

Thaiz Batista Azevedo Rangel

Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa
de monitoramento de resíduos de agrotóxicos
em leite longa vida

PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2006

Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa de
monitoramento de resíduos de agrotóxicos
em leite longa vida

Thaiz Batista Azevedo Rangel

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga
Dr. Thomas Manfred Krauss

Rio de Janeiro

2006

Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa de
monitoramento de resíduos de agrotóxicos
em leite longa vida

Thaiz Batista Azevedo Rangel

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. _____
Thomas Manfred Krauss

Prof^a. Dr^a. _____
Mirian Ribeiro Leite Moura

Prof^a. Dr^a. _____
Silvana do Couto Jacob

Orientador: _____
Prof^a. Dr^a Ana Maria Cheble Bahia Braga

Orientador: _____
Prof. Dr. Thomas Manfred Krauss

Rio de Janeiro
2006

Rangel, Thaiz Batista Azevedo

Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite longa vida./ Thaiz Batista Azevedo Rangel. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2006.

xvii, 81p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós – Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2003. Orientadores: Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga e Dr. Thomas Manfred Krauss.

1. Agrotóxicos. 2. Leite de vaca. 3. Validação. 4. Vigilância de alimentos. 5. Segurança alimentar. 6. Análise de resíduos.

I. Título.

Às cinco pessoas mais importantes da minha vida
Papai, Mamãe, Tiça, Luciana e Dezinho,
sem as quais não teria tido forças para superar todas as
dificuldades encontradas nessa etapa da minha vida.

Vocês cinco são meus amores, meu tudo...

A duas pessoas especialíssimas, Letícia e Helena,
sem as quais os obstáculos encontrados jamais
seriam vencidos com tanto êxito...

Agradecimentos

Aos meus pais, Helder e Lucília, por todo amor, exemplo de vida e confiança em mim depositada;

Às minhas irmãs, Leticia e Luciana, simplesmente pelo fato de existirem em minha vida;

Ao afilhado mais querido e amado do mundo, Helder Neto, alegria da minha vida;

Ao Paolo, pelo companheiro e amigo maravilhoso que foi durante todos os anos de nossa convivência;

Aos meus cunhados, Ian e Nicolau;

À minha eterna amiga Penha, que de onde quer que esteja tenho a certeza de que estará sempre ao meu lado;

Ao meu orientador, Thomas Manfred Krauss pelas horas de dedicação, aprendizado, paciência, e amizade;

À minha orientadora Ana Maria Cheble Bahia Braga, pela orientação e credibilidade;

À Mirian, pelo exemplo de profissionalismo, alegria em viver e AMIZADE;

Ao meu amigo Jeferson, pela amizade e momentos de descontração divertidíssimos;

Ao pessoal do laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS, em especial à Helena, Lúcia, Adélia e Adherlene por toda a ajuda, incentivo e momentos de boas risadas perante as dificuldades;

A Adherlene por toda a amizade demonstrada nos momentos difíceis;

Ao pessoal do laboratório de produtos naturais de Farmanguinhos, em especial ao Allan Heringer;

Aos meus amigos Bruno e Ilana, pela presença, carinho e amizade, numa época tão conturbada da minha vida;

À Marta, pela ajuda com as referências bibliográficas e por todo o carinho;

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nesse momento da minha vida.

Resumo

A presença de agrotóxicos, especialmente dos organoclorados (OCs), em alimentos gordurosos como o leite, deve-se à lipofilicidade e ao elevado poder residual. São substâncias persistentes que podem ser encontradas no meio ambiente e nos alimentos em concentrações variáveis colocando em risco a saúde da população. Em consequência, seu uso e produção foram proibidos há décadas. O presente estudo propõe uma metodologia para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos OCs em leite longa vida (UHT/UAT) visando o controle da exposição da população geral a estes contaminantes através da alimentação.

Desenvolveu-se um método analítico para a identificação e quantificação de OCs no leite, o qual foi validado de acordo com os parâmetros estatísticos para a validação de métodos de ensaios químicos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pelo *Codex Alimentarius*. Foram estudadas 25 substâncias constituídas por 23 OCs e 2 organofosforados (OFs) (clorpirifós metil e clorpirifós etil). Todos os analitos apresentaram faixa de trabalho linear e coeficientes de correlação linear (r) entre 0,9948 e 0,9999. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) se encontraram entre as faixas de 0,0002 - 0,0007mg/kg e 0,001 - 0,002mg/kg, respectivamente. As taxas de recuperação variaram entre 77 e 115% e os coeficientes de variação (CV%), entre 3,5 e 20,7%.

Observou-se que, das 20 amostras de leite longa vida analisadas, 10% apresentaram resíduos de *p,p'* DDE (0,009 - 0,015mg/kg), 50% apresentaram resíduos de metoxicloro (0,001 - 0,018mg/kg) e 75% apresentaram resíduos de clorpirifós etil (0,182 - 2,846mg/kg). Vale atentar que os OCs, como o *p,p'* DDE e o metoxicloro foram proibidos há décadas e as monografias dessas substâncias que estabelecem os limites máximos de resíduos permitidos (LMRs) em alimentos, no país, foram canceladas. A ANVISA estabelece LMR não intencional de 0,01mg/kg para o clorpirifós etil na gordura do leite.

Os dados do presente estudo indicam, portanto, a necessidade da implantação de um programa de monitoramento de OCs e OFs em leite longa vida, visando a minimização da exposição da população a estas substâncias. O método analítico aplicado se mostrou eficiente e confiável.

Abstract

The presence of pesticide in fatty food, especially the organochlorines (OCs), is due to their lipophilic and high residual potential characteristics. They are persistent and can be detected in the environment and in food in variable concentrations posing a threat to human's health. Consequently, their use and production were forbidden many decades ago. The present study proposes a methodology for monitoring OC pesticides residues in UHT milk aiming at controlling human exposure to these contaminants via food consumption.

An analytical method was developed with the objective of the identification and quantification of OCs in milk. It was validated according to statistical parameters for the validation of chemical assays established by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA), the National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO), and the *Codex Alimentarius*. The analysis included 25 substances, constituted of 23 OCs and 2 organophosphorus (OFs) (chlorpyrifos methyl e chlorpyrifos ethyl). All studied analytes presented linear working range and correlation coefficients (r) between 0,9948 and 0,9999. The detection (LD) and quantification (LQ) limits varied from 0,0002 to 0,0007mg/kg and 0,001 to 0,002mg/kg, respectively. The recovery rates varied between 77 e 115%, and the variation coefficients (CV%), between 3,5 e 20,7%.

It was observed that, among the 20 analysed Ultra-High-Temperature milk samples, 10% presented *p,p'* DDE residues (0,009 - 0,015mg/kg), 50% had methoxychlor (0,001 - 0,018mg/kg) residues, and 75% presented chlorpyrifos ethyl (0,182 - 2,846mg/kg) residues. It is relevant to point out that OCs, as *p,p'* DDE and methoxychlor were prohibited, in Brazil, many decades ago and the monographs that establish the Maximum Residue Levels (MRLs) in food, were cancelled. Related to chlorpyrifos ethyl residues, ANVISA establishes a non-intentional MRL of 0,01mg/kg in milk fat.

Hence, the present data indicate the urge for the implantation of a monitoring program for OCs and OFs in UHT milk, in order to minimize the population exposure. The applied analytical method has shown to be efficient and reliable.

Siglas e Abreviaturas

- ABLV – Associação Brasileira de Leite Longa Vida
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATPase - Adenosina-trifosfatase
- Ca – Cálcio
- Ca²⁺ - Íon cálcio
- CESTEH – Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
- CG – Cromatografia Gasosa
- Cl⁻ - Íon Cloreto
- Cl – Cloro
- Co – Cobalto
- Cr – Cromo
- Cu – Cobre
- CPG – Cromatografia por Permeação em Gel
- CV – Coeficiente de Variação
- D. I. – Diâmetro Interno.
- DB5 – Coluna capilar de sílica fundida 5% fenil metil siloxano
- DCE – Detector por Captura de Elétrons
- DDD – Diclorodifenildicloroetano
- DDE – Diclodifenildicloroetano
- DDT – Diclorodifeniltricloroetano
- DPR – Desvio Padrão Relativo
- DSM – Detector Seletivo de Massas
- ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública
- F – Flúor
- FAO – Food and Agriculture Organization (Organização da Agricultura e dos Alimentos)
- Fe – Ferro
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FQPA – Food Quality Protection Act – Ato de Proteção da Qualidade Alimentar
- GABA – Ácido Gama-Aminobutírico
- GABA_A – Receptores Gabaérgicos (receptores ionotrópicos do GABA)
- HCB – Hexaclorobenzeno

HCH – Hexaclorociclohexano

I – Iodo

IARC - International Agency for Research on Câncer (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K – Potássio

K⁺ - Íon Potássio

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LMR – Limite Máximo de Resíduo

log k_{ow} – coeficiente de partição octanol / água

Mg – Magnésio

Mg²⁺ - Íon Magnésio

Mn – Manganês

μ DCE – Micro Detector por Captura de Elétrons

Na – Sódio

Na⁺ - Íon Sódio

OCs – Agrotóxicos Organoclorados

OFs – Agrotóxicos Organofosforados

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Fósforo

PAMVet – Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PDP - Pesticide Data Program (Programa de Avaliação de Agrotóxicos)

PIC – Prior Informed Consent (Consentimento Prévio Informado)

POP – Procedimento Operacional Padrão

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

r – Coeficiente de correlação linear

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNS – Sistema Nervoso Sensorial

UAT – Ultra Alta Temperatura

UHT – Ultra High Temperature

USDA – United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

USEPA – Environmental Protection Agency of the United States – Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos

Zn – Zinco

Lista de Tabelas

	Página
<u>Tabela 1</u> : Composição nutricional do leite integral	5
<u>Tabela 2</u> : Características dos Agrotóxicos Organoclorados	7
<u>Tabela 3</u> : Propriedades físico – químicas dos agrotóxicos organoclorados	8
<u>Tabela 4</u> : Classificação dos agrotóxicos organoclorados estudados quanto ao potencial carcinogênico segundo a IARC	12
<u>Tabela 5</u> : Sinais e sintomas das intoxicações agudas e crônicas por OCs	13
<u>Tabela 6</u> : Valores de G tabelado para o número de replicatas correspondentes	35
<u>Tabela 7</u> : Valores de Cochran referentes ao número de replicatas (n) e comparações (k)	39
<u>Tabela 8</u> : Análise de variância na regressão para a confirmação da regressão linear das substâncias avaliadas.	46
<u>Tabela 9</u> : Limites de detecção das 25 substâncias analisadas em leite longa vida	49
<u>Tabela 10</u> : Limites de quantificação determinados para as 25 substâncias analisadas em leite longa vida	50
<u>Tabela 11</u> : Coeficiente de variação (%) dos analitos determinados em leite longa vida	52

	Página
<u>Tabela 12</u> : Critérios de aceitação da recuperação de método analítico	53
<u>Tabela 13</u> : Níveis de Organoclorados e Organofosforados em amostras de leite longa vida, 2005.	56
<u>Tabela 14</u> : Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras de leite de vaca analisadas em diferentes países	59

Lista de figuras

	Página
<u>Figura 1</u> : Mercado total de leite fluido no Rio de Janeiro nos anos de 1990 e 2004.	6
<u>Figura 2</u> : Esquema do procedimento analítico para a determinação de OCs em leite.	25
<u>Figura 3</u> : Representação cromatográfica dos testes realizados com a mistura de padrões dos OCs e OFs para a determinação da faixa de trabalho para a cromatografia por permeação em gel. A. Fração 120-130ml B. Fração 130-140ml. C. Fração 220-230ml. D. Fração 230-240ml.	27
<u>Figura 4</u> : Cromatograma do branco do leite utilizado para a validação do método analítico proposto pelo presente estudo	30
<u>Figura 5</u> : Cromatograma da solução de mistura dos padrões das substâncias de interesse de concentração aproximadamente 0,02 µg/ml	31
<u>Figura 6</u> : Representação gráfica do teste de Grubbs	36
<u>Figura 7</u> : Representação gráfica dos valores de $G_{calculado}$ para a avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos das 25 substâncias de interesse	40
<u>Figura 8</u> : Representação das curvas analíticas das substâncias de interesse	42
<u>Figura 9</u> : Representação gráfica da avaliação das recuperações do branco do leite fortificado com as substâncias estudadas nas concentrações 1 (0,01mg/kg;), 3 (0,04 mg/kg) e 5 (0,15 mg/kg).	54

Sumário

	Página
Resumo	vii
Abstract	viii
Siglas e Abreviações	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiv
I. Introdução	1
II. Aspectos Gerais	4
II.1. O Leite e seu Valor Nutritivo	4
II.2. Características dos Agrotóxicos da Classe dos Organoclorados (OCs)	6
II.3. Propriedades Toxicológicas e Farmacológicas dos Agrotóxicos da Classe dos Organoclorados	9
II.3.1. Aspectos Toxicológicos dos OCs	9
II.3.2. Exposição Infantil aos OCs	13
II.4. A importância da Legislação – Aspectos Nacionais e Internacionais	14

	Página
III. Objetivos	18
III.1. Objetivo Geral	18
III.2. Objetivos Específicos	18
IV. Materiais e Método	19
IV.1. Seleção das amostras	19
IV.2. Lavagem de material	19
IV.3. Materiais	20
IV.3.1. Vidrarias e outros materiais utilizados nas análises	20
IV.3.2. Reagentes:	20
IV.3.3. Preparo das soluções de padrões	21
IV.3.3.1. Soluções estoque:	21
IV.3.3.2. Soluções intermediárias:	21
IV.3.4. Equipamentos e Acessórios	22
IV.4. Método Analítico	22
IV.5. Condições Cromatográficas	23
IV.5.1. Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons com fonte radioativa de Ni ⁶³ (CG/μDCE)	23
IV.5.2. Cromatógrafo a gás com detector seletivo de massas (CG/DSM)	24

	Página
V Resultados e Discussão	25
V.1. Estudo do método analítico	25
V.2. Validação do método analítico	32
V.2.1. Seletividade	33
V.2.2. Faixa de trabalho	33
V.2.3. Linearidade	34
V.2.4. Estudos dos limites de detecção e quantificação	48
V.2.4.1. Limite de detecção	48
V.2.4.2. Limite de quantificação	49
V.2.5. Precisão	51
V.2.5.1. Desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV)	51
V.2.6. Exatidão	52
V.2.6.1. Taxa de recuperação	53
V.3. Análise das amostras de leite longa vida	54
VI Conclusões	66
VII Referências bibliográficas	67
VIII Anexos	77
Anexo A: Estruturas moleculares das substâncias analisadas	77
Anexo B. Valores das variáveis utilizadas para os cálculos da linearidade dos analitos de interesse	79

I. Introdução

A preocupação acerca do uso de agrotóxicos, especialmente da classe dos OCs, nas atividades agrícolas e a conseqüente contaminação de gêneros alimentícios como o leite, impõe o desenvolvimento de ações para o controle e o estabelecimento de níveis de segurança de substâncias tóxicas nesse alimento, foco deste estudo.

Ao longo dos anos, o homem vem desenvolvendo métodos para controlar vertebrados, invertebrados e microorganismos que ameaçam a produção agrícola e, conseqüentemente, o suprimento de alimentos para os diversos níveis tróficos da cadeia alimentar. Acredita-se que a batalha do homem contra essas pragas tenha sido iniciada com a utilização de barro e pó espalhados em seus corpos a fim de repelir insetos sugadores e picadores. A história também não nos conta exatamente quando substâncias químicas começaram a ser utilizadas com finalidades agrotóxicas. Provavelmente, o enxofre queimado tenha sido a primeira substância usada com esse propósito. Registros da Grécia antiga relatam o uso de extratos de folhas de tabaco e vinagre para o combate aos insetos. De fato, consta que no final do século XVIII e início do século XIX o arsenal de substâncias utilizadas para o combate às pragas ainda era restrito, sendo limitado aos compostos a base de arsênico, frações do refino de petróleo, nicotina, piretro, rotenona, enxofre, gás cianídrico, dentre outros. No século XX, a II Guerra Mundial deu início à era das substâncias químicas sintéticas através da introdução de um novo conceito em controle de pragas: o dos agrotóxicos orgânicos sintéticos, dentre os quais se destaca o diclorodifeniltricloroetano (DDT) (MÍDIO, 1974).

Os agrotóxicos são definidos como *produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como*

desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989). Dentre as classificações que recebem, são categorizados com relação à finalidade a que se destinam ou segundo os tipos de praga que combatem. Quanto à finalidade de uso, encontram-se subdivididos para o uso na agricultura (defensivos agrícolas, defensivos químicos e/ou agrotóxicos), na erradicação de vetores transmissores de doenças contagiosas (agentes fitossanitários) e no uso doméstico (agrotóxicos domissanitários). Já quanto aos tipos de pragas que combatem são subdivididos para o uso nos animais invertebrados (insetos - inseticidas, ácaros - acaricidas, nematóides - nematicidas e moluscos - molusquicidas), nos animais vertebrados (roedores - rodenticidas e/ou raticidas, aves - avicidas e peixes - piscicidas), nos vegetais superiores (ervas daninhas - herbicidas, culturas - reguladores de crescimento vegetal, desfolhantes e dessecantes) e nos vegetais inferiores (fungos - fungicidas e algas - algicidas) (MÍDIO & MARTINS, 2000).

Cumprir mencionar que não se dispõe de substâncias agrotóxicas completamente seletivas às pragas. Como consequência, o homem e demais vertebrados são também susceptíveis aos seus efeitos deletérios. Em virtude da seletividade parcial dessas substâncias, contaminam grande parte da superfície terrestre. As principais rotas pelas quais os OCs atingem culturas, solo, água e gêneros alimentícios compreendem a aplicação para o controle de pragas nas plantações; a lixiviação para os lençóis freáticos; o transporte para campos adjacentes; a transferência do solo para as culturas em crescimento; o descarte em córregos, rios e lagos e os efluentes de indústrias de agrotóxicos (MUKERJIE & GOPAL, 1996).

Os agrotóxicos comercialmente disponíveis podem ser classificados quanto à persistência no meio ambiente em: não persistentes ou ligeiramente residuais (agrotóxicos organofosforados - OFs, carbamatos e piretróides); em moderadamente persistentes ou moderadamente residuais (agrotóxicos derivados da uréia) e em persistentes ou altamente residuais (agrotóxicos organoclorados - OCs). A persistência é uma característica intrínseca dessas substâncias sintéticas e está relacionada ao tempo necessário para que 75 a 100% da substância sejam degradadas no local de aplicação. Dessa maneira, para substâncias classificadas como persistentes ou altamente residuais como os OCs, são necessários períodos de 2 a 5 anos para que não sejam mais detectadas, ao passo que aquelas classificadas como não persistentes ou moderadamente persistentes são

indetectáveis no sítio de aplicação após 1 a 12 semanas e 1 a 18 meses, respectivamente (MENZER, 1991).

Além da persistência e da meia vida longa dos OCs, outras características contribuíram para a contaminação do ar, da água e do solo com seus resíduos. Dentre elas, vale apontar seu uso extensivo e indiscriminado, sua estabilidade química e a inexistência de enzimas catalisadoras das reações de quebra e conjugação dos OCs. Como resultado, observou-se a bioacumulação de OCs em mamíferos, como as vacas, quando alimentados por ração/pasto contaminados com estas substâncias. Cumpre citar que a contaminação de mamíferos é facilitada pela elevada lipossolubilidade dos OCs, já que eles são primeiramente armazenadas nos tecidos ricos em gorduras e subseqüentemente translocados e excretados no leite (PANDIT et al., 2002; LACKMANN *et al.*, 2004). Além disso, são substâncias que se biomagnificam ao longo da cadeia alimentar. Dessa forma, a transferência para o feto ocorre durante o período pré-natal, e o leite, devido ao seu alto conteúdo lipídico, configura uma rota de eliminação de OCs de grande relevância (LACKMANN *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar amostras de leite longa vida coletadas e avaliadas na terceira rodada do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) quanto à presença de resíduos de OCs (aldrin; clordano; dicofol; dieldrin; *o,p'* - DDD; *o,p'* - DDE; *o,p'* - DDT; *p,p'* - DDD; *p,p'* - DDE; *p,p'* - DDT; endosulfan sulfato; α - endosulfan; β - endosulfan; endrin; HCB; α - HCH; β - HCH; γ - HCH; δ - HCH; heptacloro; heptacloro exo epóxido; metoxicloro e mirex), para que medidas de controle possam ser implementadas pelos órgãos nacionais competentes.

II. Aspectos Gerais

II.1.O Leite e seu Valor Nutritivo

Estudos nutricionais realizados na primeira metade do século XX mostraram que os produtos de origem animal são de grande relevância para a saúde pelo valor nutritivo para os seres humanos. O leite, em especial, ocupa uma posição única dentre muitos alimentos, principalmente pelo fato de representar o alimento exclusivo para o homem e para todos os animais mamíferos durante a primeira fase de vida. Apresenta, ainda, os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de organismos jovens, tais como concentrações suficientes de proteínas e minerais, como descrito na Tabela 1. Ademais, o leite e seus derivados são historicamente considerados parte importante de uma dieta balanceada também para os adultos. De fato, na cultura ocidental e em muitas outras, o leite é apreciado por conter todos os nutrientes importantes para a nutrição adulta, suprimindo as necessidades nutricionais do organismo de modo tal que dificilmente se atingiria com outra fonte alimentar (MAIJALA, 2000).

Tabela 1: Composição Nutricional do Leite Integral

Principais Componentes	%	Sub-componentes	Sub sub componentes
Água	86,8	-	Vitaminas hidrossolúveis (B e C)
Lactose	4,8	Galactose Glucose	-
Gordura	4,4	Ácidos graxos Glicerídeos Fosfolipídeos Esteróides Vitaminas	Mono, di e tri Lecitina Colesterol A, D, E e K
Proteína	3,3	Caseína (60%) Proteínas de soro de leite (20%) Microproteínas	β - lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulina Enzimas e hormônios
Minerais	Traços	Macro mineral Micro mineral	Ca, P, K, Cl, Na, Mg Zn, Cr, I, F, Fé, Cu, Co, Mn
Outros	Traços	Elementos traços	Hormônios, enzimas, dentre outros.

Fonte: Maijala, 2000.

A partir de 1962, com o advento da técnica da ultrapasteurização (Ultra Alta Temperatura – UAT) que submete o leite a uma temperatura de 130°C a 150°C por um período de 2 a 4 segundos e resfriamento rápido, o leite conhecido como leite longa vida passou a ser o tipo mais consumido pela população brasileira. Trata-se de um produto totalmente isento de bactérias que possui envases assépticos e que pode ser armazenado por um período de até um ano em temperatura ambiente. Associado a isso, existe o fato de que ele é acondicionado em embalagens de grande praticidade (TetraPack). Atualmente, as prateleiras dos estabelecimentos comerciais estão quase que exclusivamente ocupadas por embalagens de leite longa vida. Segundo a Associação Brasileira de Leite Longa Vida - ABVL, em algumas regiões como o Grande Rio, o consumo de leite UAT já ultrapassou 70% do consumo total de leite na região (Figura 1). Nota-se o marcado aumento no consumo de leite longa vida no Rio de Janeiro que passou de 4,4% em 1990 para 73,5% em 2004 (ABVL, 2005).

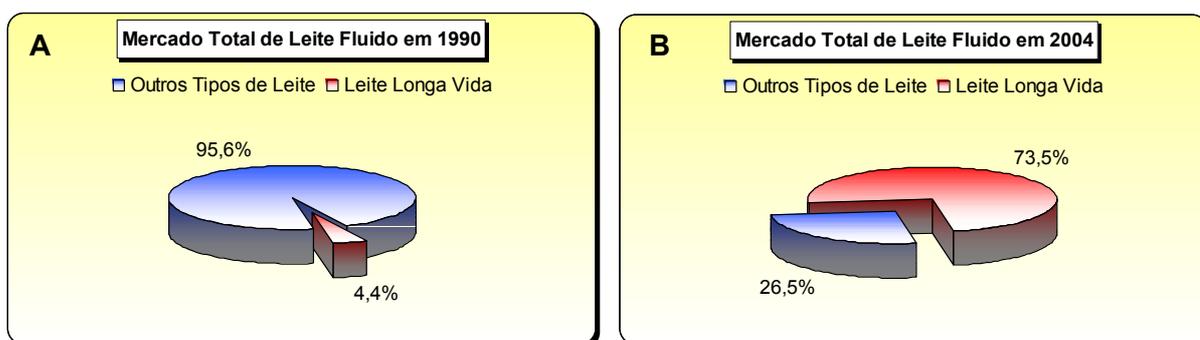


Figura 1: Mercado total de leite fluido no Rio de Janeiro nos anos de 1990 (A) e 2004 (B). Fonte: ABLV, 2005.

