

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE  
MATERNO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS  
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM  
IONIZAÇÃO QUÍMICA NEGATIVA (GC-NCI-MS)**

**TESE DE DOUTORADO**

**Mariela de Souza Viera**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

**DETERMINAÇÃO DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO  
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO QUÍMICA  
NEGATIVA (GC-NCI-MS)**

**Mariela de Souza Viera**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **DOUTOR EM QUÍMICA.**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado**

**DETERMINAÇÃO DE POPs E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO  
EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA  
DE MASSAS COM IONIZAÇÃO QUÍMICA NEGATIVA (GC-NCI-MS)**

**Elaborada por:**

**Mariela de Souza Viera**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Renato Zanella, Prof. Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

Manoel Leonardo Martins, Prof. Dr. (FURG)

---

Sandra Cadore Peixoto, Prof. Dr. (UNIFRA)

---

Roger Wagner, Prof. Dr. (UFSM)

---

Martha Bohrer Adaime, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS, 31 de março de 2016

## AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de fazer parte do grupo do LARP, por poder participar ativamente da implantação da ISO 17025, pela orientação, aprendizado e por buscar incansavelmente recursos para manter o funcionamento do laboratório. Ao Prof. Dr. Osmar D. Prestes, agradeço pela co-orientação, que mesmo nos momentos mais difíceis sempre me apoiou, incentivando-me a continuar e mostrando que com muito trabalho alcançamos os nossos objetivos.*

*Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins que acompanhou o início deste trabalho sempre dando boas ideias, disposto a ajudar, respondendo meus extensos e-mails com várias dúvidas.*

*A todos os colegas do LARP, que levarei sempre no meu coração, pois com vocês o aprendizado foi diário. Muito obrigada a todos que gastaram um tempinho em função do meu trabalho, seja com a manutenção dos equipamentos ou com uma conversa informal que muitas vezes foi uma luz no fim do túnel.*

*A minha irmã Eliana que acompanhou o início do doutorado, sempre preocupada e cuidadosa, tornando minhas noites mais animadas. A minha irmã Laura que cresceu com a expectativa das minhas visitas, e mesmo assim, a distância não nos separou. Aos meus pais, que apoiaram as minhas decisões, por mais que elas me levassem para longe de casa. Vocês foram imprescindíveis para concluir esse trabalho. Ao meu namorado Rodolfo, que tem me acompanhando nesta jornada, sempre paciente e compreensivo com minhas angústias.*

*A minha banca de qualificação, Dr. Renato Zanella, Dr. Osmar D. Prestes, Dr. Manoel Leonardo Martins, Dr. Ubiratan Flores da Silva e Dra. Carin von Mühlen pelas contribuições para este trabalho, sendo as mesmas de grande importância.*

*A minha banca de defesa, Dr. Renato Zanella, Dra. Martha Bohrer Adaime, Dr. Roger Wagner, Dr. Manoel Leonardo Martins e Dra. Sandra Cadore Peixoto, pelas contribuições e sugestões a fim de engrandecer este trabalho.*

*Agradeço aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da UFSM, os quais contribuíram para minha formação. Ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido e pela bolsa de doutorado.*

*À Deus pela força e proteção.*

## RESUMO

Tese de doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DETERMINAÇÃO DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO QUÍMICA NEGATIVA (GC-NCI-MS)**

Autora: Mariela de Souza Viera  
Orientador: Renato Zanella  
Santa Maria, 31 de março de 2016

A Convenção de Estocolmo foi a primeira atitude mundial a tentar preservar a saúde humana e o ambiente do uso indiscriminado de agrotóxicos, especialmente os poluentes orgânicos persistentes (POPs), que se caracterizam por serem lipofílicos podendo bioacumular nos tecidos adiposos e também no leite materno. Porém, os POPs constituem apenas uma parte dos produtos químicos com potencial de contaminação ambiental e humana uma vez que novas substâncias estão constantemente sendo desenvolvidas e liberadas no ambiente. Neste trabalho a etapa de preparo de amostra foi otimizada com base nos resultados do planejamento fatorial  $3^2$  variando solventes e sorventes. O método foi validado para 54 compostos utilizando uma mistura de hexano:acetona para a extração, limpeza do extrato por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) empregando Florisil<sup>®</sup> ativado e determinação por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC-NCI-MS). O efeito matriz foi compensado pela utilização de curva analítica extraída. A validação do método apresentou resultados satisfatórios para linearidade, exatidão (recuperação entre 719-119,8%) e precisão (RSD <29%). Uma etapa de evaporação do extrato concentrou os analitos possibilitando analisar baixos limites de detecção (3 a 26 ng g<sup>-1</sup> de gordura) e de quantificação (9 a 86 ng g<sup>-1</sup> de gordura). O método foi aplicado em 20 amostras de leite materno coletadas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, das quais todas apresentaram pelo menos um dos compostos estudados. Com análise por componentes principais dos resultados foi possível relacionar os agrotóxicos detectados com relação a cidade de origem das amostras e número de gestações da nutriz. Considerando que o leite materno é uma matriz complexa, o método analítico foi eficaz para a determinação em nível de traço de POPs e agrotóxicos em leite materno, podendo ser aplicado em análise de monitoramento da exposição humana a esses contaminantes.

**Palavras chave:** leite materno, POPs, agrotóxicos, GC-NCI-MS.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Graduate Program in Chemistry  
Federal University of Santa Maria

### DETERMINATION OF POPs AND PESTICIDES IN BREAST MILK BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY WITH NEGATIVE CHEMICAL IONIZATION (GC-NCI-MS)

Author: Mariela de Souza Viera  
Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella  
Santa Maria, March 31th, 2016

The Stockholm Convention was the first global attitude trying to preserve human health and the environment of the indiscriminate use of persistent organic pollutants (POPs), especially pesticides, which are characterized by being lipophilic and can bioaccumulate in fatty tissues including breast milk. However, POPs represent only a part of the chemicals with the potential for environmental pollution and human as new substances are constantly being developed and released into the environment. In this work, the sample preparation step was optimized based on the results of the factorial design  $3^2$  varying solvents and sorbents. The method was validated for 54 compound using a mixture of hexane:acetone for extraction, clean-up by dispersible solid phase extraction (d-SPE) using activated Florisil® and determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative chemical ionization (GC-NCI-MS). The matrix effect was compensated by the use of extracted analytical curve. The validation of the method showed satisfactory results for linearity, accuracy (recovery between 71.9 and 119.8%) and precision (RSD <29%). An evaporation step of the extract concentrated the analytes enabling low detection (3 to 26 ng g<sup>-1</sup> of fat) and quantitation (9 to 86 ng g<sup>-1</sup> of fat) limits. The method was applied to 20 samples of breast milk collected in different regions of Rio Grande do Sul state, Brazil, all of which contained at least one of the studied compounds. With principal component analysis of the results, it was possible to relate the pesticides detected in relation to the city of origin of the samples and the number of nursing mother's pregnancies. Considering that breast milk is a complex matrix, the analytical method was effective for the determination of trace levels of POPs and pesticides in breast milk and can be applied in monitoring analysis of human exposure to these contaminants.

**Keywords:** breast milk, POPs, pesticides, GC-NCI-MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de um analisador quadrupolar. ....	32
Figura 2- Gráficos de interações resultantes do planejamento fatorial $3^2$ para os compostos ciflutrina (piretróide), exaclorobenzeno (organoclorado), protiofós (organofosforado) e trifluralina (dinitroanilina). ....	58
Figura 3- Comparação dos diferentes solventes de extração e limpeza com EMR-Lipid®. ....	59
Figura 4- Extração de coextrativos com diferentes solventes da matriz fórmula infantil. ....	60
Figura 5- Remoção dos coextrativos com diferentes sorventes de limpeza. ....	61
Figura 6- Cromatogramas de íons totais para os ensaios realizados com acetona e hexano. ....	62
Figura 7- Representação do método de preparo da amostra utilizado para a extração de agrotóxicos e POPs em leite materno. ....	63
Figura 8- Efeito matriz entre curva em solvente e curva analítica extraída. ....	64
Figura 9- Avaliação da presença de interferentes nos cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS: branco da matriz, branco dos reagentes e matriz fortificada em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . ....	65
Figura 10- Resultado da análise das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul (resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ ). ....	74
Figura 11- Gráfico dos pesos PC1xPC2 demonstrando os grupos formados com relação a cidade de origem das amostras e os compostos detectados. ..	76
Figura 12- Gráfico dos pesos PC1xPC3 demonstrando os grupos formados com relação ao número de gestações da nutriz cidade e os compostos detectados. ....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos agrotóxicos conforme a toxicologia. ....	17
Tabela 2- Lista de POPs de acordo com a Convenção de Estocolmo. ....	19
Tabela 3- Parâmetros de validação.....	35
Tabela 4- Análise da variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados. ....	38
Tabela 5- Relação dos compostos estudados, analisados por GC-NCI-MS, modo de aquisição SIM, com informações da pureza, grupo químico, classe e fórmula molecular. ....	44
Tabela 6- Comparação da composição nutricional do leite materno maduro e fórmula infantil para lactantes.....	47
Tabela 7- Variáveis avaliadas pelo planejamento fatorial $3^2$ para otimizar o preparo de amostra. ....	49
Tabela 8- Parâmetros de validação de método e critérios de aceitação. ....	50
Tabela 9- Pontos de coleta de amostra de leite materno no estado do Rio Grande do Sul. ....	52
Tabela 10- Programação de temperatura do injetor PTV e forno da coluna. ....	54
Tabela 11- Compostos analisados por GC-NCI-MS, com seus respectivos $t_R$ , massa molecular e íons monitorados. ....	55
Tabela 12- Resultados ANOVA p-valor.....	59
Tabela 13- Resultados da validação para os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e precisão intermediária....	68
Tabela 14- Caracterização das nutrizes. ....	71
Tabela 15- Hábitos alimentares das nutrizes. ....	71
Tabela 16- Compostos detectados nas análises das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul (resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ ). ....	73
Tabela 17- Resultados da variância obtida pela PCA. ....	76



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMAP	Programa de Avaliação e Monitoramento do Ártico, do inglês <i>Arctic Monitoring and Assessment Programme</i>
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
BDE	Difenil éter polibromado
CI	Ionização química, do inglês <i>chemical ionization</i>
CE	Convenção de Estocolmo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Componente principal
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Tricloroclorofeniletano
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>
EI	Ionização por elétrons, do inglês <i>electron ionization</i>
EM	Efeito matriz
EMR-lipid®	<i>Enhanced Matrix Removal-Lipid</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GCB	Carbono grafitizado, do inglês <i>graphitized carbon black</i>
GC-ECD	Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons
GC-MS	Cromatografia a gás - espectrometria de massas
GMP	Programa de Monitoramento Global, do inglês <i>Global Monitoring Program</i>
GPC	Cromatografia com permeação em gel
HBCD	Hexabromociclododecano
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCI	Ionização química negativa, do inglês <i>negative chemical ionization</i>
NIP	Plano Nacional de Implementação
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>principal component analysis</i>
PCB	Bifenilas policloradas
PCDD	Dioxinas policloradas

PCDF	Furanos policlorados
PFOA	Ácido perfluorooctanóico
PFOS	Ácido sulfônico perfluorooctano
PFOSF	Ácido sulfônico perfluorooctano fluorado
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
PTV	Injetor de vaporização com temperatura programada, do inglês <i>programmed temperature vaporizing</i>
REC	Recuperação
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SIM	Monitoramento do íon selecionado, do inglês <i>selected ion monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>
SRM	Monitoramento de reação selecionada, do inglês <i>selected reaction monitoring</i>
TIC	Cromatograma de íon total, do inglês <i>total ion chromatogram</i>
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Ambiente, do inglês <i>United Nations Environment Programme</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 LEITE MATERNO.....	16
2.2 AGROTÓXICOS.....	17
2.2.1 Convenções adotadas, uso e exposição aos POPs .....	18
2.3 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO .....	23
2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE MATERNO PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	26
2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	29
2.5.1 Analisadores de massas .....	30
2.5.1.1 Analisadores de massas tipo quadrupolo .....	31
2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	33
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	34
2.7.1 Linearidade e curva analítica.....	35
2.7.1.1 Avaliação da presença de valores extremos .....	37
2.7.1.2 Avaliação da falta de ajuste da curva analítica .....	37
2.8 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	42
3.2 MATERIAIS, REAGENTES, SOLVENTES E GASES.....	42
3.3 PADRÕES ANALÍTICOS.....	43
3.3.1 Compostos selecionados para o estudo.....	43
3.3.1.1 Preparo das soluções analíticas.....	46
3.3.1.2 Escolha do padrão interno e padrão de controle .....	46
3.4 AMOSTRAS BRANCO .....	47
3.5 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E LIMPEZA PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO .....	48

3.5.1 Planejamento experimental.....	49
3.5.2 Avaliação dos coextrativos após a etapa de limpeza .....	50
3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO .....	50
3.7 COLETA DAS AMOSTRAS REAIS.....	51
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA POR MEIO DA PCA .....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	54
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-NCI-MS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO.....	54
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	57
4.2.1 Resultados do planejamento experimental.....	57
4.2.2 Resultados da avaliação de coextrativos após a limpeza do extrato .....	59
4.2.3 Método otimizado .....	62
4.3 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO.....	64
4.3.1 Efeito matriz .....	64
4.3.2 Seletividade.....	64
4.3.3 Linearidade e curva analítica.....	65
4.3.4 Limite de quantificação e detecção .....	66
4.3.5 Exatidão e precisão .....	67
4.4 ANÁLISE DOS QUESTIONÁRIOS.....	71
4.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	72
4.6 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS E OS RESULTADOS DAS AMOSTRAS POR MEIO DA PCA.....	75
5 CONCLUSÃO.....	79
6 REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE 1 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO .....	89
APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	93

APÊNDICE 3- QUESTIONÁRIO PARA POTENCIAIS DOADORAS DE LEITE MATERNO .....	96
APÊNDICE 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DA CURVA ANALÍTICA PARA OS COMPOSTOS ESTUDADOS. ....	100

## 1 INTRODUÇÃO

Os crescentes índices de produção e produtividade do setor agrícola estão aliados à aplicação de agrotóxicos em diversas culturas. Esses são utilizados para eliminar pragas e doenças, manter a qualidade e durabilidade dos alimentos. Apesar dos agrotóxicos serem indispensáveis para o sistema agropecuário, muitos destes compostos apresentam características tóxicas, tanto ao ambiente como a saúde do ser humano. Estes podem ser bioacumulados, mantendo-se por gerações presentes no ambiente, além da possibilidade de serem transportados a lugares remotos como a região polar, que de acordo com Programa de Avaliação e Monitoramento do Ártico (AMAP, 2010), encontraram resultados positivos de contaminação de agrotóxicos nestas regiões.

