um OF derivado do ácido fosfórico, também classificado como clorofosforado por apresentar um átomo de cloro na sua estrutura, dando a esse composto a característica de ação residual lenta oriunda de um composto clorado (FIGURA 13). Foi desenvolvido a partir de agentes químicos de guerra OFs após a Segunda Guerra Mundial em 1955, e desde então vem sendo amplamente utilizado como um agrotóxico pelo seu poderoso efeito inseticida e larvicida, controlando pragas causadoras de doenças em animais domésticos como miíase (também conhecida como bicheira), no combate de vetores auxiliando na saúde pública, e principalmente no combate de pragas nas plantações. (DAS, 2013; LARINI, 1997). Um estudo do National Toxicology Program (NTP) relatou um aumento da incidência de tumores do pâncreas, glândulas mamárias e estômago em ratos, sendo esse composto classificado no grupo B2 (provável carcinógeno humano). (DIKSHITH, 2010).

FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO DICLORVÓS (DDVP).



Diclorvós

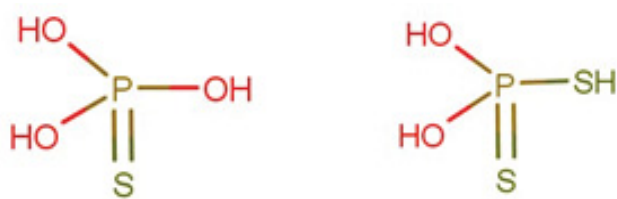
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.2 Tiofosforados

Os compostos tiofosforados são definidos ainda por outras duas classificações, os monotiofosforados (derivados do ácido tionofosfórico) e os ditiofosforados (derivados do ácido ditionofosfórico), representados pela (FIGURA 14). São substâncias que apresentam menor toxicidade, quando comparadas com os compostos fosforados, devido às ligações P=S. O átomo de enxofre é menos eletronegativo que o oxigênio, realizando ligações mais fracas dos compostos OF com o centro esterásico da acetilcolinesterase. (LARINI, 1997; FEE; GARD; YANG, 2006).

FIGURA 14 - ESTRUTURAS FUNDAMENTAIS DOS OF_s TIOFOSFORADOS: ÁCIDO TIONOFOSFÓRICO E ÁCIDO DITIONOFOSFÓRICO.



Ácido Tionofosfórico

Ácido Ditionofosfórico.

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

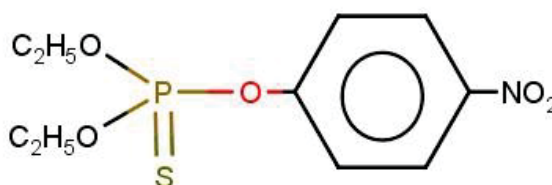
NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.2.1 Paration Etilico

Paration etílico (O,O-dietil 0-(4-nitrofenil) fosforotioato), representado na (FIGURA 15), é um derivado do ácido tionofosfórico, sendo um potente inseticida e acaricida, desenvolvido em 1940, por I.G. Farbenindustrie AG, muito utilizado sob forma de pulverização em plantações de algodão, arroz e frutas. É um composto altamente tóxico para organismos não alvo, incluindo seres humanos, tendo o seu uso proibido ou restrito em muitos países. (LARINI, 1997; FEE; GARD; YANG, 2006).

O Paration atua indiretamente sobre a enzima acetilcolinesterase. Depois que o agente é ingerido, ocorre uma reação de biotransformação (dessulfuração oxidativa), que faz com que o átomo de enxofre seja substituído por um átomo de oxigênio, formando o composto chamado paraoxon, o qual possui uma toxicidade mais elevada. (LARINI, 1997; FEE; GARD; YANG, 2006).

FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF PARATION ETÍLICO.



Paration etílico

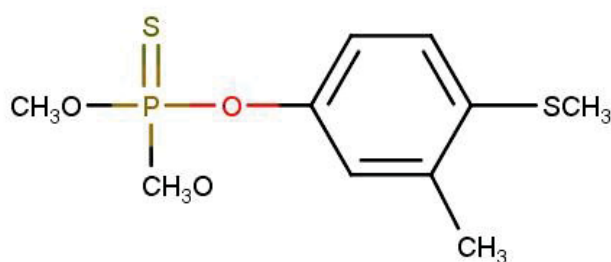
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.2.2 Fention

O Fention (O,O-dimetil-O-(3-metil-4-mercaptofenil) fosforotioato) é um tiofosforado derivado do ácido tionofosfórico (FIGURA 16), muito utilizado como inseticida em plantações de cana-de-açúcar, arroz, algodão, milho, café e frutas, assim como também usado como avicida e acaricida. Devido à sua toxicidade relativamente baixa para os seres vivos não-alvo, o fention está listado como composto moderadamente tóxico pela OMS, tendo o seu uso restrito. Em diversos países o fention já está proibido para uso em culturas alimentares. (EXTOXNET, 2003).

FIGURA 16 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF FENTION.



Fention

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

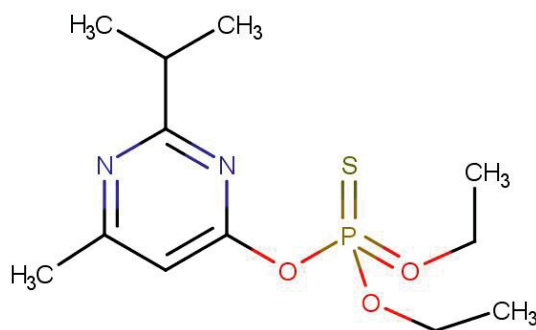
NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.2.3 Diazinon

Diazinon (O,O-dietil-O-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidinil-fosforotioato) é um éster do ácido tionofosfórico (FIGURA 17), desenvolvido em 1952 pelo laboratório suíço Ciba-Geigy. É um inseticida OF usado para controlar insetos em plantações de frutas e legumes e também utilizado para controlar as pragas domésticas como moscas, formigas, pulgas e baratas. Hoje seu uso doméstico é proibido, porém ainda é aprovado para uso agrícola. (SHAROM et al., 1980)

O diazinon é relativamente estável sob a temperatura e pressão ambiente, mas é susceptível a formação do gás fosfina, tóxico após o aquecimento. Além disso, o diazinon apresenta como impureza de fabricação uma porção de SULFOTEPP que pode sofrer oxidação durante o armazenamento inadequado do inseticida e produzir o TEPP, com elevada toxicidade. (SHAROM et al., 1980; LARINI, 1997).

FIGURA 17 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF DIAZINON.



Diazinon

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

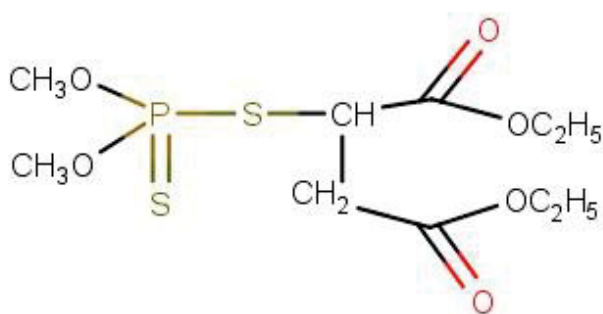
3.2.2.1.2.4 Malation

O Malation (O,O-dimetil-S-(etil-1,2-dicarboetoxi-fosforoditioato), éster do ácido ditionofosfórico (FIGURA 18), foi o primeiro inseticida OF com um largo espectro de ação e baixa toxicidade para organismos não alvo. (ATSDR, 2003). O malation puro é um líquido transparente, no entanto, a solução de grau técnico é um líquido âmbar que contém de 95 a 98% de substância ativa e diversas impurezas. (LARINI, 1997).

Quando é armazenado em condições inadequadas, sofre decomposição, em um processo de isomerização, produzindo compostos similares de elevada toxicidade, como o Isomalation. Já *in vivo* sofre metabolização, por oxidação, transformando-se na sua forma mais tóxica chamada Malaoxon (FIGURA 19). (LARINI, 1997).

Malation é muito usado como inseticida e acaricida sob diversas formas de aplicação em uma ampla gama de plantações de frutas e verduras. Além da aplicação em plantas, o Malation é um componente dos produtos de higiene pessoal utilizados para o controle de piolhos em animais domésticos. (ATSDR, 2003).

FIGURA 18 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF MALATION.

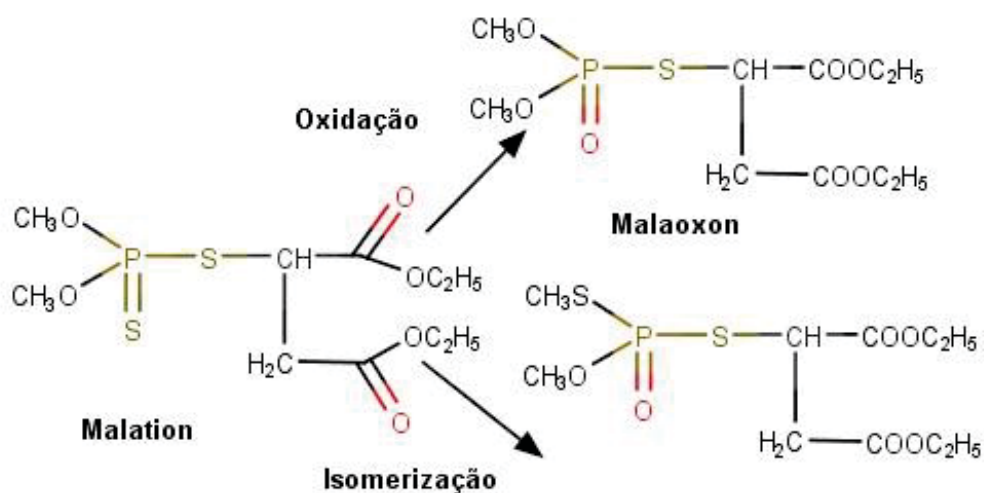


Malation

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

FIGURA 19 - DECOMPOSIÇÃO DO COMPOSTO OF MALATION PARA SEUS ANÁLGOS DE MAIOR TOXICIDADE, O MALAOXON E O ISOMALATION.



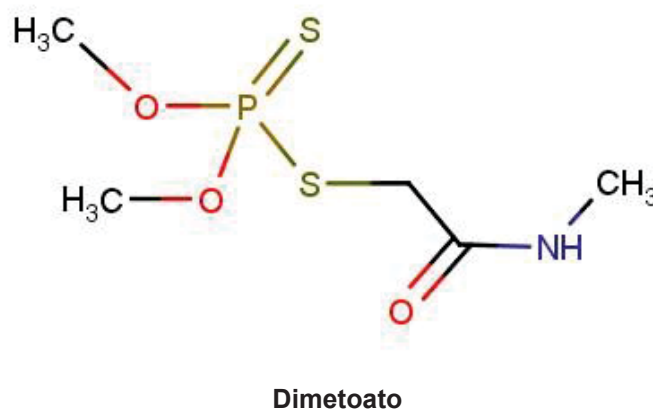
FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.1.2.5 Dimetoato

Dimetoato (O,O-dimetil-S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato), um éster do ácido ditionofosfórico (FIGURA 20), foi patenteado em 1950 pela empresa American Cyanamid, e desde então é muito usado como inseticida e acaricida em culturas de algodão, citros, maçã, rosa, tomate e trigo. (DAUTERMAN et al., 1960; LIECHOSCKI, 2004).

FIGURA 20 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO OF DIMETOATO.



Dimetoato

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

NOTA: Elaborado pelo autor através do Software MarvinSketch 17.28.0.

3.2.2.2 Características Físico-químicas dos Organofosforados

Os compostos organofosforados os inseticidas mais utilizados mundialmente como alternativa aos compostos organoclorados, pelo fato de possuírem menor toxicidade e enorme eficácia para sua finalidade, sendo amplamente utilizados no controle de pragas. Por serem ésteres são rapidamente hidrolisados, insolúveis em água e solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Possuem um alto coeficiente de partição óleo/água. (LARINI, 1997).

3.2.2.3 Toxicocinética e Toxicodinâmica dos Organofosforados

A exposição à OFs ocorre através de via oral, pulmonar e por absorção dérmica, e é possível através da exposição intencional/acidental (suicídios), ocupacionais (trabalhadores rurais, e na elaboração da calda de pulverização) e principalmente por fontes alimentares. (LARINI, 1997).

Após absorvidos, são rapidamente distribuídos por todos os tecidos. As reações de biotransformação dos OFs ocorrem principalmente no fígado o que leva, na maioria das vezes, a produtos menos tóxicos e mais polares para que sejam eliminados com maior facilidade. A principal via de biotransformação, para os tiofosforados, se dá pela reação de oxidação (dessulfuração oxidativa), originando compostos mais tóxicos pela conversão das formas tions (ligação P=S) em formas oxons (ligação P=O) através de enzimas do complexo citocromo P-450. A eliminação ocorre principalmente pela urina, e pelas fezes em menor proporção, sendo que 80 a 90% da dose absorvida é eliminada nas primeiras 48 horas. (ECOBICHON, 1996; LARINI, 1997).

O principal mecanismo de ação de sua toxicodinâmica dos agrotóxicos OFs é a inibição de hidrolases de éster carboxílico, particularmente da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso, impossibilitando-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em grupamentos colina e ácido acético. A enzima acetilcolinesterase inativada promove o acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas encontradas no sistema nervoso central e periférico, junções neuromusculares e nas membranas dos eritrócitos, e

butirilcolinesterase no plasma. (MOREAU; SIQUEIRA, 2008; SCHVARTSMAN, 1991).

3.2.2.4 Toxicidade dos Organofosforados

Os inseticidas OFs estão entre as principais causas de intoxicação aguda no mundo, sendo estimado cerca de 250 mil mortes por ano devido a intoxicações acidentais e intencionais, o que representa uma porcentagem de cerca de 30% dos suicídios. (CAREY; DUNN; GASPARI, 2013). Tal fato deve-se à alta toxicidade de algumas formulações OFs, assim como também a facilidade que se têm para adquirir esses produtos disponíveis para uso agrícola, veterinário ou doméstico, e a ineficaz fiscalização quanto ao uso e venda desses agrotóxicos. (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

O quadro clínico de exposição aguda a organofosforados está associado ao aparecimento de sintomas relacionados a alterações nos receptores muscarínicos e nicotínicos de Ach. Os sintomas mais frequentes se dão pela miose, salivação, sudorese, incontinência urinária, fraqueza, tremores, miofasciculações, ansiedade, hipotensão, taquicardia, vômitos e náuseas. Em intoxicações mais severas observa-se: insuficiência respiratória, dispnéia, confusão mental, torpor, hipertensão, bradicardia, cólica abdominal, diarreia, hipotermia, paralisia, cianose e coma. (ECOBICHON, 1996).

A toxicidade aguda de alguns agrotóxicos OF é difícil de ser avaliada devido à presença de inúmeras impurezas que são resultantes do processo de fabricação ou devido ao armazenamento inadequado do produto, tornando o produto ainda mais tóxico. Como o exemplo do malation, que puro apresenta uma DL_{50} aguda oral de acima de $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$, seu produto técnico 1.000 a 1.375 mg kg^{-1} , e seus produtos de metabolização, o malaoxon com $3,34 \text{ mg kg}^{-1}$ e o isomalation $1,34 \text{ mg kg}^{-1}$. A (TABELA 5) compara a toxicidade definida pelos níveis de DL_{50} (mg Kg^{-1}) aguda por via oral em ratos dos agrotóxicos organofosforados apresentados nesse estudo. (LARINI, 1997; YANG, 1994).

Em exposições crônicas, apresentam efeitos clínicos de baixo nível, pois se degradam rapidamente e teoricamente não se acumulam nos tecidos adiposos. (BOUVIER et al., 2005; BOOBIS et al., 2008). Apesar de teoricamente esses compostos não se acumularem em tecidos adiposos, alguns estudos já

comprovaram que agrotóxicos OFs como clorpirifós, dimetoato, ethion, paration e triazofós possuem propriedades químicas de grande lipofilicidade, tendo potencial para depositar nos tecidos adiposos, e assim, possuindo a capacidade de ser excretado através do leite materno, expondo lactentes a essas substâncias através da amamentação.

Os efeitos crônicos são mais prejudiciais do que os agudos, pois se manifestam em alterações imunológicas, hematológicas, hepáticas, neurológicas, malformações congênitas, cânceres e tumores. (PARAÍBA et al., 2009; WELDON et al., 2011).

TABELA 5 - CLASSES TOXICOLÓGICAS DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS DEFINIDA PELOS NÍVEIS DE TOXICIDADE DL₅₀ (mg Kg⁻¹) AGUDA POR VIA ORAL EM RATOS.

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA		AGROTÓXICOS
Classe I	Extremamente tóxico	TEPP
Classe II	Altamente tóxico	Diclorvós, Paration metílico e etílico
Classe III	Mediamente tóxico	Fention, Dimetoato, Malaoxon. Isomaltion
Classe IV	Pouco tóxico	Malation

FONTE: Adaptado de LARINI (1997).