Diversos países como Brasil, Índia e México realizaram estudos acerca da contaminação do leite de vaca por resíduos de OCs, sendo que traços desses contaminantes foram detectados no alimento (ALMEIDA & BARRETO, 1971; LARA *et al.*, 1980; MARTINÉZ *et al.*, 1997; WALISZEWSKI *et al.*, 1997; CERKVENIK *et al.*, 2000; JOHN *et al.*, 2001; NIGAM & SIDDIQUI, 2001; PANDIT *et al.*, 2002; CISCATO *et al.*, 2002; SALAS *et al.*, 2003; PARDIO *et al.*, 2003; PAGLIUCA *et al.*, 2004; BATTU *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005). Os resultados de referidos estudos, associados à estimativa de que são consumidos cerca de 130 litros de leite *per capita* ao ano, reforçam a necessidade de um monitoramento e controle da presença de OCs no leite longa vida, objetivando a qualidade do alimento e a garantia da saúde da população (VILELA, 2003).

II.2. Características dos Agrotóxicos Organoclorados (OCs)

Especialmente os inseticidas OCs, constituíram-se a classe de agrotóxicos amplamente utilizada em função de sua eficácia e persistência. Entretanto, o potencial toxicológico dessas substâncias é devido, além do poder de bioacumulação nos organismos vivos, às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Embora esta seja uma classe de compostos que diferem entre si quanto às suas estruturas químicas básicas (Tabela 2) e propriedades físico-químicas (Tabela 3), estes preservam algumas características comuns. Dentre elas, lista-se: i) são derivados de hidrocarbonetos; ii) são solúveis em óleos, gorduras e solventes orgânicos ($\log k_{ow}$); iii) são persistentes e apresentam elevado poder residual, iv) são neurotóxicos para o homem e demais animais vertebrados (MÍDIO, 1974).

Tabela 2: Características dos Agrotóxicos Organoclorados

Classe	Exemplos de Compostos	Composição
Derivados do Difeniletano	DDT Metoxicloro Dicofol	DDT (<i>o, p'</i> - DDT: 14,9%; <i>p, p'</i> - DDT: 77,1%; <i>o, p'</i> -DDD: 0,1%; <i>p, p'</i> - DDD: 0,3% e impurezas: 3,5%).
Derivados dos Ciclodienos e Compostos relacionados	Clordano Endosulfan Heptacloro Aldrin Dieldrin Endrin Toxafeno	Clordano (α e γ – clordano/ 8 Cloros; <i>cis</i> e <i>trans</i> nonacloro) e oxyclordano (8 cloros). Endosulfan (α e β – endosulfan: 64-67% e 29-32% respectivamente). Heptacloro (8 cloros) e Heptacloro Epóxido (7 cloros).
Outros Hidrocarbonetos Clorados	Hexaclorobenzeno (HCB) Hexaclorociclohexano (HCH) Mirex (Dodecloro)	HCH técnico (α – HCH: 55-80%; β – HCH: 5-14%; γ – HCH: 8-15%; δ – HCH: 2-16%; ϵ – HCH: 3-5%).

Fonte: Mídio & Martins, 2000; Ecobichon, 2001; D'Amato *et al.*, 2002.

Tabela 3: Propriedades Físico-Químicas dos Agrotóxicos Organoclorados

Nome	Fórmula Molecular	Ponto de Fusão	Pressão de Vapor	log K_{ow}	Solubilidade	Estabilidade
HCH Gama-HCH	$C_6H_6Cl_6$	112.5- 113.5°C	5.6 mPa a 20°C	3,3	Solúvel em água a 25°C, 7.3 mg/l. Solúvel em acetona, metanol, tolueno, acetato de etila, ciclohexano e outros.	Extremamente estável à luz, em temperaturas acima de 180°C e em ácidos.
HCB	C_6Cl_6	226°C	1.45 mPa a 20°C	3,03 – 6,42	Praticamente insolúvel em água. Solúvel em benzeno, clorofórmio, éter dietil.	Muito estável até mesmo em álcalis e ácidos.
Heptacloro	$C_{10}H_5Cl_7$	95-96°C (puro); 46- 74°C (técnico)	53 mPa a 25°C	4,40 – 5,5	Praticamente insolúvel em água. Solúvel em muitos solventes orgânicos como acetona, benzeno, ciclohexano e outros.	Estável à luz do dia, ao ar, à umidade e ao calor moderado (acima de 160°C). Susceptível a epoxidação. Lenta perda de hidrogênio e cloro em meio alcalino
Aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$	104- 104.5°C	7.5×10^{-5} mmHg a 20°C; $1.4 \times$ 10^{-4} mmHg a 25°C	5,17 – 7,4	Solúvel em água a 27°C, 27µg/l, moderadamente solúvel em óleos de petróleo. Solúvel em acetona, benzeno e xileno.	Estável ao calor, aos álcalis e aos ácidos fracos.
Clordano	$C_{10}H_6Cl_8$	Isômero cis: 106- 107°C Isômero trans: 104- 105°C	1.3 mPa a 25°C (puro) 61 mPa a 25°C (técnico)	6,0	Em água a 25°C, 0.1mg/l. Miscível na maioria dos solventes orgânicos.	Decomposto por álcalis, com a perda de um cloro. Sob irradiação UV, ocorre mudança na estrutura e no conteúdo de cloro.
DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	108.5- 109°C	0.025 mPa a 20°C (p,p'- DDT)	4,89 – 6,914	Praticamente insolúvel em água. Solúvel em solventes aromáticos e clorados; moderadamente solúvel em solventes orgânicos polares e óleos de petróleo.	p,p'-DDT sofre desclorinação em soluções alcalinas e em temperaturas acima do ponto de fusão, em DDE. É geralmente estável a oxidação.
Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	175-176°C	3.1×10^{-6} mmHg a 20°C; $5.4 \times$ 10^{-6} mmHg a 25°C	3,69 – 6,2	Solúvel em água a 25-29°C, 0.186 mg/l. Solúvel em acetona e em solventes aromáticos.	Estável aos álcalis, aos ácidos fracos e à luz.
Endrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	226-230°C	2×10^{-7} mmHg a 25°C	3,21 – 5,34	Insolúvel em água. Solúvel em acetona, benzeno, álcoois e hidrocarbonetos de petróleo.	Estável aos álcalis e aos ácidos

Tabela 3: Propriedades Físico-Químicas dos Agrotóxicos Organoclorados (cont.)

Nome	Fórmula Molecular	Ponto de Fusão	Pressão de Vapor	log K_{ow}	Solubilidade	Estabilidade
Endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	109.2°C (α-endosulfan puro); 231.3°C (β-endosulfan puro); 70-100°C (técnico)	1.2 Pa a 80°C (não determinável em temperatura ambiente)	3,83	Em água a 22°C, 0.32 mg/l. Em acetato de etila, diclorometano, tolueno, etanol e hexano (todos em g/l a 20°C)	Estável à luz solar. Hidrolisado lentamente em ácidos aquosos e álcalis, com a formação de diol e dióxido de enxofre.
Dicofol	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	78.5-79.5°C	Insignificante em temperatura ambiente	5,02	Em água a 25°C, 0.8mg/l. Em acetona, acetato de etila, tolueno, metanol, hexano, isopropanol.	Estável em ácidos, mas instável em meios alcalinos. Termoestável.
Metoxicloro	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	89°C (técnico 88-90%: 77°C)	Muito baixa	4,18	Em água a 25°C, 0.1 mg/l. Extremamente solúvel em solventes aromáticos, clorados e cetônicos e óleos vegetais.	Estável aos agentes oxidantes e à irradiação UV
Mirex	C ₁₀ Cl ₁₂	485°C	3 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C	5,28	Insolúvel em água. Solúvel em vários solventes orgânicos como clorofórmio e benzeno.	Extremamente estável

Fonte: WORTHING, 1979; WORTHING, 1991; TOMLIN, 1994.

As estruturas moleculares das substâncias investigadas encontram-se no Anexo A.

II.3. Propriedades Toxicológicas e Farmacológicas dos Agrotóxicos da Classe dos Organoclorados

II.3.1. Aspectos Toxicológicos dos OCs

Como discutido previamente, as propriedades físico-químicas e farmacológicas dos OCs conferem a eles marcada toxicidade. Além disso, a biotransformação dos OCs é extremamente lenta, em parte por suas estruturas complexas constituídas de anéis aromáticos e do número de cloros substituintes. Esses últimos são extremamente difíceis de serem retirados através dos processos

enzimáticos disponíveis no organismo humano. A depuração desses agentes ocorre lentamente, num período de semanas no caso do clordano e num período de meses a anos para o aldrin/dieldrin, DDT e outros (CRAAN & HAINES, 1998; DELORME *et al.*, 1999).

Efetivamente, são observados diversos efeitos adversos nos seres humanos decorrentes da exposição crônica aos agrotóxicos OCs. Se classicamente o principal sítio de toxicidade dos OCs é o sistema nervoso, outros alvos têm sido investigados. Nesse contexto, destaca-se a indução de desregulação endócrina por OCs, principalmente afetando o sistema reprodutor humano. Por outro lado, há relatos, embora ainda controversos, que correlacionam a exposição aos OCs à carcinogênese, à alteração no desenvolvimento, à genotoxicidade e à imunotoxicidade.

No sistema nervoso, a avaliação comparativa entre os eventos elétricos de neurônios normais e de neurônios “envenenados” por DDT, substância OC derivada do difeniletano, revela a ocorrência da prolongação da fase de declínio do potencial de ação (pós-potencial negativo). A membrana do neurônio permanece parcialmente no estado despolarizado e se torna extremamente sensível à despolarização induzida por pequenos estímulos. Dessa forma, a exposição ao DDT promove estímulos sucessivos dos neurônios sensoriais periféricos através de toque ou som, causando tremores generalizados (JOY, 1994). Matsumura (1985) descreve alguns mecanismos responsáveis pelos efeitos referidos: Nos neurônios, os OCs comprometem a repolarização da membrana excitada por diminuir a permeabilidade da mesma aos íons K^+ e por inativar o fechamento de canais de Na^+ . Ainda na membrana neuronal, eles inibem a adenosina-trifosfatase (ATPase) neuronal, particularmente a Na^+ , K^+ - ATPase e a Ca^{2+} - ATPase, que desempenham papel vital na repolarização neuronal. Por fim, na fibra pré-sináptica, inibem a exocitose de neurotransmissor para a fenda sináptica por comprometer a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina. Os derivados dos ciclodienos, ciclohexanos e benzeno, por sua vez, diferem dos derivados do difeniletano em vários aspectos, principalmente no que se refere aos possíveis mecanismos de ação dos efeitos tóxicos centrais. Especificamente, eles antagonizam a ação do neurotransmissor ácido aminogababutírico (GABA). Neste contexto, agem nos receptores gabaérgicos ($GABA_A$), bloqueando o fluxo dos íons Cl^- . Como resultado, ocorre repolarização parcial das membranas neuronais e conseqüente estado de excitação descontrolado (NAGATA

& NARAHASHI, 1994). Além disso, são potentes inibidores da Na^+ , K^+ - ATPase e da Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPase (MATSUMURA, 1985; WAFFORD *et al.*, 1989).

Além das suas ações centrais, os OCs têm comprovada ação desreguladora do sistema endócrino, principalmente aquelas concernentes ao sistema ginecológico e reprodutor humanos. De fato, os OCs podem exercer ação agonista ou antagonista de hormônios mesmo em baixas concentrações (COLBORN *et al.*, 1993; KALPANA, 1999; KAVLOCK, 1996; AMARAL-MENDES, 2002; WITORSCH, 2002). A exemplo, o metabólito do DDT, DDE, inibe a ligação do androgênio ao seu receptor, ao passo que o DDT apresenta uma potente atividade estrogênica em mamíferos (KELCE *et al.*, 1995, 1998; SONNENSCHNEIN & SOTO, 1998). Substâncias com essas características podem levar ao desenvolvimento de tumores estrogênio-dependentes, principalmente de mama, como já demonstrado com o mirex, heptacloro e clordano, ou ainda alterar diversos mecanismos endócrinos (PATLAK, 1996).

Embora existam controvérsias, alguns estudos apontam que os OCs podem interferir na fertilidade e reprodução. Há relatos de que os OCs podem influenciar na contagem e na motilidade de espermatozoides (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993; IRVINE *et al.*, 1996). Ademais, Hardell *et al.* (2003) mostraram que a concentração de alguns OCs se encontra elevada nas mães de crianças que desenvolveram câncer de testículo, quadro potencialmente comprometedora da fertilidade masculina.

A desregulação endócrina sexual já mencionada pode estar associada aos processos carcinogênicos, ainda controversos, associados aos OCs. Como mencionado anteriormente, DDT e seu metabólito mais persistente DDE, podem induzir a transformação maligna de células mamárias por descreverem atividade estrogênica. De fato, alguns estudos epidemiológicos sugerem uma relação direta entre a exposição de mulheres a concentrações elevadas de DDE e a incidência de câncer de mama, sendo observado um risco 4 vezes maior de aparecimento da doença nas mulheres expostas ao DDE se comparado àquelas isentas da exposição à substância. (WOLFF *et al.*, 1993; DAVIS *et al.*, 1992; ARNOLD *et al.*, 1996). Por outro lado, Krieger *et al.* (1994) não encontraram diferenças entre grupos de mulheres com diferentes níveis séricos de DDE.

Ainda no que tange à carcinogênese induzida pelos OCs, vale inseri-los em um contexto de classificação internacional para subsidiar o entendimento dos riscos da exposição humana às substâncias quanto ao desenvolvimento de câncer. As

principais agências reguladoras internacionais, como a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), 2005 – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, consideram dados experimentais (*in vivo e in vitro*) e epidemiológicos para estabelecer sistemas de classificação para os agentes carcinogênicos. A classificação das substâncias quanto ao potencial carcinogênico segundo a IARC são: i) Grupo 1: Carcinógeno para humanos – suficiente evidência em humanos; ou evidência suficiente em animais e forte evidência em humanos; ii) Grupo 2 A: Provável carcinógeno para humanos – evidência limitada em humanos e suficiente evidência em animais; ou evidência inadequada em humanos mas suficiente em animais com forte evidência de que o mecanismo é relevante para humanos; ou evidência limitada em humanos; iii) Grupo 2 B: Possível carcinógeno para humanos - evidência limitada em humanos e pouco suficiente em animais; ou inadequada evidência em humanos e limitada em animais, mas com suporte em outros dados; iv) Grupo 3: Não classificado quanto à carcinogenicidade em humanos – evidências inadequadas em humanos; ou inadequadas e/ou limitadas em animais; ou evidências suficientes em animais, mas os mecanismos não são relevantes em humanos; ou ainda quando a substância não é inserida em nenhum outro grupo; v) Grupo 4: Improvável carcinógeno para humanos – ausência de evidências de potencial carcinogênico em humanos e em animais; ou inadequada evidência em humanos, porém evidências sugerindo ausência de carcinogenicidade em animais com suporte em outros dados. De acordo com a classificação da IARC, então, os OCs alvos do presente estudo são incluídos nos grupos 2B e 3 demonstrando que, apesar de evidências experimentais e epidemiológicas, o potencial carcinogênico dos OCs permanece controverso (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação dos OCs estudados quanto ao potencial carcinogênico, segundo a IARC.

Substância	IARC		Substância	IARC
Aldrin	3		HCB	2B
Clordano	2B		Mirex	2B
Dieldrin	3		Metoxicloto	NI
<i>p, p'</i> - DDT	2B		Endosulfan	NI
Endrin	3		Dicofol	3
Heptacloro	2B			

NI – Não Informado; Fonte: IARC, 2005.

Enfim, os sinais e sintomas relacionados à intoxicação por OCs são principalmente derivados de seus efeitos centrais e endócrinos, como demonstrado e sumarizado na Tabela 5.

Tabela 5: Sinais e Sintomas das Intoxicações Agudas e Crônicas por OCs

<i>Classe</i>	<i>Sinais Intoxicação Aguda</i>	<i>Sinais Intoxicação Crônica</i>
<u>Diclorodifeniletanos</u>		
DDT	Parestesia (ingestão oral)	Perda de peso e anorexia
DDD	Ataxia, andar anormal.	Anemia leve
Dicofol	Tonteira, convulsão, dor de cabeça.	Tremores
Metoxicloro	Náuseas e vômitos	Fraqueza muscular
	Fadiga e letargia	Hiperexcitabilidade, ansiedade.
	Tremores (periféricos)	Tensão nervosa
		Alterações nos padrões dos eletroencefalogramas.
<u>Hexaclorociclohexanos</u>		
Lindano (isômero γ)	Semelhantes aos efeitos dos diclorodifeniletanos	Semelhantes aos efeitos dos diclorodifeniletanos
<u>Ciclodienos</u>		
Endrin	Tonteira, dor de cabeça.	Dor de cabeça, tonteira, hiperexcitabilidade.
Isodrin	Náuseas e vômitos	Contração intermitente dos músculos e espasmos.
Endosulfan	Hiperexcitabilidade motora	Desordens fisiológicas como insônia, ansiedade e irritabilidade.
Heptacloro	Hiperreflexia	Alterações nos padrões dos eletroencefalogramas.
Aldrin	Espasmos	Perda de consciência
Dieldrin	Mal estar geral	Convulsões epileptiformes
Clordano	Ataques convulsivos	Dores no peito, artralgia.
	Convulsões Generalizadas	
Mirex		“Rush” Cutâneo
		Ataxia, incoordenação, opsoclonos.
		Dificuldade visual, incapacidade de focalização e fixação.
		Nervosismo, irritabilidade e depressão.
		Perda de memória recente
		Fraqueza muscular e tremores
		Severo prejuízo na espermatogênese

Fonte: Ecobichon, 2001.

II.3.2. Exposição Infantil aos OCs

Se considerada a faixa etária da população exposta aos xenobióticos, destacam-se as crianças. Efetivamente, há marcado desenvolvimento dos sistemas nervoso central, endócrino e de detoxificação nos 2 primeiros anos de vida (WEISS

et al., 2004). Além disso, as crianças possuem uma taxa de ingestão de alimentos por peso corpóreo maior do que os adultos e assim, representam a faixa da população que é submetida ao maior risco de exposição a contaminantes alimentares (ECOBICHON, 2001). Ademais, elas apresentam menor quantidade de gordura corpórea do que os adultos para armazenar substâncias lipofílicas, o que pode estar associado a maiores níveis de substâncias circulantes no organismo. Paradoxalmente, as crianças tendem a apresentar uma dieta menos variada e, embora um determinado agrotóxico possa ser encontrado em baixos níveis em certos alimentos, a exposição cumulativa através da ingestão pode ser alta caso o alimento represente elevada porcentagem na dieta (WEISS *et al.*, 2004). A exemplo, deve-se considerar a possível presença de resíduos de OCs no leite. Considerando o elevado teor de gordura do leite, capaz de acumular agrotóxicos lipofílicos como os OCs, e a ingesta diária do alimento pelas crianças, pode-se compreender a importância de se monitorar o conteúdo de OCs no leite como fins de assegurar a saúde e o desenvolvimento infantil no Brasil.

A preocupação acerca dos impactos das exposições a agrotóxicos à saúde das crianças motivou esforços políticos e o desenvolvimento de pesquisas na área. Em resultado, foram estabelecidos o Departamento da Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency of the Unites States - USEPA)- e o Comitê Conselheiro para a Saúde da Criança, além da promulgação o Ato de Proteção da Qualidade Alimentar (Food Quality Protection Act - FQPA) de 1996, que teve um importante papel na regulamentação de agrotóxicos em alimentos. Políticas preventivas para tratar mais estritamente riscos potenciais à saúde infantil foram incluídas no FQPA (DOURSON *et al.*, 2002).

II.4. A importância da Legislação – Aspectos Nacionais e Internacionais

Entre as décadas de 40 e meados de 60, os OCs foram amplamente utilizados como inseticidas, acaricidas e fungicidas na agropecuária, em programas de controle de vetores de doenças contagiosas e em serviços de desinsetização. Nessa época, a persistência desses compostos foi considerada uma característica relevante para a produtividade agrícola pelo seu poder residual. Porém, com o avanço dos estudos acerca dos possíveis efeitos residuais, concluiu-se que os resíduos eram responsáveis por sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana,

e a característica até então positiva, tornou-se motivo para sua proibição (OLIVEIRA, 1998).

No Brasil, o uso de OCs em aplicação direta na agricultura foi proibido desde 1985. Porém, algumas exceções devem ser consideradas, dentre elas (BRASIL, 1985):

- Endosulfan em culturas de café, cacau, algodão, soja e como preservante de madeira;
- Dicofol em culturas de cítricos e algodão;
- Aldrin no controle de formigas e cupins;
- Mirex no controle de formigas;
- DDT e HCH em campanhas de saúde pública.

O uso do aldrin no combate a formigas e cupim foi permitido até 1993. Em 1998, porém, a Portaria nº 11 do Ministério da Saúde proibiu o uso do aldrin, endrin, heptacloro, HCH, lindano e DDT em residências e na agricultura (BRASIL, 1998). Recentemente, o heptacloro, o lindano e o mirex ainda eram usados como preservante de madeira, e até janeiro de 1998, o DDT e o HCH eram usados no combate à malária, sendo utilizadas cerca de 3.000 toneladas de DDT para esse propósito entre os anos de 1988 e 1994 (MEYER *et al.*, 1999).

Muitos OCs, como o HCB e o DDT, ainda são encontrados no meio ambiente, embora a maioria dessas substâncias tenham sido proibidas em países industrializados entre 1970 e 1980. Face aos sérios problemas ocasionados pelo uso indiscriminado dessas substâncias tóxicas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) coordena, há alguns anos, estudos epidemio-toxicológicos com o intuito de estabelecer os possíveis danos da exposição dos seres humanos aos efeitos dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (WHO, 1988, 1990, 1996). Esses são definidos como substâncias químicas que apresentam em comum o fato de possuírem cloro e carbono em suas cadeias químicas. Além disso, se tratam de substâncias tóxicas de alta periculosidade, as quais não se decompõem facilmente, se mantêm inalteradas por longos períodos e que podem ser transportadas a longas distâncias, face à sua volatilidade, acarretando danos ao meio ambiente e à saúde humana em locais distantes das fontes de lançamento. Inicialmente, foram identificados doze POPs dentre os quais se encontram nove agrotóxicos, todos OCs

(aldrin, endrin, dieldrin, toxafeno, DDT, HCB, heptacloro, clordano e mirex), e sobre os quais a comunidade científica internacional vem adotando ações com vistas à sua eliminação.

Acordos internacionais vêm sendo implementados para que medidas de proteção do meio ambiente e à saúde humana possam ser efetivamente alcançadas. Nesse contexto, se destaca a Convenção de Estocolmo sobre os POPs, com o principal objetivo de proteger a saúde contra os danos potenciais ocasionados por certas substâncias químicas, especialmente os OCs. A Convenção de Estocolmo surgiu da necessidade da criação de ações capazes de diminuir e/ou eliminar os POPs e entrou em vigor em 17 de maio de 2004. Atualmente, 97 países fazem parte da Convenção, dentre os quais o Brasil, com a ratificação em 16 de junho de 2004 (UNEP, 2005).

Além do tratado internacional citado anteriormente, também são de grande relevância os programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos realizados em diversas regiões mundiais. Países como os Estados Unidos, a Irlanda, o Reino Unido e o Brasil possuem implementados programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em diversos gêneros alimentícios, como hortifrutigranjeiros, carne, leite e derivados, com análises contínuas e programadas. Em maio de 1991, o United States Department of Agriculture (USDA)-Departamento de Agricultura dos Estados Unidos introduziu o Pesticide Data Program (PDP)- programa de agrotóxicos em alimentos cujos resultados são disponibilizados anualmente. Na Irlanda, o programa de monitoramento data de julho de 1999. No Reino Unido, os resultados do programa do ano de 1995 mostraram que nove das 216 amostras de leite analisadas, excederam os limites máximos de lindano permitidos (MAFF, 1996). Embora no período de 1998 a 2002 não tenham sido encontrados resíduos de lindano nas amostras de leite analisadas (MAFF, 1999, 2000, 2003), o proposto pelo programa é que essa substância continue sendo monitorada para que futuras contaminações sejam detectadas.