Em função desses fatos, muitos agrotóxicos estão sendo banidos do mercado. Por exemplo, a Convenção de Estocolmo em 1972, teve como objetivo implementar ações que devem ser tomadas para a eliminação e substituição dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), bem como o monitoramento da persistência desses no ambiente. Os POPs caracterizam-se por serem lipofílicos e assim, irão acumular-se, preferencialmente, nos tecidos adiposos dos animais. No caso dos seres humanos podem acumular-se no leite materno, pois é uma matriz com alto teor de gordura e a amamentação é uma forma de liberação destes compostos do organismo. Segundo o Programa de Monitoramento Global (GMP, do inglês *Global Monitoring Program*), criado pela Convenção de Estocolmo, o leite materno pode ser utilizado como um bioindicador na avaliação da eficácia da eliminação da produção e uso de POPs.

Porém, os POPs constituem apenas uma parte dos produtos químicos com potencial de contaminação ambiental. Novas substâncias estão constantemente sendo desenvolvidas e liberadas no ambiente. Nesse grupo podem ser incluídos, novos agrotóxicos, como os piretróides que surgiram como uma alternativa aos agrotóxicos com maior potencial tóxico, como o DDT. Devido essa dinâmica o monitoramento de resíduos não se deve restringir somente aos agrotóxicos proibidos.

Alguns trabalhos recentes têm demonstrado a bioacumulação de POPs e piretróides no leite materno. Assim, tornam-se necessários constantes estudos e

desenvolvimento de métodos para determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos em matrizes como o leite materno.

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento, validação e aplicação em amostras reais de um método analítico simples e eficaz para a determinação, em nível de traço de POPs e agrotóxicos, em leite materno. Um planejamento fatorial  $3^2$  foi aplicado para desenvolvimento do preparo de amostra empregando diferentes solventes de extração e sorventes para a etapa de limpeza. A análise foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC-NCI-MS). O método desenvolvido foi aplicado em amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul, e as nutrizes doadoras preencheram um questionário para caracterização das amostras. Para correlacionar os agrotóxicos detectados com as características das amostras foi utilizado a análise por componentes principais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEITE MATERNO

O leite dos mamíferos apresenta composições bioquímicas altamente específicas, que estão de acordo com adaptação do recém-nascido quanto às necessidades fisiológicas de cada espécie. Nos seres humanos, o leite materno é considerado o alimento mais adequado para o recém-nascido, pois esse demonstra uma imaturidade no desenvolvimento das funções digestiva, metabólica e excretora. Esta imaturidade se traduz por múltiplas deficiências enzimáticas que são supridas pela ingestão de leite materno (BORTOLOZO et al., 2004). O aleitamento materno, também favorece o vínculo mãe-filho facilitando o desenvolvimento emocional, cognitivo e do sistema nervoso (UNICEF, 2007). A Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), recomenda aleitamento materno por dois anos ou mais, sendo de forma exclusiva nos primeiros seis meses de vida.

A composição do leite materno varia com o passar dos meses de lactação. Existem três fases principais: a primeira é a produção do colostro, seguida do leite de transição e finalmente o leite maduro ou definitivo. O colostro é uma secreção de cor amarelada, devido ao seu alto teor de beta caroteno e destaca-se por suas propriedades anti-infecciosas. Quando comparado ao leite maduro o colostro é mais viscoso, pois possui concentrações mais elevadas de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis (LANG, 1999). O leite de transição é o leite intermediário entre o colostro e o leite maduro. Seu período de produção ocorre em média entre o sexto e décimo quinto dia após o parto, podendo perdurar por todo primeiro mês de lactação. Já o leite maduro é o leite definitivo que alimentará o recém-nascido por pelo menos seis meses após o parto (LANG, 1999).

O leite materno contém de 3 a 5% de lipídios, cerca de 50% do valor calórico total é proveniente da gordura, que é fonte de colesterol, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (SILVA et al., 2007). Também contém concentrações de aminoácidos essenciais de alto valor biológico (cistina e taurina) que são fundamentais ao desenvolvimento do sistema nervoso central. Isso é particularmente importante para o prematuro, que não consegue sintetizá-los a partir de outros aminoácidos por deficiência enzimática (BORTOLOZO et al., 2004).



## 2.2 AGROTÓXICOS

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para uso no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, para alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação de seres vivos nocivos.

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras. Entre elas destacam-se quanto ao seu modo de ação no organismo alvo de acordo com o ingrediente ativo como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas e nematicidas (natureza da praga combatida) e quanto aos efeitos que causa à saúde humana (toxicologia). Também podem ser classificados conforme sua classe química, sendo os mais importantes os organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, clorfenoxi e triazinas (BAIRD, 2002; BARBOSA, 2004). Quanto à sua toxicologia os agrotóxicos podem ser classificados em quatro classes e são diferenciados pelas cores dos rótulos, facilitando sua identificação pelo usuário, como descrito na Tabela 1 (ANVISA, 2005).

Tabela 1- Classificação dos agrotóxicos conforme a toxicologia.

<b>Classificação</b>	<b>Nível de Toxicidade</b>	<b>Cor</b>	<b>DL 50 (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Classe I	Extremamente tóxico	Vermelha	0 – 50
Classe II	Altamente tóxico	Amarela	50 – 500
Classe III	Mediamente tóxico	Azul	500 – 5000
Classe IV	Pouco tóxico	Verde	> 5000

DL 50: Dosagem letal para 50% dos organismos.  
Fonte: ANVISA, 2005.

Um dos primeiros agrotóxicos sintetizados foi o DDT, em 1939, um composto organoclorado. Esse foi utilizado para prevenção de tifo em soldados durante a Segunda Guerra Mundial. Seu uso também foi empregado em programas de controle de doenças como a malária e a leishmaniose visceral (AMATO, TORRES & MALM, 2002). Nesta mesma época outros compostos organoclorados foram sintetizados como hexaclorociclohexano (HCH), aldrin, dieldrin, endrin e clordano. Esses juntamente com o DDT foram amplamente utilizados no sistema agropecuário como inseticidas por serem de baixo custo e muito eficazes.

Em 1962, Rachel Carson publicou em seu livro “Primavera Silenciosa”, que o amplo uso do DDT poderia ter impacto sobre a redução populacional de diversas aves. Neste mesmo livro a autora relata a persistência e possíveis consequências à saúde e ao ambiente do uso indiscriminado de compostos organoclorados. Essa publicação pode ser considerada como uma das primeiras manifestações ecológicas contra o uso extensivo e intensivo de agrotóxicos.

A partir dos anos 80 a comunidade científica se organiza, por meio de programas como o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) apoiando três convenções: Convenção de Basiléia, Convenção de Roterdã, e Convenção de Estocolmo (CE).

### **2.2.1 Convenções adotadas, uso e exposição aos POPs**

A convenção da Basiléia, ocorrida em 1989, objetivou coibir o tráfico ilegal e previa a intensificação da cooperação internacional para a gestão ambientalmente adequada de resíduos de agrotóxicos. Assim, seria possível evitar que resíduos considerados perigosos ou mesmo rejeitos fossem exportados de países desenvolvidos para países em desenvolvimento, na maioria das vezes como descarte. Passou a vigorar em 5 de maio de 1992 (CONVENÇÃO DE BASILÉIA, 2013). No Brasil a convenção foi adotada pelo Decreto Nº 875, de 19 de julho de 1993, e regulamentada pela Resolução CONAMA Nº 452, de 02 de julho de 2012 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

Já a Convenção de Roterdã, em 1998, teve como objetivo promover a responsabilidade compartilhada e os esforços corporativos entre as Partes no comércio internacional de certas substâncias químicas perigosas, a fim de proteger a saúde humana e o ambiente contra potenciais danos, contribuindo assim para o uso correto desses produtos. Entrou em vigor somente no ano de 2004, após a ratificação de mais de 50 países (CONVENÇÃO DE ROTERDÃ, 2013). No Brasil a Convenção de Roterdã foi promulgada pelo decreto Nº 5.360 de 31 de janeiro de 2005.

Em 1972 foi realizado o primeiro evento da Convenção de Estocolmo, conhecida como a primeira atitude mundial a tentar preservar a saúde humana e o ambiente do uso indiscriminado de agrotóxicos, principalmente os organoclorados.

Esses foram classificados como POPs, pois permanecem inalterados no meio ambiente, ocasionando bioacumulação em diferentes níveis tróficos.

Em 2001, na Conferência de Plenipotenciários, foi adotada a Convenção de Estocolmo para POPs. Essa entrou em vigor em 2004 (CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, 2013) e ficaram estabelecidas a eliminação ou redução das emissões de 12 POPs, suporte à transição para alternativas mais seguras, foco em novas ações contra os POPs, limpeza de antigos estoques que contenham POPs e realização de trabalhos mundiais para um mundo livre de POPs. Com o passar dos anos, outros compostos químicos foram adicionados à lista, os chamados novos POPs. Esta lista está em constante ampliação, visto que uma das ações da Convenção de Estocolmo é analisar novas propostas de produtos químicos, enviadas pela comunidade científica, que podem ser considerados POPs. O Comitê de Revisão POPs avalia essas propostas e faz recomendações à Conferência. Os POPs, bem como os produtos químicos que estão sob revisão, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Lista de POPs de acordo com a Convenção de Estocolmo.

Composto		Tipo/ Uso	Recomendações CE
2001			
Aldrin		Agrotóxico	Eliminação
Dieldrin		Agrotóxico	Eliminação
Endrin		Agrotóxico	Eliminação
Clordano		Agrotóxico	Eliminação
Heptacloro		Agrotóxico	Eliminação
Hexaclorobenzeno (HCB)		Agrotóxico industrial	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação
Mirex		Agrotóxico	Eliminação
Toxafeno		Agrotóxico	Eliminação
DDT		Agrotóxico	Produção e uso com restrições
Bifenilas policloradas (PCB)		Industrial	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação
Dioxinas (PCDD)	Policloradas	Subproduto	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação

<b>Composto</b>	<b>Tipo/ Uso</b>	<b>Recomendações CE</b>
Furanos policlorados	Subproduto	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação
<b>2009</b>		
Clordecona	Agrotóxico	Eliminação
Lindano ( $\gamma$ - HCH)	Agrotóxico	Eliminação
$\alpha$ -HCH	Agrotóxico e Subproduto	Eliminação
$\beta$ -HCH	Agrotóxico e Subproduto	Eliminação
Hexabromobifenila	Industrial	Eliminação
Tetra-BDE e Penta-BDE	Industrial	Eliminação
Hexa-BDE e Hepta-BDE	Industrial	Eliminação
PFOS e seus sais	Industrial	Produção e uso com restrições
PFOSF	Industrial	Produção e uso com restrições
Pentaclorobenzeno	Agrotóxico Industrial e Subproduto	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação
<b>2011</b>		
Endossulfam	Agrotóxico	Eliminação
<b>2014</b>		
Hexabromociclododecano (HBCD)	Industrial	Eliminação
<b>2015 (As alterações foram recomendadas à Conferência, porém estes compostos não formam incluídos na lista de POPs da CE)</b>		
Naftalenos clorados	Industrial	Produção não intencional, contínua redução e, sempre que possível eliminação
Hexaclorobutadieno	Industrial	Eliminação
Pentaclorofenol	Agrotóxico	Eliminação
<b>Compostos em revisão</b>		
Deca-BDE	Industrial	-
Parafinas cloradas de cadeia curta	Industrial	-
Dicofol	Agrotóxico	-
Ácido Perfluorooctanóico (PFOA) e seus sais	Industrial	-

CE: Convenção de Estocolmo.

Fonte: Stockholm Convention. Disponível em: <<http://chm.pops.int/>> Acesso em: 15 dez. 2015.

Os compostos estabelecidos como POPs pela Convenção de Estocolmo é uma pequena parte dos muitos produtos químicos em uso comercial no mundo. Por isso a convenção definiu como critérios para inserção de novos POPs a persistência no meio ambiente, potencial de transporte a longa distância, bioacumulação e toxicidade (CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, 2013).

Assim, foi definido que cada país signatário deveria ter o seu Plano Nacional de Implementação (NIP), o qual constaria as propostas para cumprir o acordo estabelecido pela Convenção de Estocolmo. A esse é incluso o monitoramento ambiental e humano da presença dos POPs (LAL et al., 2013).

No Brasil a Conferência Rio 92 abordou esse tema, e foi considerada um dos eventos mais importantes do final do século 20. Foram tratadas questões ambientais, focando na contaminação pelos POPs propondo que esses produtos fossem produzidos e utilizados de maneira a minimizar os danos à saúde. Nesse contexto foi lançado um documento sistematizado em um plano (Agenda 21) de ações com o objetivo de alcançar o desenvolvimento sustentável mundial (Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, 1995).

Segundo o plano nacional de implementação (BRASIL, 2013), o Brasil não produz nenhum dos POPs listados na Convenção de Estocolmo, uma vez que esses estão sujeitos à proibição ou à restrição expressas legalmente à produção, à comercialização e ao uso, desde 1985, por meio da Portaria MA nº 329, de 2 de setembro de 1985. Porém essa portaria prevê exceções que permitem a utilização destes como produto domissanitário em campanhas de saúde pública, ou na agricultura, em situações emergenciais.

Antes mesmo da portaria de 1985, em 1971, foram publicadas no Brasil duas portarias do Ministério da Agricultura abordando o uso de organoclorados. Uma Portaria proibiu a fabricação e comercialização de DDT e HBC para combate a ectoparasitas em animais domésticos - Portaria nº 356/71; e a outra Portaria proibiu o uso de organoclorados em pastagens - Portaria 357/71. Além dessas, na década de 1970 o Ministério da Agricultura publicou a Portaria nº 393/72, proibindo o uso de organoclorados na cultura do fumo.

Dentre os POPs cabe destacar os PCBs. O uso desses compostos foi regulamentado da década de 30 nos Estados Unidos em instalações elétricas. A partir de então, foram desenvolvidas várias formulações de óleos isolantes para transformadores baseadas nos PCBs, devido à sua característica de não

flamabilidade. As misturas contendo PCB possibilitam seu emprego em vários segmentos industriais, como fluidos dielétricos em capacitores e transformadores elétricos, turbinas de transmissão de gás, fluidos hidráulicos, resinas plastificantes, adesivos, sistemas de transferência de calor, aditivo antichama e lubrificantes. O uso foi facilitado, pois sua fórmula é adaptável à quase todos os polímeros, além de possuírem baixo custo. Pequenas quantidades destes compostos podem ser encontradas no ambiente decorrente de liberações que ocorreram no passado e da sua formação não intencional a partir de processos térmicos envolvendo matéria orgânica e cloro, como resultado da combustão incompleta ou reações químicas (LEEUWEN, BAVEL & BOER, 2013). A exposição crônica dos seres humanos aos PCBs pode resultar em alterações hepáticas, imunológicas, oculares, dérmicas e na tireoide; efeitos neuro-comportamentais, redução do peso ao nascer, toxicidade reprodutiva e aumento na incidência de tumores (CROES et al., 2012).

Os POPs constituem apenas uma parte dos produtos químicos com potencial de contaminação ambiental. Novas substâncias estão constantemente sendo desenvolvidas e liberadas no ambiente, os chamados contaminantes "emergentes", nesse grupo podem ser incluídos, novos agrotóxicos, fármacos, produtos de cuidados pessoais, medicamentos veterinários, entre outros (ÇOK et al., 2012).