3.3 LEGISLAÇÃO VIGENTE

3.3.1 Quanto aos agrotóxicos Organoclorados

No Brasil o uso e a comercialização dos agrotóxicos Organoclorados começaram a ser regulados através da Portaria N° 329/85 do Ministério da Agricultura (1985), que visava proibir, em todo território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, dentre outros: aldrin, BHC, canfenoclorado (toxafeno), DDT, dodecacloro, endrin, heptacloro, lindano, endossulfan, metoxicloro, nonacloro, pentaclorofenol, dicofol e clorobenzilato.

Porém, algumas substâncias tiveram essa proibição parcial, como o uso de iscas formicidas à base de Aldrin e Dodecacloro, cupinidas à base de aldrin para o emprego em florestamento e reflorestamento, e outras tiveram seu uso permitido para serem aplicados pelos órgãos públicos competentes, em campanhas de saúde pública de combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias, para usos emergenciais na agricultura, a critério da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária - SNAD - do Ministério da Agricultura, e também quando destinado exclusivamente à preservação de madeiras em conformidade com as normas a serem estabelecidas pelo Instituto Brasileiro do Desenvolvimento Florestal – IBDF. (BRASIL, 1985).

A legislação foi atualizada, através de portarias e, posteriormente, pela Lei dos Agrotóxicos (Lei 7.802, de 11 de julho de 1989) e agora regulamentada pelo Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002.

A resolução - RDC Nº 28, de 9 de agosto de 2010 do Ministério da Agricultura, estipulou o cancelamento da comercialização de todos os produtos formulados à base de endossulfan para a data de 31 de julho de 2013, sendo este o mais recente produto organoclorado proibido em território nacional.

3.3.2 Quanto aos agrotóxicos Organofosforados

A comercialização dos agrotóxicos organofosforados não é proibida no território nacional, mas devido ao grande uso de organofosforados nas plantações, existem regulações sobre a obtenção de agrotóxicos pela receita agrônoma, a qual só pode ser emitida após o diagnóstico de necessidade de obtenção de defensivos agrícolas, ou seja, esta não estimula a venda de agrotóxicos, mas a controla, o que consta na Lei Federal Nº 7.802/1989. (BRASIL, 1989).

A resolução - RDC Nº 6, de 14 de outubro de 1999, dispõe sobre a tramitação no Congresso Nacional, de Projetos de Lei dispendo sobre a proibição da comercialização, uso, fabricação, importação e exportação dos Produtos Paration Metílico e Metamidofós. Baseando-se na reavaliação do Paration Metílico, efetuada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), cancelando o uso do produto para alimentos como: maçã, pêssego, pêra, uva, nectarina, cereja, ameixa, cenoura, tomates, alcachofra, brócolis, couve-flor, aipo, variedades de couve, alface, mostarda, nabo, espinafre e alguns outros usos em não alimentos (plantas ornamentais, etc.). (BRASIL, 1999).

Também no alto potencial de letalidade do Metamidofós obtido com a dose letal 50% (DL₅₀), sendo responsável por casos de intoxicações severas e tendo seu uso restrito em vários países. Com isso, essa resolução suspende a aprovação e a avaliação toxicológica para registro de novos produtos técnicos e/ou formulações de agrotóxicos à base de Paration Metílico e Metamidofós, e propõe a reavaliação toxicológica dos produtos técnicos Paration Metílico e Metamidofós e suas formulações já autorizadas pelo Ministério da Saúde, bem como rever suas monografias. (BRASIL, 1999).

3.4 LEITE HUMANO

O aleitamento materno é a única fonte completa que transfere nutrientes, vitaminas e imunidade da mãe para o filho, atendendo as necessidades da criança no período de crescimento e no desenvolvimento dos recém-nascidos. No entanto, o aleitamento também pode transferir diversos contaminantes ambientais, como substâncias orgânicas ou inorgânicas, destacando-se os resíduos de agrotóxicos. (NICKERSON, 2006).

3.4.1 Características bioquímicas

O leite humano é considerado uma mistura homogênea que se estrutura na forma de um sistema, composto por moléculas complexas como açúcares, vitaminas lipossolúveis e sais minerais (sódio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, iodo e ferro). Composto por fases definidas: fração emulsão - glóbulos de gorduras; fração suspensão - micelas de caseína; fração solução - constituintes hidrossolúveis. Ao iniciar o ato da amamentação o leite é composto por elementos solúveis, que ao decorrer da mamada vão sendo substituídos pelos componentes da fração suspensão, cedendo lugar aos componentes lipossolúveis da fração emulsão. Caracterizando assim um leite de composição variada ao longo da mamada completa. Desse modo, a criança recebe um produto dinâmico, mutável, do qual as características se ajustam a cada momento de sua alimentação. (ALMEIDA; NOVAK, 1998).

3.4.2 Síntese

O leite é secretado logo após o parto por estímulo do hormônio esteroidal hipofisário, a prolactina (PRL), hormônio que é liberado quando o mamilo é manipulado, seja por sucção ou estimulação mecânica (ordenha). Quando o mamilo é manipulado, o estímulo sensorial é direcionado ao hipotálamo, local onde é sintetizado o PRF (Fator de Liberação de Prolactina) ocorrendo a liberação do hormônio. Quando o estímulo cessa, o hipotálamo secreta dopamina – Fator inibidor da Prolactina, também conhecido como FIP (Fator inibidor da Prolactina). (COLLIER et al., 1984).

A prolactina é um hormônio proteico com receptores de membrana, que atua na diferenciação das células da glândula mamária e controla os processos bioquímicos da síntese do leite. A PRL age atuando de forma simultânea com outros hormônios, aumentando a membrana da mitocôndria e induzindo a síntese de α -lactalbumina, lactose e gordura. (COLLIER et al., 1984; STEVEN et al., 2014).

3.4.3 Aspecto imunológico e protetor do leite materno

O recém-nascido torna-se suscetível a infecções por um grande número de microrganismos por apresentar imaturidade imunofisiológica. Boa parte dos seus anticorpos circulantes são compostos por IgG materno, dos quais receberam via transplacentária. (BALLOW et al., 1986).

Os principais agentes de proteção ao organismo do lactente, presentes no leite humano são: imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE), linfócitos, macrófagos (importantes na produção de complemento C3 e C4), lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, ácidos carboxílicos livres, proteinases e oligossacarídeos, os quais constituem o fator de crescimento da flora bífida e são conhecidos como "fator bifidus". (FACCHINI, 1996; NEWMAN, 1995; LONNERDAL, 2000).

A predominância de *Lactobacillus bifidus* na flora mantém a população de bactérias gram-negativas em níveis baixos. A presença de *Lactobacillus* e a ação da lactoferrina e da lisozima faz com que a população de patógenos permaneça sob controle. (FACCHINI, 1996).

3.5 REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE

Com o objetivo de ampliar as oportunidades de acesso ao conhecimento e informação, em 1998 foi criado o site da REDEBLH - www.redeblh.fiocruz.br, em projeto de parceria com o Centro de Informação Científica e Tecnológica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Hoje a Rede Brasileira de Bancos de Leite tem 220 bancos de leite e 174 postos de coleta cadastrados e é considerada a maior e mais complexa do mundo pela OMS.

3.5.1 O Banco de Leite

O Banco de Leite Humano (BLH) é uma unidade de serviço vinculada a uma maternidade e ou hospital pediátrico, e é responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta do leite materno, seleção, classificação, executa o processamento e controle de qualidade do leite humano ordenhado (LHO), procedente do posto de coleta a ele vinculado, e processa e distribui o leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP).

O Posto de Coleta de Leite Humano (PCLH) é uma unidade fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar, vinculada ao BLH e é responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta do leite materno e sua estocagem. O PCLH não executa as atividades de processamento do LHO, sendo exclusiva do BLH.

O BLH possui exigências específicas no preenchimento dos dados cadastrais, o que facilita na identificação de problemas relacionados ao LHO que possam e na obtenção de informações epidemiológicas.

Essas exigências cadastrais comportam: identificação, avaliação clínica e laboratorial da doadora, identificação e condição clínica do lactente e identificação das características físico-químicas e microbiológicas do leite disponível para doação, assim como os registros dos processos que foram realizados desde a coleta até o produto chegar ao lactente.

O BLH e o PCLH também devem seguir as orientações do Programa de Controle de Prevenção de Infecção e de Eventos Adversos dos serviços de saúde aos quais estão vinculados.

3.5.2 Etapas de Processamento do Leite Materno

Segundo o Manual Técnico de funcionamento, prevenção e controle de riscos elaborado em 2008 pela ANVISA em parceria com a Rede Nacional de Bancos de leite, ditam as seguintes etapas:

3.5.2.1 Coleta

A ordenha do leite humano se dá pela manipulação da mama da lactante, efetuando pressões na mama contra o tórax repetidas vezes em movimentos rítmicos, tomando cuidado para que não haja dor ou traumas na retirada do leite. A manipulação da mama pode ser efetuada pela própria lactante (auto-ordenha), ou pelo profissional habilitado. A ordenha pode ser realizada no BLH, no PCLH ou no domicílio da lactante doadora. Aconselha-se que a ordenha seja feita com as mãos, ao invés de bombas tira-leite, com o intuito de evitar desconfortos, traumas mamilares e contaminações no leite por proliferação bacteriana devido a falhas na limpeza e esterilização das bombas. (OLIVEIRA; CAMACHO; SOUZA, 2005).

A ordenha é o primeiro indicador do controle de qualidade do leite, uma vez que mal conduzida, o leite poderá apresentar sujidades, cores e odores diferentes, e dessa forma não estará próprio para consumo. (SILVA, 2004).

Após a ordenha, o leite coletado deve ser corretamente resfriado para que se evite contaminação com o aumento da carga microbiana, e modificação química pela transformação da lactose em ácido láctico, o que poderia levar a uma redução do valor nutricional das dosagens de cálcio e fósforo do leite humano ordenhado cru (LHOC). (SILVA, 2004).

Quando há interesse na doação voluntária, a lactante é submetida à anamnese por um exame físico, a fim de atestar que a doadora encontra-se saudável e apresenta secreção láctica superior às necessárias de seus lactentes. As doadoras que apresentam doenças infecto-contagiosas ou que se encontrem em risco nutricional são impedidas de realizar a doação, a critério médico. (BRASIL, 2006).

3.5.2.2 Transporte

O transporte ocorre da coleta do LHO no domicílio da doadora ao posto de coleta, e posteriormente este necessita ser transportado ao BLH, assim como também quando o LHOP é encaminhado do BLH a uma unidade receptora. Tanto o LHOC quanto o LHOP devem ser transportados sob cadeia de frio e o tempo de transporte não deve ultrapassar 6 horas, para que não ocorra riscos de elevação de temperatura, o que poderia favorecer a ocorrência de não-conformidades, como a alteração química do produto. (BRASIL, 2006; SILVA, 2004).

O leite deve ser transportado devidamente em caixas isotérmicas, constituídos por material liso, resistente, impermeável, de fácil limpeza e desinfecção, contendo gelo reciclável em quantidade proporcional que corresponda a 3 litros de gelo para cada litro de LHO. (BRASIL, 2008).

3.5.2.3 Estocagem

O LHOC congelado pode ser estocado por período máximo de 15 dias a partir da data de coleta, já o LHOP pode ser estocado por período máximo de 6 meses, ambos a uma temperatura máxima de - 3°C. (BRASIL, 2008).

3.5.2.4 Processamento

O Leite ordenhado cru ao chegar ao Banco de Leite é submetido à seleção e classificação e ao tratamento para a devida conservação. Nessa etapa são avaliadas as condições de conservação em que o leite se encontra no momento da recepção, verificando se a embalagem em que se encontra o leite é adequada e se encontra devidamente vedada. (FIOCRUZ, 2002; SILVA, 2004).

A seleção avalia as condições da embalagem, presença de sujidades, cor, *off-flavor* e acidez Dornic, já a classificação verifica o período de lactação e conteúdo energético (crematócrito). (FIOCRUZ, 2002).

Segundo o Manual da ANVISA em parceria com a Rede Nacional de Bancos de leite (2008), devem ser respeitadas as seguintes etapas:

3.5.2.4.1 Verificação de sujidades

O LH é analisado visualmente a fim de determinar se há corpos estranhos, como pelos, cabelo, insetos, pedaços etc., que possam caracterizar o leite humano ordenhado como impróprio para consumo. (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999).

3.5.2.4.2 Avaliação da cor

Coloração normal: cor branca - devido aos glóbulos de gordura e as partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. Cor amarelada- devido ao pigmento caroteno. Coloração anormal: cor vermelha - pode se devido à bactéria *Serratia marcescens*, como também pode indicar contaminação por sangue. Cor verde escura - devido à bactéria do gênero *Pseudomonas*. Nos dois casos o leite deve ser descartado. (SILVA, 2004; FIOCRUZ, 2002).

3.5.2.4.3 Verificação de *off-flavor*

É a característica que indica não-conformidade verificado no aroma original do leite humano ordenhado. Tal característica provém do crescimento de microrganismos pertencentes à microbiota secundária do leite, ocasionando alterações químicas na composição, tornando o produto inapropriado para o consumo. (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999; SILVA, 2004).

3.5.2.4.4 Determinação da acidez Dornic

É acidez titulável do leite a qual é expressa em Graus Dornic. É avaliada como original ou desenvolvida, onde a acidez original resulta da presença de micelas de caseína, fosfatos e citratos, e a acidez desenvolvida é consequente ao crescimento bacteriano, da microbiota primária e secundária, ocasionando a fermentação da lactose produzindo ácido láctico, elevando a osmolaridade e diminuindo os níveis de cálcio e fósforo do produto. A determinação da acidez é realizada com solução de hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), onde cada 0,01mL gasto para neutralizar 1mL de leite corresponde a 1OD (1 grau Dornic). (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999; SILVA, 2004; FIOCRUZ, 2002).

O leite humano quando recém-ordenhado, apresenta acidez com valores que variam entre 1,0 e 4,0OD (1 a 4 graus Dornic), sendo um produto livre de ácido láctico. A partir do momento em que é favorecido o crescimento de microrganismos, é estimulado a produção de ácido láctico elevando a acidez em um valor maior ou igual a 8,0OD (oito graus Dornic), o que inviabiliza o leite para o consumo. (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999; SILVA, 2004; FIOCRUZ, 2002).

3.5.2.4.5 Período de lactação

O período de lactação é classificado de acordo com a (TABELA 6).

TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO DO LEITE HUMANO DE ACORDO COM PERÍODO DE LACTAÇÃO.

NOME	DIAS
Colostro	Menos de 7 dias após o parto
Leite de transição	7 a 14 dias após o parto
Leite maduro	Mais de 14 dias após o parto

FONTE: Adaptado de ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL (1999).

Essa classificação é determinada através da informação prestada pela paciente no cadastro de doadora.

3.5.2.4.6 Crematócrito

É uma técnica em que é calculado o conteúdo energético do LHO. O leite humano é composto de mais de 250 substâncias diferentes, divididos em três frações: emulsão (constituintes lipossolúveis – gordura, óleos, vitaminas, pigmentos e alguns ácidos graxos livres), suspensão (constituída de micelas de caseína) e solução (água, proteínas do soro, sais minerais, carboidratos e anticorpos presentes no leite humano). (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999; SILVA, 2004; FIOCRUZ, 2002).

Quanto maior a fração de emulsão, maior é o conteúdo energético e menor é a concentração de anticorpos. Assim, o leite humano com conteúdo energético baixo é rico em agentes defensores do sistema imunológico, sendo um produto de maior qualidade. (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1999; FIOCRUZ, 2002).

Os produtos que não preenchem as especificações determinadas dentro dos aceitáveis são descartados, podendo ser descartados diretamente na rede de esgoto, sem tratamento prévio. (BRASIL, 2006).

3.5.2.4.7 Pasteurização

A pasteurização é processo do qual os microrganismos que possam estar presentes no LHOc patogênicos são inativados. Esse processo se realiza sob uma temperatura de 62,5°C pelo tempo de 30 minutos, e é uma etapa de requisito obrigatório para os BLH nacionais conforme (Portaria Nº 322 - MS). Somente o leite pasteurizado, cuja análise microbiológica para enterobactérias com resultado negativo será aprovado para consumo. (BRASIL, 2001).

A administração de LHOc (sem pasteurização) é permitida quando o leite é da mãe para o próprio filho, sendo este coletado sob as técnicas corretas e consumido em no máximo 12 horas, mantendo a temperatura máxima de 5°C. (BRASIL, 2006).

3.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

O desenvolvimento de uma metodologia analítica consiste em uma etapa muito importante na área de análise de resíduos de agrotóxicos. Como todo método analítico está sujeito a diversas variações, principalmente quando a metodologia é aplicada em matrizes biológicas e não somente em soluções padrão, é primordial que seja realizado o processo de validação sempre que forem desenvolvidas novas técnicas de análise ou elaboradas adaptações em metodologias já validadas. Para atestar se o método analítico utilizado é adequado, é avaliada uma sequência de parâmetros de desempenho, orientados por órgãos regulamentadores, que atribuem rastreabilidade, reprodutividade e confiabilidade dos resultados obtidos. (BRITO et al., 2003; BRASIL, 2011).