No Brasil, o programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, conhecido como PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) é coordenado pela ANVISA. Ele foi criado em junho de 2001, com o principal objetivo de avaliar continuamente os alimentos *in natura*, particularmente em frutas e vegetais frescos, com vistas à redução do número de incidentes relativos à ocorrência de resíduos ilegais nos alimentos citados (OLIVA *et*

al., 2003). Com quatro anos de implementação, o PARA apresenta resultados significativos, como a redução e até o desaparecimento da contaminação em alguns hortifrutigranjeiros (ANVISA, 2004). Além do PARA, a ANVISA também coordena o Programa de Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). O PAMVet foi iniciado em 2002, a partir da preocupação acerca do uso de medicamentos veterinários em animais produtores de leite, logo da preservação da saúde humana, e realiza análises contínuas de leite de vaca quanto ao teor de medicamentos veterinários (ANVISA, 2005).

As medidas adotadas no Brasil comprovam a importância do monitoramento contínuo dos alimentos, não só dos hortifrutigranjeiros, como também daqueles intensamente consumidos pela população, como o leite e seus derivados.

III. Objetivos

III. 1. Objetivo Geral

Propor uma metodologia de controle da exposição da população aos resíduos dos agrotóxicos OCs através da ingestão de leite longa vida (UHT/UAT), para que um programa de monitoramento de tais resíduos no alimento em questão possa ser implantado no país.

III. 2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar metodologia de análise qualitativa e quantitativa de resíduos de agrotóxicos OCs em leite longa vida;
- Identificar e quantificar no leite longa vida os níveis de resíduos dos seguintes agrotóxicos OCs: Aldrin; Clordano; Dicofol; Dieldrin; *o,p'* - DDD; *o,p'*-DDE; *o,p'*- DDT; *p,p'* - DDD; *p,p'*- DDE; *p,p'* - DDT; Endosulfan Sulfato; α - Endosulfan; β - Endosulfan; Endrin; HCB; α - HCH; β - HCH; γ - HCH; δ - HCH; Heptacloro; Heptacloro Exo Epóxido; Metoxicloro e Mirex;

IV. Materiais e Método

IV.1. Seleção das Amostras

As amostras selecionadas e analisadas nesse estudo integram aquelas coletadas e avaliadas pelo PAMVet, em seu terceiro ano de existência. Foram selecionadas aleatoriamente vinte amostras, sendo posteriormente armazenadas a -20°C até a execução das análises.

IV.2. Lavagem de material

As vidrarias e materiais utilizados no estudo foram submetidos ao processo de lavagem preconizado pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) do INCQS, nº 65.3120.014, referente à lavagem de material para análise de resíduos de agrotóxicos:

- a) Descontaminação do material utilizado com acetona destilada ou acetona para análise (P. A.);
- b) Lavagem com água corrente;
- c) Imersão do material lavado em solução de detergente alcalino a 10% por, no mínimo, duas horas, antes de passar para o item d;
- d) Lavagem com água corrente;
- e) Lavagem com água deionizada;
- f) Rinsagem com acetona grau resíduo de pesticida;
- g) Secagem do material em local plano e em temperatura ambiente;
- h) Proteção das bordas e extremidades dos materiais secos com papel alumínio e armazenamento nos armários e/ou gavetas do laboratório.

Antes das análises as vidrarias e os materiais foram rinsados com acetona e n-hexano, grau resíduo de pesticida, para garantir a ausência de contaminantes.

IV.3. Materiais

IV.3.1. Vidrarias e outros materiais utilizados nas análises

- Pipetas volumétricas de capacidade: 1 e 5ml;
- Balões volumétricos de capacidades: 10; 25; 50 e 100ml;
- Navetas de vidro para a pesagem dos padrões dos agrotóxicos analisados;
- Provetas graduadas de capacidades: 10; 50 e 100ml;
- Pipetas Pasteur;
- Espátulas de metal;
- Seringa de vidro de capacidade: 5ml;
- Béqueres de vidro de capacidades: 20; 100 e 200ml;
- Balões de fundo redondo capacidade: 500ml;
- Balões de fundo cônico de capacidades: 50 e 150ml;
- Bureta de capacidade: 10ml;
- Coluna de vidro para cromatografia por permeação em gel (D. I. =25mm e comprimento= 50cm);
 - Colunas tulipa de vidro para cromatografia de adsorção (D. I. =10mm e comprimento= 15cm);
 - Extrator de Soxhlet;
 - Unidade filtrante Millex[®] GN (0,20µm; 25mm) (Millipore, Estudos Unidos).

IV.3.2. Reagentes:

- Água destilada;
- Água deionizada;
- N – hexano para análise de resíduos – Omnisolv (Merck, Estados Unidos);
- Acetona para análise de resíduos – Pesticide (Tedia, Estados Unidos);
- Acetona pró-análise (P. A.) (Merck, Alemanha);
- Acetato de Etila para análise de resíduos – Pesticide (Tedia, Estados Unidos);
- Tolueno para análise de resíduos - Pesticide (Tédia, Estados Unidos);
- Ciclohexano para análise de resíduos – Lichrosolv (Merck, Alemanha);
- Isooctano para análise de resíduos – Suprasolv (Merck, Alemanha);
- Padrões de agrotóxicos, fornecidos por Dr. Ehrenstorfer (todos com certificados de análise e com grau de pureza fornecido) (Alemanha);

- Detergente Alcalino Extran MAO1 (para a lavagem do material) (Merck, Brasil);
- Benzeno para análise de resíduos – Omnisolv (Merck, Alemanha) (para a solubilização do padrão de β – HCH);
- BioBeads SX – 3, 200-400mesh (BIO – RAD, EUA);
- Sílica Gel 60 para cromatografia em coluna, 0,063-0,200mm (Merck, Alemanha);
- Sulfato de sódio anidro granulado (Merck, Alemanha).

IV.3.3. Preparo das soluções padrões

IV.3.3.1. Soluções estoque:

Foram preparadas soluções padrão estoque individuais de concentração 100 μ g/ml a partir da solubilização de 0,01g de cada padrão em isooctano, exceto para o β – HCH, utilizando balão volumétrico calibrado de 100ml. No preparo da solução estoque do β – HCH, o padrão foi primeiramente dissolvido em 1ml de benzeno, para facilitar a solubilização.

IV.3.3.2. Soluções intermediárias:

Foram preparadas seis soluções intermediárias de concentrações estabelecidas, também conhecidas como soluções de trabalho, para a construção da curva analítica:

- Solução intermediária de concentração estabelecida 1 μ g/ml: 1ml de cada solução estoque foi transferido para um balão volumétrico calibrado de 100ml, avolumado com isooctano;

- Soluções intermediárias de concentrações estabelecidas: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,15 μ g/ml. Preparo:

a) Solução de concentração 0,15 μ g/ml: 1,5ml da solução de concentração 1 μ g/ml foram transferidos (utilizando bureta calibrada de 10ml) para um balão volumétrico calibrado de 10ml, avolumado com isooctano;

b) Solução de concentração 0,08 μ g/ml: 5ml da solução de concentração 0,15 μ g/ml foram transferidos (utilizando pipeta volumétrica calibrada) para um balão volumétrico calibrado de 10ml, avolumado com isooctano;

- c) Solução de concentração 0,04µg/ml: 5ml da solução de concentração 0,08µg/ml foram transferidos (utilizando pipeta volumétrica calibrada) para um balão volumétrico calibrado de 10ml, avolumado com isooctano;
- d) Solução de concentração 0,02µg/ml: 1ml da solução de concentração 1µg/ml foi transferido (utilizando pipeta volumétrica calibrada) para um balão volumétrico calibrado de 50ml, avolumado com isooctano;
- e) Solução de concentração 0,01µg/ml: 5ml da solução de concentração 0,02µg/ml foram transferidos (utilizando pipeta volumétrica calibrada) para um balão volumétrico calibrado de 10ml, avolumado com isooctano.

IV.3.4. Equipamentos e Acessórios

- Balança analítica com faixa de indicação: 0,00001 a 210g (Mettler Toledo AG2 45, Suíça);
- Ultrassom (Branson 52, Estados Unidos);
- Módulo para evaporação com fluxo de nitrogênio (Pierce, Estados Unidos);
- Placa de aquecimento (Pierce, Estados Unidos);
- Manta de aquecimento (Fisatom, Brasil)
- Evaporador rotatório a vácuo (Büchi Rotavapor RE120, Suíça);
- Cromatógrafo a gás (Agilent 6890 Series), com detector por captura de elétrons com fonte radioativa de Ni⁶³ (Hewlett Packard, G2397A);
- Cromatógrafo a gás (Agilent 6890N Series), com detector seletivo de massas (Agilent 5973);
- Bomba de média pressão para cromatografia líquida por permeação em gel (Duramat 80, Alemanha);
- Cartuchos de celulose para extração (D. I. = 33mm e comprimento = 94mm) (Whatman, Inglaterra);
- Liofilizador (Christ Beta 1-16, Alemanha).

IV.4. Método Analítico

O método analítico ora proposto foi baseado no método multiresíduo S19 da Alemanha, que permite a determinação de resíduos de aproximadamente 85 agrotóxicos lipossolúveis e hidrossolúveis e alguns de seus metabólitos (THIER & ZEUMER, 1987; THIER & KIRCHHOFF, 1992). Para tal, inicialmente a gordura das amostras foi extraída através de lixiviação exaustiva por meio de solvente orgânico.

Posteriormente, foi purificada através de cromatografia por permeação em gel (CPG) recheada com gel de poliestireno (BioBeads SX-3), usando uma mistura de ciclohexano/acetato de etila (1:1 v/v) como eluente. Por fim, a fração contenedora dos resíduos (120 - 230ml) foi submetida a uma etapa posterior de purificação em pequena coluna recheada com sílica gel desativada, usando 10ml de tolueno como eluente. O recheio da coluna de sílica foi preparado conforme listado abaixo:

1°: Desativação da sílica ⇒ Inicialmente, a sílica foi mantida em mufla a 650°C durante 12 horas, sendo posteriormente transferida para um dessecador até atingir temperatura ambiente. Para a desativação, 98,5g da sílica foram hidratados com 1,5ml de água deionizada. A mistura foi deixada em equilíbrio durante 12 horas antes do uso;

2°: Preparação da coluna de sílica ⇒ A saída da coluna foi fechada com lã de vidro e preenchida com 1,0g da sílica desativada. Foram adicionados 5 a 10mm de sulfato de sódio anidro granulado acima da sílica e o recheio foi, então, lavado duas vezes com 5ml de n-hexano.

A fração proveniente da segunda etapa de limpeza foi concentrada até aproximadamente 1ml em evaporador rotatório a vácuo e posteriormente levada à quase secura sob fluxo de nitrogênio. Ressuspendeu-se em tolueno, o volume final foi ajustado para 0,5ml e, finalmente injetado (2µl) em CG/µDCE. A confirmação dos resultados obtidos foi realizada mediante a concentração (10:1 v/v) de uma alíquota do volume final. Para tal, a alíquota foi levada à secura sob fluxo de nitrogênio e posteriormente ressuspensa em solução de padrão interno (criseno, antraceno e pireno; concentração=1µg/ml). Posteriormente, procedeu-se com a injeção de 2µl no CG/DSM.

IV. 5. Condições Cromatográficas

IV. 5. 1. Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons com fonte radioativa de Ni⁶³ (CG/µDCE)

i) Injetor → modo: sem divisão de fluxo (“*splitless*”), pressão do pulso: 50psi, duração do pulso: 0,2min, temperatura: 230°C;

ii) Coluna DB5 (J&W) (30m de comprimento, diâmetro interno: 25mm, espessura do filme: 0,25 μ m)→ modo: vazão constante (1ml/min), gás de arraste: nitrogênio ultra puro;

iii) Forno→ 80°C, 30°C/min até 180°C, 180°C por 8min, 2°C/min até 200°C, 200°C por 5min, 6°C/min até 280°C, 280°C por 5min;

iv) Detector por captura de elétrons→ temperatura: 300°C, vazão do gás de “makeup”: 60ml/min, gás de “makeup”: nitrogênio ultrapuro.

IV. 5. 2. Cromatógrafo a gás com detector seletivo de massas (CG/DSM)

i) Injetor→ modo: sem divisão de fluxo (“*splitless*”) pulsado, pressão do pulso: 40psi, duração do pulso: 0,20min, temperatura: 230°C;

ii) Coluna DB5-MS (J&W) (30m de comprimento, diâmetro interno: 0,20mm, espessura do filme: 0,20 μ m)→ modo: vazão constante (1ml/min), vazão da coluna: 0,9ml/min, gás de arraste: hélio ultra puro;

iii) Forno→ 50°C, 50°C/min até 100°C, 2°C/min até 120°C, 5°C/min até 280°C, 280°C por 5min;

iv) Detector seletivo de massas→ modo: varredura (faixa de varredura de massa: 90-450u), temperatura da linha de transferência: 280°C, temperatura do quadrupolo: 150°C, temperatura da fonte: 230°C, energia do feixe de elétrons: 70eV.

V. Resultados e Discussão

A validação do método analítico e as análises das amostras de leite longa vida foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Departamento de Química do INCQS/FIOCRUZ, R.J., em parceria com o Laboratório de Poluentes Orgânicos Persistentes do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH)/ENSP/FIOCRUZ, R.J.

V. I. Estudo do Método Analítico

O método analítico validado no presente estudo compreende basicamente seis etapas, esquematizadas na Figura 2.

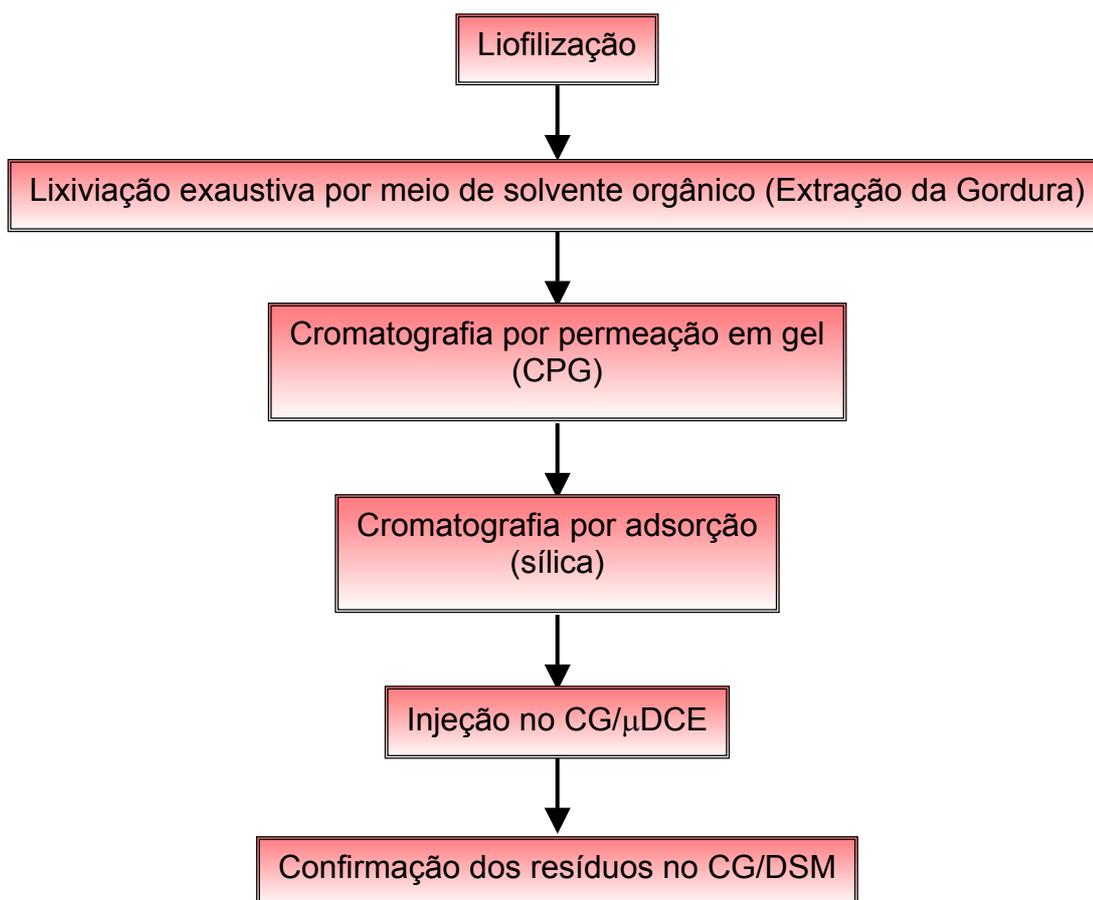


Figura 2: Esquema do Procedimento Analítico para a Determinação de OCs em Leite.

A primeira etapa do método constituiu na liofilização das amostras. Conhecida como criosecagem, a liofilização é um processo de desidratação de produtos no qual a água previamente congelada passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso. Tal processo foi realizado em baixa temperatura e na ausência de ar atmosférico, o que permitiu que as propriedades organolépticas do leite fossem praticamente inalteradas (GAVA, 1999). Nessa etapa, 200ml do leite fluído foram transferidos para um balão de 500ml e posteriormente congelados mediante rotação do balão em banho de gelo seco e acetona. O balão foi encaixado no liofilizador e as amostras então, liofilizadas.

Uma vez liofilizadas, foram pesados 20g de amostra em cartuchos extratores sobre os quais foi acrescentada fina camada de sulfato de sódio anidro granulado. Os cartuchos foram então transferidos para os extratores de Soxhlet, previamente acoplados a balões de 500ml preenchidos com 300ml de acetona/n-hexano, 1:1 v/v e pérolas de vidro. Foram realizados aproximadamente 200 ciclos para a extração da gordura e, posteriormente, o solvente foi removido por evaporação em evaporador rotatório a vácuo ($T = 50^{\circ}\text{C}$ e Pressão= 800mmHg). A gordura extraída, contendo ainda resíduos de solventes, foi transferida para um béquer e este mantido sob fluxo de nitrogênio e placa de aquecimento até peso constante. Em seguida, foram realizadas duas etapas de limpeza para que fossem evitados problemas na detecção, amostras falso-positivas, ruídos químicos altos, redução no tempo de vida da coluna cromatográfica e contaminação do detector (ARMENDÁRIZ *et al.*, 2004).

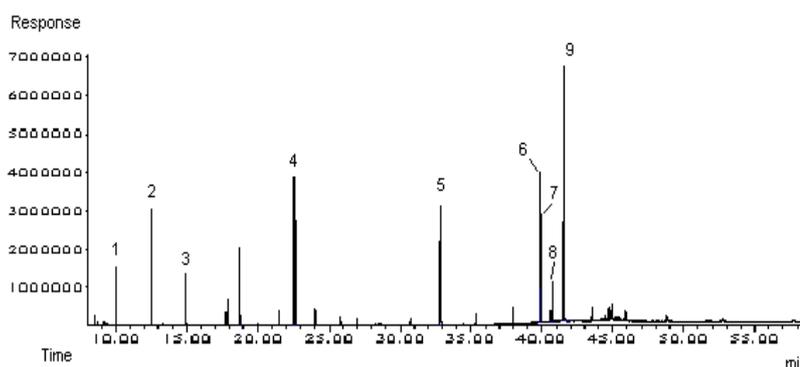
A gordura foi removida através de cromatografia por permeação em gel (CPG), conhecida como cromatografia de exclusão por tamanho. Trata-se de uma técnica eficaz para a separação quantitativa de compostos que apresentam massa molecular superior a 400u, como os OCs, de compostos macromoleculares como os lipídeos (600-1500u). Para se estabelecer a fração de trabalho, foram realizados testes com uma mistura de padrões de OCs, usando como referência o método S19, no qual a eluição dos OCs de interesse ocorre entre 100 e 165ml. Dessa forma, após a transferência da mistura de padrões para a coluna (1ml), foram coletadas as seguintes frações considerando o comprimento maior da coluna que aquele usado no método S19:

- 0 – 100ml
- 100 – 110ml
- 110 – 120ml
- 120 – 130ml
- 130 – 140ml
- 140 – 150ml
- 150 – 190ml
- 190 – 200ml
- 200 – 210ml
- 210 – 220ml
- 220 – 230ml
- 230 – 240ml

As frações de 0 – 100ml e 150 – 190ml não foram analisadas. Cada fração de 10ml foi evaporada até 1ml em evaporador rotatório a vácuo e, em seguida até quase seca sob fluxo de nitrogênio. Finalmente, ressuspendeu-se em 0,5ml de solução de padrão interno (criseno, pireno e antraceno, de concentração 1µg/ml). Identificou-se a fração de trabalho através da injeção de cada uma das frações de 10ml no CG/DSM. Observou-se que as 3 primeiras e a última frações de 10ml analisadas não apresentaram as substâncias de interesse. A Figura 3 (A, B, C, D) mostra os cromatogramas de 4 das 12 frações coletadas para o estabelecimento da fração de trabalho.

Observa-se que na Figura 3A, cromatograma da fração de 120 – 130ml, não foram identificadas as substâncias de interesse.

3 A.

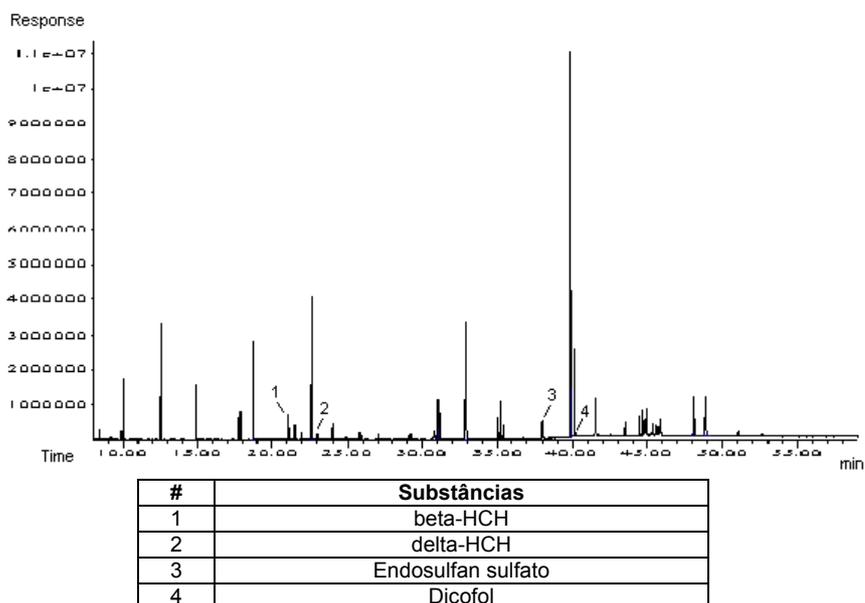


#	Substâncias	#	Substâncias
1	95% PBM Cyclopentasiloxane, decamethyl	6	Criseno D-12
2	87% PBM Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	7	59% PBM 8-Methyl-4-azafluorene
3	40% PBM 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-DODECAMETHYL-HEXASILOXANE	8	83% PBM 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester
4	Antraceno D-10	9	87% PBM Iron, monocarbonyl-(1,3-butadiene-1,4-dicarboxylic acid, diethyl ester) a, a'-dipyridyl
5	Pireno D-10	-	-

PBM=Probability-based matching (Probabilidade de se igualar aos padrões da biblioteca do espectro de massas, Wiley 7N).