No início dos anos 80 surgiram os inseticidas do grupo dos piretróides, como uma alternativa aos agrotóxicos com maior potencial tóxico, como o DDT. Acreditava-se que aqueles apresentavam baixa toxicidade aguda em mamíferos, que não se acumulariam nos tecidos adiposos e não seriam persistentes no ambiente (ALONSO et al., 2012).

Historicamente, a preocupação à exposição dos piretróides restringia-se aos organismos aquáticos, principalmente aos artrópodes e peixes, devido ao elevado grau de toxicidade, mesmo em baixas concentrações (MANACA et al., 2011). Para alguns pesquisadores os piretróides são considerados seguros, pois são convertidos em metabolitos não-tóxicos, tal como ácido fenoxibenzóico. Apesar de não serem bioacumulados nos seres humanos, eles possuem potenciais tóxicos de curta duração nos sistemas biológicos, e podem deixar consequências permanentes no organismo (FEO et al., 2012). Estudos recentes relatam o potencial cancerígeno, neurotóxico, e danoso ao sistema reprodutivo em mamíferos, podendo atingir, também, a tireoide devido à semelhança estrutural com o hormônio tireoidiano. No caso das mulheres essa alteração no período gestacional pode provocar deficiência

do sistema neurológico do feto. Trabalhos recentes têm mostrado a presença de piretróides no leite materno, com níveis de até  $1200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de gordura (ZHANG et al., 2013).

### 2.3 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO

O ser humano pode ser contaminado por diferentes compostos químicos. Muitos destes contaminantes possuem propriedades lipofílicas demonstrando a tendência à bioacumulação que é o processo através do qual os seres vivos absorvem e retêm substâncias químicas no seu organismo. Essa contaminação pode ser de forma direta, através do ambiente que os envolve (bioconcentração), e indiretamente, por meio da cadeia alimentar (biomagnificação). À medida que se sobe no nível trófico a concentração destes compostos aumenta, pois além dos compostos que o organismo já absorveu de forma direta, concentra os contaminantes que provêm da alimentação (BURATINI & BRANDELLI, 2006).

Os agrotóxicos, normalmente se acumulam nos tecidos adiposos, e no caso das mulheres a amamentação é uma forma de excretar estes compostos (SCHANTZ et al., 2013). Por isso o leite materno é considerado uma matriz importante para avaliar a exposição do ser humano aos agrotóxicos, pois apresenta teor de lipídio cerca de 10 vezes maior que sangue humano, por exemplo, e a coleta não se dá de forma invasiva (SCHANTZ et al., 2013).

Como já visto no item 2.2 na Convenção de Estocolmo foram definidas propostas para eliminação ou redução de POP's e a fim de monitorá-las foi criado um Programa de Monitoramento Global (GMP, do inglês *Global Monitoring Program*). A avaliação da eficácia na eliminação da produção e uso de POPs consiste em analisar três matrizes: leite materno ou sangue humano, e água (apenas para ácido sulfônico perfluorooctano, PFOS, do inglês *perfluorooctane sulfonate*). No caso do leite materno as amostras seguem os seguintes critérios de seleção, definidos pelo GMP (MALISCH & FIEDLER, 2012): as nutrizes devem ser primíparas, ter menos de 30 anos, saudáveis, exclusivamente amamentando uma criança (ou seja, não gêmeos), que residem na mesma área há cerca de cinco anos e a coleta das amostras deve ser realizada de 3 a 8 semanas após o parto.

No início do monitoramento global nos anos de 1987-1989 e 1992-1993, as amostras eram coletadas principalmente Europa e América do Norte, para a análise

de PCB, PCDD e PCDF. Em 2000-2003, o monitoramento abrangeu os dozes POPs listados na CE. Nos anos de 2004-2007 e 2008-2012, a WHO e PNUMA colaboraram para a realização do monitoramento global, e nestas rodadas foram ampliadas as regiões de estudo a fim de fornecer resultados representativos para todas as regiões do globo. O Brasil participou de uma rodada entre 2000-2003 (UNEP, 2013).

Os resultados apresentados pelo monitoramento global (UNEP, 2013), relatam que os níveis mais elevados de DDT foram encontrados em países tropicais e subtropicais. Esse resultado pode estar relacionado ao uso de DDT na prevenção da malária nestas regiões. Para outros compostos como aldrin, dieldrin, mirex e toxafeno, resultados das análises em leite materno demonstram que estes estão praticamente eliminados do meio ambiente. Além disso, foi observado que os países que participaram em mais de uma rodada do monitoramento global, os níveis de PCBs diminuíram de forma constante ao longo de 2000-2012. No Brasil os resultados do monitoramento realizado em 2000 demonstraram que o nível de dioxinas e furanos foi o terceiro menor do entre os países participantes (FERREIRA, KRAUSS & BRAGA, 2012).

Outra preocupação da GMP foi formar e qualificar laboratórios para realização da análise de POPs. Primeiramente foi realizado um estudo entre os laboratórios participantes para avaliar a capacitação desses. A primeira fase do estudo foi realizada na Ásia e no Pacífico, em 2009/2010, e a segunda fase na África e América Latina. Um dado importante apresentado nesses trabalhos é que o composto toxafeno não foi incluído na lista de analitos avaliados devido às condições técnicas de alguns laboratórios, pois é composto por uma mistura contendo diversos congêneres de terpenos bicíclicos policlorados (LEEUWEN, BAVEL & BOER, 2013).

Ainda, outros estudos foram realizados em diversas regiões do mundo, como o monitoramento realizado em Moçambique. Essa região foi conhecida por apresentar casos frequentes de malária, e, por isso, ocorreram diversas campanhas para a aplicação de DDT nas residências. Por essa razão, Manaca e colaboradores (2011) realizaram coletas de leite materno no período de 2002 a 2006 em áreas rurais de Moçambique para investigar a presença de compostos de DDT. Um significativo aumento das concentrações de 4,4-DDT e seu principal metabólito 4,4-DDE foi observado em 2002 (entre 2,4 e 0,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente) e em 2006 (7,3



e 2,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente). Também foram observadas diferenças entre as concentrações de DDT e compostos relacionados no leite materno de acordo com o número de filhos, sendo as maiores concentrações encontradas em leites maternos de nutrizes primíparas.

Na Índia uma pesquisa realizada por Bedi e colaboradores (2013), em uma região agrícola, determinou em leite materno resíduos  $\gamma$ - e  $\beta$ -HCH (97,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; 101,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), p p'-DDD (239,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), p p'-DDE (1574,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), p p'-DDT (100,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e endrin (90,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Neste mesmo estudo também foi detectada a presença de endossulfam, cipermetrina e clorpirifós.

Conforme publicado por Cerrilloa et al. (2005), a Espanha era o principal consumidor de endossulfam na União Europeia. Esse estudo analisou a presença de endossulfam e seus metabólitos em tecido adiposo, sangue e leite de mulheres em idade reprodutiva e sangue de crianças. Como resultados, as concentrações mais elevadas de endossulfam alfa e beta foram encontradas no tecido adiposo, com valor médio (alfa + beta) de 17,72  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de gordura, seguida por amostras de leite humano com um valor médio (alfa + beta), de 11,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  de leite. Com isso pode-se observar que o endossulfam é um composto lipofílico, e sua eliminação pode ocorrer por meio da amamentação. Por consequência desse, e outros estudos, o endossulfam passou a fazer parte dos POPs em 2011.

Na literatura está descrito que os piretróides são convertidos em metabólitos não tóxicos em mamíferos. No entanto, alguns trabalhos recentes têm demonstrado a bioacumulação no leite materno coletado em áreas onde os piretróides têm sido amplamente utilizados tanto para atividades agrícolas como no controle da malária. No trabalho desenvolvido por Corcellas e colaboradores (2012) foi avaliada a presença de 13 piretróides em amostras de leite materno provenientes do Brasil, Colômbia e Espanha. Como resultados, foram determinadas concentrações que variaram de 1,45 até 24,2  $\text{ng g}^{-1}$  de gordura. Compostos como a cipermetrina, cialotrina-lambda, permetrina, esfenvalerato e fenvalerato estavam presentes em todas as amostras estudadas. A frequência de ocorrência piretróides variou de acordo com o país de origem da amostra: no Brasil o composto mais abundante foi a bifentrina, na Colômbia a cialotrina-lambda e na Espanha a permetrina.

Luzardo e colaboradores (2013) avaliaram 57 contaminantes em leite materno (colostró e leite maduro) coletadas na Espanha, detectaram em todas as amostras

resultados positivos para hexaclorobenzeno, p,p'-DDE, PCB 138, PCB 153, PCB 180, fenantreno, fluoranteno e pireno, além de outros contaminantes.

Em vista disso torna-se necessário uma avaliação cada vez mais frequente dos agrotóxicos em matrizes como o leite materno, e uma etapa fundamental para a determinação dos compostos é o preparo das amostras. Os métodos de extração vêm evoluído à medida que se busca métodos mais robustos e aplicáveis a rotina laboratorial para a determinação de diferentes classes de resíduos de agrotóxicos, que preferencialmente devem ter capacidade de reduzir os interferentes da matriz.

## 2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE MATERNO PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Os métodos de preparo de amostras apresentados na literatura são baseados na extração líquido-líquido empregando diferentes solventes, tais como hexano, acetona, acetado de etila e acetonitrila, bem como a combinação entre eles. A limpeza deve ser eficiente, pois o extrato da matriz pode interferir na análise, sendo frequentemente utilizado a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), extração em fase sólida (SPE), cromatografia em coluna cromatográfica e cromatografia com permeação em gel (GPC).

O método oficial AOAC 970.52 (AOAC, 2007) para determinar resíduos de agrotóxicos em leite baseia-se em 100 mL leite extraído com 100 mL álcool etílico ou metanol, e 1 g de oxalato de sódio ou potássio. Adiciona-se 50 mL de éter de petróleo e agita-se por 1 min. Esse processo é realizado por duas vezes. Após a mistura é centrifugada por 5 min a 1500 rpm e a fase aquosa é extraída mais duas vezes com 50 mL de éter de petróleo. Esses extratos são misturados e secos em coluna de MgSO<sub>4</sub>.

De acordo com o guia elaborado por Malisch & Fiedler (2012) que descreve as diretrizes para organização, amostragem e análise de amostras de leite materno para o GMP, a análise de POPs básicos (aldrin, clordado, DDT, dieldrin, endrin, heptaclor, hexaclorobenzeno, mirex, PCBs -28, 52, 101, 138, 153, 180- e toxafeno) segue as seguintes etapas: homogeneização da amostra, seguida da centrifugação e separação da fase aquosa. A fase precipitada é misturada com sulfato de sódio, extraída com hexano, filtrada e evaporada resultando num extrato de lipídios. Uma alíquota de 0,5 g é dissolvida em ciclo-hexano: acetato de etila (1:1, v/v) e os

padrões internos são adicionados. A primeira etapa de limpeza é realizada com GPC e eluição com ciclo-hexano: acetato de etila (1:1, v/v), seguida da evaporação do extrato e redissolução em iso-octano. A última etapa de limpeza consiste em cromatografia em coluna com sílica gel ativada e eluição com tolueno.

Mesquita (2001) e Azeredo e colaboradores (2008) utilizaram 1 mL de amostra sendo colocadas em banho-maria de 37 °C por 20 min. À amostra adicionou-se 10 mL da mistura acetato de etila/metanol/acetona nas proporções de 1:2:2 (v/v). A mistura é submetida a vórtex por 1 min e após 20 min de ultrassom, na sequência foi centrifugada por 15 min à aproximadamente 2000 rpm e à fase orgânica foi adicionada 10 mL de água e realizada a limpeza do extrato com SPE em cartucho de C18.

Estudos realizados por Ennaceur e colaboradores (2008), a fim de determinar PCBs, DDT e HCH, empregaram de 2 a 10 mL de leite materno que foram extraídos três vezes com 20 mL de n-hexano, 5 mL de acetonitrila e 1 mL de etanol. O extrato foi filtrado com sulfato de sódio anidro e evaporou-se para 5 mL. Uma alíquota de 1 mL foi utilizada para determinar o teor de gordura por método gravimétrico. O restante do extrato foi purificado em uma coluna cromatográfica de 40 cm x 0,5 cm de diâmetro interno. Essa estava preenchida com 2 g de Florisil® e 1 g de sulfato de sódio anidro. O extrato foi eluído com uma mistura de 30 mL de diclorometano e n-hexano (1:9; v/v). Na sequência o extrato purificado foi evaporado em um sistema *Kuderna-Danish* até 0,5 mL e analisado por GC-ECD.

Colles e colaboradores (2008) procederam a extração com 25 mL de leite materno, sendo os compostos extraídos com uma mistura de 100 mL n-hexano e acetona (1:2, v/v). Ao extrato foi adicionada uma solução aquosa de 100 mL de sulfato de sódio anidro 2% (m/v). Após agitação e decantação a fase orgânica foi evaporada em sistema *Kuderna-Danish* até um volume de 3 mL, e após evaporado até a secura com fluxo suave de nitrogênio. Nesse trabalho teve-se como objetivo determinar dieldrin, heptacloro, clordano, DDT, HCB, HCH e PCBs.

O método desenvolvido por CRUZ e colaboradores (2003) baseou-se na adição de 0,5 mL de metanol ao leite materno, antes da extração. Na sequência foi realizada a extração dos compostos duas vezes, com uma mistura de 5 mL de n-hexano e acetona (90:10, v/v), seguido da agitação em vortex por 1 min. Após a amostra foi centrifugada e o extrato foi transferido para um cartucho de SPE com Florisil® e 1 cm de sulfato de sódio anidro. A eluição foi realizada com dois eluentes

distintos, sendo o primeiro 6 mL de n-hexano e o segundo com 6 mL de n-hexano-diclorometano (5:1, v/v). O extrato foi concentrado para 1 mL e analisado por GC-ECD.

Mueller e colaboradores (2008) propuseram um método para a determinação de HCBs, HCHs, heptacloro, dieldrin, DDE e DDT. Para isso, utilizaram 100 g de amostra de leite humano para a análise. As proteínas foram desnaturadas com a adição de oxalato de potássio. Na sequência os compostos foram extraídos por extração líquido-líquido, utilizando uma mistura de acetona: hexano (2:1, v/v), sendo extraídas três vezes consecutivas. As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. O extrato foi dissolvido em hexano e submetido à cromatografia de permeação em gel (GPC). Na etapa de limpeza do extrato para remover o residual de lipídios, fez-se uso de uma coluna com Florisil®. Após o extrato foi evaporado até a secura e analisado por GC-MS.

Squella e colaboradores (2013) fizeram uso da extração líquido-líquido para quantificar os compostos HCH, heptacloro, clordano, DDT e seus metabolitos. Uma alíquota de 2 mL de leite materno e 15 mL de hexano: acetona (2:1, v/v), agitando a mistura por 2 min. A fase aquosa foi extraída novamente com 15 mL de uma solução 2% de sulfato de sódio e 10 mL de hexano, após foi agitada por 1 min e a fase orgânica foi adicionada ao resto do extrato. Posteriormente filtrou-se com sulfato de sódio anidro. O extrato foi concentrado até a secura. Esse foi redissolvido em 1 mL de hexano e 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo essa mistura agitada por alguns segundos e após centrifugada. A fase superior contendo o hexano foi submetida para análise por GC-ECD e confirmada por GC-MS.