O processo de validação de um método analítico consiste na avaliação de diversos parâmetros a serem seguidos, definidos em guias de validação de órgãos regulamentadores como a ANVISA (BRASIL/ANVISA, 2003) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em BRASIL (2011).

Os parâmetros de validação envolvidos na metodologia deste trabalho seguiram os protocolos da ANVISA - Resolução - RE N° 899, de 29 de maio de 2003, e envolvem:

3.6.1 Especificidade/Seletividade

O termo especificidade refere-se à capacidade da metodologia empregada em detectar e quantificar o composto de estudo na presença de outros componentes que possam estar presentes na matriz biológica tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Já o termo seletividade refere-se à capacidade de detecção do analito (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003), ambos os termos são normalmente utilizados como sinônimos. Em métodos cromatográficos tal parâmetro é a garantia da pureza dos picos cromatográficos, utilizando detectores como a espectrometria de massas, o qual demonstra que o pico detectado é atribuído a um só componente e não foi prejudicado pela presença de interferentes da amostra. (BRASIL/ANVISA, 2003).

3.6.2 Curva de Calibração

Para determinar a linearidade do método, assim como outros parâmetros analíticos, é necessária a construção da curva de calibração utilizando amostras de controle de qualidade (CQ). Essas amostras de CQ são amostras da matriz de interesse do estudo contendo o analito de pesquisa em concentrações conhecidas. (BRITO et al., 2003; BRASIL, 2012). No caso de estudos de agrotóxicos, são utilizadas amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB), que são amostras da matriz de estudo adicionada com analito em concentração de até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ). (BRASIL, 2012).

As concentrações de analito adicionadas nas amostras controle são denominadas “níveis de fortificação”, e as escolhas de suas dosagens, em caso de análise de agrotóxicos, são relativos aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) determinados através de órgãos regulamentadores. (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003).

A curva analítica é construída através da análise de, no mínimo, 5 níveis de fortificação diferentes, em um intervalo de trabalho definido. E quando observado relação linear aparente no gráfico, métodos estatísticos são empregados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. (BRASIL/ANVISA, 2003).

3.6.3 Linearidade

É a capacidade da metodologia analítica empregada em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração conhecida do analito na amostra fortificada, dentro de uma faixa analítica (intervalo) específica. (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003; BRASIL, 2011).

A linearidade do método é observada através da relação linear indicada pelo coeficiente de correlação (r), baseada na equação da reta $y = ax + b$, onde “ y ” é o sinal analítico, “ a ” é a sensibilidade do método, “ x ” é a concentração do analito na amostra e “ b ” é a média das medidas da linha de base. Segundo a ANVISA (2003) a curva de calibração é considerada aceitável quando o coeficiente de correlação linear (r) é igual ou superior a 0,98.

3.6.4 Sensibilidade

É a capacidade de uma metodologia analítica em gerar diferentes sinais analíticos diferenciando dois valores próximos de concentração do analito. A sensibilidade é dada pela inclinação da curva de calibração expressa como coeficiente angular através da fórmula: $S = dy/dx$. (BRITO et al., 2003).

Em métodos com boa sensibilidade, uma pequena diferença na concentração do analito da amostra causa uma variação significativa no valor do sinal analítico detectado. (BRITO et al., 2003).

3.6.5 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é um parâmetro definido como é o sinal do menor valor de concentração de um analito detectado que o equipamento de análise consegue diferenciar do ruído de fundo, sob condições experimentais estabelecidas. (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003).

Em caso de metodologias analíticas instrumentais (como CG/EM), o LD é determinado mediante a relação sinal/ruído da linha de base, estabelecido por meio da análise de uma série de concentrações diluídas do analito, até o menor nível detectável. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha de base. (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). A equação do LD é expressa como: **LD = 3 x DP / IC**, onde DP = desvio-padrão da resposta; IC = é a inclinação da curva, coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método). (BRASIL/ANVISA, 2003).

3.6.6 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é estabelecido pela menor concentração do analito que pode ser quantificada em uma amostra com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. (BRASIL/ANVISA, 2003). De acordo com ANVISA (2012), o LQ pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído de 10 vezes a altura do ruído da linha de base, expresso pela fórmula: **LQ= DP x 10 / IC**, onde DP = desvio-padrão da resposta; IC = é a inclinação da curva, coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método). (BRASIL/ANVISA, 2003).

3.6.7 Precisão

Precisão é o parâmetro que avalia a proximidade dos resultados obtidos entre uma série de medidas de várias alíquotas de uma mesma amostra. (BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). É expresso como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas, e é dado pela seguinte equação: $DPR \text{ ou } CV\% = DP / CM \times 100$, onde DP é o desvio padrão e CM é a concentração média. De acordo com a ANVISA (2003) o valor máximo aceitável do DPR não deve ser superior a 5%.

3.6.8 Exatidão

Exatidão de uma metodologia analítica é a similaridade dos valores do analito obtidos da análise pelo equipamento e o valor verdadeiro usado na fortificação. Esse parâmetro mede a eficiência do processo de extração, detectando possíveis erros sistemáticos, tais como baixos níveis de recuperação na extração, erros de precisão durante o manuseio de pipetas volumétricas e substâncias interferentes na amostra, ocorridos durante o desenvolvimento analítico. (BRASIL, 2012; BRASIL/ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003).

A exatidão é calculada através da porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra durante a fortificação, e é averiguada após, pelo menos, 3 concentrações, em níveis baixo, médio e alto, em triplicatas. (BRASIL/ANVISA, 2003). O cálculo da exatidão é expresso pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental} \times 100}{\text{Concentração Teórica}}$$

(Porcentagem de recuperação)

De acordo com ANVISA (2003), os valores ideais de porcentagem de recuperação encontram-se acima de 70%, porém, admitem-se valores menores, de 50 a 60%, desde que a recuperação seja precisa e exata, com um DPR menor que 5%. (BRASIL/ANVISA, 2003).

3.7 ANÁLISES MULTIRESÍDUOS

As metodologias comumente utilizadas em análises multiresíduos em alimentos envolvem processos de extração, purificação, detecção e análise de dados. A extração é a etapa que mais consome tempo, normalmente com longas etapas de processamento, sendo esta etapa extremamente importante na determinação da exatidão e precisão do método. (MARTINS et al., 2013). Por esse motivo a escolha de um método de extração apropriado influencia diretamente no êxito da análise.

As técnicas analíticas tradicionais, como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), utilizadas para extração de resíduos de agrotóxicos em fontes alimentares, vieram sendo aperfeiçoadas nos últimos anos com o intuito de superar suas desvantagens, buscando minimizar as longas etapas de processamento, devido às repetidas lavagens de cartuchos ou colunas contendo sorvente, diminuir a quantidade de volume de amostra e de solventes químicos, evitar os altos custos com instrumentação e melhorar as porcentagens de recuperação e precisão nem sempre satisfatórias. (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Dentre as atuais técnicas analíticas desenvolvidas com o intuito de superar as desvantagens das técnicas tradicionais em análises de agrotóxicos, a metodologia QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é a que tem se destacado por sua elevada eficiência, extração de um elevado número de agrotóxicos, altas recuperações, baixo custo, rápido processamento, utilização de pequenos volumes de amostra e solventes, excelente remoção de substâncias interferentes da matriz, facilidade e segurança. (MARTINS et al., 2013; HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007).

3.7.1 Método QuEChERS

3.7.1.1 Quantidade da amostra

Uma das grandes vantagens da metodologia QuEChERS é a utilização de um menor volume de amostra, sendo esta a quantidade mínima necessária para que tenha eficiência na extração e garanta precisão e exatidão nos resultados. (ANASTASSIADES et al., 2003).

3.7.1.2 Seleção do tipo de solvente - Extração

O solvente deve ser escolhido pela sua característica de polaridade, fator essencial que define a qualidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos. Os solventes mais escolhidos para a extração em análises multiresíduos são: acetato de etila, acetona e acetonitrila. O acetato de etila apresenta a desvantagem da necessidade de adição de outros solventes para uma melhor recuperação de agrotóxicos de pH básico. Já na acetona a desvantagem encontra-se na necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa, o que não se faz necessário na acetonitrila onde apenas a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação. (MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Entre as opções de solventes, a acetonitrila é a opção mais utilizada na metodologia QuEChERS, pois além de não precisar da utilização de outros solventes para a extração, também possibilita menor índice de extração de lipídeos e é um solvente de polaridade média, extraindo ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades. A acidificação da acetonitrila com ácido acético aumenta a estabilidade dos agrotóxicos permitindo melhores índices de recuperação. (MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

3.7.1.3 Sais – Partição (separação de fases)

Na etapa de partição ocorre precipitação de proteínas da solução através da adição de altas concentrações de sais, onde esses sais atraem as moléculas H_2O de solvatação do meio, de modo a ficar menor quantidade de água disponível para as moléculas proteicas, fazendo com que as moléculas do analito fiquem livres e tendam a passar para o solvente, este efeito é chamado de “*Salting out*”. Esta etapa permite que melhore os percentuais de recuperação para analitos polares, aumentando a eficiência de extração pela diminuição da solubilidade desses compostos na fase aquosa. (PRAUSNITZ; LICHTENTHALER; AZEVEDO, 1999).

Os sais recomendados para extração em metodologias QuEChERS são o sulfato de magnésio ($MgSO_4$) juntamente com o sulfato de sódio (Na_2SO_4) ou cloreto de sódio ($NaCl$). O $MgSO_4$ além remover as moléculas de água, reduzindo o volume de fase aquosa, ele também promove uma reação exotérmica, estabelecendo um aquecimento de 40 a 45 °C na solução, favorecendo a extração dos compostos apolares. (ANASTASSIADES et al., 2003).

3.7.1.4 Clean-up (Purificação do extrato)

A metodologia de *Clean-up* para QuEChERS foi adaptada, substituindo a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), que utiliza cartuchos ou colunas de sorvente de alto custo, por extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE), o qual adiciona sorvente de amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) e $MgSO_4$. (SHIMELIS et al., 2007; MARTINEZ-VIDAL et al.; 2005).

Tal procedimento faz com que o sorvente retenha as impurezas do extrato, diminuindo as chances de interferências da matriz pelo efeito quelante do PSA, possibilitando com que o extrato seja encaminhado à análise cromatográfica da amostra. Em amostras com alto teor de gordura faz-se necessário a utilização da sílica C_{18} nesse processo, o qual retém maior quantidade de ácidos graxos livres e de outros compostos apolares presentes na matriz, melhorando as porcentagens de recuperação e eficiência do método. (SHIMELIS et al., 2007; PRESTES et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

As amostras foram processadas e extraídas no laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba/PR e analisadas em parceria como o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ - USP) em Piracicaba/SP.

4.2 LOCAIS DE COLETA DO LEITE MATERNO HUMANO

As amostras de leite materno utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram cordialmente cedidas das unidades de Bancos de Leite Humano dos municípios de Curitiba, Ponta Grossa, Apucarana, Guarapuava e Toledo do Estado do Paraná (FIGURA 21), a saber:

1. Hospital Evangélico de Curitiba, localizado na Av. Alameda Augusto Stelfeld, nº1. 809 - Bigorriho - CURITIBA / PR. **Carta de Aceite (ANEXO 01)**.
2. Hospital da Criança Prefeito João Vargas de Oliveira, localizado na rua Dr. Joaquim de Paula Xavier, 500, Vila Estrela – PONTA GROSSA / PR. **Carta de Aceite (ANEXO 02)**.
3. Hospital da Providência, localizado na Rua Rio Branco, 518 - Centro – APUCARANA / PR. **Carta de Aceite (ANEXO 03)**.
4. Banco de Leite Humano de São Vicente de Paulo, localizado na Rua Marechal Floriano Peixoto, nº 1.059 – Prédio Centro – GUARAPUAVA / PR. **Carta de Aceite (ANEXO 04)**.
5. Hospital Bom Jesus – Banco de Leite Humano Dr. Jorge Nisiide, localizado na Rua Almirante Barroso, 2.193 - Centro – TOLEDO / PR. **Carta de Aceite (ANEXO 05)**.

FIGURA 21 - MAPA DE LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES DE ABRANGÊNCIA DAS UNIDADES DE BANCO DE LEITE HUMANO NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL.



FONTE: O autor, baseado em IPARDES (2017).

4.3 AMOSTRAS DE LEITE HUMANO

Como a preocupação dos bancos de leite humano é manter estoques de leite suficientes para atender à demanda, as amostras de leite materno destinadas ao projeto foram amostras que seriam destinadas ao descarte, por terem sido reprovadas no controle físico ou microbiológico dos bancos de leite. Desta forma os autores do projeto solicitaram ao Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde a **dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**, pois as unidades cedentes (BLH) estavam cientes em participar do projeto e estas amostras seriam descartadas e não utilizadas para fins alimentícios.

4.3.1 Quantidade de amostras

Foram 75 (setenta e cinco) amostras de leite humano ao total, sendo 15 (quinze) amostras provenientes de cada banco de leite.

4.3.2 Data de coleta

As amostras foram coletadas entre setembro e outubro/2016, após aprovação do projeto pelo comitê de ética do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob número **CAAE: 58516516.4.0000.0102** (ANEXO 06).

4.3.3 Coleta

Foram coletados 50mL de cada amostra em tubos Falcon. As amostras foram mantidas em congelamento a uma temperatura de -20°C.

4.3.4 Transporte

As amostras congeladas foram transportadas das sedes de coleta para o laboratório de Toxicologia da UFPR em tubos Falcon de 50mL mantidas em caixa térmica contendo gelo seco para manter a integridade do material.

4.4 SUBSTÂNCIAS ANALISADAS NO LEITE

As substâncias analisadas neste projeto foram os organoclorados α -hexaclorociclohexano, δ -hexaclorociclohexano, lindano, heptacloro, α -endossulfan, β -endossulfan, endossulfan sulfato, p,p'- DDT, dieldrin e endrin, e os organofosforados fenitrothion, malation e clorpirifós.

Tais substâncias foram escolhidas para análise pelas seguintes razões: utilização de um único método analítico capaz de identificar e quantificar simultaneamente todas as substâncias de interesse; substâncias de uso em larga escala na agricultura e acessibilidade a esses padrões analíticos para a validação da metodologia, os malefícios a saúde humana por esses compostos, além do fato de alguns serem persistentes no meio ambiente por longos períodos de tempo.

4.5 MATERIAL UTILIZADO

4.5.1 Amostra branco

Para a amostra branco foi utilizado leite bovino cru, doado por um produtor de leite da região de Piracicaba-SP. O leite bovino comparado com o leite materno tem diferenças apenas na quantidade nutricional dos componentes, sendo assim, tal material é adequado para ser utilizado na análise. Como é de procedência orgânica, o leite foi submetido à análise prévia para confirmação da ausência dos agrotóxicos usados nesse estudo.

4.5.2 Padrões e Reagentes

Os padrões de agrotóxicos utilizados nesse estudo são certificados, e possuem grau de pureza superior a 95% da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

A acetonitrila de grau analítico utilizado como solvente de extração - Merck (Darmstadt, Germany). Os sais $MgSO_4$, de grau anidro, e acetato de sódio - Merck (Darmstadt, Germany). O sorvente *Primary Secondary Amine* (PSA) e o *octadecyl* (C_{18}) - Agilent (Santa Clara, CA, USA). O ácido acético e o hexano de grau HPLC - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.5.3 Solução Padrão

As soluções dos padrões foram preparadas separadamente em acetonitrila com 1% de ácido acético de modo a obter uma concentração final de $1\mu g mL^{-1}$.

4.6 INSTRUMENTAÇÃO

Os analitos foram identificados e quantificados utilizando Cromatógrafo a Gás Agilent Technologies 7820 A (Santa Clara, USA), equipado com coluna capilar cromatográfica J&W DB-5ms (5%-Fenil)-metilpolisiloxano) Ultra Inert Agilent (Santa Clara, USA), de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro com filme de 0,25 micrômetros de espessura, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Single Quadrupolo otimizado no modo SRM.

Para as análises os seguintes parâmetros estabelecidos na (TABELA 7) foram ajustados:

TABELA 7 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS AJUSTADOS PARA A ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO.

PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	
Solvente de solubilização	Hexano
Gás de arraste	Hélio
Fluxo constante	2,0mL min ⁻¹
Temperatura Injetor	250°C
Temperatura detector	280°C
Volume de injeção	2 microlitros
Modo	Splitless
Rampa de aquecimento	Inicial: 50°C; 10°C/min até 65°C; 25°C/min até 180°C; e 5°C/min até 280°C. 280°C por 5 min, até o final da corrida.
Tempo Total de corrida	31 min

Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados através do Software 7820A/ Enhanced Mass Hunter da Agilent Technologies. Os íons selecionados para a detecção e quantificação no espectrômetro de massas estão apresentados na (TABELA 8).