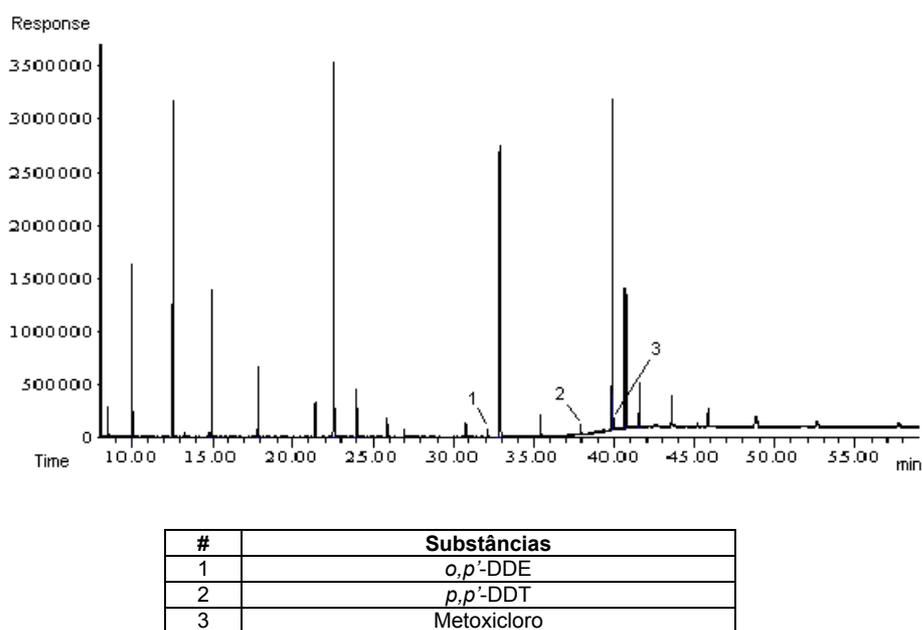
A Figura 3B representa o cromatograma da fração 130-140ml, a partir da qual os analitos de interesse começaram a eluir.

3 B.

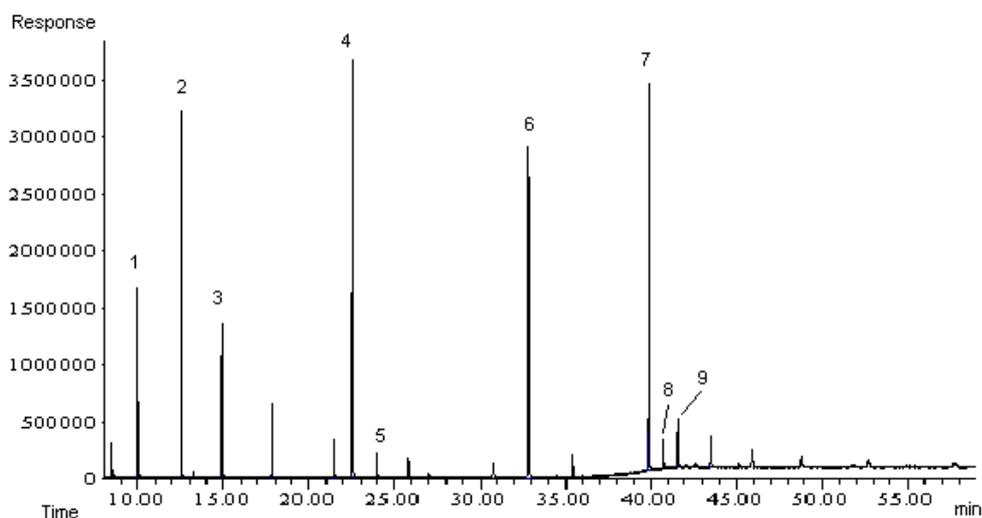


Note que a Figura 3C representa o cromatograma da fração 220-230ml, na qual ocorre a eluição das últimas substâncias estudadas. Tal fato é comprovado pela Figura 3D, correspondente à fração 230-240ml, que apresenta unicamente picos referentes aos siloxanos, ftalatos e padrões internos (criseno, pireno e antraceno).

3 C.



3 D.



#	Substâncias	#	Substâncias
1	95% PBM Cyclopentasiloxane, decamethyl	6	Pireno D-10
2	87% PBM Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	7	Criseno D-12
3	40% PBM 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-DODECAMETHYL-HEXASILOXANE	8	83% PBM 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester
4	Antraceno D-10	9	87% PBM Iron, monocarbonyl-(1,3-butadiene-1,4-dicarboxylic acid, diethyl ester) a, a'-dipyridyl
5	83% PBM 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	-	-

Figura 3: Representação cromatográfica dos testes realizados com a mistura de padrões dos OCs e OFs para a determinação da faixa de trabalho para a cromatografia por permeação em gel.

Observa-se, nas Figuras 3A e D, que os picos 1, 2 e 3 dos cromatogramas ilustrados se referem a siloxanos, provavelmente provenientes da coluna capilar de sílica fundida 5% fenil metil siloxano utilizada no cromatógrafo a gás. Esses picos também foram observados nas Figuras 3B e C. Picos de ftalatos em todos os cromatogramas das frações estudadas foram detectados, possivelmente provenientes de algum constituinte da coluna utilizada para a cromatografia por permeação em gel.

Após avaliação das frações, estabeleceu-se o critério de coleta, tal que a fração de 0 a 110ml foi descartada e a fração de 110 a 230ml foi analisada conforme descrito a seguir.

A fração contendo as substâncias de interesse foi evaporada até 1ml em evaporador rotatório a vácuo e até quase seca sob fluxo de nitrogênio. O restante foi ressuspendido em tolueno e submetido à segunda etapa de limpeza, uma vez

que resíduos de substâncias interferentes permanecem no eluato da CPG e devem ser removidas (RIMKUS *et al.*, 1996).

A solução em tolueno proveniente da CPG foi transferida para a coluna de sílica. As substâncias de interesse foram eluídas com 10ml de tolueno. Concluída a eluição, o eluato foi evaporado até 1ml em evaporador rotatório a vácuo e posteriormente levado até quase *secura* em fluxo de nitrogênio. O volume final foi ajustado para 0,5ml com tolueno e 2 μ l foram injetados no CG/ μ DCE.

Após a otimização do método analítico com a mistura de padrões, deu-se seguimento à determinação do branco da matriz. Consistiu numa amostra de leite cujo perfil cromatográfico é isento de picos com potencial de interferência nos tempos de retenção das substâncias de interesse. Cumpre mencionar que a identificação de uma amostra de leite com características de branco da matriz ocorreu de modo empírico e aleatório. Assim sendo, esse processo foi iniciado mediante solubilização de 0,5g de gordura de leite no solvente eluente (acetato de etila/ciclohexano, 1:1 v/v), seguida de filtragem em unidade filtrante e transferência para a coluna de permeação em gel. O restante do procedimento seguiu criteriosamente a metodologia abordada previamente para a mistura de padrões das substâncias de interesse. O branco da matriz foi analisado através da injeção no CG/DSM (Figura 4)

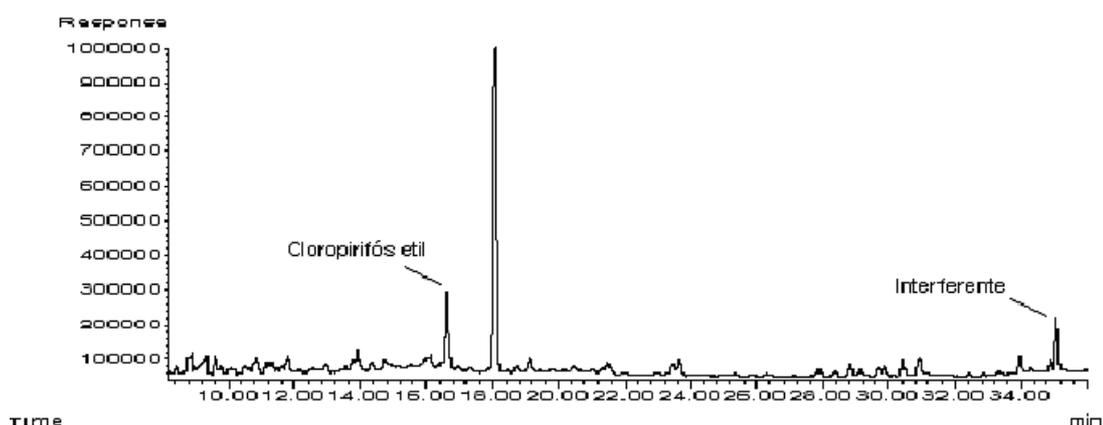
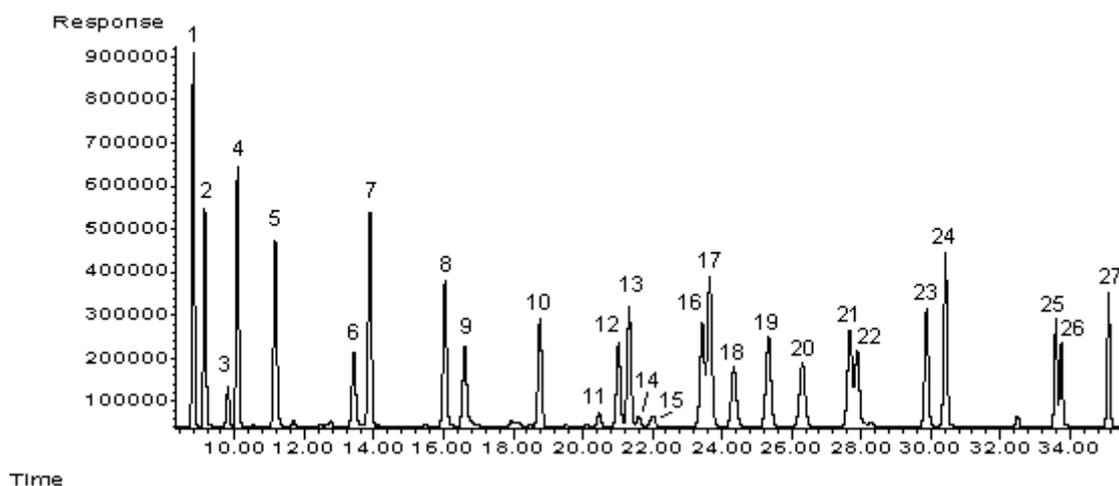


Figura 4: Cromatograma do branco do leite utilizado para a validação do método analítico proposto pelo presente estudo.

Observa-se a existência de um pico referente ao agrotóxico organofosforado clorpirifós etil e de um interferente próximo ao tempo de retenção do mirex.

A Figura 5 representa o cromatograma de uma mistura de padrões (concentração aproximadamente 0,02µg/ml) para fins de ilustração e comparação com o cromatograma do branco do leite (Figura 4).



#	Substância	#	Substância	#	Substância
1	alfa-HCH	10	heptacloro epoxido	19	endrin
2	HCB	11	<i>trans</i> -clordano	20	beta-endossulfan
3	beta-HCH	12	<i>o,p'</i> -DDE	21	<i>p,p'</i> -DDD
4	gama-HCH	13	alfa-endossulfan	22	<i>o,p'</i> -DDT
5	delta-HCH	14	<i>cis</i> -clordano	23	endossulfan sulfato
6	clorpirifós metil	15	<i>trans</i> -nonaclor	24	<i>p,p'</i> -DDT
7	heptacloro	16	dieldrin	25	dicofol
8	aldrin	17	<i>p,p'</i> -DDE	26	metoxicloro
9	clorpirifós etil	18	<i>o,p'</i> -DDD	27	mirex

Figura 5: Cromatograma da solução de mistura dos padrões das substâncias de interesse de concentração aproximadamente 0,02 µg/ml.

Pode-se observar que não foram identificados picos coincidentes com os tempos de retenção dos OCs estudados. Contudo, identificou-se um interferente próximo ao pico do mirex que impossibilitou a validação do método analítico ora proposto para a referida substância. Isso porque, na concentração mais baixa da curva analítica, foi obtido valor da taxa de recuperação superior à estabelecida pelo *Codex Alimentarius* (70-120%). Ainda no que tange à Figura 4, observou-se a presença do agrotóxico organofosforado clorpirifós etil, demonstrando a necessidade de inclusão dessa substância no processo de validação do método analítico. Deu-se seguimento ao processo de validação do método de análise com o referido branco de leite posto que foi concluída a possibilidade de realização dos cálculos das taxas de recuperação para o clorpirifós etil através da correção dos valores encontrados,

ou seja, subtraindo-se o valor das áreas de clorpirifós etil obtidas nos cromatogramas do branco fortificado com concentrações diferentes de padrão das substâncias de interesse pelo valor da área de clorpirifós etil obtida no cromatograma do branco do leite.

Os agrotóxicos OFs são ésteres de ácido fosfórico com diferentes substituintes e correspondem a um grupo heterogêneo de substâncias amplamente usadas na agricultura em função de algumas vantagens, conforme listado: alta atividade inseticida, amplo espectro de ação, ação sistêmica para a maioria dos insetos, baixa ação residual, rápida biotransformação e baixa persistência no meio ambiente (MÍDIO & MARTINS, 2000; PAGLIUCA *et al.*, 2004).

Em função do reduzido potencial de persistência ambiental, os OFs substituíram gradativamente os OCs na prática agropecuária. Paradoxalmente, configuram risco para a saúde humana por inibirem irreversivelmente a acetilcolinesterase, comprometendo a neurotransmissão colinérgica logo algumas funções vitais. Em última instância, quadros de intoxicação severa por OFs podem decorrer da possibilidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (PAGLIUCA *et al.*, 2004). Nesse contexto, os animais podem acumular OFs por ingestão ou por contato. Como consequência, alimentos de origem animal como o leite representam uma fonte indireta de OFs para os humanos, posto que eles também podem se concentrar na gordura dos alimentos (JUHLER, 1997; PAGLIUCA *et al.*, 2005).

V.2. Validação do método analítico

O método analítico proposto foi validado de acordo com os parâmetros de validação sugeridos pelo POP do INCQS, nº 65.3120.082, referente aos Parâmetros Estatísticos para Validação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, tais como seletividade, faixa de trabalho, linearidade [determinação dos valores aberrantes, análise dos resíduos da regressão (homo/ heterocedasticidade) e análise da variância da regressão (significância da regressão)], precisão (desvio padrão relativo ou coeficiente de variação), limite de detecção, limite de quantificação, e exatidão (taxa de recuperação).

V.2. 1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de componentes que podem interferir em sua determinação numa amostra complexa. A seletividade assegura que o pico da resposta é exclusivamente da substância analisada (RIBANI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2002; SANCO, 2004).

A seletividade do método ora proposto foi testada através da injeção do branco do leite (Figura 4). Para tal, o branco não deveria apresentar interferentes que coincidissem com os tempos de retenção das substâncias estudadas. Entretanto, o branco apresentou um interferente cujo tempo de retenção era próximo do mirex. Dessa forma, essa substância não pôde ser validada no presente estudo.

Para comprovar a seletividade do método proposto, foram injetadas as misturas de padrões para que os tempos de retenção relativos das substâncias de interesses fossem identificados (Figura 5).

Comparando-se os cromatogramas demonstrados nas Figuras 4 e 5, se conclui que o método é seletivo, posto que foi capaz de avaliar os OCs de maneira inequívoca.

V.2. 2. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância analisada, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. É usualmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método. Ademais, envolve as concentrações que são utilizadas para a construção da curva analítica que poderá ser utilizada na quantificação das amostras. É imprescindível que a faixa de trabalho apresente condições de linearidade (THOMPSON *et al.*, 2002).

Para determiná-la, optou-se pela escolha aleatória de valores baixos de concentração (0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,15 μ g/ml). O tratamento estatístico da curva de calibração mostrou clara linearidade, conforme descrito a seguir.

V.2. 3. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração das substâncias de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Para tal, são avaliados alguns parâmetros estatísticos como a determinação de valores suspeitos de serem aberrantes, a homogeneidade das variâncias dos resíduos (homo/heterocedasticidade) e a análise da variância da regressão.

A relação matemática entre o sinal e a concentração do analito de interesse deve ser determinada a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas desse analito. Tal relação matemática pode ser expressa como uma equação da reta denominada curva analítica. Na prática, a linha que define a reta deve ser constituída por pontos que podem variar de 3 a 7, e que não incluam o zero na curva, devido aos possíveis erros associados (THOMPSON *et al.*, 2002; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ISO/IEC 17025, 2005).

A linearidade do método analítico foi verificada através da plotagem da curva de calibração (curva analítica), onde o eixo x corresponde à concentração do analito e o eixo y à área do analito obtido na cromatografia, em cinco concentrações das soluções padrão: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,15µg/ml (valores aproximados) injetadas no CG/µDCE.

O presente trabalho se propôs a analisar 25 substâncias nas 20 amostras de leite selecionadas, coletadas pelo PAMVet. Cumpre enfatizar que as 25 substâncias foram analisadas criteriosamente seguindo tratamento estatístico descrito a seguir. Os valores das variáveis utilizadas para os cálculos da linearidade dos analitos se encontram sumarizados em tabelas no Anexo A.

Os valores aberrantes são aqueles que não fazem parte da população dos valores gerados durante as etapas de validação do método. Para a detecção desses valores é realizado o teste de Grubbs para o nível de significância $p=0,05$. Tal teste é realizado quando se deseja avaliar o menor e/ou maior valor suspeito de ser aberrante (THOMPSON *et al.*, 2002).

$$G_{\text{calculado}} = (y_{ij} - y_i)/s_{ij}$$

Onde: y_{ij} = valor suspeito de ser aberrante;

y_i = média dos valores obtidos para um determinada concentração i ;

s_{ij} = desvio padrão dos valores obtidos.

Se $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}} \rightarrow$ valor suspeito não é aberrante;

Se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}} \rightarrow$ valor suspeito é considerado aberrante.

Na tabela 6 são apresentados valores de G_{tabelado} para $n=3$, $n=4$, $n=5$, $n=6$ e $n=7$ (n é o número de replicatas).

Tabela 6: Valores de G_{tabelado} para o Número de Replicatas Correspondentes.

<i>n</i>	<i>G tabelado (95%)</i>
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020

Fonte: GRUBBS & BECK, 1972.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos a partir da aplicação do teste de Grubbs em todas áreas de todas as substâncias de interesse, nas cinco concentrações diferentes da curva analítica. Observando-se os gráficos de barras de cada substância analisada, note que as barras vermelhas correspondem aos valores de $G_{\text{calculado}}$ para as 15 áreas obtidas nos cromatogramas (3 injeções de cada uma das 5 concentrações) e que a linha azul paralela ao eixo x representa o valor de G_{tabelado} (1,155) para um número de replicatas igual a 3. Analisando-se tais variáveis, verifica-se que nenhuma das barras vermelhas ultrapassou o limite da linha azul e assim sendo, pode-se concluir que não existiram valores aberrantes.

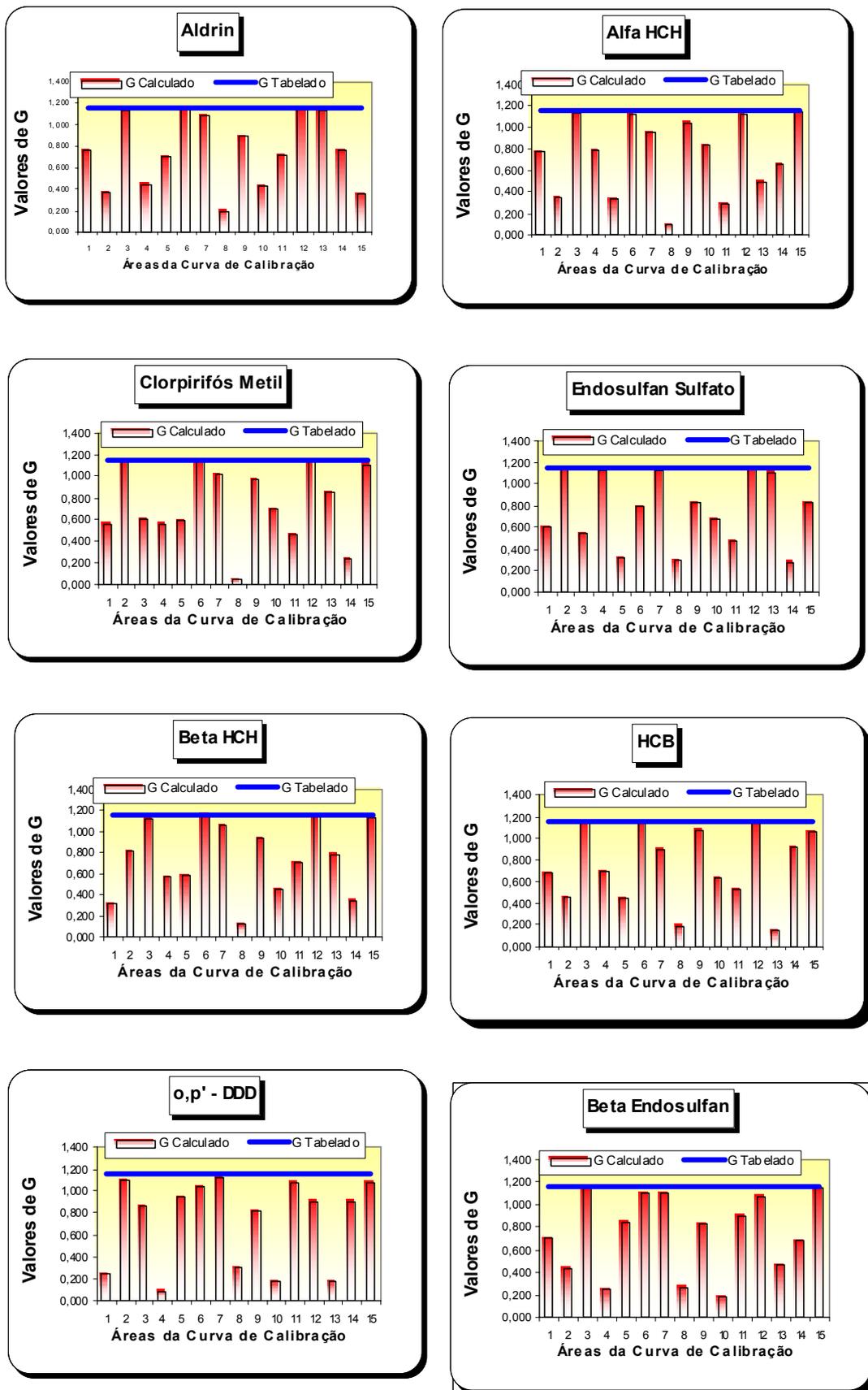


Figura 6: Representação gráfica do teste de Grubbs

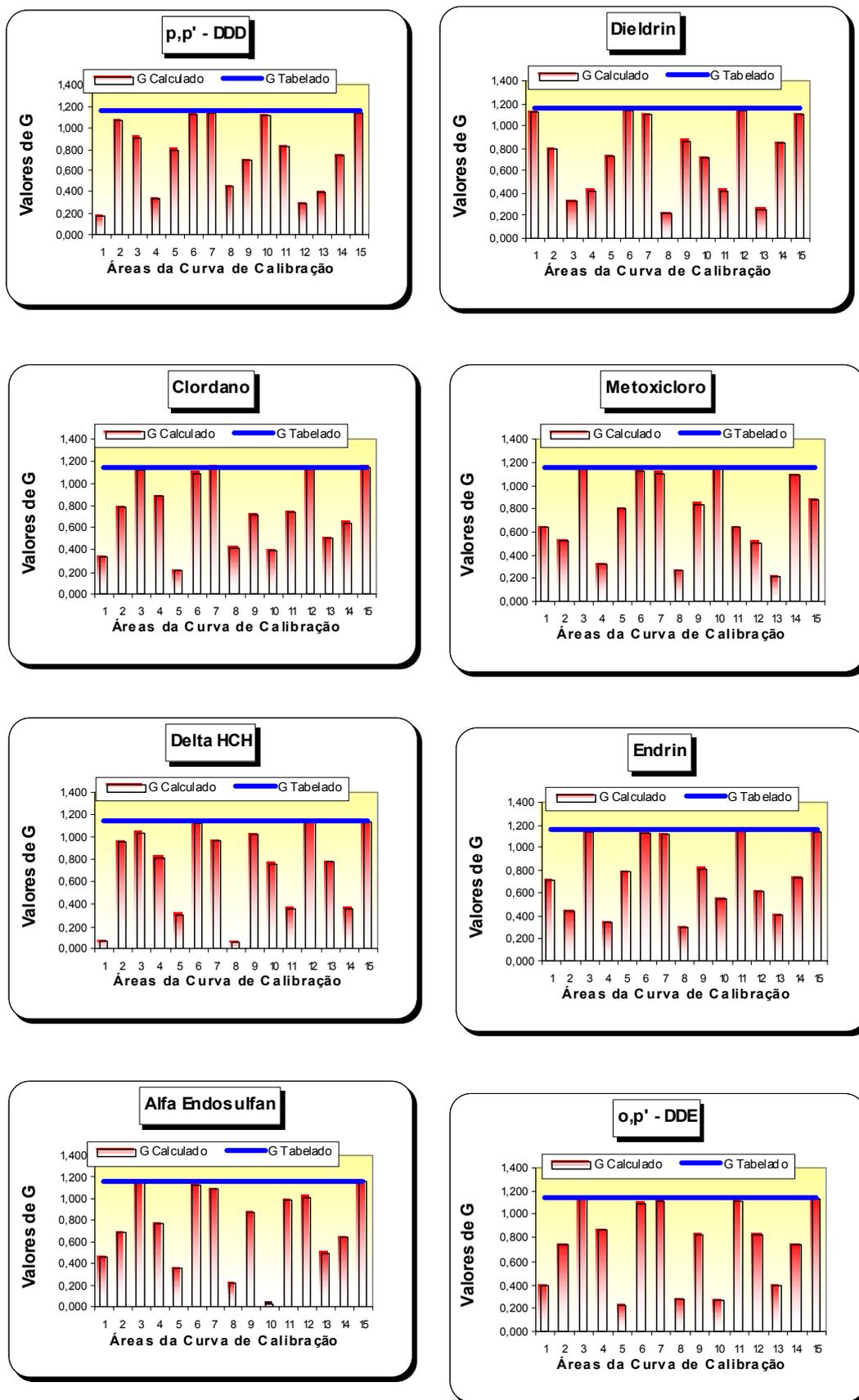


Figura 6: Representação gráfica do teste de Grubbs (cont.)