Luzardo e colaboradores (2013) aplicou uma variação do método QuEChERS para a determinação de 57 compostos incluindo organoclorados, HPAs e PCBs. Foram utilizados 5 mL de leite materno diluídos em 5 mL de água ultrapura seguida da extração com 10 mL de acetonitrila saturada em hexano e agitação por 10 min. Posteriormente foi adicionado 4 g de MgSO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl, 0,5 g de citrato dissódico e 1 g de citrato trissódico, agitação por 1 min e centrifugação a 5000 rpm (20 °C) por 5 min. A fase precipitada foi re-extraída com 5 mL de acetonitrila saturada com hexano. A etapa de limpeza foi realizada com a fase da acetonitrila por d-SPE com 0,9 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,5 g do sorvente PSA (amina primária secundária, do inglês *primary secondary amine*). O extrato foi filtrado, evaporado e reconstituído em ciclo hexano.

O trabalho desenvolvido por Chen e colaboradores (2014) fez uso da extração líquido-líquido com acetonitrila e hexano, seguida de uma etapa de congelamento para precipitação da fase lipídica. A limpeza foi realizada com PSA e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  seguida da extração em fase sólida com carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) e PSA. As análises foram realizadas por GC-MS/MS, para determinação de 25 compostos pertencentes às classes dos organoclorados, organofosforados e piretróides.

A grande dificuldade nesse tipo de análise é extrair os compostos com o mínimo de coextrativos da matriz, principalmente os lipídios. Os métodos disponíveis na literatura utilizam a combinação de solventes, diferentes tipos de limpeza além de etapas de evaporação da amostra para obter um fator de enriquecimento dos analitos, já que os níveis encontrados na maioria das vezes são da ordem de  $\text{ng g}^{-1}$ .

## 2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Na cromatografia a gás os componentes de uma amostra voláteis ou volatilizáveis e termicamente estáveis são separados em decorrência das interações entre a fase estacionária (sólida ou líquida) e a fase móvel (gasosa). Assim, uma amostra é eluída por meio de um fluxo de uma fase móvel de gás inerte, sendo que a separação dos compostos se baseia na eluição dos analitos através do tempo de retenção. Essa técnica facilita o uso de pequenas quantidades de amostra, que pode se tornar limitante em algumas análises (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

Em GC o sistema de detecção deve apresentar: sensibilidade adequada; boa estabilidade e reprodutibilidade; resposta linear para os analitos; ampla faixa de temperatura, desde ambiente até pelo menos 400 °C; tempo de resposta curto independente da vazão. Dentre os detectores mais comumente empregados em GC são os clássicos (detector de ionização de chama, detector de condutividade térmica e detector por captura de elétrons) e detectores de massa (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

Os detectores de massas podem acoplado à um cromatógrafo, combinam as vantagens da cromatografia como alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

### 2.5.1 Analisadores de massas

As amostras para serem analisadas por espectrometria de massas devem ser puras, pois a fragmentação às vezes dificulta a interpretação de espectros de misturas. A GC constitui uma forma ideal de introduzir misturas ou amostras complexas, já que seus componentes são separados antes da entrada do detector de massas (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008). A combinação de GC com espectrometria de massas é relativamente simples, com o uso de colunas capilares é possível conectar a saída da coluna diretamente na fonte do espectrômetro. Além disso, a amostra ao sair do cromatógrafo está na forma de vapor, e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de GC e o alto vácuo do espectrômetro de massas (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

Nos detectores de espectrometria de massas as moléculas de uma amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza essas moléculas. As fontes empregadas com maior frequência são ionização por elétrons (EI) e ionização química (CI) (WATSON & SPARKMAN, 2011). Em EI o analito de interesse, em fase gasosa, é ionizado pelo bombardeamento com um feixe de elétrons energéticos (geralmente a 70 eV) que são emitidos de um filamento de tungstênio ou rênio aquecidos e acelerados. As fontes de EI produzem altas correntes de íons, que proporcionam boas sensibilidades. O analito é ionizado pela remoção de um único elétron, esse processo requer, normalmente, 10 eV e o restante da energia gera a fragmentação dos analitos podendo produzir uma fragmentação extensiva. A fragmentação extensiva pode resultar em vantagens e desvantagens. Um grande número de picos pode ser vantajoso do ponto de vista de tornar inequívoca a identificação dos analitos. Porém quando provoca o desaparecimento do pico do íon molecular caracteriza-se uma desvantagem, já que a massa molecular do analito não pode ser facilmente estabelecida (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; WATSON & SPARKMAN, 2011).

A ionização química ocorre de forma mais branda que EI, aumentando a produção de íon molecular e reduzindo as fragmentações associadas com a ionização por elétrons, resultando, para algumas classes de compostos, o aumento da sensibilidade analítica. Os átomos gasosos da amostra são ionizados por colisão com íons produzidos por bombardeamento eletrônico de um excesso de gás reagente (WATSON & SPARKMAN, 2011). Um dos gases reagente mais comum é o

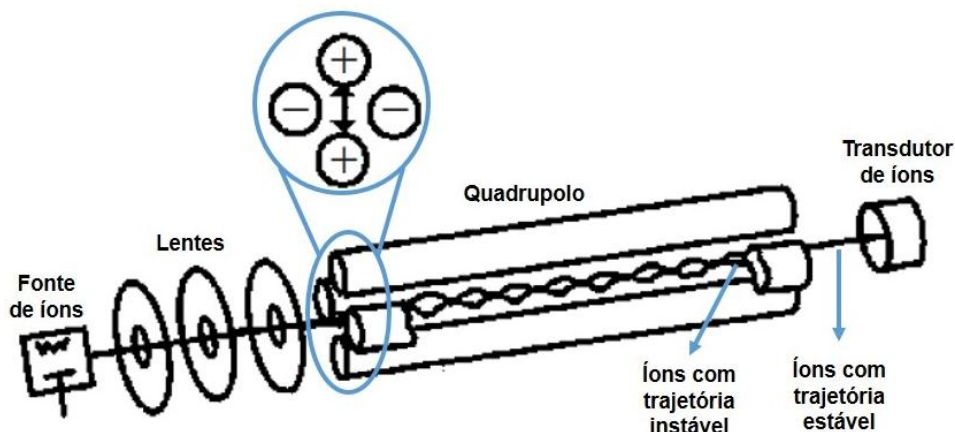
metano, que reage com elétrons de alta energia para produzir vários íons, como  $\text{CH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3^+$  e  $\text{CH}_2^+$ . Os dois primeiros predominam, e representam cerca de 90% dos produtos da reação. Esses íons reagem rapidamente com as moléculas de metano que são adicionadas na fonte de ionização. A pressão do gás na fonte deve ser relativamente elevada, permitindo que as colisões ocorram frequentemente. A ionização química com íons negativos (NCI, do inglês *negative chemical ionization*) é utilizada para a determinação de analitos que contêm átomos muito eletronegativos, pois formam ânions muito estáveis, gerando grupos específicos de fragmentos de alta intensidade (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Em NCI ocorre uma ionização mais seletiva para compostos que apresentam grupos capturadores de elétrons consequentemente menos interferentes da matriz são ionizados, como por exemplo, os ácidos graxos. Para amostras de leite materno o GMP recomenda a utilização de ionização química negativa para compostos com mais de 6 cloros, além disso, esse modo de ionização vem sendo relatado para análise de compostos pertencentes aos grupos organoclorados, organofosforados e piretróides (UNEP, 2011; PORTOLÉS et al., 2012; CHERTA et al., 2013; DEME et al., 2014).

Depois de ionizados os íons passam para o analisador de massas, que podem ser do tipo de setor magnético, dupla focalização, armadilha de íons, quadrupolo e analisadores de alta resolução como o de tempo de voo. No analisador os íons são selecionados conforme suas razões massa/carga ( $m/z$ ), e então são detectados e representados na forma de um gráfico pelo sistema de dados (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

#### 2.5.1.1 Analisadores de massas tipo quadrupolo

O quadrupolo consiste de quatro barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos. Os pares opostos das barras estão conectados eletronicamente, sendo um par ligado ao lado positivo e outro par ligado ao terminal negativo. Nesses se aplicam uma corrente contínua do tipo corrente direta e um potencial de rádio frequência alternante. Em um valor específico de voltagem íons de uma determinada razão  $m/z$  atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável. Os demais íons atingem as barras e são convertidos em moléculas neutras. A trajetória dos íons é complexa, mas simplificada segue uma trajetória helicoidal, como mostra a Figura 1 (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Figura 1- Esquema de um analisador quadrupolar.



Fonte: Adaptado de HOFFMANN & STROOBANT (2007).

Esse instrumento é mais compacto, de menor custo, e mais robusto que a maioria dos outros tipos de analisadores. Apresenta altas velocidades de varredura e boa linearidade (WATSON & SPARKMAN, 2011). Os analisadores quadrupolares podem estar configurados de forma sequencial (triplo quadrupolo), chamados de espectrometria de massas sequencial (MS-MS). Essa configuração permite obtenção de um espectro de massas de íons pré-selecionados e fragmentados.

Os triplos quadrupolos são constituídos por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (Q2) não é utilizado para separar íons de mesma razão  $m/z$ , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), geralmente por dissociação induzida por colisão, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3) (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008; HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). A principal vantagem de um analisador do tipo triplo quadrupolo, em relação a um quadrupolo simples é o aumento da relação sinal/ruído, visto que no primeiro selecionam-se somente os íons característicos do analito de interesse. Por isso torna-se mais seletivo e sensível, podendo obter melhores limites de quantificação para os compostos de interesse (WATSON & SPARKMAN, 2011).

Os detectores por espectrometria de massas apresentam diversos modos de varreduras para a obtenção dos espectros, independentemente do tipo de equipamento. Entre os principais pode-se destacar: modo de varredura "Full Scan", monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *selected ion monitoring*) e o



monitoramento de reação selecionada (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) (GROSS, 2004; HARRIS, 2008).

a) *Full Scan*: Neste modo de varredura analisa-se todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de  $m/z$  (GROSS, 2004). Esse modo é mais usual quando se dispõe de um único quadrupolo, mas quando se tem um sistema MS-MS pode-se utilizá-lo quando somente o Q1 realiza a varredura completa da amostra em uma faixa ampla de  $m/z$ , durante a corrida cromatográfica. Neste caso o Q2 e o Q3 funcionam como lentes, transmitindo os íons para o detector. Nesse modo de varredura pode-se identificar íons característicos dos analitos, por meio de análise de soluções individuais dos padrões. O cromatograma nessa condição é conhecido como cromatograma de íon total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

b) SIM: nesse modo de operação o espectrômetro faz a separação de somente um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse, que estão presentes em uma mistura complexa, o que aumenta a sensibilidade uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Neste caso o Q2 e o Q3 servem somente para transmitir os íons filtrados no Q1 (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

c) SRM: o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e estes íons são fragmentados novamente (MS/MS). Esse modo de operação requer uma instrumentação do tipo triplo quadrupolo. Uma mistura de íons entra no primeiro quadrupolo (Q1), que deixa passar somente uma determinada razão  $m/z$  para o segundo quadrupolo Q2. Em Q2 a célula de colisão induzida é preenchida com  $N_2$  ou Ar, o íon precursor selecionado em Q1 colide com o  $N_2$  ou Ar com energia suficiente para se quebrar em outros fragmentos. O quadrupolo Q3 seleciona apenas um tipo de íon resultante para passar para o detector (HARRIS, 2008). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa com sobreposições de picos no mesmo tempo de retenção (CHIARADIA; COLLINS & JARDIM, 2008; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

## 2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para uma consistente análise de experimentos é necessário um plano experimental, que siga os princípios básicos da experimentação. O planejamento

experimental consiste na realização de experimentos com diferentes combinações de níveis para mais de uma variável, tornando possível conhecer o sistema de maneira abrangente e avaliar as interações entre variáveis que possuem influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse (TEÓFILO & FERREIRA, 2006). Ao realizar experimentos devemos fazer uso de réplicas, para minimizar o erro experimental, pois quando a média de uma amostra é usada para estimar o efeito de uma variável no experimento permite-se a obtenção de uma medida mais precisa. Os métodos estatísticos requerem que as observações, ou os erros, sejam variáveis aleatórias distribuídas independentemente (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010).

Os planejamentos experimentais dividem-se em planejamentos de triagem e modelagem. Os planejamentos de triagem podem ser classificados como: fatorial, fatorial fracionário e *Plackett Burman*. Esses possuem como objetivo selecionar as variáveis significativas, podendo ser empregado tanto para variáveis quantitativas quanto para qualitativas (BORGES et al., 2015). Com poucos fatores é viável utilizar planejamentos fatoriais completos, onde as interações entre as variáveis (interações principais) e de segunda ordem podem ser obtidas. Esse é de extrema importância para a compreensão do comportamento do sistema. As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento (BORGES et al., 2015).

No planejamento fatorial  $3^k$  tem-se k fatores avaliados em 3 níveis denotados por baixo (-1), médio (0) e alto (+1). Ele pode ser utilizado para obter uma curvatura em função da resposta, uma vez que o modelo de regressão possui termo quadrático, quando as variáveis são quantitativas. Já quando as variáveis forem qualitativas os efeitos e interações estatisticamente importantes podem ser visualizados pelos gráficos de Pareto ou de interações (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

## 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A validação de um método é o processo que envolve uma série de experimentos planejados que irão caracterizar o método desenvolvido, fornecendo evidências da adequação da análise garantindo resultados confiáveis (ZANELLA et al., 2015). No Brasil existem documentos normativos para a validação de método, como os desenvolvidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial (INMETRO), através do DOQ-CGCRE-08 de julho de 2011 e o Guia para a Qualidade em Química Analítica de 2003, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tais documentos sugerem as diretrizes a serem seguidas. Os órgãos internacionais também dispõem de guias como a União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (THOMPSON; ELLISON & WOOD, 2002) e SANTE (2015).

As principais características de desempenho envolvidas no processo de validação de métodos analíticos são: efeito matriz; seletividade; exatidão; precisão; limite de detecção e limite de quantificação e precisão intermediária e linearidade e curva analítica, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros de validação

Parâmetros	Descrição
Efeito Matriz	Os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando desvios nos resultados. Caracteriza-se por alterações na resposta analítica.
Seletividade	Verificação se o método proposto é seletivo, pode-se comparar a resposta analítica de uma análise da matriz isenta dos analitos (matriz branco), com a análise de uma matriz onde é adicionado os analitos de interesse (amostra fortificada).
Linearidade e curva analítica	Descrito no item 2.7.1
Exatidão	O grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.
Precisão	A precisão de um método analítico representa a dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra.
Limite de quantificação (LOQ)	Menor nível de fortificação em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável em um método validado.
Limite de detecção (LOD)	Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOD 3,33 vezes menor que o valor de LOQ.
Precisão Intermediária	Refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

Fonte: ARAUJO (2009); ANVISA (2003); INMETRO (2011); SANTE (2015); ZANELLA et al. (2015)

### 2.7.1 Linearidade e curva analítica

Em um processo analítico normalmente a concentração de determinados compostos em uma amostra é determinada de forma indireta, a partir de medidas de grandezas como absorção ou emissão de luz, condutividade ou área. Então para

obter o valor da concentração é necessário encontrar uma função que relacione essas medidas, denominada de curva analítica sendo este passo de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e com boa exatidão. (PIMENTEL & NETO, 1996; BAZILIO et al., 2012).