TABELA 8 – ÍONS PRECURSORES, FRAGMENTOS E TEMPO DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM GC-MS.

COMPOSTO	ION PRECURSOR (m/z)	FRAGMENTO (m/z)	GRUPO	RT(min)	INTEVALO DO GRUPO (min)
α-HCH	219	111	1	9,56	
Lindano	219	181	1	10,24	7 a 11
δ-HCH	219	183	1	10,75	
Heptacloro	274	237	2	11,95	
Fenitroton	277	263	2	12,42	11 a 14,5
Malation	173	127	2	12,68	
Clorpirifós	314	197	2	13,00	
α-endossulfan	241	195	3	15,06	
Dieldrin	277	263	3	15,84	14,5 a 17
Endrin	263	67	3	16,52	
B-endossulfan	241	207	3	16,81	
p p'- DDT	235	165	4	18,30	17 a 20
Endossulfan sulfato	272	229	4	18,17	

RT - tempo de retenção

4.7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

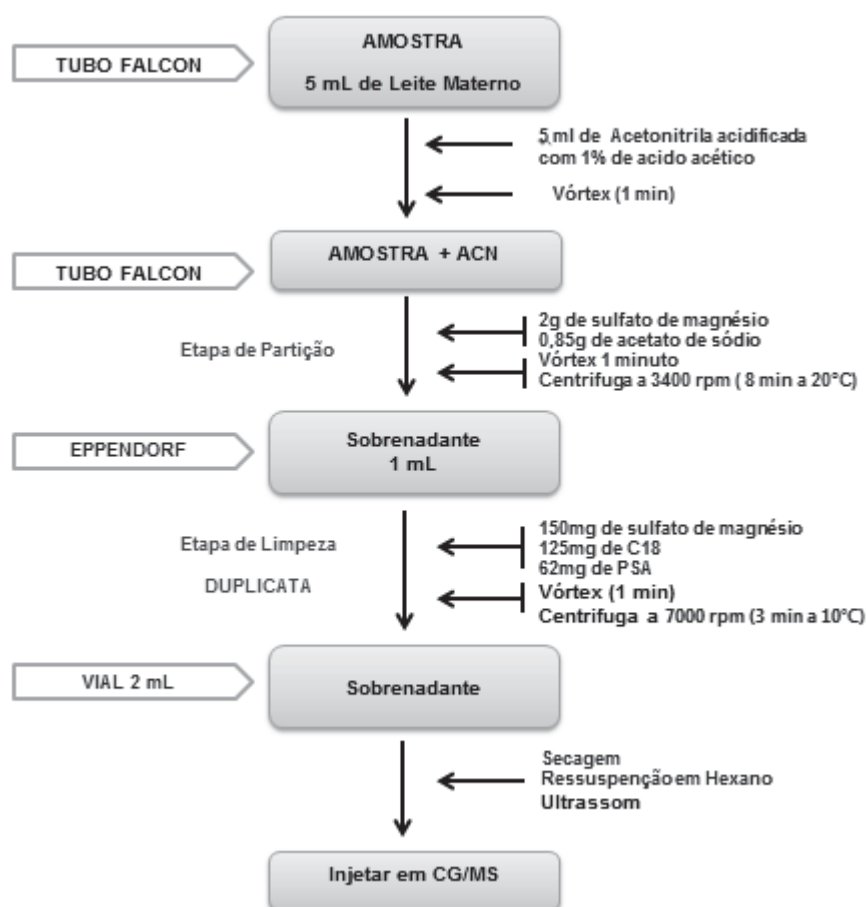
4.7.1 Extração QuEChERS

O procedimento de extração de resíduos de agrotóxico em leite utilizado nesse estudo se deu a partir da utilização de 5 mL do solvente acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético em 5mL de leite e esta mistura foi submetida a agitação durante 1 min utilizando um vórtex a velocidade máxima. Para a etapa de partição foram adicionados 2,0g de sulfato de magnésio (MgSO₄) anidro e 0,85g de acetato de sódio ao tubo e imediatamente submetidos a agitação em vórtex durante 1 min e posterior centrifugação a 3400 rpm por 8 min à 20°C.

4.7.2 Clean-up

Na etapa de limpeza (*clean-up*), utilizou-se a técnica de D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, uma alíquota de 1 mL da camada superior de acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético foi transferida para um eppendorf contendo 150mg de MgSO₄ anidro, 62mg de PSA (amina primária secundária) e 125mg de sílica C18. O tubo foi agitado durante 1 min em vórtex e, em seguida, centrifugado durante 3 min a 7000 rpm a 10°C. Uma alíquota da camada superior final foi filtrada com filtro 0,22µm e transferida em um vial de 2 mL. Após a secagem, foi ressuspenso em hexano grau CG e submetido para análise CG-MS. A (FIGURA 22) exemplifica a metodologia de extração e limpeza.

FIGURA 22 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS AGROTÓXICOS EM LEITE HUMANO.



FONTE: O autor (2017).

4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O procedimento de extração dos agrotóxicos pesquisados nesse trabalho foi adaptado da metodologia desenvolvida por Bandeira et al. (2014), o qual empregou método QuEChERS modificado para a determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados, piretróides e dinitroanilinas em leite bovino. Para garantir a confiabilidade do método escolhido na extração dos agrotóxicos organoclorados e organofosforados de escolha deste trabalho, algumas alterações e várias soluções de fortificação foram testadas.

A adequação da metodologia escolhida foi avaliada através da realização das curvas analíticas, sendo observados os seguintes parâmetros estabelecidos pelo **Protocolo ANVISA - Resolução - RE N° 899, de 29 de maio de 2003**: seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (repetitividade) e exatidão (recuperação).

4.8.1 Seletividade

Foi analisada a pureza dos picos cromatográficos através da sobreposição dos cromatogramas obtidos da amostra branca de leite com a amostra do leite fortificado, onde as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção (RT) do analito devem ser inferiores a 5% da resposta do analito obtido com a matriz fortificada.

4.8.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção das curvas analíticas, utilizando ensaios de fortificação preparados em leite bovino cru, em 7 níveis diferentes de concentração (0,025; 0,05; 0,01; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em triplicatas. Uma curva de calibração para cada analito utilizado foi construída a fim de observar se a relação linear é aceitável, indicada pelo coeficiente de correlação (r) igual ou superior a 0,98.

Com isso foram realizadas curvas analíticas baseadas na equação da reta ($y = ax + b$), os cálculos foram realizados através do software do equipamento. Os dados foram submetidos à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e após a verificação da adequação da linearidade das curvas analíticas, os parâmetros LOD e LOQ foram calculados considerando a relação razão do sinal/linha de base (ruído).

4.8.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi avaliada através da análise do coeficiente angular do gráfico analítico, obtido através da inclinação da curva de calibração através da fórmula: **$S = dy/dx$** .

4.8.4 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados através da relação sinal-ruído da linha de base. As amostras de leite bovino foram fortificadas com os padrões dos agrotóxicos de estudo, sendo diluídas sucessivamente em até que o menor sinal (pico cromatográfico) de cada composto fosse detectado.

O LD foi estimado através da relação sinal/ruído de 3 vezes o ruído a altura da linha de base, já o LQ foi determinado por meio da relação sinal/ruído de 10 vezes a altura do ruído da linha de base. O LQ foi definido pelo menor nível de fortificação com recuperação na faixa de 60 a 120%.

4.8.5 Precisão e Exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados através da análise em triplicatas de três concentrações diferentes, em níveis baixo, médio e alto (0,25; 0,50; 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$), no mesmo dia (intradia).

Para o parâmetro de precisão foi avaliado a proximidade dos resultados obtidos entre as triplicatas, sendo averiguada em função do desvio padrão relativo (DPR) obtidos através da porcentagem de exatidão, sendo aceito como valor máximo DPR inferior a 5%. Já para o parâmetro de exatidão foi avaliado a porcentagem de recuperação, objetivando-se valores acima de 70%, porém, aceitando valores menores desde que o valor do DPR máximo fosse aceitável (<5%).

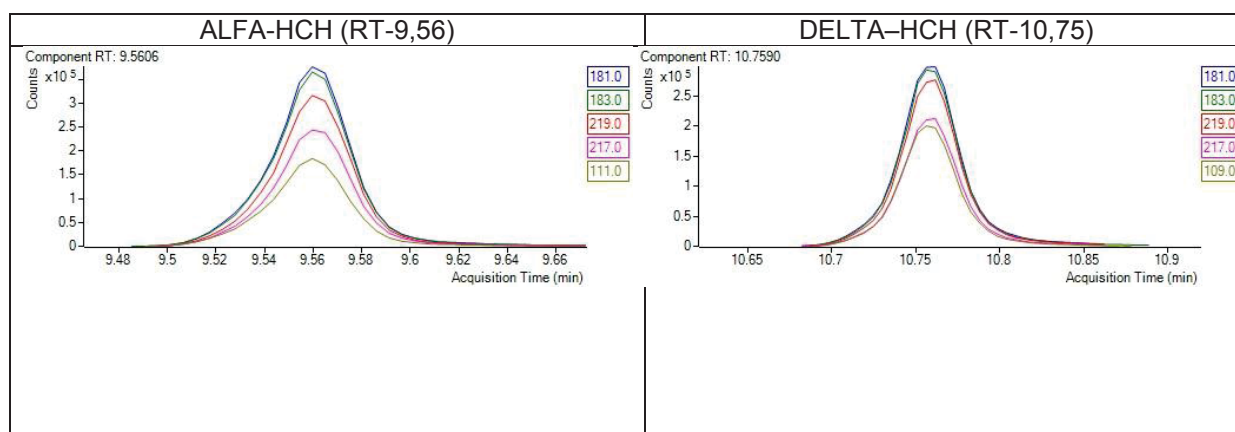
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos das fortificações em leite bovino cru, de cada analito utilizado como padrão nesse estudo, estão representados nas (FIGURAS 23 e 24). Após análise desses cromatogramas, observou-se que nenhum interferente apresentou tempo de retenção (RT) igual ou próximo ao RT dos analitos, podendo ser considerada essa metodologia com boa seletividade.

FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p p' DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, UTILIZADOS NO ESTUDO.



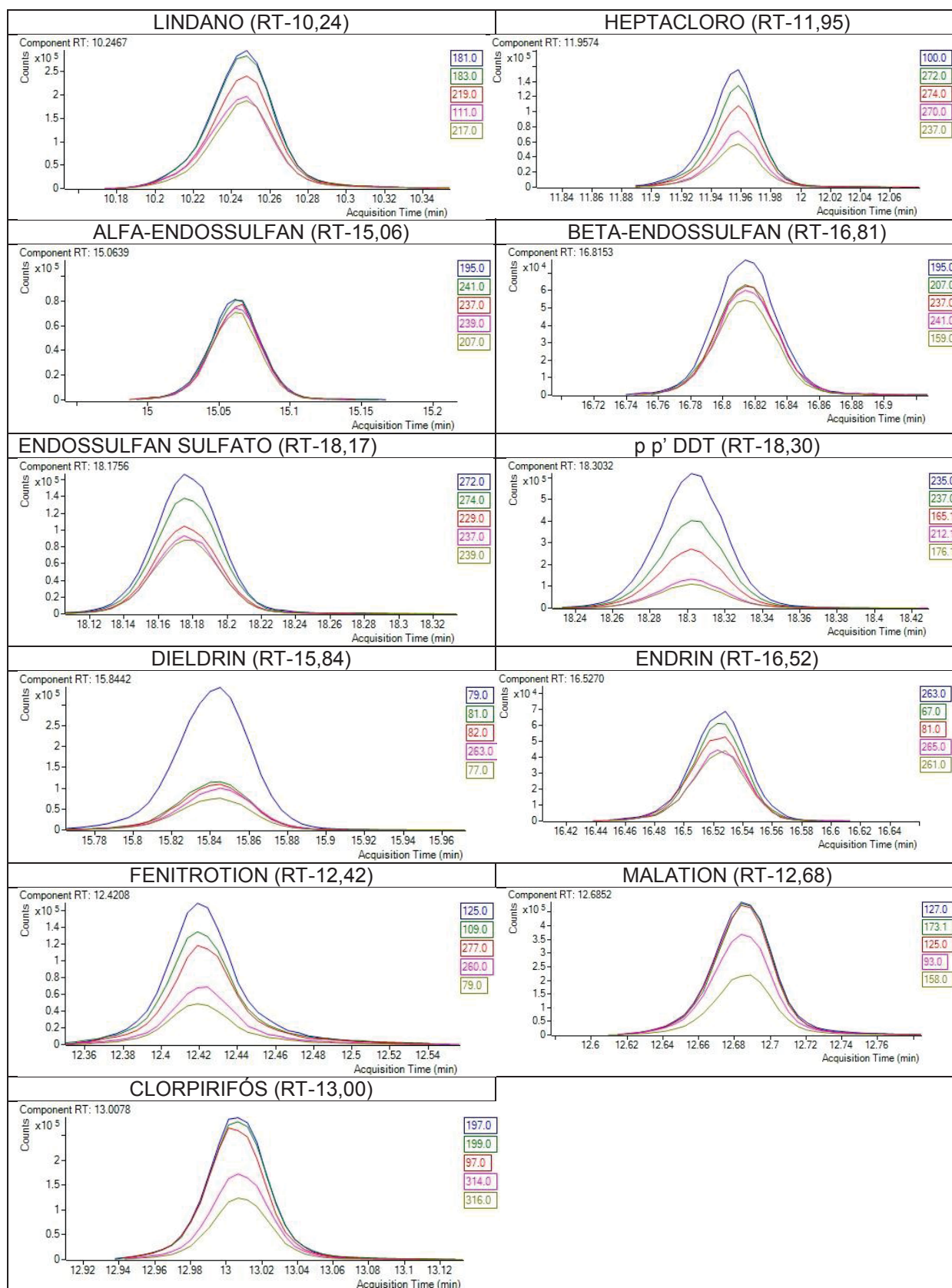
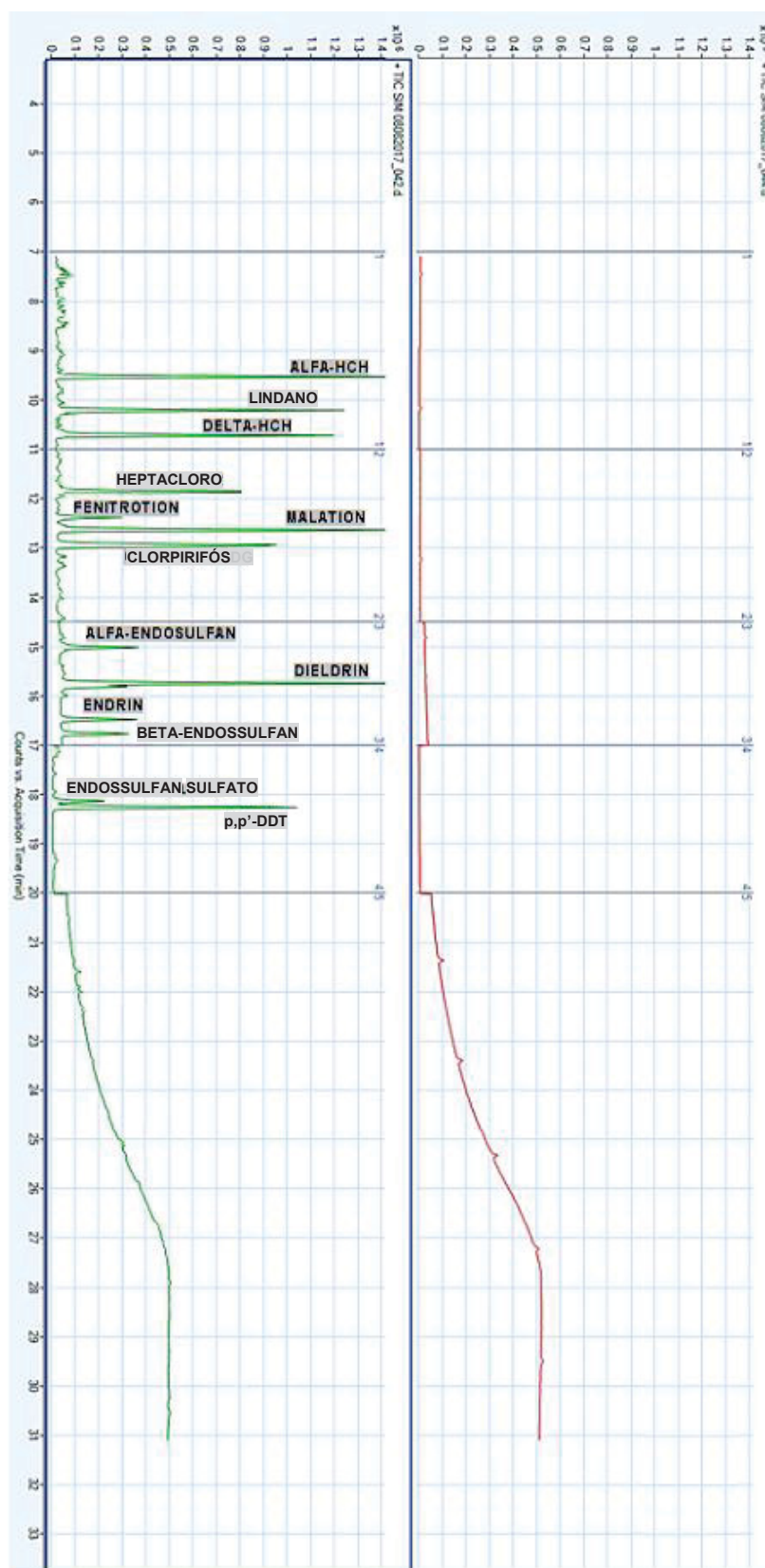