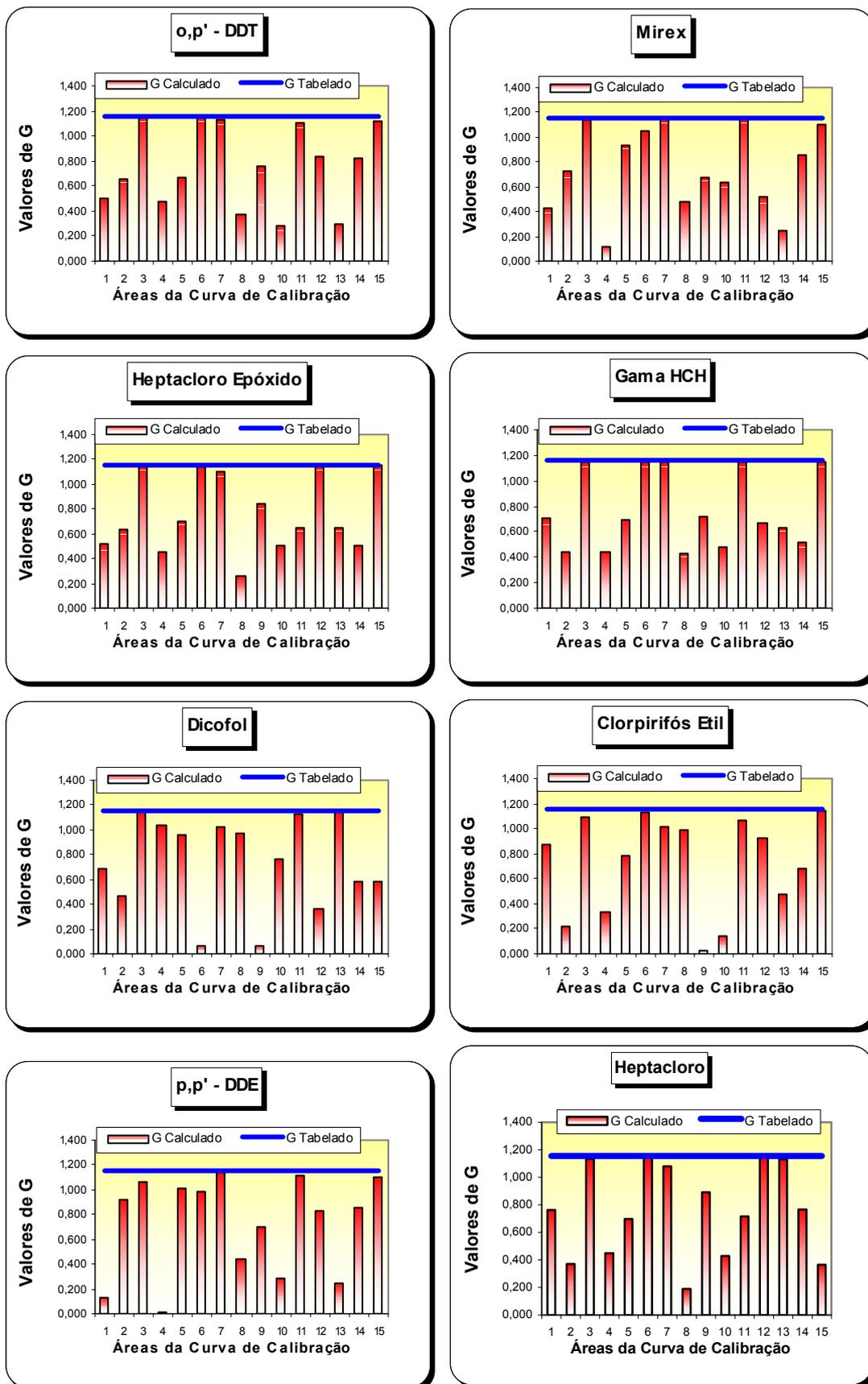


Figura 6: Representação gráfica do teste de Grubbs (cont.)

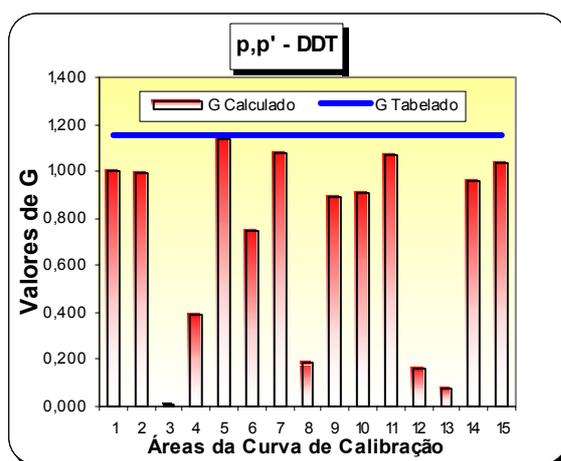


Figura 6: Representação gráfica do teste de Grubbs (cont.)

Ainda no que se refere à linearidade, foi verificada a homogeneidade das variâncias dos resíduos. Essa avaliação indica a homogeneidade ou heterogeneidade da variância dos resíduos da análise da regressão, através do teste de Cochran, aplicando a fórmula que se segue (THOMPSON *et al.*, 2002):

$$C_{\text{calculado}} = S^2_{\text{maior}} / \sum S^2_j$$

Onde: S^2_{maior} = maior variância;

$\sum S^2_j$ = somatório das variâncias.

Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}} \rightarrow$ As variâncias dos resíduos não são diferentes, há homocedasticidade;

Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}} \rightarrow$ As variâncias dos resíduos são diferentes, há heterocedasticidade.

Os valores de C_{tabelado} para $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$ e $n=6$ (n é o número de replicatas e k é o número de comparações) encontram-se sumarizados na tabela 7.

Tabela 7: Valores de cochran referentes ao número de replicatas (n) e comparações (k).

<i>k</i>	<i>n = 2</i>	<i>n = 3</i>	<i>n = 4</i>	<i>n = 5</i>	<i>n = 6</i>
3	0,967	0,871	0,798	0,746	0,707
4	0,906	0,768	0,684	0,629	0,590
5	0,841	0,684	0,598	0,544	0,506
6	0,781	0,616	0,532	0,480	0,445

Fonte: COSTA NETO, 1994.

Conforme ilustrado na Figura 7, os valores de $G_{\text{calculado}}$ para as 25 substâncias de interesse se apresentaram abaixo do valor de G_{tabelado} (0,684) para um número de repetições igual a 3 e para um número de comparações igual a 5. Uma exceção deve ser observada para o dicofol, cujo valor de $G_{\text{calculado}}$ se apresentou maior do que o valor de G_{tabelado} . Dessa forma, a equação da reta para a referida substância foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados ao passo que para os demais analitos, cujos valores de $G_{\text{calculado}}$ foram menores do que o valor de G_{tabelado} , as equações da reta foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

Note que as barras vermelhas representam os valores de $G_{\text{calculado}}$ pelo teste de Cochran para todas as substâncias estudadas e que a linha azul paralela ao eixo x representa o valor de G_{tabelado} (0,684) para o número de repetições igual a 3 e número de comparações igual a 5. Observe que das 25 substâncias analisadas apenas o dicofol não apresentou homogeneidade nas variâncias de seus resíduos

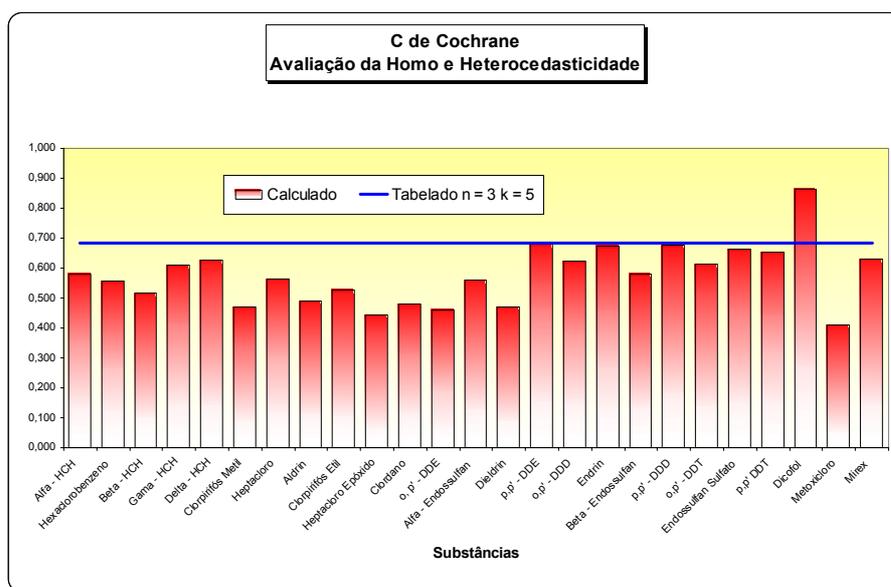


Figura 7: Representação gráfica dos valores de $G_{\text{calculado}}$ para a avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos das 25 substâncias de interesse.

Nos casos em que a hipótese de homocedasticidade foi confirmada, a equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Nos casos em que se confirmou a hipótese de heterocedasticidade, por outro lado, aplicou-se o método dos mínimos quadrados ponderados. Conforme visualizado na

Figura 7, todos os analitos investigados se apresentaram homocedásticos, com exceção do dicofol que se apresentou heterocedástico.

Realizada a análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários ou ponderados, o coeficiente de correlação linear (r) foi calculado e a equação da reta determinada. A Figura 8 apresenta as curvas analíticas dos analitos estudados.

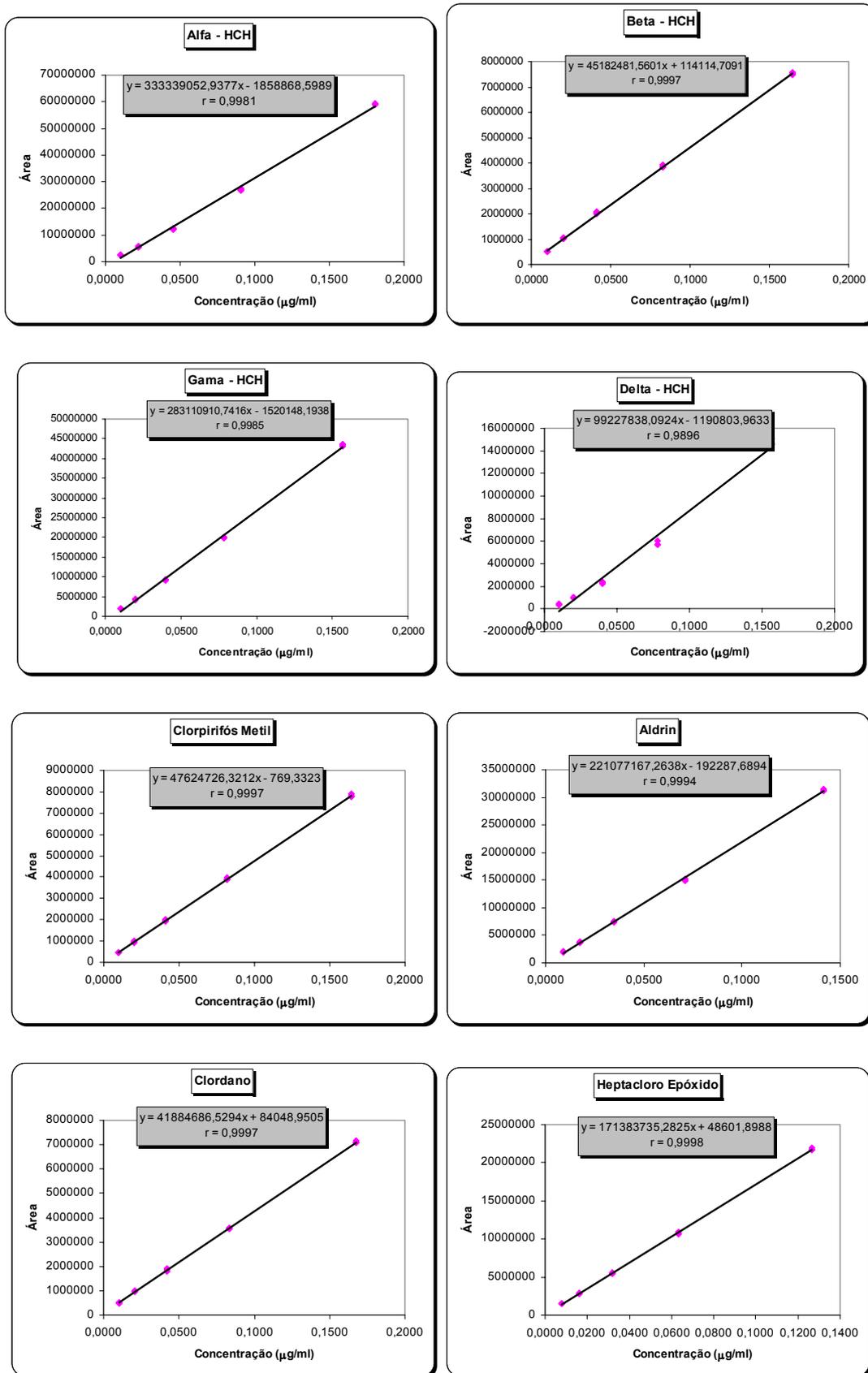


Figura 8: Representação das curvas analíticas das substâncias de interesse.

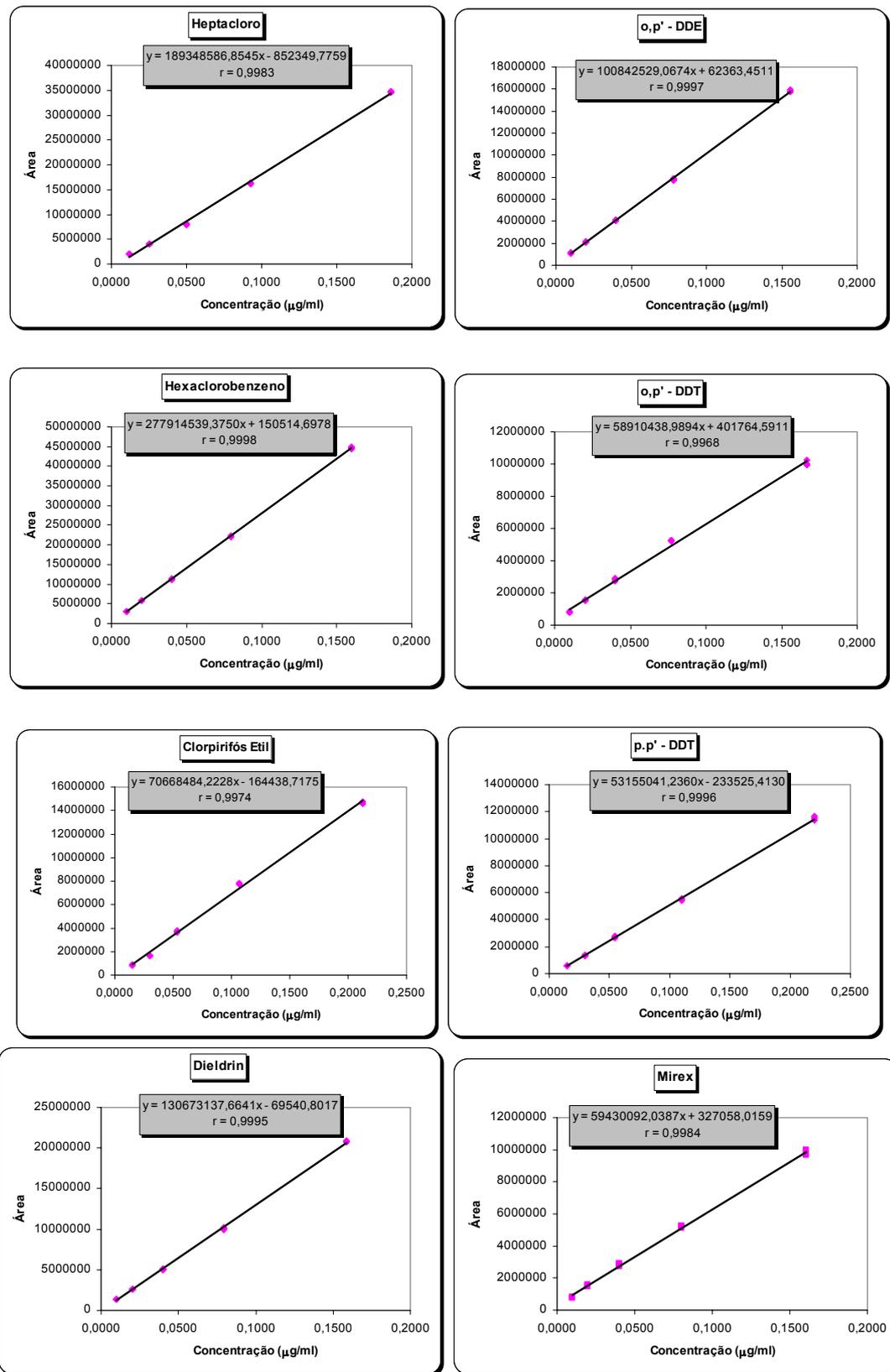


Figura 8: Representação das curvas analíticas das substâncias de interesse (cont.).

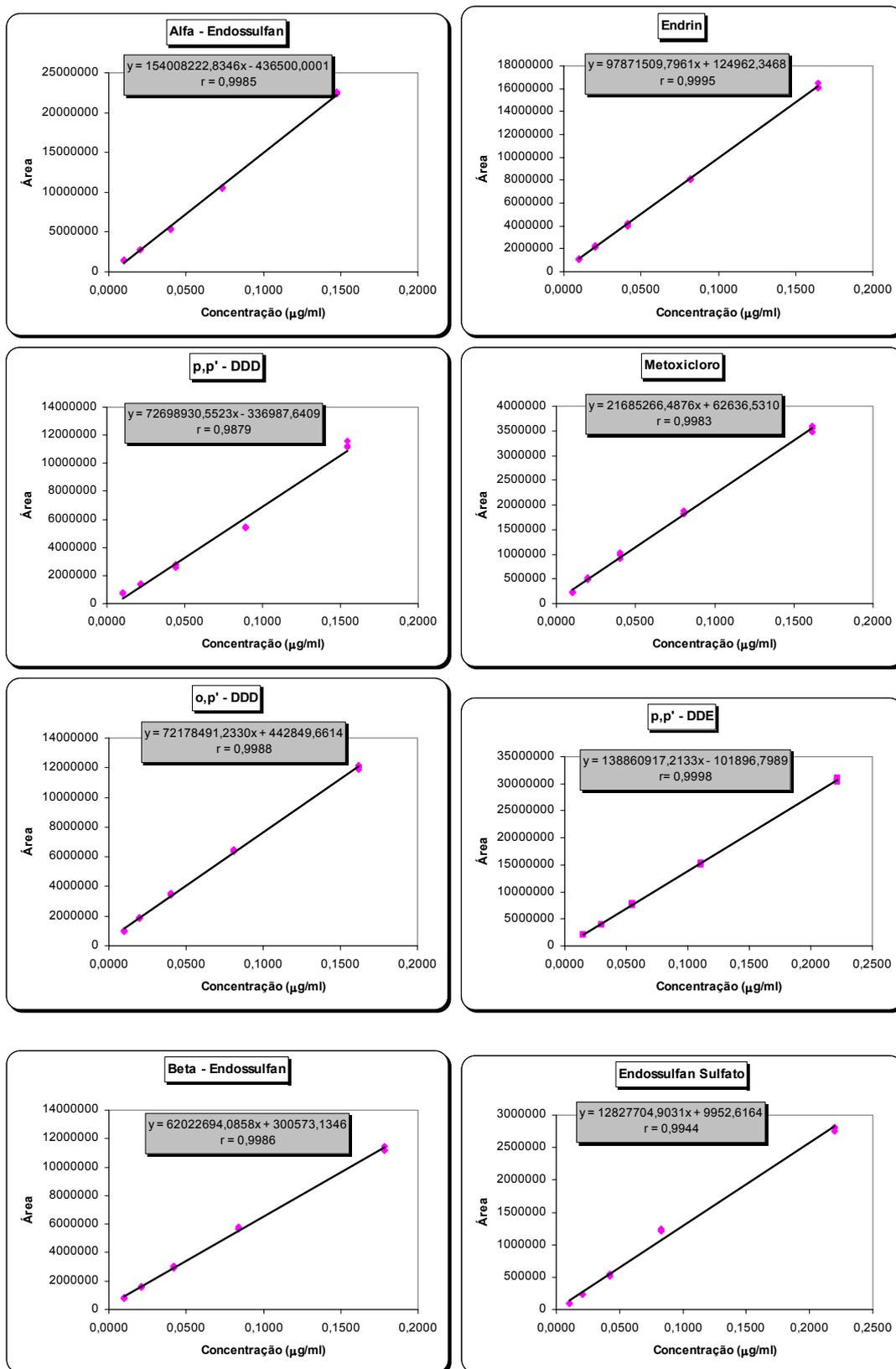


Figura 8: Representação das curvas analíticas das substâncias de interesse (cont.).

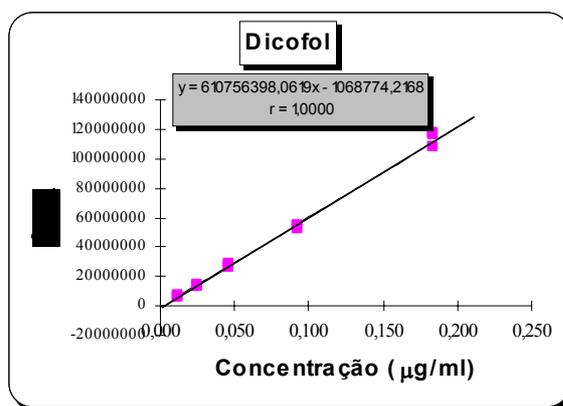


Figura 8: Representação das curvas analíticas das substâncias de interesse (cont.).