Ao construir uma curva analítica tem-se como objetivo que ela passe o mais próximo possível dos pontos experimentais. Logo, a linearidade refere-se à relação entre a quantidade de uma solução padrão introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET et al., 2007). A curva analítica é calculada pelo método de ajuste por mínimos quadrados, conhecida como regressão linear, em que se estabelece uma relação linear entre uma variável aleatória  $y$  e uma variável não aleatória  $x$  e pode ser descrita como na Equação 1 (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010):

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

$y$ : é o sinal analítico de determinado analito, normalmente expresso em unidade de área;

$a$ : coeficiente de inclinação da curva analítica;

$b$ : coeficiente de intercepção da curva analítica;

$x$ : concentração do analito na faixa linear avaliada.

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta (INMETRO, 2011). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2011) recomendam valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, respectivamente.

Para definir adequadamente a faixa linear na relação entre a concentração e a resposta é necessário o uso de um número suficiente de soluções analíticas (BRITO et al., 2003). A ANVISA (2003) especifica um mínimo de cinco níveis de concentração. Para o INMETRO (2011) a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e apresentar, de preferência, mais que

seis pontos de calibração. Cabe ressaltar que as concentrações das amostras devem, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

#### 2.7.1.1 Avaliação da presença de valores extremos

O teste de *Grubbs* pode ser utilizado para avaliar a presença de valores extremos em observações amostrais, verificando discrepância pela média do conjunto de dados. Quando identificado a existência de valores anômalos nas extremidades do conjunto, esses podem ser excluídos, pois valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados. Para identificar valores extremos em uma curva analítica, não se pode avaliar diretamente a resposta para cada ponto da curva devido a ampla faixa de observações, uma vez que resultaria na exclusão dos menores e maiores pontos da curva analítica. Por isso, para excluir possíveis valores extremos deve-se avaliar os valores residuais de cada ponto, pois esses valores são de mesma grandeza numérica, como apresentado na Equação 2 (GUARIEIRO et al., 2008; CHUI, BARROS & SILVA, 2009; Software Action, 2014):

$$G_c = \frac{|x_i - x_m|}{s} \quad (2)$$

Onde:

$G_c$ : é o valor de *Grubbs* calculado;

$x_i$ : é observação amostral (valor residual);

$x_m$ : é a média residual;

$s$ : é o desvio padrão residual.

Se o valor de  $G_c$  for maior que o valor de *Grubbs* tabelado (no determinado nível significância), o valor é considerado anômalo. Deve-se observar que o máximo de 22,2% de dados pode ser excluídos e para uma curva analítica deve-se preservar pelos menos uma réplica em cada ponto (BAZILIO et al., 2012).

#### 2.7.1.2 Avaliação da falta de ajuste da curva analítica

A análise dos resíduos é fundamental para que possamos avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo. Os resíduos devem ser pequenos, pois se um modelo

deixa resíduos consideráveis, significa que ele não consegue representar satisfatoriamente o conjunto de dados. O método mais utilizado para se avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo é a análise de variância (ARAUJO, 2009).

As observações repetidas no mesmo ponto  $x$  devem se distribuir simetricamente, com desvios positivos e negativos na mesma proporção. A variância dos erros ao longo da faixa linear estudada deve obedecer à hipótese de homocedasticidade, ou seja, essas variâncias devem ser homogêneas. Como os erros se distribuem normalmente pode-se utilizar a distribuição de *Student*, e as médias quadráticas para testar a significância do modelo (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010).

Quando o experimento é realizado com réplicas, pode-se obter uma estimativa do erro aleatório. Com essa estimativa tem-se um critério quantitativo para avaliar se o modelo escolhido é uma boa representação das observações. Assim, é possível calcular as somas e médias quadráticas do modelo para cada analito conforme Tabela 4 (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010).

Tabela 4- Análise da variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

$n_i$ = número de repetições do nível  $i$ ;

$m$ = número de níveis distintos da variável independente;

$n = \sum n_i$ = número total de observações;

$p$ = número de parâmetros do modelo.

Fonte: NETO, SCARMINIO & BRUNS (2010).

A falta de ajuste do modelo linear e a significância da regressão podem ser avaliadas por meio do teste F. A falta de ajuste pode ser verificada comparando a média quadrática da falta de ajuste com a média quadrática devida ao erro puro, ou seja, se valor da razão entre  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  for maior que o valor de F tabelado de acordo com os graus de liberdade e o nível de significância pretendido, é evidenciado que o modelo linear apresenta falta de ajuste. Após a eliminação da falta de ajuste do modelo, verifica-se a significância da regressão, comparando a razão  $MQ_R/MQ_r$ , com o valor apropriado de F tabelado. A relação linear entre as duas variáveis é estatisticamente significativa quando a razão entra as médias apresentar valor maior do que o valor tabelado para F indicará a existência de uma relação linear entre as duas variáveis (PIMENTEL & NETO, 1996).

## 2.8 ANÁLISE MULTIVARIADA

Para avaliação estatística das informações, principalmente quando as relações existentes entre as variáveis não são facilmente compreendidas, a análise multivariada pode ser utilizada. Se o objetivo é verificar o reconhecimento de padrões, análise exploratória de dados, a classificação de amostras ou obter a relação de similaridade entre as amostras, destacam-se métodos de análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) e análise por agrupamento hierárquico. Já quando o objetivo é estimar a concentração de uma ou mais espécies é necessário construir um modelo de calibração, sendo os métodos mais utilizados incluem as regressões em componentes principais e por quadrados mínimos parciais, o algoritmo genético, as redes neurais artificiais e os mínimos quadrados parciais não lineares (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2006).

A análise de componentes principais, é uma ferramenta quimiométrica classificada como uma análise exploratória ou não supervisionada, normalmente utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridade entre amostras, detectar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados. A PCA é considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis é realizada pela construção de novas variáveis ortogonais, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores, transformando um conjunto original de variáveis em componentes principais (CP) de dimensões equivalentes. As componentes principais são organizadas em ordem

decrecente de importância, ou seja, a primeira componente aponta a direção de maior variação dos dados, a segunda, que é ortogonal à primeira, aponta outra direção que descreve a maior variação restante dos dados e assim por diante. Os gráficos obtidos são apresentados em um sistema cartesiano onde os eixos correspondem as componentes principais (SOUZA & POPPI, 2012; BALLABIO, 2015).

Matematicamente, na PCA, a matriz  $X$  é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores ( $T$ ) e pesos ( $P$ ), mais uma matriz de erros ( $E$ ), como mostrado na Equação 3:

$$X = T.P^T + E \quad (3)$$

Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelas componentes principais. A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores. Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O uso desses algoritmos tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras (SOUZA & POPPI, 2012).

Uma etapa importante antes da realização da PCA é o pré-processamento dos dados, pois os dados originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, apresentando magnitudes e unidades distintas, não podendo estes valores ser combinados e por isso é necessário realizar um pré-processamento dos dados. Os métodos mais utilizados consistem basicamente em centrar os dados na média, onde é calculada a média dos valores experimentais para cada variável e subtrai-se cada valor experimental do respectivo valor médio; e auto escalar os dados que significa centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada variável (LYRA, et al. 2010; FERREIRA et al., 1999).

Na área da química a PCA possui o uso bastante disseminado, porém ela pode ser empregada em outras áreas como é o caso do trabalho apresentado por SILVA, SILVA & BORGES (2015), que utilizaram PCA para avaliar políticas públicas por meio de um índice de desempenho social com base nas variáveis funções sociais per capita. ROSÁRIO, KIPPER & FERRÃO (2012), também utilizaram a PCA



para avaliar a satisfação de clientes identificando comportamentos similares entre os clientes, facilitado a implementação de novas diretrizes para melhorar a relação cliente – empresa.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

A instrumentação utilizada para o desenvolvimento deste trabalho segue descrita abaixo:

- Sistema GC-MS/MS Varian (EUA) equipado com:
  - Cromatógrafo a gás CP 3800;
  - Detector de massas triplo quadrupolo (TQ) 1200-MS;
  - Amostrador automático CP 8400;
  - Injetor 1079 com Programação de Temperatura de Vaporização - PTV;
  - Sistema de aquisição de dados através do Software MS Workstation 6.6 (Varian, EUA);

- Coluna capilar VF-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano), com 30 m de comprimento x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent Technologies, EUA).

- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, EUA);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX 420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Centrífuga refrigerada modelo NT 825, com rotação máxima de 3500 rpm - (Novatécnica, Brasil);
- Evaporador Turbovap® LV (Biotage, Alemanha);

#### 3.2 MATERIAIS, REAGENTES, SOLVENTES E GASES

Para a execução desse trabalho utilizaram-se os seguintes materiais:

- Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear, capacidade de 50 e 15 mL;
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- *Insert* de vidro, capacidade de 200 µL;
- Vidraria comum de laboratório.

Foram utilizados também os seguintes materiais, reagentes e solventes:

- Octadecilsilano (C18) com tamanho de partículas de 40 µm – Bondesil (Agilent Technologies, EUA);
- Florisil® 60–100 mesh (Mallinckrodt, EUA)
- Bond Elut QuEChERS EMR—Lipid dSPE EMR-Lipid® (Agilent, EUA);
- Bond Elut QuEChERS EMR—Lipid Final Polish® (Agilent, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio (J.T. Baker, EUA);
- Hexano (Caledon, Canadá);
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich, Brasil);
- Acetona (Tedia, EUA)
- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Acetato de etila (Mallinckrodt, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV (resistividade de 18,2 MΩ cm).

Os gases utilizados na evaporação da amostra e no sistema cromatográfico foram:

- Hélio 99,9997% de pureza (Air Products, Brasil);
- Argônio 99,9992% de pureza (Air Liquid, Brasil).
- Metano 99,995% de pureza (Air Liquid, Brasil).
- Nitrogênio comum 99,99% de pureza (Air Liquid, Brasil);

### 3.3 PADRÕES ANALÍTICOS

Os compostos avaliados neste estudo foram adquiridos como padrões analíticos sólidos com alto grau de pureza (91,5%-99,5%). Os PCBs foram adquiridos em solução na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, ambos fornecidos pela empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha). Esses foram mantidos em freezer, em temperatura próxima a -18 °C.

#### 3.3.1 Compostos selecionados para o estudo

A escolha dos analitos foi baseada na lista de POPs e em outros compostos amplamente utilizados. Entre os POPs estão os PCBs que é o nome genérico dado à classe de compostos organoclorados, resultante da reação do grupo bifenila com

cloro, essas moléculas podem apresentar diversas substituições possíveis que variariam de 1 a 10 átomos de cloro podendo ser obtidos até 209 congêneres (PENTEADO & VAZ, 2001). A GMP recomenda o monitoramento de pelo menos sete congêneres: PCB-28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 (UNEP, 2011; XU, WANG & CAI, 2013). Os compostos analisados, bem como as informações da pureza, grupo químico, classe e fórmula molecular estão apresentados na Tabela 5 e as fórmulas estruturais no Apêndice 1.

Tabela 5- Relação dos compostos estudados, analisados por GC-NCI-MS, modo de aquisição SIM, com informações da pureza, grupo químico, classe e fórmula molecular.

<b>Composto</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Classe</b>	<b>Fórmula molecular</b>
2,4 DDD	97,5	Organoclorado	A/ I	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>
2,4 DDE	99	Organoclorado	A/ I	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>
4,4 DDD	99,5	Organoclorado	A/ I	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>
Aldrin	97	Organoclorado	I	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>
Azoxistrobina	99	Estrobilurina	F	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
Bifentrina	99,5	Piretróide	A/ I	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Bioaletrina	91,5	Piretróide	I	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>
Bromofós etílico	98,5	Organofosforado	A/ I	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> BrCl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS
Bromofós metílico	99,5	Organofosforado	F	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> BrCl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS
Cialotrina lambda	98,5	Piretróide	I	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>
Ciflutrina	98	Piretróide	I	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>
Cipermetrina	92	Piretróide	A/ I	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Clordano	99,5	Organoclorado	I	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>8</sub>
Clorpirifós etílico	99,5	Organofosforado	A/ I/ N	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Clorpirifós metílico	97	Organofosforado	I	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Cresoxim metílico	98	Estrobilurina	F	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>
DDT	99	Organoclorado	A/ I	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>
Deltametrina	99	Piretróide	I	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Dicofol	96,5	Organoclorado	A	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> O
Dieldrim	97,5	Organoclorado	I	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O
Endossulfam alfa	96	Organoclorado	A/ I	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S
Endossulfam beta	98	Organoclorado	A/ I	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S
Endossulfam sulfato	99,5	Organoclorado	A/ I	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S
Endrim	99,5	Organoclorado	I	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O
Epoxiconazol	99	Triazol	F	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O

Composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	Fórmula molecular
Esfenvalerato	98	Piretróide	I	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>
Fempropatrina	99,5	Piretróide	A/ I	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>
Fenitrotiona	97,5	Organofosforado	I	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> PS
Fenvalerato	98	Piretróide	A/ I	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>
Fipronil	97,5	Pirazol	A/ I	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS
HCH alfa	97,5	Organoclorado	R/ I	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>
HCH beta	98,4	Organoclorado	I	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>
HCH gama	98,5	Organoclorado	A/ I/ R	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>
Heptacloro	98,5	Organoclorado	I	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>
Heptacloro epóxido	99	Organoclorado	F	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O
Hexaclorobenzeno	99,5	Organoclorado	F	C <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>
Malationa	99	Organofosforado	A/ I	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>
Miclobutanil	99,5	Triazol	F	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>
Mirex	99	Organoclorado	I	C <sub>10</sub> Cl <sub>12</sub>
Oxifluorfem	98	Éter difenílico	H	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>
Parationa etílica	99	Organofosforado	A	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS
Pendimetalina	98,8	Dinitroanilina	H	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Permetrina	94	Piretróide	A/ I	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Procimidona	98	Dicarboximida	F	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
Propiconazol	97,5	Triazol	F	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Protiofos	94	Organofosforado	I	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>
Quintozeno	96	Cloroaromático	F	C <sub>6</sub> Cl <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
Teflutrina	98	Piretróide	I	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> ClF <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Tetradifona	98,5	Clorodifenilsulfona	A	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
Transflutrina	99	Piretróide	I	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Trifluralina	97,5	Dinitroanilina	H	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Trifluralina d14 (PI)	99,1	Dinitroanilina	PI	C <sub>14</sub> H <sub>3</sub> D <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
PCB 101	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub>
PCB 118	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub>
PCB 138	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>
PCB 149	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>
PCB 153	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>
PCB 170	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>7</sub>
PCB 18	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>
PCB 180	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>7</sub>
PCB 194	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>8</sub>

Composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	Fórmula molecular
PCB 209	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> Cl <sub>10</sub>
PCB 28	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>
PCB 31	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>
PCB 44	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub>
PCB 52	*	Organoclorado	In/SP	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub>

A: acaricida; I: inseticida; In: industrial; F: fungicida; H: herbicida; N: nematocida; PI: padrão interno; PC: padrão de controle; R: rodenticida; RC: regulador de crescimento; SP: subproduto.