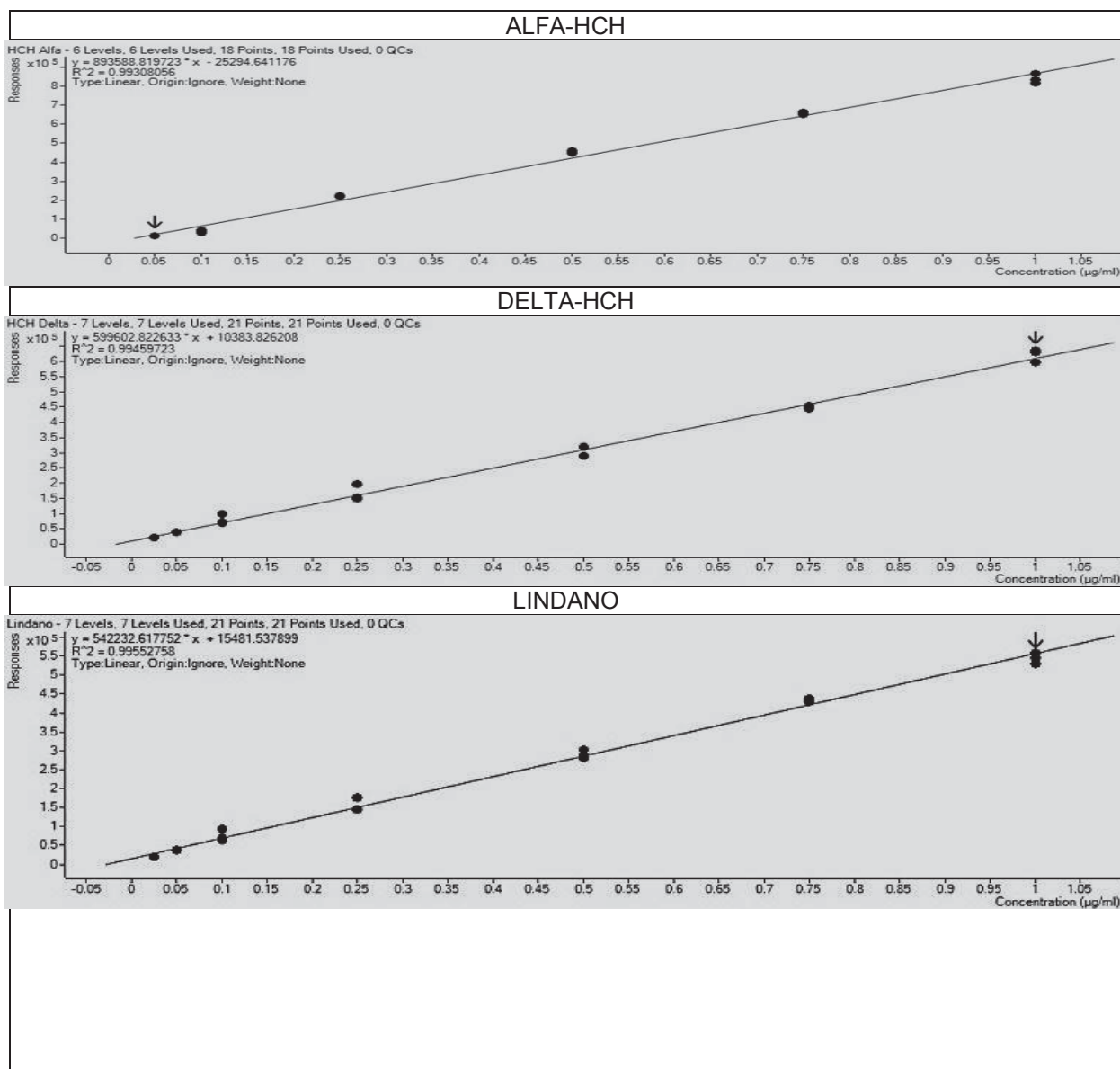
FIGURA 24- CROMATOGRAMA GERAL DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p p'-DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, E CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE BOVINO UTILIZADOS NO ESTUDO.

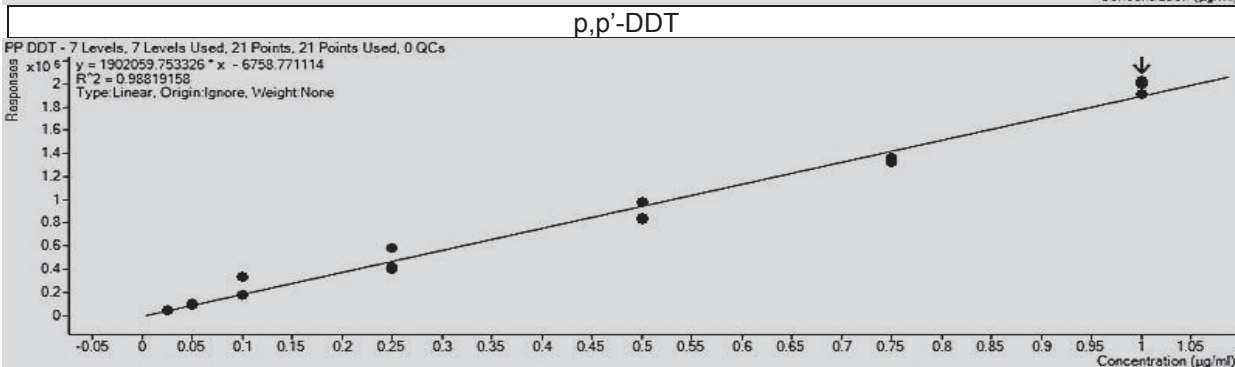
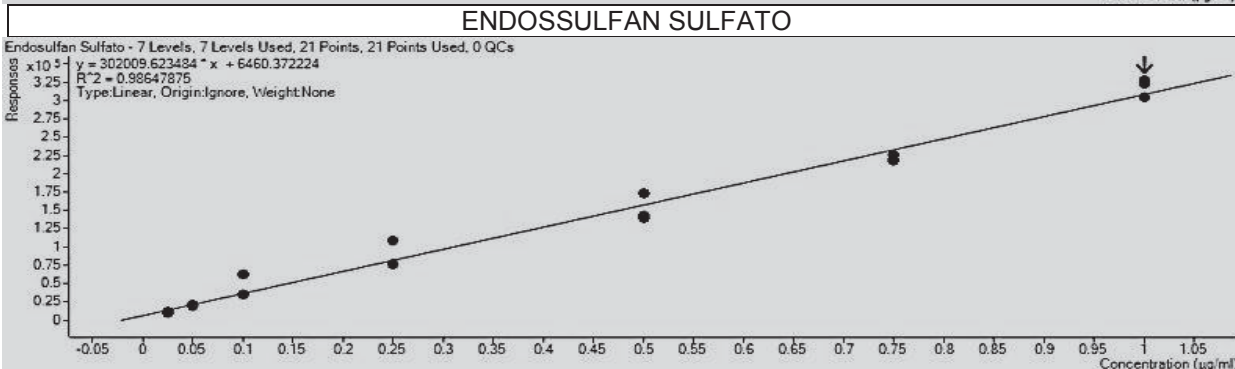
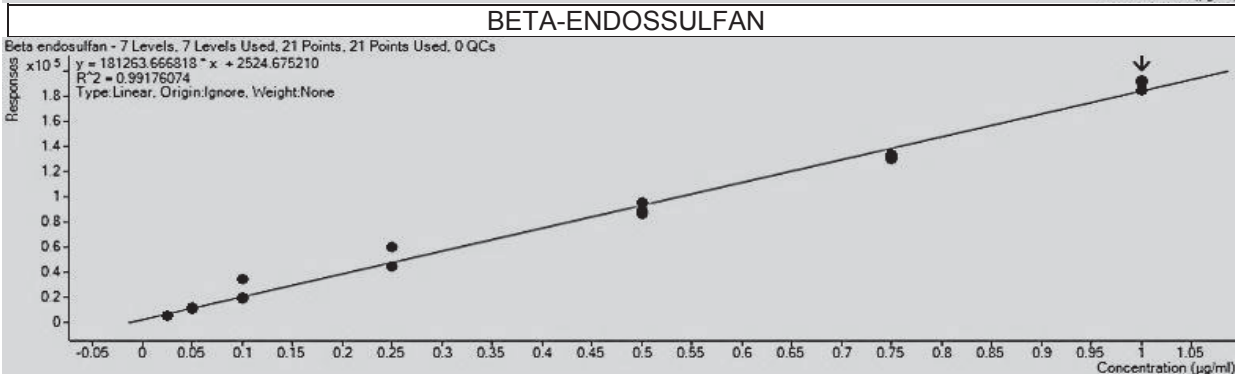
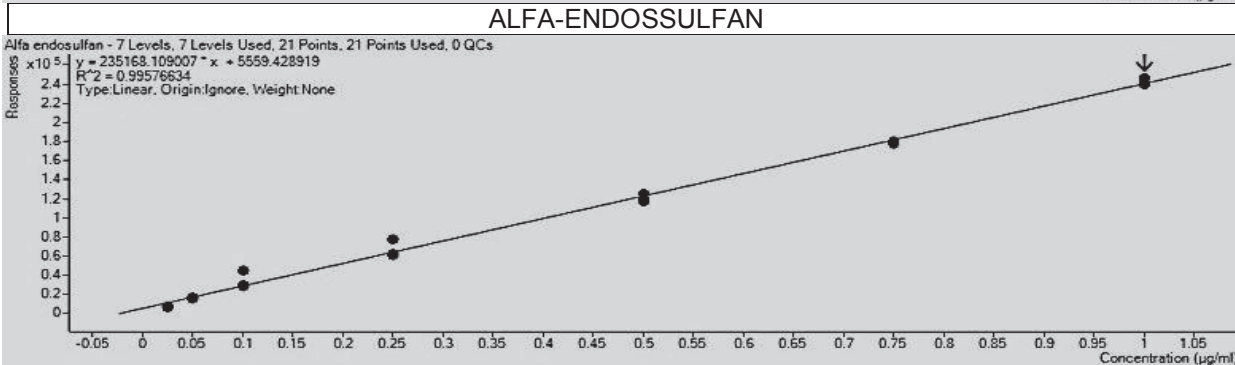
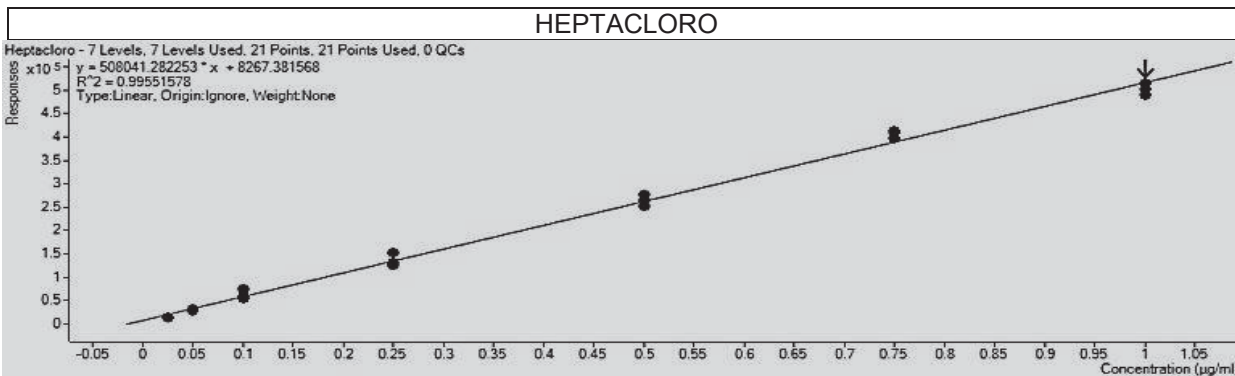


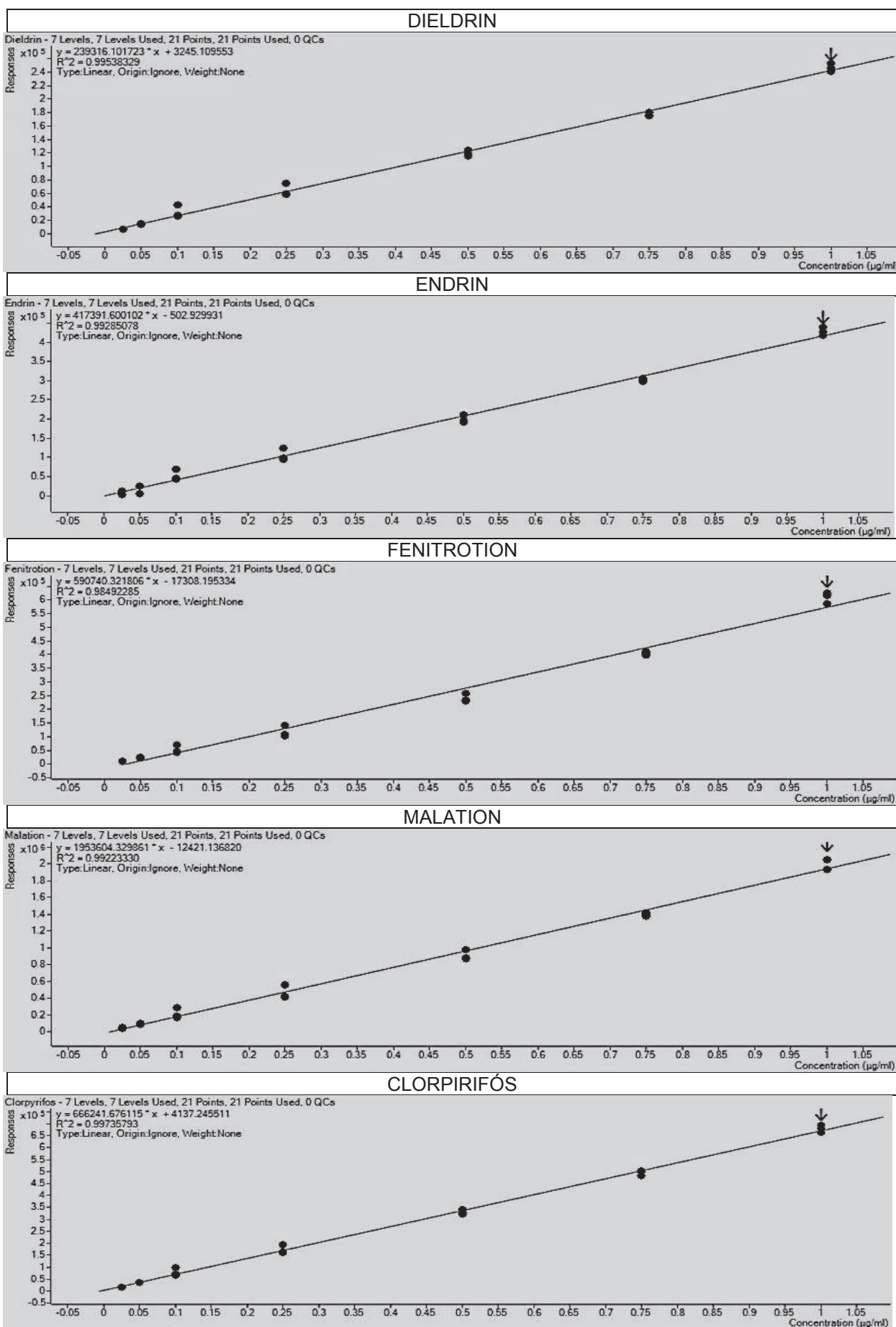
5.1.2 Linearidade

As curvas de calibração (FIGURA 25), obtidas após a injeção no sistema GC-MS das fortificações em leite bovino cru em 7 pontos, nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,01, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram adequado comportamento linear verificado através do coeficiente de correlação (r) com valores iguais ou maiores que 0,98, para a maioria dos compostos, assim como recomendado pela resolução da ANVISA (2003).

FIGURA 25 - CURVAS ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS ALFA-HCH, DELTA-HCH, LINDANO, HEPTACLORO, ALFA-ENDOSSULFAN, BETA-ENDOSSULFAN, ENDOSSULFAN SULFATO, p'p DDT, DIELDRIN, ENDRIN, FENITROTION, MALATION E CLORPIRIFÓS, UTILIZADOS NO ESTUDO.