O coeficiente de correlação linear (r) expressa a relação de x e y na curva, cujos valores podem estar compreendidos no intervalo $-1 \leq r \leq +1$. Os valores ideais são $+1$ e -1 , ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior é a probabilidade de existir uma relação linear definida. Se os valores de r tenderem a zero, indicam que não há uma relação linear definida (MILLER & MILLER, 1988). Analisando-se a figura 7 se observa que os valores de r para os analitos estudados variaram entre 0,9948 e 0,999, o que indica que há uma relação linear entre as variáveis. Porém, embora o r indique a correlação do ajuste do modelo, ele não pode ser usado isoladamente para testar a linearidade. O r só é válido para a verificação da correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo método (x e y) através da reta de regressão. A avaliação de um modelo e a conclusão de que o ajuste da reta é satisfatório, indicando assim a significância estatística da curva ajustada, são comprovadas através do teste F (PIMENTEL & NETO, 1996). Para tal, foi utilizada análise de variância na regressão (ANOVA) para confirmar a regressão linear. Estudou-se a distribuição F , utilizada para realizar o teste de hipótese da equação da reta de regressão, onde a hipótese nula (H_0) considera o coeficiente angular $b = 0$ e a hipótese alternativa (H_1), $b \neq 0$. Se o $F_{\text{calculado}}$ for maior do que o $F_{\text{crítico}}$ ou $F_{\text{de significação}}$, a hipótese nula deve ser rejeitada e a hipótese alternativa, aceita (LÖWEN, 2003). Sendo assim, foi realizada a análise da variância da regressão (ANOVA) para a confirmação da regressão, cujos resultados se encontram na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de variância na regressão para a confirmação da regressão linear das substâncias avaliadas.

ANOVA					
Aldrin	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,11608E+15	2,11608E+15	7715,916705	2,01745E-19
Resíduo	13	3,56524E+12	2,74249E+11		
Total	14	2,11965E+15			
Alfa Endosulfan	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,07149E+14	1,07149E+14	51337,34586	9,09436E-25
Resíduo	13	27133093028	2087161002		
Total	14	1,07176E+14			
Alfa HCH	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	6,39986E+15	6,39986E+15	6874,908859	4,26623E-19
Resíduo	13	1,21017E+13	9,30901E+11		
Total	14	6,41196E+15			
Beta Endosulfan	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,87325E+15	1,87325E+15	1,165358099	0,29997906
Resíduo	13	2,08968E+16	1,60745E+15		
Total	14	2,27701E+16			
Beta HCH	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	9,66078E+13	9,66078E+13	37639,1502	6,8342E-24
Resíduo	13	33366905747	2566685057		
Total	14	9,66412E+13			
Clordano	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	8,57864E+13	8,57864E+13	47008,46469	1,61207E-24
Resíduo	13	23723886115	1824914317		
Total	14	8,58101E+13			
Clorpirifós Etil	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3,84998E+14	3,84998E+14	4964,392176	3,52563E-18
Resíduo	13	1,00817E+12	77551855152		
Total	14	3,86006E+14			
Clorpirifós Metil	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,07149E+14	1,07149E+14	51337,34586	9,09436E-25
Resíduo	13	27133093028	2087161002		
Total	14	1,07176E+14			
Delta HCH	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,17083E+14	4,17083E+14	1233,722798	2,86236E-14
Resíduo	13	4,39489E+12	3,38068E+11		
Total	14	4,21477E+14			
Dicofol	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,96314E+13	1,96314E+13	8333,006564	6,09123E-16
Resíduo	10	23558571988	2355857199		
Total	11	1,96549E+13			
Dieldrin	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,97207E+14	2,97207E+14	3573,258239	3,17615E-16
Resíduo	12	9,98104E+11	83175309278		
Total	13	2,98205E+14			
Endosulfan Sulfato	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,45081E+13	1,45081E+13	3926,513318	1,61251E-17
Resíduo	13	48033882361	3694914028		
Total	14	1,45562E+13			
Endrin	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,5254E+14	4,5254E+14	25870,24707	7,8114E-23
Resíduo	13	2,27405E+11	17492693019		
Total	14	4,52768E+14			

Tabela 8: Análise de variância na regressão para a confirmação da regressão linear das substâncias avaliadas.

ANOVA					
Gama HCH	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,87325E+15	1,87325E+15	1,165358099	0,29997906
Resíduo	13	2,08968E+16	1,60745E+15		
Total	14	2,27701E+16			
HCB	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3,43793E+15	3,43793E+15	86130,14554	3,15029E-26
Resíduo	13	5,18901E+11	39915492939		
Total	14	3,43845E+15			
Heptacloro	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,11608E+15	2,11608E+15	7715,921398	2,01744E-19
Resíduo	13	3,56523E+12	2,74249E+11		
Total	14	2,11965E+15			
Heptacloro Epóxido	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,07149E+14	1,07149E+14	51337,34586	9,09436E-25
Resíduo	13	27133093028	2087161002		
Total	14	1,07176E+14			
Metoxicloro	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,1442E+13	2,1442E+13	7753,30744	1,95514E-19
Resíduo	13	35951902985	2765530999		
Total	14	2,1478E+13			
Mirex	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,58574E+14	1,58574E+14	8233,887579	1,32333E-19
Resíduo	13	2,50363E+11	19258700310		
Total	14	1,58824E+14			
o,p DDD	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,38313E+14	2,38313E+14	11054,02664	1,95558E-20
Resíduo	13	2,80266E+11	21558957158		
Total	14	2,38594E+14			
o,p DDE	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,26964E+14	4,26964E+14	41045,28418	3,89234E-24
Resíduo	13	1,35229E+11	10402267805		
Total	14	4,27099E+14			
o,p DDT	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,67863E+14	1,67863E+14	18496,24036	6,90817E-22
Resíduo	13	1,17982E+11	9075532453		
Total	14	1,67981E+14			
p,p DDD	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,22776E+14	2,22776E+14	9017,274351	7,33621E-20
Resíduo	13	3,21171E+11	24705430144		
Total	14	2,23097E+14			
p,p DDE	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,62437E+15	1,62437E+15	36491,96612	8,35672E-24
Resíduo	13	5,78669E+11	44512998042		
Total	14	1,62495E+15			
p,p DDT	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,34541E+14	2,34541E+14	32044,02235	1,94461E-23
Resíduo	13	95151504371	7319346490		
Total	14	2,34636E+14			

gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial.

Note que para todas as substâncias analisadas o valor de F de significação foi menor do que o valor de F calculado. Dessa forma, a hipótese nula pôde ser rejeitada e a hipótese alternativa aceita e, a regressão linear para todos os analitos estudados aceita.

Na análise de resíduos, para que a linearidade seja considerada significativa, o valor de $F_{\text{calculado}}$ pela ANOVA, tem que ser maior do que o $F_{\text{crítico}}$. Nesse caso, de acordo com a Figura 8, os valores de $F_{\text{calculado}}$ para todas as substâncias de interesse foram menores do que seus respectivos valores de $F_{\text{crítico}}$, logo a regressão linear para todos os analitos foi confirmada e aceita.

V. 2. 4. Estudo dos limites de detecção e quantificação

V.2. 4. 1. Limite de detecção (LD)

O LD corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas que não necessariamente pode ser quantificada, com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento analítico (THOMPSON *et al.*, 2002).

Utilizou-se o método da relação sinal/ruído para o cálculo do LD. Neste, foi estabelecida uma comparação entre o sinal do ruído da linha base do cromatograma e o sinal da resposta dos analitos de interesse, na menor concentração conhecida na matriz (0,01 μ g/ml). Dessa forma, foi identificada uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada com confiabilidade. A relação sinal/ruído aceita como estimativa do limite de detecção foi 3:1, o que significa dizer que o sinal das respostas dos analitos de interesse foi 3 vezes maior do que o sinal do ruído da linha base do cromatograma (RIBANI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2002).

Os valores dos LD para as substâncias analisadas no estudo são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Limites de detecção das 25 substâncias analisadas em leite longa vida.

Agrotóxico	LD (mg/kg)
Alfa - HCH	0,0005
Hexaclorobenzeno	0,0006
Beta - HCH	0,0007
Gama - HCH	0,0002
Delta - HCH	0,0002
Clorpirifós Metil	0,0006
Heptacloro	0,0005
Aldrin	0,0007
Clorpirifós Etil	0,0004
Heptacloro Epóxido	0,0004
Clordano	0,0005
<i>o, p'</i> - DDE	0,0004
Alfa - Endossulfan	0,0003
Dieldrin	0,0004
<i>p, p'</i> - DDE	0,0006
<i>o, p'</i> - DDD	0,0004
Endrin	0,0004
Beta - Endossulfan	0,0004
<i>p, p'</i> - DDD	0,0003
<i>o, p'</i> - DDT	0,0003
Endossulfan Sulfato	0,0003
<i>p, p'</i> DDT	0,0004
Dicofol	0,0005
Metoxicloro	0,0005
Mirex	0,0006

V.2. 4. 2. Limite de quantificação (LQ)

O LQ corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser medida de maneira quantitativa, com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento analítico (THOMPSON *et al.*, 2002).

Assim como feito no cálculo do LD, utilizou-se o método da relação sinal/ruído para o cálculo do LQ. Dessa forma, foi estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser quantificada com precisão e exatidão. A relação sinal/ruído aceita como estimativa do limite de quantificação foi 10:1, o que significa dizer que o sinal das respostas dos analitos de interesse foi 10 vezes maior do que o sinal do ruído da linha base do cromatograma (RIBANI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2002).

Os valores dos LQ para as substâncias analisadas no estudo são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Limites de quantificação determinados para as 25 substâncias analisadas em leite longa vida

Agrotóxico	LQ (mg/kg)
Alfa - HCH	0,002
Hexaclorobenzeno	0,002
Beta - HCH	0,002
Gama - HCH	0,001
Delta - HCH	0,001
Clorpirifós Metil	0,002
Heptacloro	0,002
Aldrin	0,002
Clorpirifós Etil	0,001
Heptacloro Epóxido	0,001
Clordano	0,001
<i>o, p'</i> - DDE	0,001
Alfa - Endossulfan	0,001
Dieldrin	0,001
<i>p, p'</i> - DDE	0,002
<i>o, p'</i> - DDD	0,001
Endrin	0,001
Beta - Endossulfan	0,001
<i>p, p'</i> - DDD	0,001
<i>o, p'</i> - DDT	0,001
Endossulfan Sulfato	0,001
<i>p, p'</i> DDT	0,001
Dicofol	0,002
Metoxicloro	0,002
Mirex	0,002

Neste momento, deve-se ressaltar a sensibilidade do método de análise de resíduos de agrotóxicos descrito na presente dissertação. O fato é sustentado pelos valores estimados de LD e LQ, notadamente baixos. Assim sendo, este método se destaca por possibilitar a detecção de resíduos OCs, cujos LMR estabelecidos já não têm registro em função da noção de que a interrupção de seu uso os isenta do potencial residual em alimentos. Ademais, o presente método reporta LQ para o clorpirifós etil uma ordem de grandeza inferior ao LMR estabelecido pela ANVISA, isto é, 0,001mg/kg e 0,01mg/kg, respectivamente.

V.2. 5. Precisão

V.2.5.1. Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV)

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade. Essas englobam: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (THOMPSON *et al.*, 2002).

Para o estudo da repetitividade do método, foram realizados testes com a adição das soluções intermediárias de concentrações 0,01µg/ml; 0,04µg/ml e 0,15µg/ml ao branco do leite. Solubilizou-se 0,5g da gordura do branco em solvente eluente (ciclohexano/acetato de etila, 1:1 v/v) e, em seguida a gordura foi filtrada em unidade filtrante e a ela foi adicionado 0,5ml da solução intermediária de determinada concentração (fortificação). Transferiu-se para a coluna de permeação em gel e o restante do procedimento seguiu criteriosamente a metodologia descrita anteriormente para a mistura de padrões das substâncias de interesse.

Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada solução intermediária de concentração diferente, totalizando 9 experimentos.

A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas em cada concentração estudada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) e/ou coeficiente de variação (CV%).

$$\text{DPR \% ou CV\%} = (s_j \times 100)/y$$

Onde: s_j =desvio padrão das leituras j no nível de concentração estudado;

y =média dos resultados obtidos.

O intervalo aceitável de variação para as análises de resíduos é menor ou igual a 20%.

Entretanto, a amostra de leite utilizada como branco apresentou o analito clorpirifós etil e nesse caso em particular, os cálculos para exatidão e precisão requereram correções nos valores encontrados. Para tal, foi avaliado o valor da área do clorpirifós etil no branco e então, para cada concentração de fortificação foi subtraída a área do branco.

Os resultados dos coeficientes de variação se encontram na Tabela 11.

Tabela 11: Coeficiente de Variação (%) dos Analitos Determinados em Leite Longa Vida

Agrotóxico	CV (%)
Alfa - HCH	5,5 - 19,2
Hexaclorobenzeno	4,9 - 17,7
Beta - HCH	5,2 - 15,7
Gama - HCH	5,0 - 18,2
Delta - HCH	5,4 - 18,2
Clorpirifós Metil	4,0 - 10,4
Heptacloro	5,4 - 16,2
Aldrin	4,7 - 17,6
Clorpirifós Etil	4,6 - 8,8
Heptacloro Epóxido	4,6 - 19,7
Clordano	7,0 - 12,4
<i>o, p'</i> - DDE	3,6 - 17,5
Alfa - Endossulfan	3,5 - 18,4
Dieldrin	8,3 - 12,4
<i>p, p'</i> - DDE	5,4 - 20,7
<i>o, p'</i> - DDD	5,8 - 16,7
Endrin	7,6 - 18,5
Beta - Endossulfan	6,3 - 18,7
<i>p, p'</i> - DDD	5,6 - 17,4
<i>o, p'</i> - DDT	7,5 - 18,4
Endossulfan Sulfato	5,9 - 14,9
<i>p, p'</i> DDT	7,8 - 17,6
Dicofol	5,8 - 9,1
Metoxicloro	7,0 - 9,0
Mirex	9,4 - 14,5

V.2. 6. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (THOMPSON *et al.*, 2002). Os ensaios de exatidão foram realizados através da avaliação das taxas de recuperação dos analitos.

V.2. 6. 1. Taxa de recuperação

A taxa de recuperação é a relação existente entre a quantidade do analito a ser analisado, obtido após seguir o procedimento analítico completo, e a quantidade adicionada no início do procedimento, expressa em porcentagem.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos estão na tabela 12.

Tabela 12: Critérios de Aceitação da Recuperação de Método Quantitativo

Concentração	Faixa de recuperação aceitável (%)
≤1µg/kg	50-120
>1µg/kg≤0,01mg/kg	60-120
>0,01mg/kg≤0,1mg/kg	70-120
>0,1mg/kg ≤1mg/kg	70-110
>1mg/kg	70-110

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS, 2000; SANCO, 2004.

O procedimento analítico para a avaliação das taxas de recuperação dos analitos de interesse seguiu criteriosamente a metodologia abordada para o estudo da repetitividade.

A avaliação estatística da exatidão foi executada através do cálculo do percentual esperado, ou seja, a relação percentual entre a abundância da área do analito encontrada, em cada concentração, e a abundância esperada (referente à concentração conhecida do analito).

Conforme visualizado na Figura 9, todas as substâncias avaliadas apresentaram taxas de recuperação dentro do intervalo estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (Tabela 12), exceto o mirex, que na concentração mais baixa, o valor da taxa de recuperação excedeu o limite preconizado (153%). Provavelmente isso se deveu a um interferente do branco (Figura 4), cujo pico se mostrou bem próximo ao pico do mirex, o que dificultou a identificação/quantificação. Dessa forma, a validação do presente analito não foi possível ser concluída, havendo a necessidade de estudos futuros. Vale ressaltar que em métodos multiresíduos é difícil obter resultados satisfatórios para todas as substâncias de interesse (SALAS *et al.*, 2003)

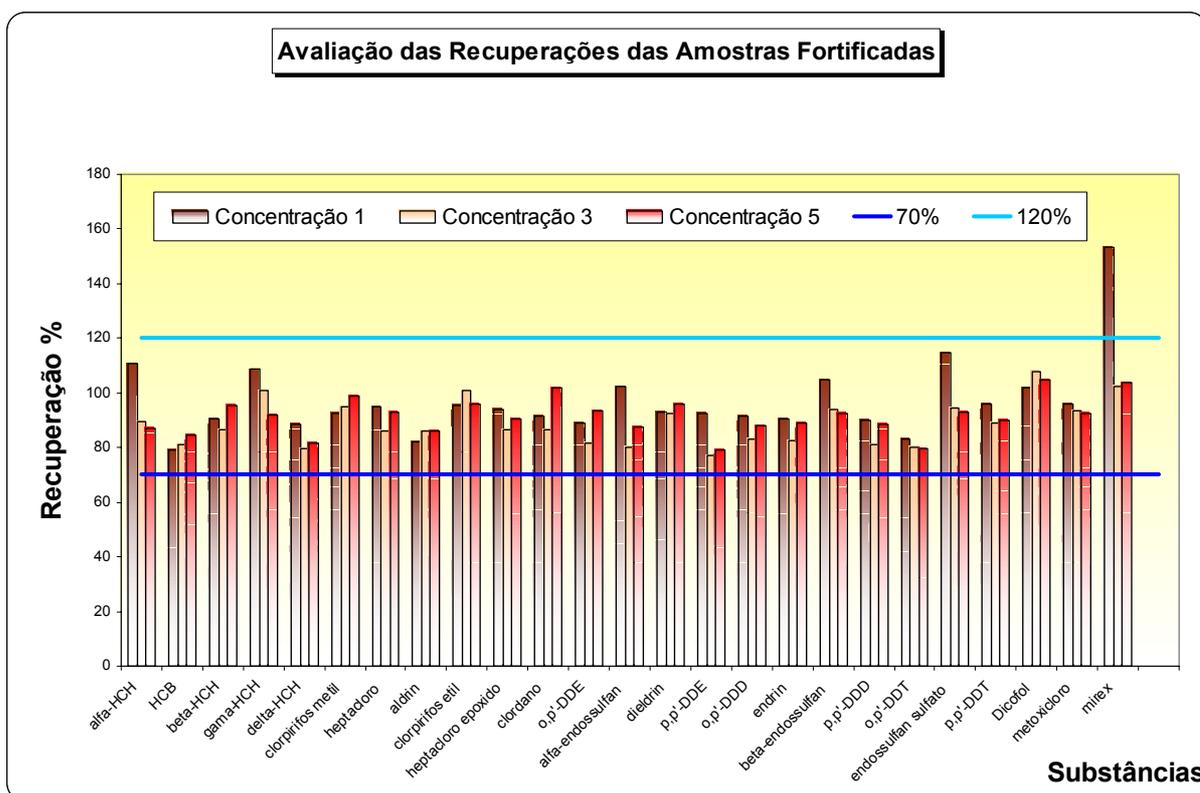


Figura 9: Representação gráfica da avaliação das recuperações do branco do leite fortificado com as substâncias estudadas nas concentrações 1 (0,01mg/kg;), 3 (0,04 mg/kg) e 5 (0,15 mg/kg).

As barras marrons representam os valores das taxas de recuperação para a concentração 1. As barras bege correspondem aos valores das taxas de recuperação para a concentração 3 e as barras vermelhas representam os valores das taxas de recuperação para a concentração 5. As linhas azul clara e azul escura, ambas paralelas ao eixo x, representam respectivamente, os valores mínimo (70%) e máximo (120%) das taxas de recuperação aceitáveis pelo *Codex Alimentarius* para a análise de resíduos de agrotóxicos. Note que de todas as substâncias analisadas, apenas o mirex apresentou valor de taxa de recuperação excedente à linha limite máximo de 120%, o que impossibilitou sua validação no presente método analítico.

V. 3. Análise das Amostras de Leite Longa Vida

Concluída a validação do método analítico proposto, procedeu-se com as análises das 20 amostras de leite longa vida. As referidas análises seguiram rigorosamente as etapas descritas em detalhe no processo de determinação do branco da matriz.

Cada amostra foi analisada quanto à presença de resíduos de alfa-HCH, HCB, beta-HCH, gama-HCH, delta-HCH, clorpirifós metil, clorpirifós etil, heptacloro, heptacloro epóxido, clordano, *o, p'* – DDE, alfa-endosulfan, dieldrin, *p,p'* – DDE, *o,p'* – DDD, endrin, beta-endosulfan, *p,p'* – DDD, *o,p'* – DDT, endosulfan sulfato, *p,p'* DDT, dicofol, metoxicloro e mirex. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

Observou-se que das 20 amostras de leite longa vida analisadas, 10% apresentaram resíduos de *p,p'* DDE variando de 0,009 a 0,015mg/kg, 50% resíduos de metoxicloro variando de 0,001 a 0,018mg/kg e em 75% foram detectados resíduos de clorpirifós etil entre 0,182 e 2,846mg/kg. As demais substâncias avaliadas apresentaram teores abaixo dos limites de quantificação do método analítico utilizado.

Tabela 13: Níveis de Organoclorados e Organofosforados em amostras de leite longa vida, 2005.

Agrotóxico	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Alfa - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Hexaclorobenzeno	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Beta - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Gama - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Delta - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clorpirifós Metil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Heptacloro	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
ALQrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clorpirifós Etil	0,183 mg/kg	1,800 mg/kg	1,206 mg/kg	0,827 mg/kg	< LQ	0,797 mg/kg	< LQ	< LQ	0,823 mg/kg	< LQ
Heptacloro Epóxido	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clordano	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
o, p' - DDE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Alfa - Endossulfan	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
DieLQrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
p,p' - DDE	0,015 mg/kg	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,009 mg/kg	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
o,p' - DDD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Endrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Beta - Endossulfan	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< L	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
p,p' - DDD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
o,p' - DDT	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Endossulfan Sulfato	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
p,p' DDT	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dicofol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metoxicloro	0,004 mg/kg	0,018 mg/kg	0,012 mg/kg	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,013 mg/kg	0,005 mg/kg
Mirex	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

< LQ=menor que o limite de quantificação.

Tabela 13: Níveis de Organoclorados (OCs) e Organofosforados (OFs) em amostras de leite longa vida, 2005 (cont.).

<i>Agrotóxico</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>	<i>A13</i>	<i>A14</i>	<i>A15</i>	<i>A16</i>	<i>A17</i>	<i>A18</i>	<i>A19</i>	<i>A20</i>
Alfa - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Hexaclorobenzeno	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Beta - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Gama - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Delta - HCH	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clorpirifós Metil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Heptacloro	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
ALQrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clorpirifós Etil	< LQ	0,182 mg/kg	0,236 mg/kg	0,360 mg/kg	0,971 mg/kg	0,158 mg/kg	2,847 mg/kg	0,461 mg/kg	0,598 mg/kg	1,066 mg/kg
Heptacloro Epóxido	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Clordano	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>o, p'</i> - DDE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Alfa - Endossulfan	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
DieLQrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>p, p'</i> - DDE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>o, p'</i> - DDD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Endrin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Beta - Endossulfan	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>p, p'</i> - DDD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>o, p'</i> - DDT	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Endossulfan Sulfato	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
<i>p, p'</i> DDT	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dicofol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metoxicloro	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,014 mg/kg	< LQ	0,004 mg/kg	0,001 mg/kg	0,010 mg/kg	0,009 mg/kg
Mirex	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

< LQ=menor que o limite de quantificação.

Vários países têm se preocupado com o monitoramento de resíduos de agrotóxicos no leite de vaca, principalmente os OCs. Essas substâncias apresentam elevada lipossolubilidade, estabilidade química e pronunciada ação residual, podendo se acumular nos tecidos adiposos dos organismos vivos e serem detectados no leite. Entretanto, os OCs tiveram seu uso proibido em função de suas principais características, anteriormente listadas. Conseqüentemente, foram gradativamente substituídos pelos OFs, não menos tóxicos do que os OCs, porém, menos persistentes do que eles (SALAS *et al.*, 2003; PAGLIUCA *et al.*, 2004).

Poucos trabalhos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite de vaca vêm sendo realizados no Brasil. Os primeiros estudos foram conduzidos pelo Instituto Adolfo Lutz, nos quais Almeida e Barreto (1971) analisaram 17 amostras de leite de vaca consumido na cidade de São Paulo. Foram detectados isômeros de HCH em teores que variavam entre 0,005 e 0,007mg/kg em todas as amostras analisadas. Entre os anos de 1997 e 1998, Ciscato *et al.* (2002) estudaram a presença de resíduos de OCs em amostras de leite de vaca pasteurizado coletadas no comércio da cidade de São Paulo. Os resultados das análises das 132 amostras de leite mostraram que 0,76% apresentaram resíduos de α – HCH (0,01mg/kg) e 10,6%, resíduos de endosulfan (isômeros α e β) (0,01mg/kg). Não foram detectados resíduos de OFs, carbamatos e piretróides nas amostras analisadas.