\* Os PCBs foram obtidos em solução na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

Fonte: PPDB: Pesticide Properties DataBase. Disponível em:

<<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>> Acesso em: 16 dez. 2015.

### 3.3.1.1 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas foram preparadas a partir de padrões sólidos levando-se em consideração a pureza dos mesmos. Primeiramente preparou-se uma solução estoque de cada analito na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> em tolueno. A partir das soluções individuais preparou-se uma mistura contendo todos os compostos em uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (exceto para os PCBs, que foram adquiridos em solução de isoctano na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>). Essas soluções foram utilizadas para o preparo de novas soluções na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, e a partir dessa foram realizados os ensaios de fortificação (5, 10, 25 e 50 µg L<sup>-1</sup>) e preparo da curva analítica (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 µg L<sup>-1</sup>).

### 3.3.1.2 Escolha do padrão interno e padrão de controle

Para a escolha dos padrões interno e de controle procurou-se analitos que tivessem características físico-químicas similares aos analitos estudados e que estariam ausentes nas amostras.

Como padrão de controle fez-se uso do bromofós etílico. Esse foi utilizada para avaliar o procedimento de extração, não sendo necessário seu uso como corretor de recuperação para nenhum dos analitos estudados. O bromofós etílico foi adicionado em todas as amostras de leite materno antes da extração, resultando na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup> no extrato final. A trifluralina deuterada (d-14) foi escolhida como padrão interno, para verificar as variações do sinal analítico no instrumento, não sendo utilizada a sua resposta para os cálculos de recuperação.

Esta foi adicionada ao final da etapa de preparo da amostra diretamente no *vial* antes da injeção cromatográfica, resultando em uma concentração de 50 µg L<sup>-1</sup>.

### 3.4 AMOSTRAS BRANCO

Devido à dificuldade de coletar amostras de leite materno para a realização dos testes e validação, foi utilizado a fórmula infantil em pó para lactantes, com indicação de 0-6 meses, adquiridas em comércio local. A fórmula infantil é indicada como alimento alternativo para lactantes que não dispõem do leite materno. Essas são produzidas a partir do leite bovino, porém com suas propriedades modificadas para facilitar a digestão do lactante e geralmente enriquecidos com os nutrientes necessários para cada fase do crescimento. A distribuição calórica da fórmula infantil, de acordo com o fabricante, é de 8% de proteínas, 48% de carboidratos e 44% de lipídios. A composição nutricional do leite materno e a fórmula infantil para lactantes estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Comparação da composição nutricional do leite materno maduro e fórmula infantil para lactantes.

	Leite materno	Fórmula infantil reconstituída
Energia (kcal/100 mL)	70	66
Proteínas (g/100 mL)	1,1	1,3
Caseína (% total de proteínas)	20	40
Seroproteínas (% total de proteínas)	80	60
Lipídios (g/100 mL)	4,5	3,5
Prebióticos (g/100 mL)	-	0,8

Fonte: REGO (2006); Informações obtidas da embalagem da fórmula infantil para lactantes.

A reconstituição da fórmula infantil para lactantes procedeu-se de acordo com a indicação do fabricante, 4,6 g da fórmula infantil para 30 mL de água. Para a realização dos testes, após a reconstituição, a solução foi homogeneizada em banho de ultrassom por 10 min.

### 3.5 ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E LIMPEZA PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO

A primeira parte deste trabalho foi desenvolvida para alguns compostos pertencentes aos POPs sendo eles: 2,4 DDE, aldrin, DDT, dieldrin, endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, endrin, HCH alfa, HCH beta, HCH gama, heptacloro, hexaclorobenzeno e mirex, desenvolvido por FERRONATO (2014). Os experimentos foram baseados no método QuEChERS, em que se variou os solventes de extração e sorventes. Os solventes utilizados para os testes foram acetonitrila e uma mistura de hexano: etanol (4:1, v/v), uma vez que a acetonitrila é o solvente mais tradicional no método QuEChERS e a mistura citada foi empregada por vários autores para a extração de compostos lipofílicos em leite, bem como os sorventes utilizados na etapa de limpeza:  $MgSO_4$ , ZSep®, C18, PSA, sílica e  $NH_2$  (aminopropil). O método validado segue o seguinte procedimento: em uma alíquota de 6 mL de leite materno foi adicionado 50  $\mu$ L de uma solução de água: ácido fórmico (1:1, v/v) e extraída com 6 mL de acetonitrila sob agitação por um minuto em vortex. A etapa de partição foi realizada com a adição de sais (2,4 g  $MgSO_4$  e 0,6 g NaCl) seguida de agitação por um minuto e posterior centrifugação a 2510 g por 8 min a 5 °C. Uma alíquota de 4 mL do sobrenadante foi retirada para a etapa de limpeza dispersiva utilizando 600 mg de  $MgSO_4$  e 200 mg de C18. Agitou-se por 1 min e centrifugou-se por 10 min a 1590 g na temperatura de 5 °C. O extrato foi filtrado e desse coletou-se 2 mL que foram submetidos a etapa de evaporação em fluxo suave de nitrogênio por 30 min a 60 °C. O extrato foi redissolvido em 200  $\mu$ L de acetonitrila e analisado por GC-NCI-MS.

Para fins de aumentar o número de analitos e diversificar os grupos químicos, novos experimentos foram realizados para promover a extração de agrotóxicos em leite materno utilizando diferentes solventes de extração e sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato. Os solventes de extração foram a acetona: hexano (1:1, v/v), acetato de etila e acetonitrila, e os sorventes C18, Florisil® e EMR-Lipid® (do inglês *Enhanced Matrix Removal-Lipid*).

O Florisil® foi ativado conforme descrito por Ramos e colaboradores (1997), aquecendo em mufla por 12 h a 550 °C, após deixando em dessecador por 12 horas. Na sequência foi aquecido em estufa por mais 5 h a 130 °C. Após chegar em



temperatura ambiente em dessecador, foi adicionado 8% de água ultrapura e homogeneizado em mesa agitadora por 30 min.

O EMR-Lipid<sup>®</sup> é um sorvente que foi disponibilizado em 2015 pela empresa Agilent Technologies com o objetivo de remover seletivamente os lipídios em matrizes complexas. Existem protocolos de utilização deste novo sorvente em amostras de abacate, salmão e fígado bovino, com teores de lipídios de 21%, 27% e 4% respectivamente, apresentando excelentes resultados de recuperação e limpeza do extrato (AGILENT, 2015a). De acordo com esses protocolos, o EMR-Lipid<sup>®</sup> pode ser ativado com água, proporcionando um melhor contato entre o extrato da amostra e o sorvente. A ativação é realizada com a adição de 5 mL de água ultrapura e agitado em vortex por aproximadamente 30 s. Após essa etapa é adicionado 5 mL do extrato da amostra e agitado por um minuto, e esse é centrifugado. Como foi adicionado água ultrapura para a ativação EMR-Lipid<sup>®</sup>, o extrato tem que passar pela a fase de polimento (Polish<sup>®</sup>) que é composto por MgSO<sub>4</sub> e NaCl na proporção de 1:4 (m/m), para a remoção da fase aquosa. No Polish<sup>®</sup> é adicionado todo o volume de extrato resultante do EMR-Lipid<sup>®</sup>, agitado rapidamente por um min e centrifugado (AGILENT, 2015b).

### 3.5.1 Planejamento experimental

Para avaliar a influência das variáveis solventes de extração e sorventes utilizados na limpeza do extrato foi realizado um planejamento fatorial 3<sup>2</sup> a partir da configuração randômica gerada pelo *software* Statistica 7.0, resultando em 9 combinações distintas. As variáveis e os níveis estão apresentados na Tabela 7, e os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 18 análises.

Tabela 7- Variáveis avaliadas pelo planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para otimizar o preparo de amostra.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
Solvente de extração	Acetona: Hexano	Acetato de etila	Acetonitrila
Limpeza	Florisil <sup>®</sup>	C18	EMR-Lipid <sup>®</sup>

Os testes do planejamento fatorial foram realizados com 6 mL de fórmula infantil para lactantes reconstituída seguida da extração com 6 mL de solvente. A

partição ocorreu com a adição de 2,4 g MgSO<sub>4</sub> e 0,6 g de NaCl. A limpeza foi realizada com 600 mg de MgSO<sub>4</sub> e 200 mg de Florisil<sup>®</sup> ou C18. Para os testes com o EMR-Lipid<sup>®</sup> foram utilizados 800 mg desse e 1,6 g do Polish<sup>®</sup>. Uma alíquota de 2 mL seguiu para a avaliação dos coextrativos e outra para análise cromatográfica.

### 3.5.2 Avaliação dos coextrativos após a etapa de limpeza

A eficiência da limpeza do extrato foi avaliada quantitativamente através do volume de coextrativos resultante de cada processo do preparo de amostra. Para isso o volume de 2 mL dos extratos foi evaporado até a secura antes e após a limpeza em Evaporador Turbovap<sup>®</sup> LV, por 30 minutos a 60 °C. A remoção de coextrativos foi calculada de acordo com a diferença em massa de coextrativos antes e depois do processo de limpeza (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013), de acordo com a Equação 4.

$$\%Coextrativos = \frac{C_a - C_d}{C_a} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C<sub>a</sub>: massa dos coextrativos antes da limpeza.

C<sub>d</sub>: massa dos coextrativos depois da limpeza.

## 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO

Os parâmetros avaliados na etapa de validação do método analítico estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Parâmetros de validação de método e critérios de aceitação.

Parâmetros	Procedimento realizado	Critérios de aceitação
Efeito Matriz	<p>Injeções de curva preparada em solvente (tolueno) e curva analítica extraída, comparando-se a inclinação das curvas analíticas.</p> $EM\% = \left( \frac{a_e}{a_s} - 1 \right) \times 100$ <p>Onde:  a<sub>e</sub>: inclinação da curva analítica extraída;  a<sub>s</sub>: inclinação da curva analítica preparada no solvente.</p>	<p>Para que o efeito matriz seja considerado desprezível EM% ≤ 20%</p>

Parâmetros	Procedimento realizado	Critérios de aceitação
Seletividade	Injetaram-se extratos de amostras branco, isentas dos analitos em estudo e um branco reagente com os solventes e reagentes, sem a presença da amostra.	Verificação da existência de picos/íons no mesmo tempo de retenção que o analito.
Linearidade e curva analítica	As curvas preparadas em branco da matriz fortificada em duplicata, nas concentrações 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ Exclusão de valores extremos por meio de teste de <i>Grubbs</i> , com nível de significância de 95%.	Análise da variância: Significância da regressão avaliada por meio do teste F.
Exatidão	Foi realizado 4 níveis de fortificação (5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 réplicas. $Rec\% = \frac{C_1}{C_2} \times 100$ Onde: C <sub>1</sub> : concentração do analito na amostra fortificada; C <sub>2</sub> : concentração do analito adicionado na fortificação	Rec. entre 70-120%
Precisão	Cada nível de fortificação foi extraído 6 réplicas, sendo injetada no equipamento uma vez cada replica. $RSD\% = \frac{DP}{CMD} \times 100$ Onde: DP: Desvio Padrão; CMD: Concentração Média Determinada.	RSD $\leq$ 20 %
Limite de quantificação (LOQ)	Foi realizado 4 níveis de fortificação (5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 réplicas.	Rec. entre 70 – 120% e RSD% <20%
Limite de detecção (LOD)	$LOD = \frac{LOQ}{3,33}$	-
Precisão Intermediária	Foram repetidos os ensaios de exatidão e precisão, para os níveis de fortificação de 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ , com diferentes analistas, lotes de hexano e $\text{MgSO}_4$ .	Rec. entre 70 – 120% e RSD% $\leq$ 20%.

Fonte: ARAUJO (2009); ANVISA (2003); INMETRO (2011); SANTE (2015); ZANELLA et al. (2015).

### 3.7 COLETA DAS AMOSTRAS REAIS

As amostras de leite materno foram coletadas em diversos pontos do estado do Rio Grande do Sul, apresentados na Tabela 9. As coletas foram realizadas no segundo semestre do ano de 2013 e primeiro semestre de 2014 seguindo alguns critérios estabelecidos pela WHO (WHO, 2007). Estas foram armazenadas em frascos de vidro, previamente esterilizados, mantidas resfriadas até chegar ao laboratório e após conservadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até a data da análise. Cabe

ressaltar que foi realizado contato com diversas cidades do estado, porém a maioria não demonstrou interesse em participar da pesquisa.

Tabela 9- Pontos de coleta de amostra de leite materno no estado do Rio Grande do Sul.

Cidade	Região	Nº de amostras
Bagé	Sudoeste	4
Bossoroca	Noroeste	5
Cachoeira do Sul	Central	2
Tiradentes do Sul	Noroeste	4
Três Passos	Noroeste	3
Tupanciretã	Central	2
Total de Amostras de leite materno		20

A recomendação da WHO é de que a coleta do leite materno deve ser realizada em um intervalo de tempo que compreende 3 a 8 semanas após o parto. Neste trabalho, devido à dificuldade em conseguir as amostras, essas foram coletadas em uma faixa maior de tempo de aleitamento, desde o colostro até o leite maduro. Outras recomendações da WHO não puderam ser executadas, como a idade das nutrizes (menor que 30 anos) e coleta de leite oriundos da primeira gestação.

As nutrizes que aceitaram participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, o qual descreve os objetivos do projeto, informa que a participação na pesquisa seria de forma voluntária. Para fins de visualização, esse termo se encontra no Apêndice 2 (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Juntamente com o termo foi aplicado às nutrizes um questionário, que continham 21 perguntas, conforme apresentado no Apêndice 3 (Questionário para Potenciais Doadoras de Leite Materno). Esse questionário incluiu perguntas sobre características das nutrizes como idade, se a coleta era da primeira gestação, bem como o tipo de alimentação, localidade onde reside, proximidade de indústrias químicas ou áreas de agropecuária. No total 20 nutrizes doaram leite materno e preencheram o questionário.

Para evitar uma mensuração tendenciosa dos resultados, as perguntas mais importantes eram respondidas objetivamente, com valores numéricos ou respostas fechadas sim/não.