5.1.3 Sensibilidade

Foi avaliada a sensibilidade do método através da análise do coeficiente angular do gráfico analítico. Foram observados valores elevados de coeficientes angulares das retas para cada analito analisado, qualificando alta sensibilidade ao método. Tal resultado significa que pequenas variações na concentração geraram grandes variações nos sinais medidos, o que garantiu a distinção entre duas concentrações próximas.

O valor de cada parâmetro de regressão linear, de cada composto analisado, está descrito na (TABELA 9).

TABELA 9 – PARÂMETROS DE REGRESSÃO LINEAR DOS COMPOSTOS ORGANOCORADOS E ORGANOFOSFORADOS.

COMPOSTOS	PARÂMETROS		
	COEFICIENTE LINEAR (a)	COEFICIENTE ANGULAR (b)	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Alfa- HCH	765753	25033	0,9906
Delta-HCH	599602	10383	0,9945
Lindano	542232	15481	0,9955
Heptacloro	508041	8267	0,9955
Alfa endossulfan	235116	5559	0,9957
Beta endossulfan	181263	2524	0,9917
Endossulfan sulfato	302009	6460	0,9864
p,p'-DDT	1902059	6758	0,9881
Dieldrin	239316	3245	0,9953
Endrin	417391	502	0,9928
Fenitroton	590740	17308	0,9849
Malation	1953604	12421	0,9922
Clorpirifós	66624	4137	0,9973

5.1.4 Limites de Detecção e de Quantificação do método.

Os valores de LD e LQ foram calculados pelo equipamento, sendo estimados de acordo com recomendações da ANVISA (2003). Foram observados LD baixo (sinal/ruído > 3) estimados entre 0,37 a 10,54 $\mu\text{g L}^{-1}$, e LQ baixo (sinal/ruído > 10) estimados entre 0,39 e 105,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. O agrotóxico organoclorado alfa endossulfan apresentou valores mais elevados de LD (10,54 $\mu\text{g L}^{-1}$) e LQ (105,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), devido às baixas relações sinal de ruído em todos os níveis, sendo o único agrotóxico a apresentar baixa sensibilidade no método. Todos os valores de LD e LQ calculados, assim como todos os valores de sinal/ruído de todos nos níveis de cada composto estão descritos na (TABELA 10).

TABELA 10 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO.

COMPOSTO	SINAL RUIDO (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	SINAL RUIDO (0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	SINAL RUIDO (0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	MEDIA SINAL RUIDO	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Alfa- HCH	137,53	116,72	216,65	156,966	0,00048	0,0048
Delta-HCH	100,16	120,1	154,41	124,89	0,00060	0,0060
Lindano	102,79	120,1	154,41	125,76	0,00060	0,0060
Heptacloro	245,95	197,4	136,9	193,41	0,00039	0,0039
Alfa endossulfan	3,89	3,99	13,46	7,11	0,01054	0,1054
Beta endossulfan	36,61	18,3	15,88	23,59	0,00318	0,0318
Endossulfan sulfato	84,37	77,85	92,49	84,90	0,00088	0,0088
p,p'-DDT	189,96	128,49	284,45	200,96	0,00037	0,0037
Dieldrin	84,97	65,22	64,18	71,45	0,00105	0,0105
Endrin	86,72	85,8	15,43	62,65	0,00120	0,0120
Fenitrothion	134,67	208,04	133,56	158,75	0,00047	0,0047
Malation	149,51	132,26	187,06	156,27	0,00048	0,0048
Clorpirifós	192,13	172,62	193,59	186,11	0,00040	0,0040

5.1.5 Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos para o parâmetro de precisão apresentaram valores de DPR entre 0,79% a 4,64%, demonstrados na (TABELA 11). De acordo com a ANVISA (2003), as porcentagens de DPR não devem ser superiores a 5%, podendo concluir que os valores obtidos na análise demonstram que o método utilizado é preciso, com boa repetitividade, pois todos os compostos estudados apresentam desvio-padrão relativo menor que 4,59%.

Os resultados para o parâmetro de exatidão (porcentagem de recuperação), nos três níveis de fortificação, ficaram entre 60 a 90% de recuperação, com um desvio padrão abaixo de 5%, em todos os compostos, exceto o heptacloro que obteve uma média porcentagem de recuperação de 58,88%. De acordo com ANVISA (2003), idealiza-se porcentagens de recuperação acima de 70%, porém, admitem-se valores menores de 50 a 60%, desde que a recuperação tenha um desvio padrão relativo menor que 5%, demonstrando assim resultados satisfatórios na eficiência do processo de extração da metodologia aplicada.

Esses resultados de precisão e exatidão indicam uma resposta confiável dentro dos limites de concentração estabelecidos.

TABELA 11 – PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO (DPR) DOS COMPOSTOS DESSE ESTUDO.

COMPOSTO	*MÉDIA (%) 0,25µg mL ⁻¹	*MÉDIA (%) 0,50µg mL ⁻¹	*MÉDIA (%) 0,75µg mL ⁻¹	MÉDIA TOTAL (%)	DESVIO PADRÃO (%) (DPR)
Alfa- HCH	57,44	66,63	62,12	62,07	4,59
Delta-HCH	77,55	79,16	79,06	78,59	0,90
Lindano	65,74	71,23	68,97	68,65	2,76
Heptacloro	56,00	62,00	58,64	58,88	3,01
Alfa endossulfan	67,12	68,99	67,95	68,03	0,94
Beta endossulfan	73,14	75,82	75,26	74,75	1,41
Endossulfan sulfato	79,42	83,68	88,39	83,84	4,49
p,p'-DDT	65,84	68,41	67,65	67,30	1,32
Dieldrin	66,75	73,72	69,77	70,09	3,50
Endrin	74,44	73,72	69,77	72,65	2,51
Fenitroton	84,28	86,97	93,33	88,20	4,64
Malation	86,99	85,73	87,19	86,64	0,79
Clorpirifós	70,59	70,95	69,36	70,30	0,83

NOTA: * Média de 3 repetições na concentração indicada.

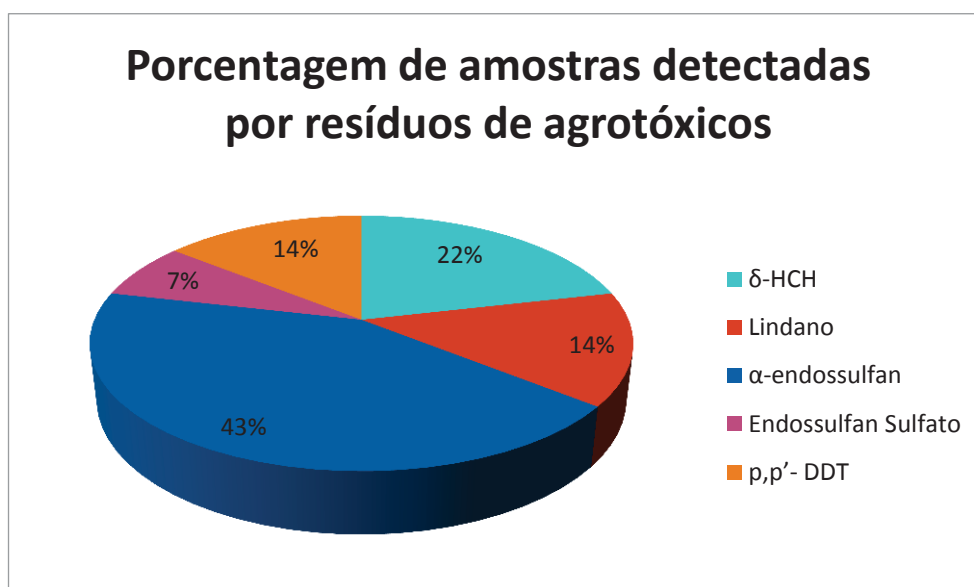
O fato da região de Curitiba ser a única região em que não apresentou contaminações de resíduos de agrotóxicos em suas amostras já era esperado por esse estudo, pois a cidade de Curitiba, dentre as regiões verificadas nesta pesquisa, é a única que não apresenta áreas agrícolas importantes próximas, caracterizando-se uma cidade com maior área urbana.

As outras cidades estão muito próximas de áreas agrícolas, onde o uso e a exposição a agrotóxicos é mais frequente e elevada. Isso mostra que grande parte da exposição aos agrotóxicos acontece por contaminação ambiental e ocupacional.

5.2.2 Detecção de resíduos de agrotóxicos no leite materno humano

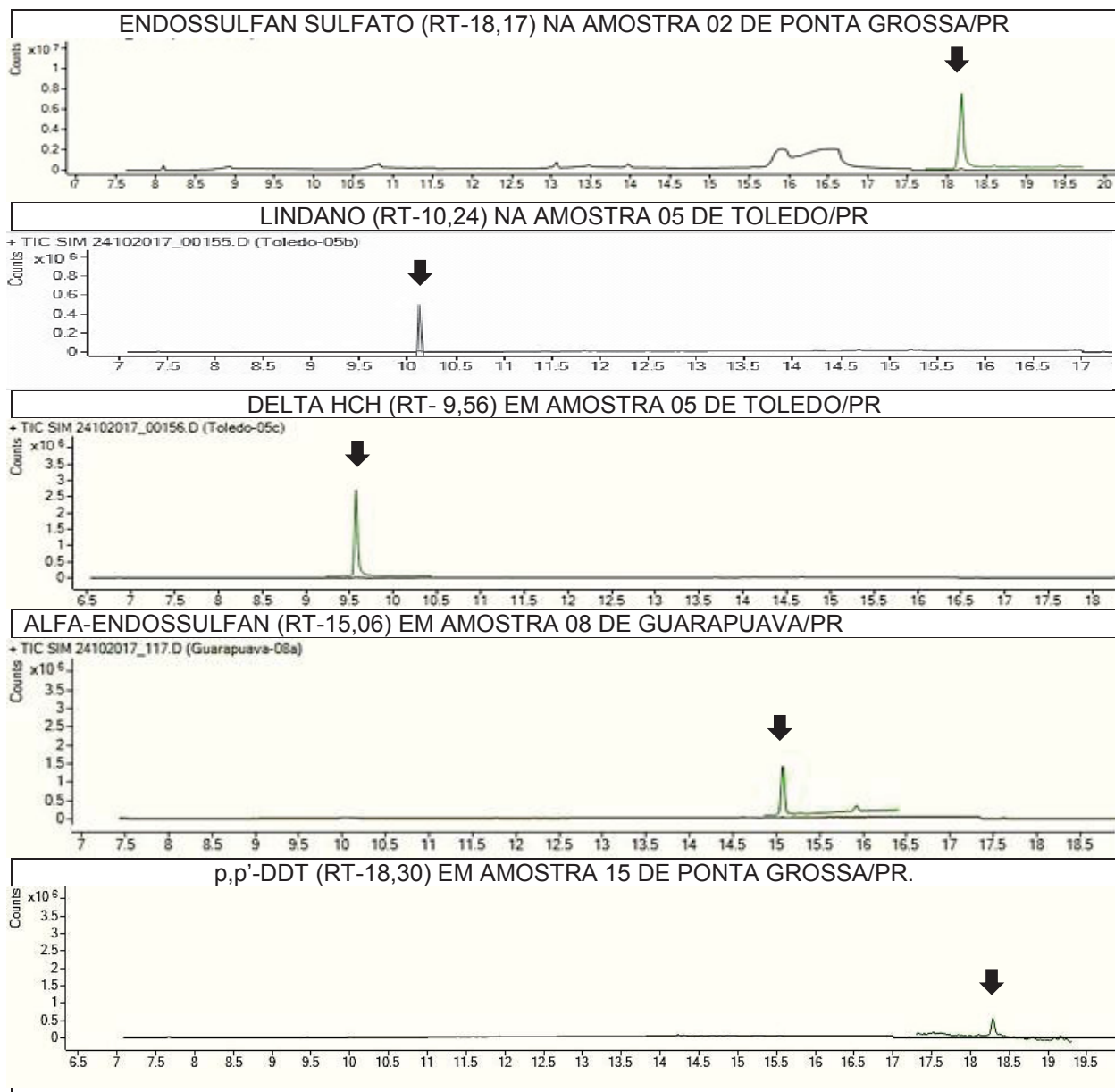
Após a análise das 75 amostras de leite materno humano, 11 amostras foram indicadas com contaminações residuais, dando um percentual de 14,6% de amostras positivas. Nas amostras de nº 1 e nº 5 da região de Toledo foram detectadas mais de um agrotóxico, considerando-se uma contaminação multiresidual em cada amostra, dando um total de 14 compostos encontrados nas 11 amostras positivas (GRÁFICO 1), sendo eles: alfa-endossulfan (n=6), endossulfan sulfato (n=1), delta-hexaclorociclohexano (n=3), lindano (n=2) e p,p'-DDT (n=2).

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE AMOSTRAS DETECTADAS POR RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.



As substâncias detectadas apresentaram seus picos cromatográficos perfeitamente enquadrados dentro do tempo de retenção (RT) de cada composto e estão representados nos cromatogramas da (FIGURA 26).

FIGURA 26 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA TÍPICO CADA AGROTÓXICO ENCONTRADO NAS ANÁLISES DAS 75 AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.



Dentre as 13 substâncias pesquisadas nas amostras de leite materno, foram detectados resíduos de 5 substâncias organocloradas, sendo o α -endossulfan o composto com maior índice de detecção. O α -endossulfan é um produto de degradação do β -endossulfan. Segundo Santos et al. (2011) essa conversão acontece no ambiente logo após a aplicação do produto. O que explica a predominância do composto α -endossulfan nas nossas análises. Não foram identificados resíduos de substâncias organofosforadas.

Apenas 7 dos 14 compostos encontrados nas amostras apresentaram contaminação acima dos valores de LQ do método, com valores de quantificação médios de: 0,0221 ug mL⁻¹ para delta- hexaclorociclohexano, 0,0212 ug mL⁻¹ para lindano, 0,0809 ug mL⁻¹ para endossulfan sulfato, e 0,0037 ug mL⁻¹ para p,p'-DDT, e por esse motivo, somente essas puderam ser quantificadas. Todas as amostras que continham resíduos do composto alfa-endossulfan apresentaram níveis abaixo do LQ, impossibilitando sua quantificação.

Os níveis de agrotóxicos encontrados nas amostras de leite estão apresentados na (TABELA 17) com valores expressos em µg mL⁻¹.

TABELA 17 - NÍVEIS DOS AGROTÓXICOS QUANTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE LEITE DO PARANÁ

COMPOSTOS	%	LD (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)	MÉDIA (µg mL ⁻¹)	VALORES MÁXIMOS	VALORES MÍNIMOS
δ-HCH	17%	0,0006	0,0060	0,022152	0,03565	0,00958
Lindano	12%	0,0006	0,0060	0,021271	0,03003	0,01251
α-endossulfan	53%	0,0105	0,1054	-	-	-
Endossulfan Sulfato	6%	0,0008	0,0088	0,080947	0,083278	0,07689
p,p'-DDT	12%	0,0003	0,0037	0,003724	0,003634	0,003814

5.3 FATORES DE ASSOCIAÇÃO

5.3.1 Culturas predominantes no estado do Paraná

Segundo o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) a região de Apucarana é destacada pelas suas densas plantações de Café, as regiões de Guarapuava e Ponta Grossa se destacam pela importante produção de soja e a região de Toledo pelas suas vastas lavouras de algodão e soja.

Um dos grandes problemas das plantações de café é o ataque aos frutos de café pela praga conhecida como “broca-do-café” (*Hypothenemus hampei*). Tal inseto limita a produção cafeeira causando dano econômico pela perda da qualidade e quantidade dos frutos. Segundo o MAPA (2003) o único inseticida conhecido com eficiência reconhecida contra a broca-do-café praga é o agrotóxico organoclorado

Endossulfan (Thiodan®), substância de uso proibido no estado do Paraná desde 2003. Como as lavouras de café são predominantes na região Apucarana, justifica a detecção do composto Endossulfan em amostra dessa região. (BRASIL/MAPA, 2003).

O composto Endossulfan foi responsável pela contaminação de praticamente a totalidade das lavouras de soja produzidas no estado do Paraná, sendo aplicado com a finalidade de combater a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), inseto que causa dano econômico pela diminuição na produção da cultura através de desfolha da planta. Partindo do princípio da grande utilização do composto Endossulfan nas lavouras de soja tanto em Guarapuava, maior produtora de soja do estado, quanto em Ponta Grossa e Toledo, justificamos a detecção do Endossulfan em algumas das amostras dessas três regiões.