A tabela 14 apresenta os resultados reportados por estudos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em amostras de leite realizados em diversos países. Os achados desses estudos comprovaram que embora os OCs tenham sido proibidos na década de 70 na maioria dos países, seus resíduos continuam sendo detectados no leite.

Tabela 14: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras de leite de vaca analisadas em diferentes países.

<i>Local</i>	<i>Período Estudado</i>	<i>Agrotóxicos Encontrados</i>	<i>Resultados (mg/kg)</i>	<i>Referência</i>	<i>Observações</i>
Agra (Índia)	-	γ e β - HCH <i>p,p'</i> - DDE <i>p,p'</i> - DDT <i>o,p'</i> - DDT	0,048 0,055 0,040 0,01	KUMAR et al., 2005.	Análise em leite total
São Paulo (Brasil)	1971	HCH	0,007-0,005	ALMEIDA & BARRETO, 1971.	-
São Paulo (Brasil)	1980	α , β e γ - HCH	0,03-0,48	LARA et al., 1980.	-
Paso San Juan, Medellín e Tlalixcojan (México)	-	<i>p,p'</i> - DDE <i>o,p'</i> - DDT	0,018-0,039 0,026	PARDIO et al., 2003.	Análise em leite total
Veracruz (México)	1998-2001	β - HCH <i>p,p'</i> - DDT <i>p,p'</i> - DDE	0,087-0,106 0,037-0,078 0,033-0,051	WALISZEWSKI et al., 2003.	Análise na gordura do leite
Jaipur (Índia)	1993-1996	<i>p,p'</i> - DDE aldrin heptacloro heptacloro epóxido	0,030-0,246 0,074-0,674 0,52-1,442 0,066-0,617	JOHN et al., 2001.	Análise em leite total
São Paulo (Brasil)	1997-1998	endosulfan α - HCH	0,01-0,15 0,01	CISCATO et al., 2003.	Análise na gordura do leite
Lusiânia (Índia)	1999-2001	HCH (total) DDT (total)	0,001-0,98 0,001-0,46	BATTU et al., 2004.	Análise em leite total
Espanha	-	<i>p,p'</i> - DDE DDT (total) HCH (total) aldrin dieltrin clordano heptacloro (total)	0,003-0,538 0,002-0,538 0,002-0,0756 0,0003 0,001-0,170 0,002-1,004 0,013-0,536	MARTINÉZ et al., 1997.	Análise na gordura do leite
Eslovênia	1994-1998	HCH (total) lindano DDT (total)	0,003-0,008 0,003-0,023 0,007-0,091	CERKVENIK et al., 2000.	Análise na gordura do leite
Veracruz (México)	1996	HCH (total) α - HCH β - HCH γ - HCH DDT (total) <i>o,p'</i> - DDT <i>p,p'</i> - DDD <i>p,p'</i> - DDT <i>p,p'</i> - DDE HCB α - endosulfan β - endosulfan	0,093-0,094 0,011-0,020 0,018-0,104 0,014-0,052 0,049-0,159 0,044-0,014 0,000-0,014 0,036-0,141 0,060-0,018 0,006-0,019 0,006-0,010 0,006-0,010	WALISZEWSKI et al., 1997.	Análise na gordura do leite
Maharashtra (Índia)	1999	α - HCH β - HCH γ - HCH δ - HCH HCH (total) TDE DDE DDT DDT (total)	0,001-0,006 0,002-0,015 0,002-0,004 0,002-0,002 0,001-0,023 0,003-0,011 0,002-0,007 0,009-0,019 0,014-0,027	PANDIT et al., 2002.	Análise na gordura do leite em pó

Tabela 14: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras de leite de vaca analisadas em diferentes países.(cont.)

Local	Período Estudado	Agrotóxicos Encontrados	Resultados (mg/kg)	Referência	Observações
Lucknow (Índia)	-	<i>p,p'</i> - DDE <i>p,p'</i> - DDT <i>o,p'</i> - DDT DDT (total) α - HCH β - HCH γ - HCH δ - HCH HCH (total)	0,005-0,010 0,002-0,010 0,001-0,005 0,014-0,033 0,028-0,089 0,020-0,115 0,009-0,067 0,004-0,009 0,088-0,277	NIGAM & SIDDIQUI, 2001.	Análise em leite total
Itália	-	clorpirifós etil acefato	<0.02 <0.1	PAGLIUCA et al., 2004.	Análise em leite total
México	-	diclorvós mevinfós forato dimetoato disulfoton parationa metílica malationa clorpirifós clorfenvinfós	0.0146-0.2994 0.0160-0.0354 0.0481-0.1728 0.010-0.0161 0.0050-0.0170 0.0068-0.0253 0.0190-0.0271 0.0133 0.0117-0.2063	SALAS et al., 2003.	Análise em leite total
Rio de Janeiro (Brasil)	2005	<i>p,p'</i> - DDE metoxicloro clorpirifós etil	0,0085-0,0152 0,0005-0,0179 0,1822-2,8460	Presente estudo	Análise na gordura do leite em pó

Os isômeros do agrotóxico DDT, encontrados nas amostras de leite analisadas no presente estudo (*p,p'*-DDE → 0,009 - 0,015mg/kg) também foram detectados em outros países como Índia, Espanha, México e Argentina. Martínéz *et al.* (1997), na Espanha, analisaram a gordura de amostras de leite e encontraram principalmente resíduos de *p,p'*-DDE na faixa de 0,003 - 0,538mg/kg, dentre os isômeros do DDT. Os autores verificaram uma redução na detecção dos isômeros *o,p'* nas amostras analisadas na Espanha. Comparando-se seus resultados com outros estudos realizados nesse mesmo país, Martínéz *et al.* (1997) notaram, unicamente, a presença de *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDE e, atribuíram esse achado ao fato de que os isômeros *p,p'* sejam química e metabolicamente mais estáveis do que os isômeros *o,p'*. A esse respeito, John *et al.* (2001) detectaram 0,030 - 0,246mg/kg de resíduos de *p,p'*-DDE em amostras de leite total analisadas na Índia entre os anos de 1993-1996. Nigam & Siddiqui (2001) analisaram nesse mesmo país, amostras de leite total e seus resultados mostraram a presença de *p,p'*-DDE (0,005 - 0,010mg/kg), *p,p'*-DDT (0,002 - 0,010mg/kg) e *o,p'*-DDT (0,001-0,005mg/kg). Ainda

na Índia, estudo realizado em 1999 por Pandit *et al.* (2002), na gordura de amostras de leite em pó, reportou a presença de DDE numa faixa de concentração de 0,002 - 0,007mg/kg e de DDT entre 0,009 e 0,019mg/kg. Estudo publicado em 2005 por Kumar *et al.* (Índia) revelou a presença de *p,p'*-DDE (0,055mg/kg); *p,p'*-DDT (0,040mg/kg) e *o,p'*-DDT (0,01mg/kg) nas amostras de leite total analisadas. Os achados desses estudos realizados na Índia confirmaram o uso atual de OCs, especialmente de DDT, no combate a propagação de vetores transmissores de doenças como malária. No México, Waliszewski *et al.*(2003) realizaram estudos da concentração de OCs na gordura de amostras de leite no ano de 1997 e entre os anos de 1998 e 2001. Os achados desses estudos comprovaram uma diminuição significativa nas concentrações dos isômeros do DDT nas amostras analisadas no ano de 2001, se comparado aos anos anteriores. Tal fato foi atribuído à substituição dos inseticidas OCs por piretróides no combate a malária, em 1999 no México.

Embora os isômeros do agrotóxico HCH não tenham sido detectados nas amostras analisadas no presente estudo, a maioria dos trabalhos relacionados, inclusive os realizados no Brasil, os detectou em suas análises. Vale ressaltar que, comparando-se os resultados obtidos nesses estudos, pode-se concluir que o nível de contaminação com OCs vem diminuindo ao longo dos anos. Ainda em 1997-1998, o trabalho realizado por Ciscato *et al.* (2002) reportou baixos níveis de resíduos de HCH no leite, fato não observado no estudo atual.

Na análise da contaminação por metoxicloro no presente estudo, pudemos constatar que os níveis de resíduos variaram de 0,001 a 0,018mg/kg. Avaliando-se criteriosamente os resultados apresentados na tabela 14, observa-se que nenhum dos trabalhos citados reportou resíduos dessa substância nas amostras de leite analisadas. Em estudo publicado por Bordet *et al.*, em 2002. os autores reforçam a importância do uso de pelo menos 2 colunas com fases estacionárias de diferentes polaridades ou o uso de um detector de massas para a clara identificação de agrotóxicos a fim de se excluir dados falso-positivos provocados pela co-eluição de compostos. Através de um estudo interlaboratorial de um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos OCs e piretróides bem como de bifenilas policloradas (PCBs) em amostras de leite, peixes, ovos e gordura de carne, vários resultados não se apresentaram confiáveis posto que 7 laboratórios participantes reportaram resultados positivos para determinada substância em uma amostra de leite, que não havia sido adicionada à matriz. Dessa forma, foram solicitados a esses laboratórios

os cromatogramas da amostra de leite analisada e, a avaliação detalhada indicou um pico no tempo de retenção da substância suspeita, confirmando a necessidade da injeção das amostras em duas colunas cromatográficas diferentes ou o uso de um detector de massas para a clara identificação de agrotóxicos. No estudo atual realizou-se a identificação e quantificação das substâncias de interesse através do uso de um micro-detector por captura de elétrons com fonte radioativa de Ni ⁶³ e a confirmação dos resultados foi obtida com o uso de um detector seletivo de massas, assegurando assim, a confiabilidade de seus resultados.

Além de OCs, um agrotóxico OF, o clorpirifós etil, foi detectado nas amostras de leite analisadas no estudo atual. As concentrações variaram de 0,182 - 2,846mg/kg. Salas *et al.* (2003) realizaram análises de amostras de leite total no México quanto ao teor de OFs. Os resultados confirmaram a presença de vários OFs, dentre eles o clorpirifós etil (0,013mg/kg), Ainda a esse respeito, foram confirmados resíduos de clorpirifós etil (menos do que 0,02mg/kg) nas amostras de leite totais analisadas na Itália (PAGLIUCA *et al.*, 2004).

Avaliando-se os resultados do presente estudo com os demais listados na tabela 14, pode-se observar que as concentrações de clorpirifós etil aqui reportadas para as amostras analisadas se encontraram em valores superiores aos reportados, mas não devem ser comparadas diretamente, uma vez que, a diferença significativa entre os valores detectados nas amostras analisadas e nos estudos realizados no México e na Itália, deve-se principalmente à realização de análise em gordura (no estudo atual) e em leite total (nos outros dois estudos).

Cumprir mencionar que seu uso é autorizado nos países onde foram realizados os estudos. No México, os OFs são amplamente utilizados no combate a ectoparasitas do gado e/ou em culturas que servem de alimentos para os animais tais como milho, alfafa e soja. No Brasil, o uso é autorizado para algumas culturas como café, cevada, algodão, batata, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, tomate e trigo; aplicação no solo nas culturas de batata e milho; aplicação direta nas culturas de banana e aplicação no controle de formigas (ANVISA, 2005). O clorpirifós etil é um agrotóxico clorofosforado e, assim como os OCs, tende a se bioacumular ao longo da cadeia alimentar (PAGLIUCA *et al.*, 2004). Dessa forma, pode-se dizer que também é constituído por propriedades lipofílicas e conseqüentemente se acumula em tecidos ricos em gordura, sendo posteriormente também excretados através da gordura do leite.

A presença desses OFs nas amostras de leite analisadas contrasta com a opinião de alguns autores que consideram que os OFs são metabolizados tão rapidamente, que seus resíduos são raramente observados no leite (BLÜTHGEN & HEESCHEN, 1997 *apud* SALAS *et al.*, 2003). Os resultados encontrados no presente estudo reforçam a importância e a necessidade do monitoramento de resíduos de OFs no leite, uma vez que essas substâncias, acima dos LMR permitidos, podem representar riscos para a saúde dos consumidores, principalmente para as crianças.

As análises de alimentos de origem animal como o leite são mais difíceis de serem realizadas posto que se tratam de matrizes complexas, constituídas por uma série de interferentes. Dessa forma, as etapas de extração e purificação são cruciais, principalmente pelo fato dos OFs e OCs apresentarem estruturas químicas e propriedades físicas diferentes (PAGLIUCA *et al.*, 2004). Vários estudos utilizam ácido sulfúrico no processo de limpeza dos extratos gordurosos uma vez que permite a precipitação quantitativa da gordura e a degradação dos ésteres de ftalatos que interferem na identificação cromatográfica desses compostos, permitindo assim, uma determinação mais acurada (WALISZEWSKI *et al.*, 2003). Entretanto, é sabido que muitos OCs, como o aldrin, são sensíveis ao tratamento com ácido sulfúrico, o que pode acarretar baixas taxas de recuperação dessas substâncias. Neste estudo optou-se pela purificação dos extratos gordurosos das amostras de leite através das duas etapas de limpeza conforme já descritas no método analítico (cromatografia por permeação em gel-Biobeads SX-3 e cromatografia por adsorção-sílica gel desativada) para evitar problemas na identificação das substâncias de interesse mais sensíveis ao tratamento ácido, embora não se tenha conseguido solucionar os inconvenientes referentes aos picos de ftalatos, conforme visualizado nos cromatogramas dos testes realizados para a escolha da fração de trabalho na etapa de limpeza que envolvia a CPG.

Durante o estudo do intervalo de trabalho, no processo da validação do método analítico, foi observada a ausência de detecção do dicofol. Embora essa substância integrasse o grupo dos analitos a serem estudados, não foi possível separá-la e identificá-la quando as soluções intermediárias para a construção da curva de calibração eram injetadas no CG/ μ DCE, motivando uma pesquisa mais aprofundada deste comportamento. O dicofol ainda apresenta uso permitido para algumas culturas tais como maçã, citros e algodão. Nessa etapa, observou-se que o

“liner” do injetor “recheado” com lã de vidro impedia a detecção do dicofol sendo substituído por um outro sem lã de vidro. No teste, foi possível identificar a substância e dar continuidade ao processo de validação do método analítico. Dessa forma, suspeita-se que a lã de vidro retenha ou decomponha o dicofol. Porém, para que tal fato seja comprovado cientificamente, faz-se necessária a condução de estudos futuros no sentido de evidenciar tal fato.

O presente estudo não é o primeiro a relatar dificuldades com a validação de um método analítico para a análise de dicofol em matrizes gordurosas como o leite. Bordet *et al.* (2002), reportaram em estudo interlaboratorial, que o dicofol é decomposto em altas temperaturas no injetor. Os 2 isômeros do dicofol: *o,p'*-dicofol ou 2,2,2-tricloro-1(2-clorofenil)-1(4-clorofenil) etanol e *p,p'*- dicofol ou 2,2,2-tricloro-1,1bis(4-clorofenil) etanol são hidrolisados na presença de luz ou de temperaturas acima de 80°C em 2,4`- diclorobenzofenona ou 4,4`- diclorobenzofenona. Assim sendo, muitos dos participantes nesse estudo, não apresentaram resultados para o *o,p'*-dicofol (7 dos 15 laboratórios participantes) e para o *p,p'*-dicofol (9 dos 15 laboratórios participantes). A partir de tal constatação, todos os participantes foram notificados para que as respectivas condições cromatográficas fossem ajustadas, utilizando-se temperaturas mais baixas nos injetores. Porém, a variabilidade dos resultados encontrados dificultou a interpretação e conseqüentemente o método proposto para dicofol no leite, não pode ser validado.

A detecção de OCs nas amostras investigadas ressalta a importância do monitoramento visando o controle e assegurando a qualidade do alimento consumido, embora a utilização tenha sido proibida há décadas e as monografias que estabelecem os LMR no país, canceladas. Sob essa observação, a detecção nas amostras analisadas representa uma não conformidade. Ressalta-se a detecção do clorpirifós etil na maioria das amostras (15 das 20 amostras) se considerando que a ANVISA estabelece um LMR não intencional de 0,01mg/kg em gordura de leite. Essa substância ainda apresenta uso permitido na aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate e trigo; aplicação localizada na cultura de banana (saco para a proteção do cacho); aplicação no solo nas culturas de batata e milho e na aplicação no controle de formigas, apenas na isca granulada, conforme aprovação em rótulo e bula (ANVISA, 2005).

Concluindo, o presente trabalho demonstrou que o isolamento da gordura do leite na investigação dos contaminantes OCs e OFs (clorofosforados), constitui em etapa fundamental do processo. Como resultado, em contraste aos demais estudos consultados na literatura nacional e internacional, estes analitos foram detectados em concentrações significativamente superiores àquelas permitidas pela ANVISA. Por fim, a partir dos dados apresentados, constata-se que a otimização e a validação do método presente trouxeram uma perspectiva inovadora sobre a necessidade da implantação de um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite de vaca e derivados consumidos pela população brasileira.

VI. Conclusões

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que:

- os achados relatados quanto à sensibilidade do dicofol à lã de vidro contida em alguns “liners” atenta para o uso de “liners” revestidos internamente exclusivamente com agentes silanizantes;
- as concentrações de alguns OCs reportadas no presente estudo, ressaltam a importância da existência de métodos analíticos sensíveis o suficiente para a detecção de concentrações ínfimas dessas substâncias em alimentos, como ora demonstrado ;
- as concentrações de clorpirifós etil encontradas em valores superiores àqueles estabelecidos pela ANVISA (0,01mg/kg) reforçam a necessidade do monitoramento de resíduos de OFs no leite, uma vez que essas substâncias, quando presentes em LMR acima dos permitidos, podem representar riscos para a saúde dos consumidores, principalmente as crianças;
- o presente trabalho demonstrou que o isolamento da gordura do leite na investigação dos contaminantes OCs e OFs (clorofosforados), constitui em etapa fundamental do processo;
- o método analítico desenvolvido e validado no presente estudo se mostrou adequado para o que se propõe, posto que todos os parâmetros estatísticos avaliados se apresentaram em concordância com o estabelecido pelos órgãos reguladores como o *Codex Alimentarius*, o INMETRO e a ANVISA, para as análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos;
- o método de análise proposto apresentou sensibilidade e eficiência adequados e necessários para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em matrizes gordurosas como o leite.

VII. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de produtos agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>. >. Acesso em: 15 dez. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal-PAMVet- Relatório 2002/2003- monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relatorio_02_03.pdf. > Acesso em: 20 dez. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/medidas.htm>>. Acesso em: 22 jun. 2004.

ALMEIDA, M.E.W., BARRETO, H.H.C. Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.31, p.13-20, 1971.

AMARAL-MENDES, J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.781-788, 2002.

ARMENDÁRIZ, C., CIRIZA, J.A.P, FARRÉ, R. Gas chromatography determination of organochlorines pesticides in cow milk. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.55, n. 3, p. 215-221, 2004.

ARNOLD, S.F. et al. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. **Science**, v.272, p.1489-1492, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA – ABVL. Disponível em:< <http://www.abvl.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida>> Acesso em: 20 out. 2005.

BATTU, R.S.; SINGH, B.; KANG, B.K. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.324-331, 2004.

BORDET, F.; INTHAVONG, D.; FREMY, J.M. Interlaboratory study of a multiresidue gas chromatographic method for determination of organochlorine and pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in milk, fish, eggs and beef fat. **Journal of AOAC International**, v.85, n.6, p.1398-1409, 2002.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

BRASIL. Portaria nº 11, de 08 de janeiro de 1998. Exclui da “relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e produtos domissanitários”, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 jan. 1998.

BRASIL. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, dentre outros: ALDRIN, BHC, CANFENO CLORADO (TOXAFENO), DDT, DODECACLORO, ENDRIN, HEPTACLORO, LINDANE, ENDOSULFAN, METOXICLORO, NOMACLORO, PENTACLOROFENOL, DICOFOL e CLOROBENZILATO. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jul. 1985.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

CERVENIK, V.; DOGANOC, D. Z.; JAN, J. Evidence of some trace elements, organochlorine pesticides and PCBs in Slovenian cow's milk. **Food Technol. Biotechnol.**, v.38, n. 2, p. 155-160, 2000.

CISCATO, C.H.P.; GEBARA, A.B.; SPINOSA, H.S. Pesticide residues in cow milk consumed in São Paulo city (Brazil). **Journal of Environmental Science and Health B**, v.37, n.4, p.323-330, Jul. 2002.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide residues in food: methods of analysis and sampling**. 2.ed., v. 2A, part. 1, 2000.

COLBORN, T. et al. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v.101, p.378-384, 1993.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística. São Paulo: Edgard Blücher, 1994. Apêndice 6, tabela A6.8: valores críticos para o teste de Cochran. p. 257.

CRAAN, A.G.; HAINES, D.A. Twenty –five years of surveillance for contaminants in human breast milk. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.35, p.702-710, 1998.

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.

DAVIS, D.L. et al. Agricultural exposures and cancer trends in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p.39-44, 1992.

DELORME, P.D. et al. Long-term effects of toxaphene and depuration in lake trout and white sucker in a natural ecosystem. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, p.1992-2000, 1999.

DOURSON, M., CHARNLEY, G., SCHEUPLEIN, R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II. Risk and Regulation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.35, n.3, p. 448-467, Jun. 2002.

ECOBICHON, D.J. Toxic Effects of Pesticides. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D., (Ed.). **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 6.ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001. cap.22. p.763-810.

GRUBBS, F. E.; BECK, G. Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Teste of Outlying Observations. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 847-854, 1972.

HARDELL, L. et al. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. **Environmental Medicine**, v.111, n.7, p.930-934, 2003.

_____. Repeated measurement of organochlorine exposure and breast cancer risk (Denmark). **Cancer Causes Control**, v.11, p.177-184, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Normalização e Qualidade Industrial**. Orientações sobre validação de ensaios químicos. DOQ – CGCRE – 008. Revisão: 01 – Março/2003. 35p. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgre008r01.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER – IARC. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/IEC 17025**: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005. 28p.

IRVINE, S. et al. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. **British Medical Journal**, v.312, n.7029, p.467-471, 1996.

JOHN, P.J., BAKORE, N., BHATNAGAR, P. Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. **Environment International**, v.26, p.231-236, 2001.

JOY, R.M. Chlorinated hydrocarbon insecticides. In: ECOBICHON, D.J.; JOY, R.M. **Pesticides and Neurological Diseases**. 2.ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 81-170, 1994.

JUHLER, R.K. Optimized method for determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v.786, p.145-153, 1997.

KALPANA, B. **Human health assessment for exposures to pesticides**: a case study of endocrine disrupters. Proceedings of the Eight National Symposium on Environmental, Kalpakkam, India, p. 70-72, 1999.

KAVLOCK, R.J. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of the US EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v.104, p.714-740, 1996.

KELCE, W.R. et al. Persistent DDT metabolite *p, p'*- DDE is a potent androgen receptor antagonist. **Nature**, v. 375, p.581-585, 1995.

KELCE, W.R.; GRAY, L.E.; WILSON, E.M. Antiandrogens as environmental disruptors. **Reproduction and Fertility Development**, v.10, p.105-111, 1998.

KLAASSEN, C.D. Agentes tóxicos ambientais não metálicos. In: GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 67. p.1248-1255.

KRIEGER, N. et al. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black and asian women. **Journal of the National Cancer Institute**, v.86, p.589-599, 1994.

KUMAR, A. et al. Persistent organochlorine pesticide residues in milk and butter in Agra city, India: a case study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, p. 175-179, 2005.

LACKMANN, G.M.; SCHALLER, K.H.; ANGERER, J. Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. **Science of the Total Environment**, v.329, p.289-293, 2004.

LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C.; INOMETO, O.N.K. Variação dos níveis de pesticidas organoclorados em leite consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.40, p. 65-73, 1980.

LÖWEN, T.C.R. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de lamivudina e do ensaio limite do enantiômero (*) BHC-189 em comprimidos de lamivudina**. p.39-46. Tese (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2003.

MAIJALA, K. Cow milk and human development and well-being. **Livestock Production Science**, v.65, p.1-18, 2000.

MARTINÉZ, M.P. et al. Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.621-624, 1997.

MATSUMURA, F. **Toxicology of Insecticides**. New York: Plenum Press, 1985. p. 122-128.

MENZER, R.E. Water and soil pollutants. In: In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D., (Ed.). **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 4.ed. New York: Pergamon Press, 1991. p.872-902.