A análise dos dados foi efetuada buscando avaliar, por meio da frequência das respostas, o perfil das doadoras para posteriormente correlacionar com a possível contaminação dos leites maternos amostrados.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA POR MEIO DA PCA

A análise estatística do tipo exploratória através do uso de PCA foi utilizada para tentar correlacionar os resultados das amostras de leite materno com as repostas dos questionários. Os resultados das amostras foram tabelados de forma que as amostras estavam descritas nas linhas e os resultados dos compostos encontrados foram dispostos nas colunas. Para avaliar uma possível relação com as respostas dos questionários, foram inseridas colunas com as respectivas respostas do questionário referente para cada amostra. A PCA foi realizada por meio do *software* Statistica 7.0 e os dados foram previamente auto escalados. Para cada resposta foi gerada uma PCA para a avaliação de possíveis correlação dos resultados das amostras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-NCI-MS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO

As condições cromatográficas para o método desenvolvido foram baseadas em estudos desenvolvidos por Prestes (2007), Kolberg e colaboradores (2011) e Ferronato (2014). A partir das informações desses estudos foram escolhidos os melhores parâmetros com o uso de uma solução 250 µg L<sup>-1</sup> dos compostos estudados preparada em tolueno. Os parâmetros são descritos abaixo:

- Volume de injeção: 2 µL, sem divisão de fluxo (*splitless*);
- Injetor operando no modo PTV com programação conforme Tabela 10;
- Programação de temperatura do forno da coluna indicada na Tabela 10;
- Gás de arraste hélio numa vazão de 1,3 mL min<sup>-1</sup>;
- Tempo total de análise: 30 min.
- Temperatura da linha de transferência (*transferline*): 275 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 150 °C;
- Tempo de *delay*: 6,4 min;
- Modo de aquisição: SIM
- Modo de ionização: CI negativo (NCI);
- Pressão do gás de ionização metano: 6-7 mTorr;
- Corrente da fonte de ionização: 50 µA;
- Tensão de operação da eletromultiplicadora: 1800 V.

Tabela 10- Programação de temperatura do injetor PTV e forno da coluna.

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C min <sup>-1</sup> )	Temperatura Constante (min)	Total (min)
Programação de temperatura do injetor PTV			
110	0	0,10	0,10
300	200	12,00	13,20
110	resfriamento	14,75	30,0
Programação de temperatura do forno da coluna			
110	0	1,00	1,00
180	25,00	0,00	5,00
280	5,00	6,2	30,0

A fim de verificar o tempo de retenção de cada analito e seus íons característicos (modo SIM), injetou-se 2 µL de cada padrão individualmente numa concentração de 500 µg L<sup>-1</sup> e para os PCBs na concentração de 250 µg L<sup>-1</sup> no modo *full scan*. A partir dos resultados obtidos definiram-se os segmentos do método e o monitoramento dos íons característicos de cada analito apresentados na Tabela 11. Preferencialmente os íons escolhidos devem possuir massas elevadas a fim de que se minimize a ação de interferentes no sistema de detecção (GROSS, 2004).

Tabela 11- Compostos analisados por GC-NCI-MS, com seus respectivos t<sub>R</sub>, massa molecular e íons monitorados.

t <sub>R</sub> (min)	Composto	Massa molecular (Da)	Íons monitorados			
7,34	Trifluralina d14 (PI)	349	319	350		
7,43	Trifluralina	335	305	336		
8,13	HCH alfa	291	71	73	255	253
8,15	Hexaclorobenzeno	284	284	286	282	288
8,67	Quintozeno	295	249	251	247	250
8,86	HCH beta	291	71	255	72	253
8,86	HCH gama	291	71	255	72	253
8,97	Teflutrina	418	241	243	205	
9,45	Heptacloro	373	266	264	300	302
10,05	Clorpirifós metílico	322	214	212	141	
10,2	Transflutrina	371	207	209		
10,69	2,4 DDD	320	248	246	71	
10,91	Fenitrotiona	277	277	168		
11,0	Malationa	330	157	156	172	
11,15	Aldrin	365	237	239	335	330
11,25	Parationa etílica	291	291	154	155	
11,27	Clorpirifós etílico	351	313	315	214	169
11,65	Fipronil	437	366	368	331	367
11,78	Heptacloro epóxido	387	237	239	318	241
11,82	Pendimetalina	281	281	282		
11,92	Dicofol	370	250	252	251	
11,97	Bromofós metílico	366	257	270	141	
12,04	Procimidona	284	282	284	235	233
12,45	Bromofós etílico	394	79	169	256	
12,49	PCB 18	257	326	328	327	330

$t_R$ (min)	Composto	Massa molecular (Da)	Íons monitorados			
12,63	Bioaletrina	301	167	168	166	
12,76	PCB 28	257	326	324	328	330
12,76	PCB 31	257	326	324	328	330
13,05	2,4 DDE	318	318	248	246	
13,10	4,4 DDD	320	248	250	249	
13,18	PCB 52	292	358	362	364	363
13,20	Endossulfam alfa	407	370	237	242	407
13,23	Clordano	409	410	408	412	406
13,61	Protiofos	345	237	301	303	239
13,85	Oxifluorfem	362	361	296	363	295
13,91	Cresoxim metílico	313	107	174	106	175
14,01	Dieldrim	381	237	346	239	380
14,34	Endrim	381	346	380	238	
14,46	PCB 44	292	358	362	364	363
14,66	PCB 101	326	360	362	358	364
14,74	Endossulfam beta	407	242	240	244	406
14,87	Miclobutanil	288	288	290	289	
15,48	PCB 118	326	360	392	394	396
15,48	PCB 149	361	360	392	394	396
16,07	DDT	354	283	281	71	
16,20	Endossulfam sulfato	423	386	388	80	97
16,27	PCB 153	361	360	392	394	396
16,35	Propiconazol	342	256	258	220	221
17,02	Bifentrina	423	386	387	241	205
17,72	Cialotrina lambda	449	241	205	243	
18,16	Epoxiconazol	330	293	224	247	294
18,31	Fempropatrina	349	141	198	322	323
18,40	PCB 138	361	392	360	394	398
19,32	PCB 170	395	392	360	394	398
19,61	Tetradifona	356	320	318	322	356
19,84	Mirex	545	402	368	439	
21,39	PCB 180	395	394	396	428	426
21,84	Permetrina	391	207	209	354	171
22,46	PCB 194	430	464	462	466	467
23,34	Ciflutrina	434	207	209	171	



$t_R$ (min)	Composto	Massa molecular (Da)	Íons monitorados			
23,62	PCB 209	499	496	464	462	494
23,78	Cipermetrina	416	207	209	171	
25,68	Esfenvalerato	420	211	213	392	394
24,86	Fenvalerato	420	211	213	392	394
27,52	Deltametrina	505	79	81	297	299
28,02	Azoxistrobina	403	403	371	404	356

$t_R$ : tempo de retenção.

## 4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

### 4.2.1 Resultados do planejamento experimental

Para a realização do planejamento fatorial  $3^2$ , foram avaliados as áreas obtidas para 35 compostos (aldrin, azoxistrobina, bifentrina, bioaletrina, bromofós etílico, bromofós metílico, ciflutrina, cipermetrina, clordano, clorpirifós etílico, clorpirifós metílico, dieldrin, endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, endrin, esfenvalerato, fenvalerato, fipronil, HCH alfa, HCH beta, HCH gama, heptacloro, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, mirex, oxifluorfem, parationa etílica, pendimetalina, permetrina, protiofós, quintozeno, teflutrina, tetradifona, transflutrina, trifluralina). As interações entre variáveis estudadas foram avaliadas plotando o gráfico de interações para cada composto com nível de confiança de 95%, e ao analisar o experimento pela ANOVA, foi possível observar o *p-valor* que indica se as áreas obtidas, nos diferentes testes são estatisticamente diferentes. Na Figura 2 estão sendo apresentados os compostos representativos dos grupos químicos, e na Tabela 12 o *p-valor* para os fatores analisados.

Figura 2- Gráficos de interações resultantes do planejamento fatorial  $3^2$  para os compostos ciflutrina (piretróide), hexaclorobenzeno (organoclorado), protiofós (organofosforado) e trifluralina (dinitroanilina).

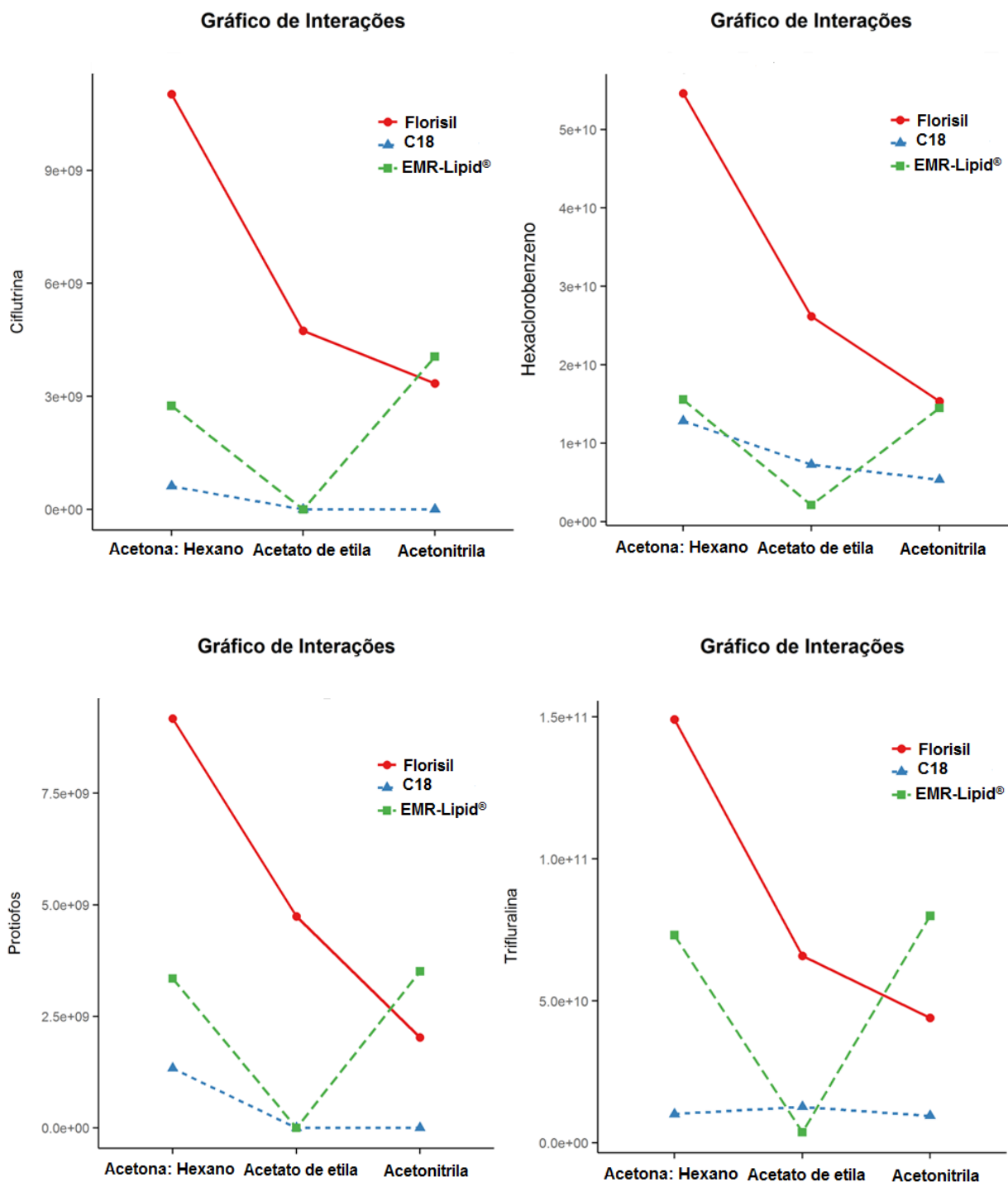


Tabela 12- Resultados ANOVA *p*-valor.

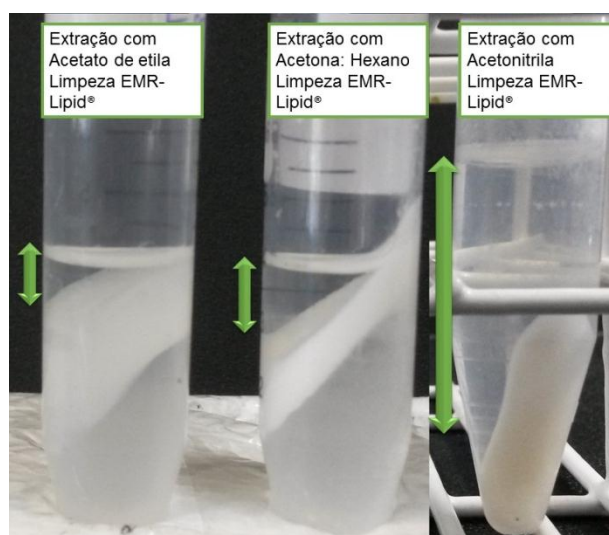
	Ciflutrina	Hexaclorobenzeno	Protiofós	Trifluralina
Fator	<i>p</i> -valor			
Solvente	0,527	0,276	0,080	0,229
Limpeza	0,306	0,068	0,059	0,215

Como pode ser observado independentemente do grupo químico o comportamento foi similar para todos os compostos, sendo a melhor resposta analítica obtida ao utilizar a etapa de extração com a mistura de solventes de acetona e hexano e a limpeza com Florisil<sup>®</sup>. E ao analisar o resultado do *p*-valor, quando maior que 0,05, indica que os fatores apresentam influência significativa no sistema.

#### 4.2.2 Resultados da avaliação de coextrativos após a limpeza do extrato

Os ensaios com o sorvente EMR-Lipid<sup>®</sup>, nas extrações em que foram utilizados os solventes acetona, hexano e acetato de etila foi necessário realizar a troca de solvente após a extração para acetonitrila. Pois quando esses solventes foram adicionados diretamente no EMR-Lipid<sup>®</sup> foi observado que o volume resultante após a etapa de centrifugação foi insuficiente para a etapa do Polish<sup>®</sup>, como pode ser visualizado na Figura 3. Esse fato pode ter ocorrido pois o EMR-Lipid<sup>®</sup> foi desenvolvido para métodos que utilizam acetonitrila na fase da extração.

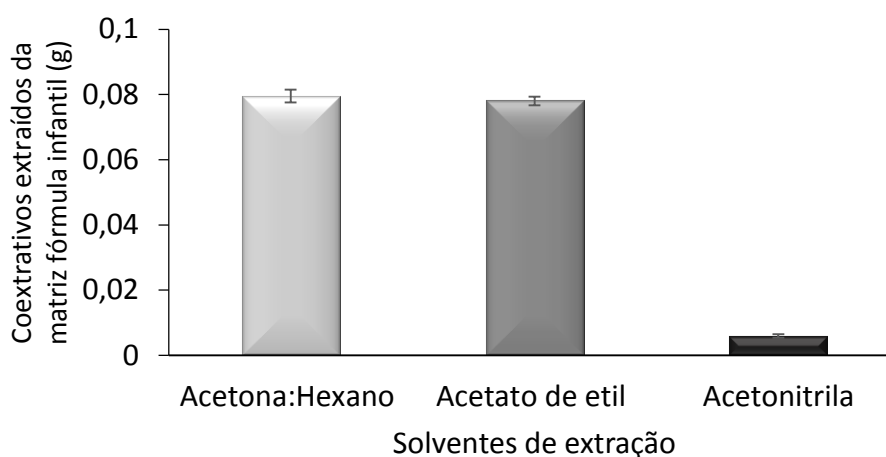
Figura 3- Comparação dos diferentes solventes de extração e limpeza com EMR-Lipid<sup>®</sup>.