O agrotóxico organoclorado DDT, como citado na revisão deste trabalho, foi amplamente utilizado após a Segunda Guerra Mundial, e desde o início da década de 70 ocorria uma média de aproximadamente 6 aplicações desse inseticida por ciclo de cultura de soja no estado do Paraná. Tal composto era a principal opção de escolha na época pelo seu amplo espectro, atingindo as diversas pragas que acometem a produção de soja no estado. (EMBRAPA, 2010). A região de Ponta Grossa é citada pelo IAPAR como uma importante região de cultura de soja no Paraná, e por esse motivo atribuímos a detecção do composto organoclorado DDT das amostras de Ponta Grossa ao grande uso desse composto nas lavouras de soja ao longo desses anos, associado ao longo tempo de permanência desta substância no meio ambiente.

Já os resíduos do composto organoclorados HCH (isômero δ -HCH e lindano) detectados nas amostras da região de Toledo, atribuímos às extensas culturas de algodão que a região já apresentou, já que o composto HCH entrou no Brasil sendo o principal produto para combate de pragas do algodão, e foi largamente utilizado pelos agricultores nas lavouras durante longos anos. Assim como ao composto DDT, associamos também o os resíduos encontrados da substância HCH com o longo tempo de biodisponibilidade no meio ambiente.

5.3.2 Análise do tempo de meia vida

Analizamos o tempo de meia vida de cada agrotóxico encontrado nessa pesquisa (TABELA 18) e verificamos que há agrotóxicos presentes no ambiente por mais tempo que o devido, partindo do princípio da época do qual esses agrotóxicos foram proibidos no Brasil.

Todos os compostos organoclorados que foram detectados nessa pesquisa foram constatados seu uso após seu período de proibição, lembrando que os compostos DDT e HCH foram proibidos desde 1985, o composto Endossulfan foi totalmente proibido no ano 2010, com o uso permitido até 2013, todos sendo detectados muito além do seu período de meia vida.

TABELA 18 – TEMPO DE MEIA VIDA DE CADA AGROTÓXICO ENCONTRADO NESSA PESQUISA.

AGROTÓXICOS	TEMPO DE MEIA VIDA ESTIMADO
δ-HCH	De 3 a 4 anos
Lindano	De 3 meses a 3 anos.
α-endossulfan	9 meses a 6 anos
Endossulfan Sulfato	9 meses a 6 anos
p,p'-DDT	Cerca de 5 anos

FONTES: Adaptado de ATSDR, 2005; WHO, 1991; US EPA, 2002; ATSDR, 2002.

5.3.3 Outros Fatores

Verificamos que a metabolização do p,p'-DDT se dá num período de 12 meses, sendo transformado no p,p'-DDE. (MATUO et al., 1992). O p,p'-DDE não foi encontrado e sim o p,p'-DDT, na região de Ponta Grossa, sugerindo uma exposição mais recente a esse agrotóxico, o qual continua sendo utilizado indevidamente.

Quando observamos a região de Toledo, verificamos que é a região aonde mais apresentou resíduos dos agrotóxicos pesquisados nesse trabalho, atribuímos tal contaminação ao fator de que a região de Toledo ser uma região de fronteira com o país vizinho, o Paraguai. De acordo com o SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, o contrabando e a falsificação de agrotóxicos vem se expandindo ano a ano, sendo o Paraná um dos estados que mais pratica esse ato ilegal, o que justifica o aparecimento desses agrotóxicos atualmente.

5.4 RESULTADOS DE PESQUISAS DE CONTAMINAÇÃO EM LEITE.

O extenso período de uso indiscriminado, a alta biodisponibilidade no meio ambiente, e as características toxicológicas dos agrotóxicos organoclorados são fatores que possibilitaram a bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, e motivo pelo qual são encontrados em diversas análises em alimentos até os dias de hoje.

Estudos realizados no Brasil evidenciam a contaminação tanto em leite bovino quanto em leite humano em diferentes regiões do país. Caleffi (2005) realizou um estudo em regiões do Rio Grande do Sul analisando, dentre outros tecidos, 19 amostras de leite materno humano para determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados. As amostras foram separadas conforme a área aonde a doadora residia: urbano (n=10) e rural (n=9). Todas as amostras de leite provindas de residentes de área urbana deram negativas para os agrotóxicos pesquisados, o que corrobora com os resultados negativos da região de Curitiba do nosso estudo. E das 9 amostras de área rural, 7 deram positivas para os seguintes compostos: DDE, Heptacloro, Oxiclordane e Dieldrin.

Palma et al. (2014) realizou um estudo com 62 amostras de leite humano coletadas da Cidade de Lucas do Rio Verde-MT, para a detecção de agrotóxicos organoclorados e piretróides. Em todas as amostras foram detectados o composto organoclorado p,p'-DDE, assim como também foram detectados os compostos organoclorados p,p'-DDT, β -endossulfan e aldrin em menores frequências.

Na região do Rio de Janeiro, Mesquita (2001) analisou 50 amostras de leite materno. Todas as amostras evidenciaram contaminação por agrotóxicos organoclorados, prevalência do p,p' DDE em 100% das amostras, seguido do p,p'-DDT em 90% das amostras e do β -HCH em 84% das amostras., os compostos p,p'-DDD, α -endossulfan, γ -clordano, α -HCH, lindano, aldrin, dieldrin, endrin, β -endossulfan, metoxicloro e mirex também foram detectados em menor frequência.

Agrotóxicos organoclorados também foram detectados por Stuetz et al. (2001), através da análise de 25 amostras de leite materno de mães residentes no norte de Chiang Mai, Tailândia, onde o composto p,p'-DDT foi detectado em todas as amostras, seguido por heptacloro-epóxido, hexaclorociclobenzeno, e isômero gama de HCH.

Bulut et al. (2011) realizaram pesquisa de organoclorados em amostras de leite de vaca, búfala e ovelha, provindos da região de Afyonkarahisar, na Turquia. Em todas as amostras foram encontrados o composto beta-HCH, 21 compostos organoclorados foram detectados nas amostras, desses, 16 compostos em leite de ovelha, 14 resíduos em leite de búfala e 11 resíduos em leite de vaca.

Estudos em outros países também têm relatado contaminações em leite. Nag; Raikwar (2008) analisaram 325 amostras de leite bovino da região de Bundelkhand – Índia, para detecção de resíduos de agrotóxicos organoclorados. Dentre elas, 206 (63,38%) deram resultado positivo para resíduos de organoclorados. Todos os 4 principais isômeros do HCH foram detectados, assim como o alfa, beta endossulfan, endossulfan sulfato, DDT, DDE e DDD.

Estes estudos analisados, tanto no Brasil quanto em outros países, são recentes e demonstram evidente contaminação residual por organoclorados em leite, indicando um problema de contaminação ambiental e saúde pública em diversas partes do mundo.

6 CONCLUSÕES

A metodologia de extração QuEChERS empregada demonstrou ser eficiente apresentando boa seletividade, com pureza nos picos cromatográficos nos tempos de retenção (RT) igual ou próximo ao RT dos analitos, alta precisão, com valores de DPR entre 0,79% a 4,59%, e valores de exatidão adequados, com porcentagens de recuperação satisfatórias na faixa entre 60 a 90% para 13 compostos avaliados.

A metodologia de análise cromatográfica CG/MS demonstrou adequado comportamento linear, com coeficientes de correlação (r) adequados em cada composto analisado, boa sensibilidade, com valores elevados de coeficientes angulares das retas para cada analito analisado, apresentando valores de LD e LQ baixos, possibilitando a detecção e quantificação de pequenas quantidades de analito nas amostras, sendo considerada uma metodologia adequada de análise.

A eficiência da metodologia, tanto na extração quanto na análise cromatográfica possibilita o emprego dessa metodologia em programas de monitoramento de agrotóxicos organoclorados e organofosforados em leite. A metodologia QuEChERS possibilita a implementação desta metodologia em laboratórios oficiais a fim de reduzir custos e principalmente tempo.

Das 75 amostras de leite materno humano proveniente das nutrizes de 5 cidades do estado do Paraná, 11 amostras apresentaram evidente contaminação residual, sendo identificados 5 compostos organoclorados, δ -HCH, lindano, α -endossulfan, endossulfan sulfato, e p,p'-DDT.

O isômero α do composto endossulfan foi encontrado em 6 amostras o que sugere uma exposição atual nas regiões de Apucarana, Guarapuava e Toledo. Assim como o resíduo de p,p'-DDT encontrado na região de Ponta Grossa, sugerindo uma exposição mais recente a esses agrotóxicos, o que mostra que estas substâncias continuam sendo utilizadas indevidamente.

A região de Toledo têm altos índices de contrabando de agrotóxicos ilegais por ser uma região de fronteira com o Paraguai, fato do qual atribuímos à maioria dos resíduos encontrados nas amostras provindas dessa região.

A região de Curitiba por ser uma região com maior área urbana foi a única que não apresentou contaminações de resíduos de agrotóxicos em suas amostras. Já as demais cidades, com amplo território rural e com o uso intensivo de agrotóxicos nas lavouras, foi determinante para a contribuição de fatores para a contaminação do leite humano, indicando que populações vizinhas a áreas de plantio estão mais expostas aos efeitos desses compostos organoclorados.

Os resultados indicam um problema de contaminação ambiental e um evidente problema de saúde pública, o que demonstra que os anos em que estes compostos foram utilizados de forma racional, ou mesmo irracional, provocaram um efeito bioacumulativo no meio ambiente, fazendo com que a circulação destes compostos entre as diversas cadeias tróficas, tendo o homem como o consumidor final. Os estudos de Toxicologia Ambiental mostram que a presença destes compostos ainda se faz presente no meio ambiente e assim também mostram a persistência dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F.R. Amamentação : um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria**. v.80, n.5, p. 119, 1998.
- ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F. R.; SANDOVAL, M. H. Recomendaciones técnicas para los bancos de leche humana II: control de calidad. **Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría**. v. 61, n.1, p.12-15, 1999.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, 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. **J AOAC Int**. v.86, n.2, p.412-31, 2003.
- ATSDR. **Toxicological profile for endrin**. Atlanta, 1996.
- ATSDR. **Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD**. Atlanta, 2002.
- ATSDR. **Toxicological Profile for Malathion**. Atlanta, 2003.
- ATSDR. **Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta hexachlorocyclohexane**. Atlanta, 2005.
- ATSDR. **Toxicological profile for Heptachlor e Heptachlor Epoxide**. Atlanta, 2007.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Bookman. Porto Alegre. Ed.2, 2002.
- BALALI-MOOD, M.; ABDOLLAHI, M. **Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds**. Springer-Verlag: Londres, 2014.
- BALLOW, M.; CATES, K. L.; ROWE, J. C.; GOETZ, C.; DESBONNET, C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500 g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infections. **Pediatric research**, v. 20, n. 9, p. 899–904, 1986.
- BANDEIRA, D.D.; MUNARETTO, J.S.; RIZZETTI, T.M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. **Quim. Nova**, v. 37, n. 5, p. 900-907, 2014.
- BARRA, R.; COLOMBO, C.; EGUREN J.; JARDIM, W. F.; GAMBOA, G. N.; MENDONZA, G. Persistent organic pollutants (POPs) in eastern and western South American countries. **Rev. Environ. Contam. Toxicol**. v. 185, n.1, 2006.
- BLUMBERG, A. A., Risks and Chemical substances. **Journal of Chemical Education**. n.71, p.912- 918, 1994.
- BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**. v. 34, n. 1, p.10-15, 2012.

BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e Venenos: Agrotóxicos No Brasil e no Terceiro Mundo**. Petrópolis: Vozes/OXFAM/FASE, p.236, 1986.

BULUT, S.; AKKAYA, L.; GÖK, V.; KONUK, M. Organochlorine pesticide (OCP) residues in cow's, buffalo's, and sheep's milk from Afyonkarahisar region, Turkey. **Environ Monit Assess**. v.181, n.1-4, p.555-62, 2011.

BRASIL. - Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Legislação Federal do Brasil**, Brasília, 1989.

BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Legislação Federal do Brasil**, Brasília, 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Departamento Técnico- Normativo. Divisão de Meio Ambiente e Ecologia Humana. Organização Pan-Americana de Saúde: Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, Brasília, 1996a.

BRASIL. Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelece critérios a serem utilizados 93 junto ao IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília, 1996b.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano. Brasília, 2001.

BRASIL/MS. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Exposição humana a resíduos organoclorados na Cidade dos Meninos, Município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro: relatório de trabalho da Comissão Técnica Assessora ao Ministério da Saúde, instituída pela Portaria /GM Nº 896, de 9 de maio de 2002. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. – 2 ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente. Instituto Nacional de Câncer - Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, ed. 2, 2010.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria nº 329/85 – Ministério da Agricultura, de 02 de setembro de 1985 - Diário Oficial da União, Brasília, 1985.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº6, de 14 de outubro de 1999. Dispõe sobre o uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso

IV do Regulamento da ANVS aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o § 1º do Art. 95 do Regimento Interno aprovado pela Resolução nº 1, de 26 de abril de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 1999.

BRASIL/ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília, 2008.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília, 2012.

BRASIL/MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Inseticidas Químicos e Biológico Testados para o Controle da Broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari, 1867) em Rondônia. Comunicado Técnico - Porto Velho, RO: MAPA, 2003.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2011.

BOUVIER, G.; SETA, N.; VIGOUROUX-VILLARD, A.; BILANCHARD, O.; MOMAS, I. Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. **J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.** v.8, n.6, p. 485–512, 2005.

BOOBIS, A.R.; OSSENDORP, B.C.; BANASIAK, U.; HAMEY, P.Y.; SEBESTIEN, I.; MORETOO, A. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. **Toxicol Lett.** v. 180, n. 2, p.137-150, 2008.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.** v. 13, p. 129-146, 2003.

CALEFFI, G.H. **Resíduos Organoclorados em Sangue, Leite Materno e Tecido Adiposo Humanos em Regiões Definidas do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em ecologia). Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

CAREY, L.; DUNN, C.; GASPARI, R. J. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** v.189, n.2, p.403-410, 2013.

CHAMBERS, J.E.; CARR, R.L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. **Toxicology**. v. 105, n. 2-3, p. 291-304, 1995.

COLLIER, R.J.; MCNAMARA, J.P.; WALLACE, C.R.; DEHOFF, M.H. Review of endocrine regulation of metabolism during lactation. **J. Animal Sci.** v.59, n.2, p.498-510, 1984.

D'AMATO, C., TORRES, J. P. M., MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação ambiental - Uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DAS, S. A review of Dichlorvos toxicity in fish. **Curr World Environ.** v.8, p.1, 2013.

DAUTERMAN, W. C.; VIADO, G. B.; CASIDA, J. E.; O'BRIEN, R. D. Insecticide Residues, Persistence of Dimethoate and Metabolites Following Foliar Application to Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.8, n.2, p.115-119, 1960.

DESHPANDE, L. S.; CARTER, D. S.; PHILLIPS, K. F.; BLAIR, R. E.; DELORENZO, R. J. Development of status epilepticus, sustained calcium elevations and neuronal injury in a rat survival model of lethal paraoxon intoxication. **Neurotoxicology**. Ed. 44, p.17-26, 2014.

DIKSHITH, T. S. S. **Handbook of Chemicals and Safety**. Taylor & Francis Group. India, ed. 1, 2010.

ECOBICHON, D.J. **Toxicology** : The basic science of poisons. Ed. Mary Amdur. Ed.5, 1996.

EMBRAPA. Manejo Integrado de Pragas é debatido em dia de campo. **Sistema de Alerta**, 2010. Visualizado em: http://www.cnpsa.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=216 jan/2018.

ETO, M.; SAKATA, M.; SASAYAMA, T. Biological Activities of p-Ethylphenyl and p-Acetylphenyl Phosphates and their Thiono Analogs. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 36, v.4, p.645-650, 1972.

EXTOXNET. **Pesticide information Profile for Fenthion**. Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California at Davis, 2003.

FACCHINI, F. P. **Aleitação Materno em Recém-nascidos com Internação Prolongada no pós-parto**: Avaliação de um Programa de Estímulo. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.

FAEP. **Reflexo do agronegócio paranaense**. Boletim Informativo. Sistema FAEP. n.1388, p.16-17, 2017.

FEE, D. C.; GARD, D. R.; YANG, C.H. **Phosphorus Compounds**. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2006.

FIOCRUZ. **Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano**. Manual do Participante. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Fernandes Figueira. Rio de Janeiro, 2002.

FRUCHTENGARTEN, L.; SILVA, C. A. M. Environmental chemical hazards and child health. **Jornal de Pediatria**. v. 81, n. 5, p. 207-211, 2005.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **J. Chromatogr.** v. 1153, p. 54-73, 2007.

HOLLINGWORTH, R. M. **Insecticides biochemistry and physiology**. Plenum. New York, p. 431-506, 1976.

INCA. **Posicionamento do instituto nacional de câncer José alencar gomes da silva Acerca dos agrotóxicos**. Ministério da Saúde. 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf> Acesso em fev/2018.

IPARDES. **Base física e política**. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/index.php?pg_conteudo=1&cod_conteudo=25> Acesso em dez/2017.