MÉTODOS de conservação de alimentos. In: GAVA, A.J. **Princípios da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1999. cap.7. p.197.

MEYER, A.; SARCINELLI, P.N.; MOREIRA, J.C. Are some Brazilian population groups subject to endocrine disruptors? **Revista de Saúde Pública**, v.15, p. 845-850, 1999.

MÍDIO, A.F. **Aspectos da análise toxicológica de inseticidas em material biológico**. 1974. 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1974.

MIDIO, A.F.; MARTINS. D.I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for analytical chemistry**. 2.ed. Chichester: Elis Horwood, 1988. p.83-94.

MINISTRY of Agriculture Fisheries and Food. Pesticide residues Committee - MAFF. Annual Report, 2002. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/news/2003/030917a.htm>>. Acesso em: 22 jun. 2004.

MINISTRY of Agriculture Fisheries and Food -MAFF. Pesticide residues in food, 2000. Disponível em: <<http://www.agriculture.gov.ie/publicat/pesticides/PESTICID.PDF>>. Acesso em: 12 abr. 2004.

MINISTRY of Agriculture Fisheries and Food - MAFF. Results from pesticides monitoring. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/news/newsrel/1999/990916b.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2004.

MINISTRY of Agriculture Fisheries and Food - MAFF. Results of survey of residues in milk is published. Disponível em: < <http://www.itass.dk/960402a.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2004.

MUKHERJIE, I.; GOPDL, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residue. **Journal of Chromatography A**, v.754, p.33-42, 1996.

NAGATA, K.; NARAHASHI, T. Dual action of the cyclodiene insecticide dieldrin on the aminobutyric acid receptor chloride ion channel complex of rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.269, n.1, p.169-171, Apr. 1994.

NIGAM, U.; SIDDIQUI, M.K.J. Organochlorine insecticide residues in dairy milk samples collected in Lucknow, Índia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.66, p.678-682, 2001.

OLIVA, R. et al. Pesticide monitoring programme of the Ministry of Health of Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.8, p. 758-763, 2003.

OLIVEIRA, M.A.G.; DORES, E.F.G.C. Níveis de praguicidas organoclorados no leite materno de uma população de Cuiabá- Mato Grosso. **Pesticidas**, v.8, p.77-90, 1998.

PAGLIUCA, G. et al. Proposal of an analytical method for determination of residues of organophosphorus pesticides in milk by GLC-NPD. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.257-259, 2004.

_____. Residue analysis of organophosphorus in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v.1071, p.67-70, 2005.

PANDIT, G.G. et al. Persistent organochlorine pesticide residues in milk and dairy products in India. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.2, p.153-157, 2002.

PARDIO, V.T. et al. Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of México. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.3, p.259-269, 2003.

PATLAK, M. Estrogens may link pesticides to breast cancer. **Environmental Science & Technology**, v.30, n.5, p.210A-211A, 1996.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

QUALITY Control Procedures for Pesticide Residues Analysis (SANCO/10476/2003). Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2004.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIMKUS, G.G.; RUMMLER, M.; NAUSCH, I. Gel permeation chromatography-high-performance liquid chromatography combination as an automated clean-up technique for the multiresidue analysis of fats. **Journal of Chromatography A**, v.237, p. 9-14, 1996.

SALAS, J., H. et al. Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk. **J. Agri. Food Chem**, v. 51, p. 4468-4471, 2003.

SHARPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v.341, p.1392-1396, 1993.

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

THIER, H – P.; ZEUMER, H. **Manual of Pesticide Residue Analysis**. Weinheim: VCH, 1987. v. 1.

THEIR, H – P.; KIRCHHOFF, J. **Manual of Pesticide Residue Analysis**. Weinheim: VCH, 1992. v. 2.

TOMLIN, C., (Ed.). **The Pesticide Manual Incorporating the Agrochemicals Handbook**. 10. ed. Surrey: The Royal Society of Chemistry, 1994. 1341p.

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

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP. **Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Disponível em: <<http://www.pops.int/>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Pesticide Data Program (PDP). Disponível em: <www.ams.usda.gov/science/pdp/>. Acesso em: 12 abr. 2004.

VILELA, D. **2003**: Perspectivas positivas para a pecuária de leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/artigos/artigo2003-pdf> . Acesso em: 20 out. 2003.

WAFFORD , K.A. et al. Non competitive inhibition of GABA receptors in insect and vertebrate CNS by endrin and lindane. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.33, p.213-219, 1989.

WALISZEWSKI, S.M. et al. Organochlorine pesticide residues in cow`s milk and butter in Mexico. **The Science of the Total Environment**, v. 208, p. 127-132, 1997.

WALISZEWSKI, S.M. et al. Persistent organochlorine pesticide levels in cow´s milk samples from tropical regions of Mexico. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.3, p.270-275, 2003.

WEISS, B.; AMLER, S.; AMLER, R. Pesticides. **Pediatrics**, v.113, n.4, p.1030-1036, Apr. 2004.

WITORSCH, R.J. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p. 905-913, 2002.

WOLFF, M.S. et al. Blood levels organochlorine residues and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.85, p.648-652, 1993.

WORTHING, C. R., (Ed.). The Pesticide Manual: A world compendium. 6. ed. London: BCPC, 1979. 655p.

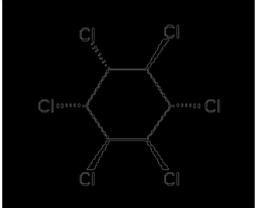
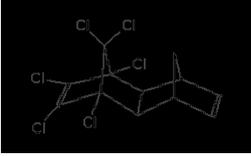
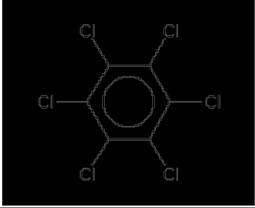
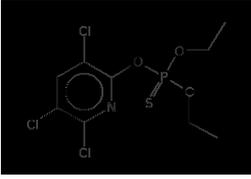
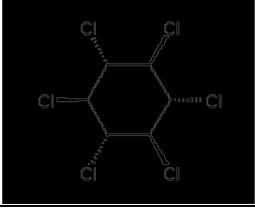
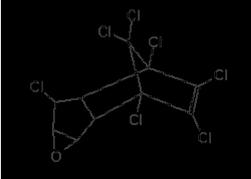
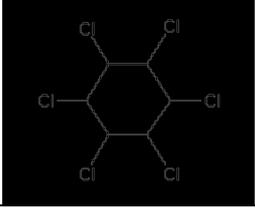
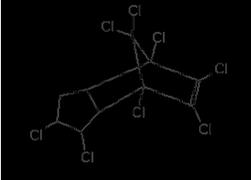
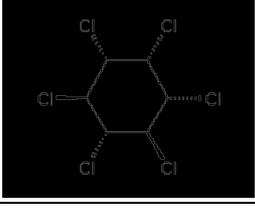
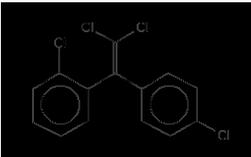
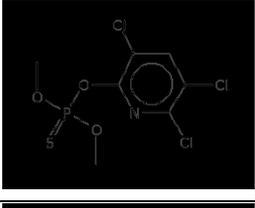
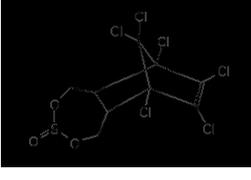
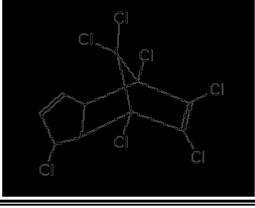
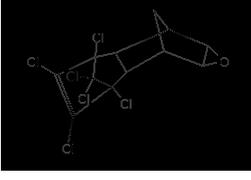
WORTHING, C. R., (Ed.). The Pesticide Manual: A world compendium. 9. ed. London: BCPC, 1991. 1141p.

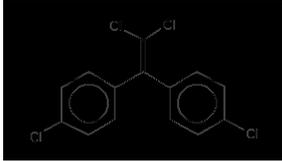
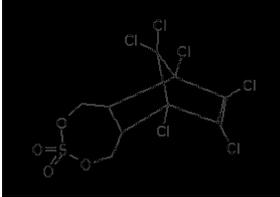
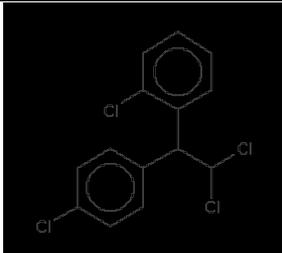
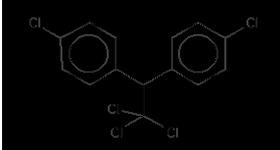
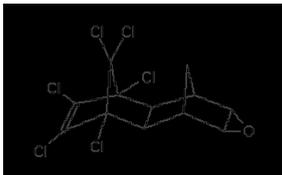
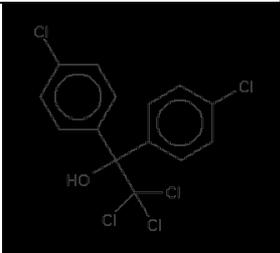
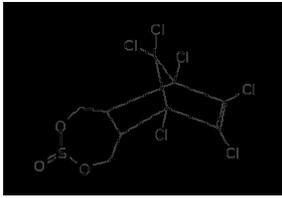
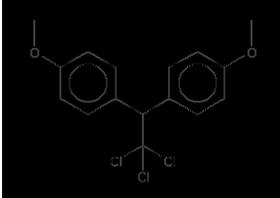
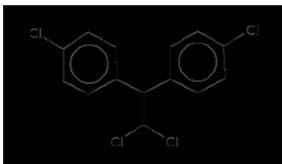
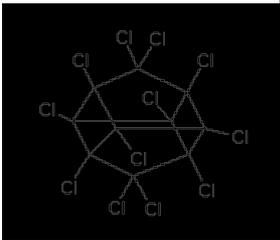
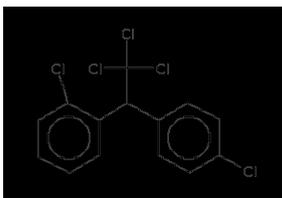
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health criteria for PCBs and PCTs**: International Register of Toxic Chemicals. Switzerland: WHO, 1990. p.2

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk**. Environmental Health in Europe 3, Copenhagen: WHO, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **PCBs, PCDDs and PCDFs in breast milk**: assessment of health risks. Copenhagen: WHO, 1988. Environmental Health 29.

Anexo A: Estruturas moleculares das substâncias analisadas

<i>Substância</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Substância</i>	<i>Estrutura</i>
Alfa - HCH		Aldrin	
Hexaclorobenzeno		Clorpirifós Etil	
Beta - HCH		Heptacloro Epóxido	
Gama - HCH		Clordano	
Delta - HCH		o, p' - DDE	
Clorpirifós Metil		Alfa - Endosulfan	
Heptacloro		Dieldrin	

Substância	Estrutura	Substância	Estrutura
p,p' - DDE		Endosulfan Sulfato	
o,p' - DDD		p,p' DDT	
Endrin		Dicofol	
Beta - Endosulfan		Metoxicloro	
p,p' - DDD		Mirex	
o,p' - DDT		-	-

Anexo B. Valores das variáveis utilizadas para os cálculos da linearidade dos analitos de interesse.

Curva de Calibração								
Substância	1º Ponto	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio	Coeficiente de Variação %	Variância
	µg/ml	Área	Área	Área	Área	Padrão		
Alfa - HCH	0,0100	2550274	2571762	2644758	2588931	49527	1,91	2452896069
Hexaclorobenzeno	0,0100	2989656	2992079	3009885	2997207	11046	0,37	122022834
Beta - HCH	0,0100	509015	505575	518830	511140	6878	1,35	47310475
Gama - HCH	0,0100	1972071	2000032	2049508	2007204	39213	1,95	1537696844
Delta - HCH	0,0100	402053	382755	426117	403642	21725	5,38	471958657
Clorpirifós Metil	0,0100	469979	461201	470217	467132	5138	1,10	26399697
Heptacloro	0,0120	2011853	2025968	2079794	2039205	35853	1,76	1285408497
Aldrin	0,0090	1974852	1991350	2031103	1999102	28916	1,45	836110002
Clorpirifós Etil	0,0150	785402	820864	892043	832770	54308	6,52	2949384394
Heptacloro Epóxido	0,0080	1478540	1475722	1516899	1490387	23003	1,54	529149889
Clordano	0,0105	499079	488325	533408	506937	23546	4,64	554434274
o, p' - DDE	0,0100	1100474	1094345	1127442	1107420	17608	1,59	310041512
Alfa - Endossulfan	0,0100	1433308	1427812	1472333	1444484	24274	1,68	589212680
Dieldrin	0,0100	1356718	1380982	1375107	1370936	12658	0,92	160235440
p, p' - DDE	0,0150	2046071	2030409	2069656	2048712	19756	0,96	390312913
o, p' - DDD	0,0100	994139	978452	1001364	991318	11714	1,18	137207056
Endrin	0,0100	1073129	1082012	1133104	1096082	32368	2,95	1047716796
Beta - Endossulfan	0,0100	765942	773444	818673	786020	28526	3,63	813750134
p, p' - DDD	0,0100	734073	690417	759968	728153	35151	4,83	1235623160
o, p' - DDT	0,0100	782647	778013	833430	798030	30745	3,85	945238489
Endossulfan Sulfato	0,0100	97069	92473	96932	95491	2615	2,74	6837444
p, p' DDT	0,0150	605315	618467	611979	611920	6576	1,07	43246357
Dicofol	0,0123	6298970	6369628	6875955	6514851	314714	4,83	99045212353
Metoxicloro	0,0100	220514	221865	240811	227730	11349	4,98	128790721
Mirex	0,0100	767007	761971	793474	774151	16923	2,19	286383732

Curva de Calibração								
Substância	2º Ponto	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio	Coeficiente de Variação %	Variância
	µg/ml	Área	Área	Área	Área	Padrão		
Alfa - HCH	0,0220	5567962	5603140	5715279	5628794	76936	1,37	5919157582
Hexaclorobenzeno	0,0200	5715846	5738665	5882407	5778973	90300	1,56	8154172674
Beta - HCH	0,0205	1028789	1028459	1053105	1036784	14135	1,36	199800345
Gama - HCH	0,0200	4250573	4266696	4372374	4296548	66161	1,54	4377212402
Delta - HCH	0,0200	946366	967816	1028028	980737	42336	4,32	1792378281
Clorpirifós Metil	0,0200	936967	936034	989105	954035	30375	3,18	922628762
Heptacloro	0,0250	3996828	3981068	4097751	4025216	63310	1,57	4008125336
Aldrin	0,0175	3744510	3752440	3823179	3773376	43312	1,15	1875950430
Clorpirifós Etil	0,0300	1659784	1652176	1684188	1665383	16724	1,00	279700837
Heptacloro Epóxido	0,0160	2815905	2808223	2866023	2830050	31389	1,11	985277841
Clordano	0,0209	971581	982554	1003589	985908	16265	1,65	264565003
o, p' - DDE	0,0200	2089955	2120072	2181995	2130674	46927	2,20	2202142203
Alfa - Endossulfan	0,0200	2719853	2739057	2805764	2754891	45091	1,64	2033219564
Dieldrin	0,0200	2590614	2577486	2658364	2608821	43404	1,66	1883942961
p, p' - DDE	0,0300	3924216	3837579	4006161	3922652	84302	2,15	7106807253
o, p' - DDD	0,0200	1866087	1844111	1895041	1868413	25545	1,37	652523932
Endrin	0,0205	2175674	2150185	2259648	2195169	57276	2,61	3280578361
Beta - Endossulfan	0,0210	1545671	1522144	1600553	1556123	40236	2,59	1618920822
p, p' - DDD	0,0220	1366945	1346412	1434018	1382458	45817	3,31	2099200442
o, p' - DDT	0,0200	1516212	1508659	1581676	1535516	40154	2,62	1612344232
Endossulfan Sulfato	0,0210	234158	237545	238646	236783	2339	0,99	5471019
p, p' DDT	0,0300	1355519	1319650	1363767	1346312	23455	1,74	550154059
Dicofol	0,0245	13825411	12976433	13358714	13386853	425188	3,18	180784749542
Metoxicloro	0,0200	488994	474872	530927	498264	29155	5,85	849995066
Mirex	0,0200	1506238	1469335	1559198	1511590	45170	2,99	2040325296

Curva de Calibração								
Substância	3º Ponto	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio	Coefficiente de	Variância
	µg/ml	Área	Área	Área	Área	Padrão	Variação	
							%	
Alfa - HCH	0,0450	12251903	12360868	12501872	12371548	125326	1,01	15706666700
Hexaclorobenzeno	0,0400	11202599	11277256	11412060	11297305	106160	0,94	11269949431
Beta - HCH	0,0410	2004665	2038958	2062826	2035483	29236	1,44	854732199
Gama - HCH	0,0400	9138251	9271522	9373709	9261161	118070	1,27	13940635362
Delta - HCH	0,0400	2267161	2316939	2375240	2319780	54095	2,33	2926321021
Clorpirifós Metil	0,0410	1914616	1957597	1994970	1955728	40210	2,06	1616812134
Heptacloro	0,0500	7812499	8007963	8116132	7978865	153894	1,93	23683284424
Aldrin	0,0350	7390030	7480148	7562882	7477687	86452	1,16	7473997097
Clorpirifós Etil	0,0530	3770237	3647726	3706255	3708073	61276	1,65	3754714214
Heptacloro Epóxido	0,0320	5410700	5510726	5553223	5491550	73171	1,33	5354000202
Clordano	0,0420	1792889	1885133	1902804	1860275	59023	3,17	3483754500
o,p' - DDE	0,0400	4013179	4105060	4141698	4086646	86209	1,62	4383599094
Alfa - Endossulfan	0,0400	5297772	5408966	5464898	5390545	85072	1,58	7237265689
Dieldrin	0,0400	4961273	5085301	5145983	5064186	94148	1,86	8863839001
p,p' - DDE	0,0550	7485365	7774148	7821039	7693517	181783	2,36	33045236874
o,p' - DDD	0,0400	3407287	3497758	3529675	3478240	63486	1,83	4030419879
Endrin	0,0410	3968801	4175415	4251009	4131742	146085	3,54	21340858849
Beta - Endossulfan	0,0420	2903332	3016813	3062765	2994303	82065	2,74	6734734192
p,p' - DDD	0,0440	2552134	2761190	2794352	2702559	131323	4,86	17245614817
o,p' - DDT	0,0400	2728170	2868627	2905568	2834122	93597	3,30	8760476122
Endossulfan Sulfato	0,0420	520309	541424	549458	537064	15056	2,80	226675430
p,p' DDT	0,0550	2638211	2725782	2774169	2712721	68914	2,54	4749093262
Dicofol	0,0460	26638080	28869645	27852649	27786791	1117239	4,02	1248223511500
Metoxicloro	0,0400	906978	991466	1026420	974955	61409	6,30	3771065937
Mirex	0,0400	2710261	2873386	2892540	2825396	100168	3,55	10033712530

Curva de Calibração								
Substância	4º Ponto	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio	Coefficiente de	Variância
	µg/ml	Área	Área	Área	Área	Padrão	Variação	
							%	
Alfa - HCH	0,0904	26820611	26974845	27367221	27054226	281818	1,04	79421590705
Hexaclorobenzeno	0,0799	21971683	21986748	22225116	22061182	142170	0,64	20212423856
Beta - HCH	0,0829	3850682	3842125	3903881	3865563	33459	0,87	1119526564
Gama - HCH	0,0784	19755449	19812238	20152359	19906682	214649	1,08	46074138877
Delta - HCH	0,0782	5657607	5731274	6004679	5797853	182864	3,15	33439349016
Clorpirifós Metil	0,0821	3868575	3884298	3992159	3915011	67273	1,72	4525702184
Heptacloro	0,0929	16214545	16183696	16383006	16260416	107281	0,66	11509207570
Aldrin	0,0708	14962854	14943019	15137628	15014500	107092	0,71	11468673630
Clorpirifós Etil	0,1063	7778005	7727711	7810172	7771963	41561	0,53	1727336474
Heptacloro Epóxido	0,0633	10710408	10696981	10865971	10757787	93931	0,87	8822958566
Clordano	0,0837	3538115	3527410	3583252	3549592	29637	0,83	878379126
o,p' - DDE	0,0779	7794401	7688375	7838411	7773729	77125	0,99	5948199012
Alfa - Endossulfan	0,0737	10568918	10490672	10655713	10655713	82557	0,77	6815723370
Dieldrin	0,0794	9974757	10017863	10251597	10081406	148958	1,48	22188349265
p,p' - DDE	0,1107	15192338	14989274	15269782	15150465	144866	0,96	20986216549
o,p' - DDD	0,0809	6425931	6351233	6470150	6415771	60106	0,94	3612727342
Endrin	0,0822	8118755	8002017	8123560	8081444	68828	0,85	4737258253
Beta - Endossulfan	0,0841	5691352	5626720	5804414	5707495	89940	1,58	8089244817
p,p' - DDD	0,0891	5478154	5375303	5403798	5419085	53102	0,98	2819851327
o,p' - DDT	0,0773	5270137	5216604	5291327	5259356	38510	0,73	1483054153
Endossulfan Sulfato	0,0832	1209745	1212965	1236946	1219885	14862	1,22	220891860
p,p' DDT	0,1100	5570070	5451064	5524946	5515360	60079	1,09	3609525556
Dicofol	0,0920	55061147	51771992	54361010	53731383	1732616	3,22	300195772853
Metoxicloro	0,0807	1869172	1821874	1825336	1838794	26365	1,43	695113524
Mirex	0,0802	5240165	5111415	5232475	5194685	72216	1,39	5215203700

Curva de Calibração								
Substância	5º Ponto	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio	Coefficiente de	Variância
	µg/ml	Área	Área	Área	Área	Padrão	Variação %	
Alfa - HCH	0,1807	58909490	58850777	59532182	59097483	377603	0,64	142584219543
Hexaclorobenzeno	0,1598	44654647	44483666	44925806	44688040	222953	0,50	49708247541
Beta - HCH	0,1644	7487833	7508843	7580660	7525779	48676	0,65	2369325586
Gama - HCH	0,1568	43115940	43150755	43688060	43318252	320736	0,74	102871673609
Delta - HCH	0,1564	14572847	14677298	15056159	14768768	254308	1,72	64672693011
Clorpirifós Metil	0,1642	7747580	7796631	7902508	7815573	79182	1,01	6269770819
Heptacloro	0,1858	34632873	34710805	34694307	34679328	41068	0,12	1686619498
Aldrin	0,1416	31218119	31273939	31488740	31326933	142882	0,46	20415177940
Clorpirifós Etil	0,2127	14621865	14601459	14781806	14668377	98761	0,67	9753761454
Heptacloro Epóxido	0,1266	21744161	21759934	21945394	21816496	111907	0,51	12523153236
Clordano	0,1675	7090483	7083806	7165614	7113301	45427	0,64	2063633059
o, p' - DDE	0,1558	15797895	15761411	15958367	15839224	104781	0,66	10979001829
Alfa - Endossulfan	0,1474	22414061	22392876	22655878	22487605	146113	0,65	21349052953
Dieldrin	0,1589	20782806	20712838	20944784	20813476	118976	0,57	14155223404
p,p' - DDE	0,2214	30589333	30367980	31073604	30676972	360883	1,18	130236796904
o,p' - DDD	0,1617	12002771	11916628	12151107	12023502	118606	0,99	14067431131
Endrin	0,1644	16149591	16070603	16539714	16253303	251164	1,55	63083364932
Beta - Endossulfan	0,1682	11183060	11150217	11432125	11255134	154156	1,37	23764026223
p,p' - DDD	0,1782	11230051	11153664	11568441	11317385	220750	1,95	48730454266
o,p' - DDT	0,1545	10019995	9944938	10221080	10062004	142784	1,42	20387189106
Endossulfan Sulfato	0,1664	2752942	2794778	2811247	2786322	30058	1,08	903491980
p,p' DDT	0,2200	11492796	11377874	11637513	11502728	130104	1,13	16927081082
Dicofol	0,1840	116001875	107484864	117320514	113602418	5338825	4,70	28503049351492
Metoxicloro	0,1615	3556466	3476388	3597235	3543363	61480	1,74	3779765809
Mirex	0,1604	9744682	9641156	9979527	9788455	173380	1,77	30060790057