KLAASSEN, C.D.; ROZMAN, K. **Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons: Absorption, distribution and excretion of toxicants**. McGraw-Hill Professional. New York, 4 ed. p. 50-87, 1991.

KONRADSEN, F; VAN DER HOEK, W.; AMERASINGHE, F.P.; MUTERO, C.; BOELEEE, E. Engineering and malaria control: learning from the past 100 years. **Acta Tropica**, v. 89, p. 99-108, 2004.

LAMBROPOULOU, D. A; ALBANIS, T. A.; Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Anal Bioanal Chem**. v. 389, n. 6, p. 1663-83, 2007.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Ed. Manole, 1997.

LEVIGARD, Y. E.; ROZEMBERG, B. A interpretação dos Profissionais de Saúde acerca do Nervoso no Meio Rural. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 1515-1524, 2004.

LI, Y. F., MACDONALD, R. W. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota. **Science of the Total Environment**. v. 342, p. 87-106, 2005.

LIECHOSCKI, D.A. **Contribuição dos sistemas da qualidade para o controle de riscos à saúde e ao meio ambiente pelo uso de agrotóxicos**. Dissertação (Mestrado em Sistemas Integrados de Gestão), Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2004.

LONNERDAL, B. Breast Milk: A Truly Functional Food. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 509-511, 2000.

MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. **Toxicology**. v. 143, p. 61-75, 2000.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. Ed. Nobel. São Paulo, 7.ed., 1985.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. J.; GARRIDO-FRENICH, A.; FERNÁNDEZ-MORENO, J. L. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v. 20, n. 3, p 365-75, 2005.

MARTINS, J. G.; CHÁVEZ, A. A.; WALISZEWSKI, S. M.; CRUZ, A. C.; FABILA, A. A. G. Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. **Chemosphere**. v. 92, p. 233–246, 2013.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **J. Chromatogr. A**. v. 1040, n. 2, p. 259-72, 2004.

MATUO, Y. K.; LOPES, J. N. C.; CASANOVA, I. C.; MATUO, T.; LOPES, J. L. C. Organochlorine pesticide residues in human milk in the Ribeirão Preto Region. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 22, n. 2, p. 167-75, 1992.

MEERDINK, G. L. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning in large animals. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**, v. 5, n. 2, p. 375-389, 1989.

MELLO, J.L. **Avaliação da contaminação por HCH e DDT, dos leites de vaca e humano, provenientes da cidade dos meninos, Duque de Caxias-RJ**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

MESQUITA, S.A. **Avaliação da contaminação do leite materno por pesticidas organoclorados persistentes em mulheres doadoras do Banco de leite do Instituto Fernandes Figueira, RJ**. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

METCALF, R. L. Insect Control. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, 2002.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. B. **Toxicologia Analítica – Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

NAG, S.K.; RAIKWAR, M.K. Organochlorine Pesticide Residues in Bovine Milk. **Bull Environ Contam Toxicol**. v.80, n.5, 2008.

NAKAGAWA, R.; HIRAKAWA, H.; IIDA, T.; MATSUEDA, T.; NAGAYAMA, J. Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 3, p. 716-724, 1999.

NEWMAN, J. How Breast Milk Protects Newborns. **Scientific American**, v. 1, n. 1, p. 58-61, 1995.

NICKERSON, K. Environmental Contaminants in Breast Milk. **J Midwifery Womens Health**, v. 51, n. 1, p. 26-34, 2006.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Rev Saúde Pública**, v. 32, n. 4, p. 372-383, 1998.

OLIVEIRA, R. M.; BRILHANTE, O. M.; MOREIRA, J. C.; MIRANDA, A. C. Contaminação por hexaclorociclohexanos em área urbana da região Sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, n. 3, 1995.

OLIVEIRA, M. I. C; CAMACHO, L. A. B.; SOUZA, I. E. O. Promoção, proteção e apoio à amamentação na atenção primária à saúde no estado do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1901-1910, 2005.

OPAS/OMS – ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Representação do Brasil. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996.

PALMA, D.C.A; LOURENCETTI, C.; UECKER, M.E.; MELLO, P.R.B.; PIGNATI, W.A.; DORES, E.F.G.C. Simultaneous Determination of Different Classes of Pesticides in Breast Milk by Solid-Phase Dispersion and GC/ECD. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.25, n.8, p.1419-1430, 2014.

PARÁIBA, L. C.; LÚCIA, V.; SALGADO, S.; HOLANDA, A. D. E.; MAIA, N. Insecticide Distribution Model in Human Tissues Viewing Worker's Health Monitoring Programs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 875–881, 2009.

PERES, F. **É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos**. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1999.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, p. 21-41, 2003.

PLIMMER, J. R.; GAMMON, D. W.; RAGSDALE, N. N. **Encyclopedia of Agrochemicals**. John Wiley & Sons. New York, 2003.

PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., DE AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of fluid-phase equilibria..** Prentice – Hall. New Jersey.3 ed, 1999.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v.3, n.1, p. 51-64, 2011.

QUENSEN, J.F.; MUELLER, S.A.; JAIN, M.K.; TIEDJE, J.M. Reductive Dechlorination of DDE to DDMU in Marine Sediment Microcosms. **Science**. v. 280, p. 722-724, 1998.

RICHARDSON, M. L.; GANGOLLI, S. The Dictionary of Substances and their Effects. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 998, 1994.

RITTER, L.; SOLOMON, K. R.; FORGET, J. An Assessment Report on: DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, Polychlorinated Biphenyls, Dioxins and Furans. **The International Programme on Chemical Safety**. p. 43, 1995.

RITTER, L.; SOLOMON, K. R.; FORGET, J.; STEMEROFF, M.; O'LEARY, C. **A Review of Selected Persistent Organic Pollutants**. The International Programme on Chemical Safety (IPCS) within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC), 1992.

SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; COSTA, J.B.N.; CAIXEIRA, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quím. Nova**. v. 30 n.1, 2007.

SANTOS, J. S.; XAVIER, A. A. O.; RIES, E. F.; COSTABEBER, I. H.; EMANUELLI, T. Níveis de organoclorados em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência Rural**. v. 36, n. 2, p. 630-635, 2006.

SANTOS, L. G.; LOURENCETTI, C.; PINTO, A. A.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. F. Validation and application of an analytical method for determining pesticides in the gas phase of ambient air. **Journal of Environmental Science and Health**. Pesticides, Food contaminants, and agricultural wastes. 2011.

SCHMIDT, W. F.; BILBOULIAN, S.; RICE, C. P.; FETTINGER, J. C.; MCCONNELL, L. L.; HAPEMAN, C. J. Thermodynamic, spectroscopic, and computational evidence for the irreversible conversion of beta- to alpha-endosulfan. **J Agric Food Chem.**, v. 49, n. 11, p. 5372–5376, 2001.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações Agudas**. São Paulo: Savier. 4.ed, 1991.

SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M. V. A. MONTEIRO, I. P. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB**. v. 1, n. 4, 2016.

SHAROM, M. S.; MILES, J. R. W.; HARRIS, C. R.; MCEWEN, F. L. Behaviour of 12 insecticides in soil and aqueous suspensions of soil and sediment. **Water Research**. v. 14, n. 8, p. 1095–1100, 1980.

SHIMELIS, O.; YANG, Y.; STENERSON, K.; KANEKO, T.; YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **J Chromatogr A**. v. 1165, n. 1-2, p.18-25, 2007.

SIGMA-ALDRICH. **Catálogo de produtos químicos**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>> Acesso em dez. 2017.

SILVA, V. G. **Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas**. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança), Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SIM, M. R.; MC'NEIL, J. J. Monitoring Chemical exposure using breast milk. A methodological review. **Am. J. Epidem.** n. 136, p. 1- 11, 1992.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, Florianópolis e Porto Alegre. 6. Ed., 2010.

SINDAG. Falsificação e contrabando de agrotóxicos: a sociedade perde a saúde, o país perde o respeito. **V Congresso Brasileiro do Algodão**. Visualizado em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/320.pdf jan/2018.

SKALSKY, H. L.; GUTHRIE, F. E. Binding of insecticides to human serum proteins. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 43, p. 229-35, 1978.

STEVEN, M. A.; PAUL, S. M.; JAMES, L. M.; MARGARET, C.N. The Physiology of Reproduction: Lactation and Hormonal Control. Knobil & Neill Editors. Reven Press, Colorado-U.S.A. 4th, 2014.

STODDART, J. F. The synthesis and reaction of organic compounds. **Comprehensive Organic Chemistry**. 6 ed., 1979.

STUETZ, W.; PRAPAMONTOL, T.; J.G ERHARDT, J.G.; CLASSEN, H.G. Organochlorine pesticide residues in human milk of a Hmong hill tribe living in Northern Thailand. **Science of The Total Environment**. v.273, n.1-3, p.53-60, 2001.

TORRES, J. P. M. **Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais**. Tese (Doutorado em Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

TOY, D. F.; WALSH, E. A. **Phosphorus Chemistry in Everyday Living**. Washington, D. C: Amer Chemical Society, 2 ed., 1987.

TURK, J. **Introduction to environmental studies**. PA: Saunders College Publishers. Philadelphia, 3.ed. 1989.

US EPA. Endosulfan RED Facts. **US EPA, Office of Prevention, Pesticides**. Visualizado em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/endosulfan_fs.htm , jan,2018.

VETORAZZI, G.; RADAELLI-BENVENUTTI, B.M. **International regulatory aspects for pesticides chemicals**. Boca Raton: CRC Press. v.2, 1982.

XAVIER, F.G.; RIGHI, D.A.; SPINOSA, H.S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Cienc. Rural**. v.37, n.4, 2007.

WARE, G.W.; WHITACRE, D.M. **The Pesticide Book: An introduction to insecticides**. Meister Media Worldwide. Willoughby, OH. 6th ed., 2004.

WELDON, R. H.; BARR, B.; TRUJILLO, C.; BRADMAN, A.; HOLLAND, N.; ESKENAZI, B. A pilot study of pesticides and PCBs in the breast milk of women residing in urban and agricultural communities of California, **J. Environ. Monit.**, v. 13, p. 3136-3144, 2011.

WHO. **Endrin**. Geneva, p. 241, 1992.

WHO. **Lindane** . Geneva. 1991.

WHO / UNEP. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. **World Health Organization/ United Nations Environment Program**. Geneva, 1990.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chem**. v. 125, p. 803–812, 2011.


YANG, R. S. H. **Toxicology of Chemical Mixtures**. Case Studies, Mechanisms, and Novel Approaches. Ed. Raymond Yang. Fort Collins, Colorado - U.S.A, 1994.

YOGUI, G. T. **Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica)**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

ANEXO 01 – CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL EVANGÉLICO DE CURITIBA.**CARTA DE ACEITE**

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar amostras de leite materno destinados a descarte desta Instituição, para o desenvolvimento de atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, intitulado: **Determinação de resíduos de agrotóxicos Organoclorados e Organofosforados em Leite Materno empregando Método QuEChERS e CG-MS/MS**, sob a responsabilidade do Pesquisador: Prof. Dr. Ricardo Wagner, matrícula UFPR 202035, CPF: 945.338.659-68 RG: 5.144.787-5 e aluna colaboradora Jennifer Teixeira dos Santos, RG: 9.369.406-6 e CPF: 085.943.149-57, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, no período previsto no referido Projeto.

Curitiba, 11 de Julho de 2016.


CARIMBO e ASSINATURA do responsável pelo setor

CPF: 030.209.159-96

ENDEREÇO COMPLETO: Al. Augusto Stelfeld, 1908

CONTATO: 41 3240-5117

ANEXO 02 - CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL DA CRIANÇA PREFEITO JOÃO VARGAS DE OLIVEIRA DE PONTA GROSSA.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PONTA GROSSA
Secretaria Municipal de Saúde
Hospital da Criança Prefeito João Vargas de Oliveira
Banco de Leite Humano

Rua Dr. Joaquim de Paula Xavier, 500 – Tel: (42) 3026-9403 - CEP 84050-000 - Ponta Grossa - Pr

CARTA DE ACEITE

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar amostras de leite materno destinados a descarte desta Instituição, para o desenvolvimento de atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, intitulado: **Determinação de resíduos de agrotóxicos Organoclorados e Organofosforados em Leite Materno empregando Método QuEChERS e CG-MS/MS**, sob a responsabilidade do Pesquisador: Prof. Dr. Ricardo Wagner, matrícula UFPR 202035, CPF: 945.338.659-68 RG: 5.144.787-5 e aluna colaboradora Jennifer Teixeira dos Santos, CPF: 085.943.149-57 e RG: 9369406-6, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pelo período de execução previsto no referido Projeto.

Ponta Grossa, 12 de julho de 2016.

Ana De Bastiani
Enfermeira
COREN 090029


CARIMBO e ASSINATURA do responsável pelo setor

CPF: 68532652972

ENDEREÇO COMPLETO: Rua Atílio Tararan, 307, Bairro Contorno, CEP: 84060476.
Ponta Grossa - Pr

CONTATO: Email: anablhpg@hotmail.com, 42- 91074177

ANEXO 03 – CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL DA PROVIDÊNCIA DE APUCARANA.

 **HOSPITAL DA PROVIDÊNCIA**
APUCARANA

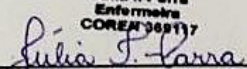
Hospital Nossa Senhora das Graças - Utilidade Pública Federal pelo Decreto n.º 49.217/60
Registro no CNSS sob n.º 035.260/52 - Insc. Isento - CNPJ 70.562.198/0005-92
Rua Rio Branco, 518 – CEP. 86800-120 – Centro – Apucarana - Paraná - Tel/Fax.: (43) 3420-1400
e-mail: secretaria@hospitaldaprovidencia.org.br

CARTA DE ACEITE

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar amostras de leite materno destinados a descarte desta Instituição, para o desenvolvimento de atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, intitulado: **Determinação de resíduos de agrotóxicos Organoclorados e Organofosforados em Leite Materno empregando Método QuEChERS e CG-MS/MS**, sob a responsabilidade do Pesquisador: Prof. Dr. Ricardo Wagner, matrícula UFPR 202035, CPF: 945.338.659-68 RG: 5.144.787-5 e aluna colaboradora Jennifer Teixeira dos Santos, RG: 9.369.406-6 e CPF: 085.943.149-57, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, no período previsto no referido Projeto.

Apucarana, 13 de setembro de 2016.

Julia I. Parra
Enfermeira
COREN 38817



CARIMBO e ASSINATURA do responsável pelo setor

CPF: 078.345.569-08

ENDEREÇO COMPLETO: Rua Rio Branco, nº 518.

CONTATO: (43) 3420-1479

**ANEXO 04 – CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL SÃO VICENTE DE PAULO,
DA CIDADE DE GUARAPUAVA.****CARTA DE ACEITE**

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar o Setor de Análise de Resíduos desta Instituição, para o desenvolvimento de atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, intitulado: **Determinação de resíduos de agrotóxicos Organoclorados e Organofosforados em Leite Materno empregando Método QuEChERS e CG-MS/MS**, sob a responsabilidade do Pesquisador: Prof. Dr. Ricardo Wagner, matrícula UFPR 202035, CPF: 945.338.659-68 RG: 5.144.787-5 e aluna colaboradora Jennifer Teixeira dos Santos, CPF: 085.943.149-57 e RG: 9369406-6, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pelo período de execução previsto no referido Projeto.

Guarapuava, 12 de Julho de 2016.


Franciele Boaria
Nutricionista
CRN8-8365

CARIMBO e ASSINATURA do responsável pelo setor

CPF: 057.639.099-36

ENDEREÇO COMPLETO: Rua Marechal Floriano Peixoto, 1059 -
Prédio - Centro - Guarapuava / PR
85 030-250

ANEXO 05 – CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL BOM JESUS - BANCO DE LEITE DR. JORGE NISIIDE DE TOLEDO.



CARTA DE ACEITE

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar amostras de leite materno destinados a descarte desta Instituição, para o desenvolvimento de atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, intitulado: **Determinação de resíduos de agrotóxicos Organoclorados e Organofosforados em Leite Materno empregando Método QuEChERS e CG-MS**, sob a responsabilidade do Pesquisador: Prof. Dr. Ricardo Wagner, matrícula UFPR 202035, CPF: 945.338.659-68 RG: 5.144.787-5 e aluna colaboradora Jennifer Teixeira dos Santos, RG: 9.369.406-6 e CPF: 085.943.149-57, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, no período previsto no referido Projeto.

Toledo, 12 de julho de 2016.

Kemely Bens
Nutricionista
CRN8 - 5410

CARIMBO e ASSINATURA do responsável pelo setor

CPF: 055 760 819 86.

ENDEREÇO COMPLETO: *Bom Jesus Rio Branco 1607, Centro*

CONTATO: *45 2103 2000*

ANEXO 06 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/SD DA UFPR

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS EM LEITE MATERNO EMPREGANDO MÉTODO QUECHERS E CG- MS/MS

Pesquisador: Ricardo Wagner

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58516516.4.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.705.232

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 31 de Agosto de 2016

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.080-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br