Fonte: Registro fotográfico pelo próprio autor.

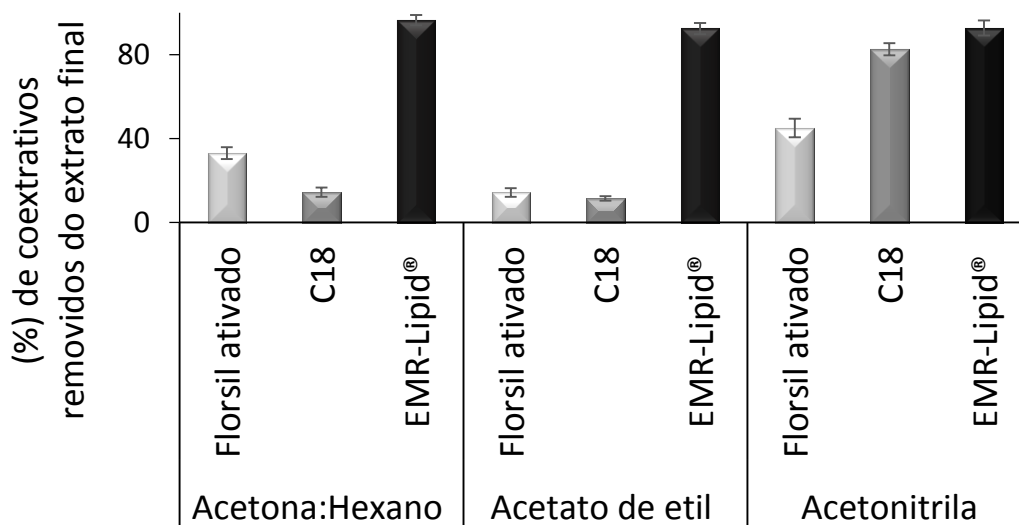
A análise gravimétrica foi realizada com intuito de quantificar os coextrativos presentes no extrato da extração e no extrato final. Para isso, uma alíquota resultante do procedimento de extração foi evaporada, e a outra alíquota submetida a etapa de limpeza também foi evaporada. Com relação a extração os resultados estão apresentados na Figura 4, em que pode ser visualizado que a acetonitrila retira da matriz uma quantidade menor de coextrativos quando comparada com os outros solventes, e por isso tem sido amplamente utilizada em métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e matrizes ambientais (PRESTES et al., 2011).

Figura 4- Extração de coextrativos com diferentes solventes da matriz fórmula infantil.



Os solventes foram avaliados pela diferença em massa dos extratos evaporados, calculados conforme a Equação 4, sendo possível avaliar o quanto cada solvente removeu de coextrativos provenientes da extração para cada ensaio do planejamento fatorial. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

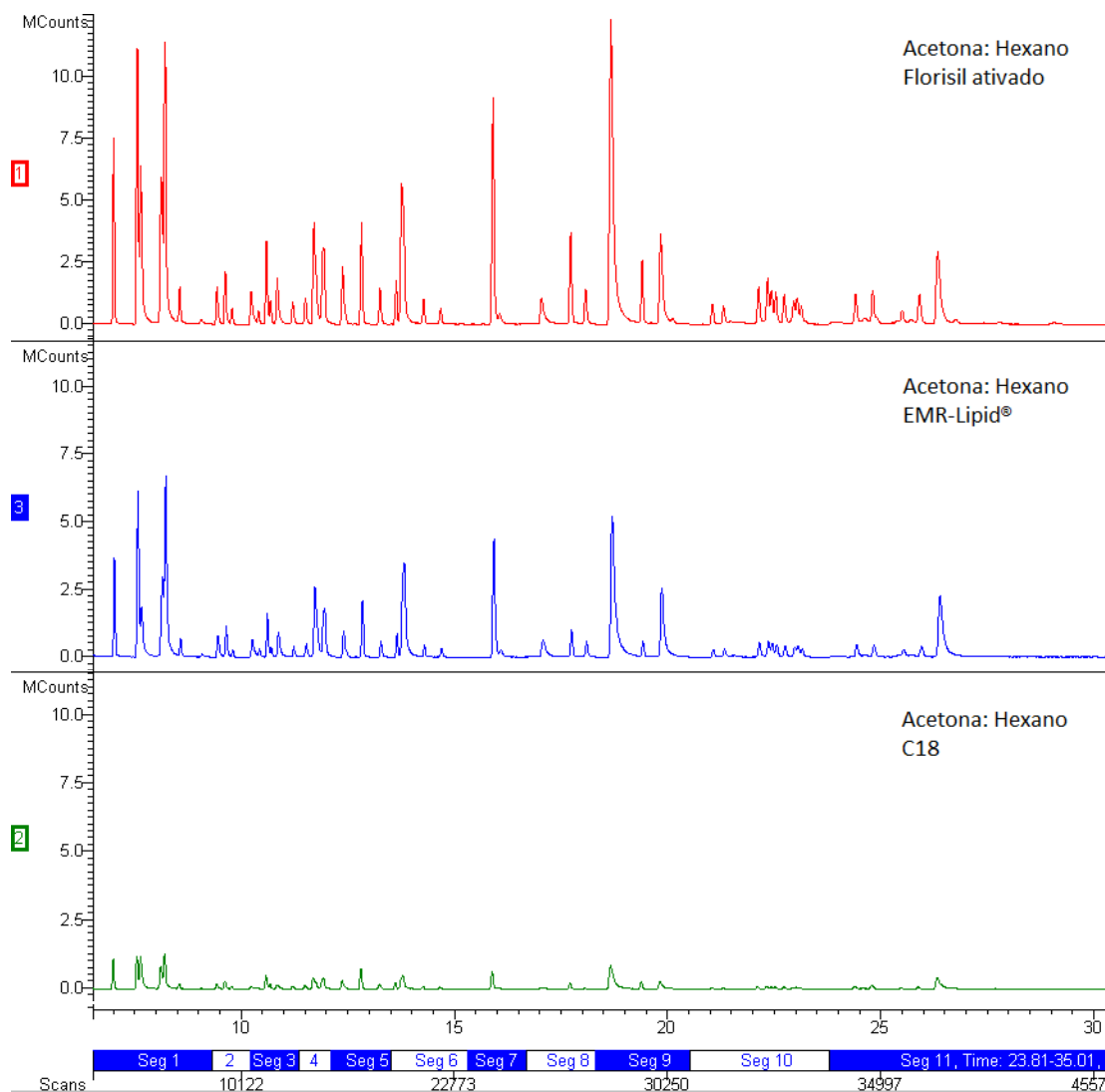
Figura 5- Remoção dos coextrativos com diferentes sorventes de limpeza.



Como pode ser observado na Figura 5, a extração com acetonitrila e seus respectivos sorventes de limpeza são os ensaios em que apresentam menos coextrativos proporcionando um extrato final mais limpo. Os extratos que utilizaram o EMR-Lipid® obtiveram um percentual de remoção dos coextrativos maiores que 90%, comprovando a eficiência desse sorvente.

Porém para a extração de compostos orgânicos persistentes com características lipofílicas, solvente como hexano é empregado para melhorar a extração desses compostos, sendo seu uso combinados com solventes de maior polaridade como a acetona para diminuir a extração de coextrativos (Martins et al., 2013). Como os métodos para análise de leite materno requerem limites de detecção baixos, o método de extração escolhido foi aquele que apresentou melhor resposta analítica, utilizando acetona e hexano. Na Figura 6 podem ser observados os cromatogramas de íons totais obtidos da matriz fortificada na concentração de  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  para os ensaios realizados com acetona e hexano e os três diferentes sorventes.

Figura 6- Cromatogramas de íons totais para os ensaios realizados com acetona e hexano.



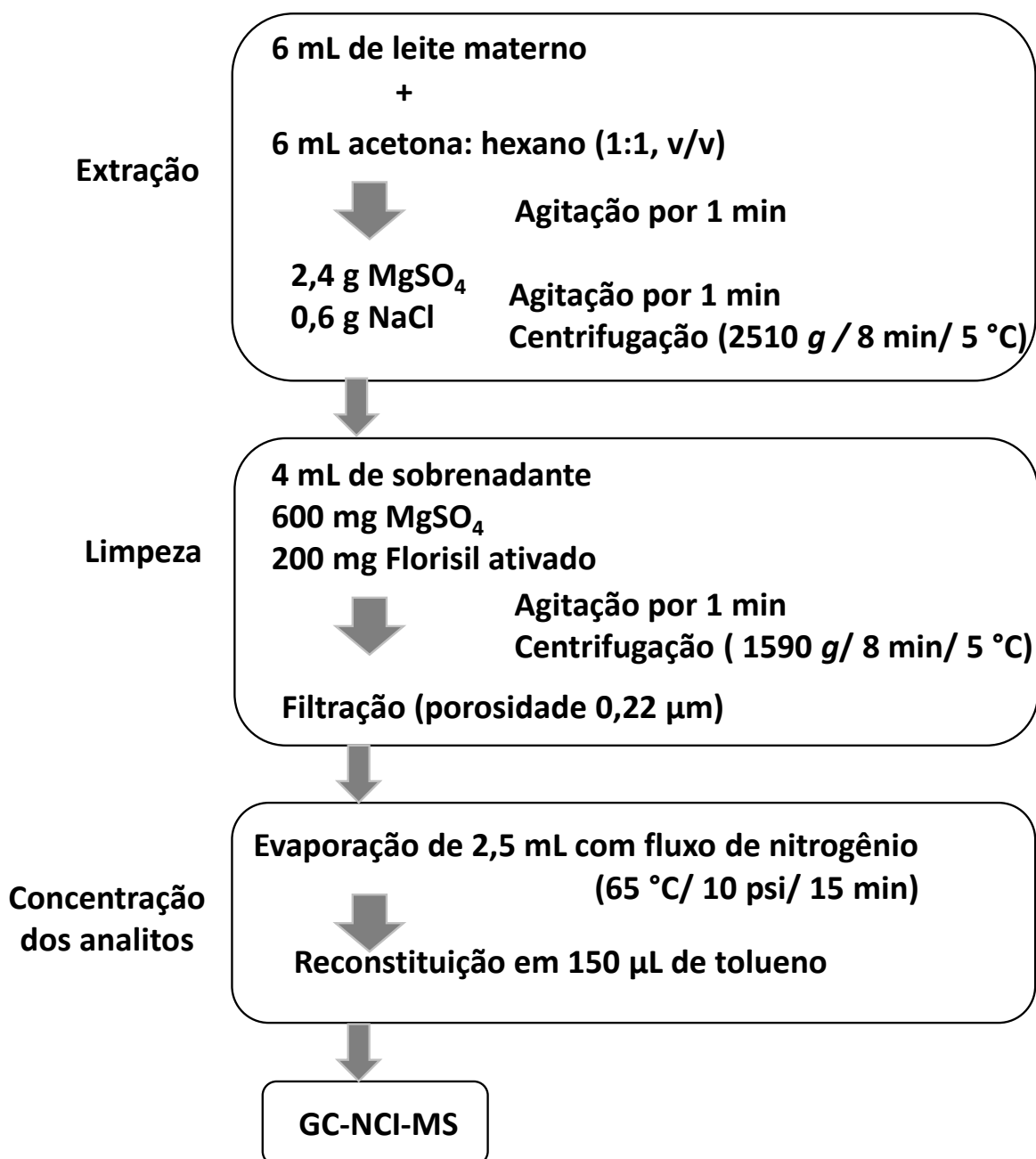
Na Figura 6 o método utilizando acetona:hexano e Florisil® apresenta aproximadamente duas vezes mais resposta analítica quando comparado com a limpeza com EMR-Lipid®. Além disso se fosse empregado o EMR-Lipid® seria necessário acrescentar uma etapa de evaporação do extrato para realizar a troca de solvente para a acetonitrila antes de etapa de limpeza.

#### 4.2.3 Método otimizado

A bioacumulação dos compostos ocorre na fase gordurosa do leite materno, e o percentual de gordura é diferente entre as nutrizes além de alterar-se durante a lactação, os resultados da concentração de agrotóxicos devem ser expressos em

relação ao percentual de gordura do leite, e não em relação ao volume total de leite. Por isso, uma das etapas importantes do método de análise de leite materno é o fator de enriquecimento dos analitos, pois, segundo recomendação da GMP, a grandeza em que os resultados devem ser apresentados é  $\text{ng g}^{-1}$  (UNEP, 2011; XU, WANG & CAI, 2013). Por isso o método escolhido para a validação foi o método que obteve maior resposta analítica, mesmo não sendo o método que obteve maior remoção de coextrativos. O procedimento de preparo de amostra está descrito na Figura 7.

Figura 7- Representação do método de preparo da amostra utilizado para a extração de agrotóxicos e POPs em leite materno.



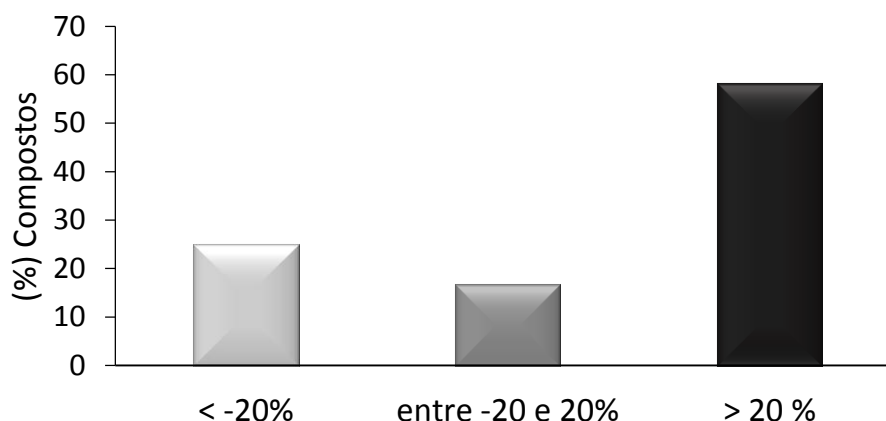
## 4.3 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO

### 4.3.1 Efeito matriz

O efeito matriz caracteriza-se por gerar supressão ou incremento do sinal analítico, analitos que apresentam resultados de efeito matriz superior a  $\pm 20\%$  sofrem efeito matriz sob sua resposta cromatográfica (SANTE, 2015).

Na Figura 8, estão apresentados o percentual de compostos que sofreram efeito matriz avaliados a partir de curvas analíticas contendo os analitos preparados na matriz fortificada e solvente tolueno. Como pode ser observado para a maioria dos compostos ocorre um incremento do sinal, pois os componentes da matriz podem atuar como protetores e adsorver preferencialmente os sítios ativos do sistema cromatográfico (HAJSLOVA & ZROSTLIKOVA, 2003),

Figura 8- Efeito matriz entre curva em solvente e curva analítica extraída.

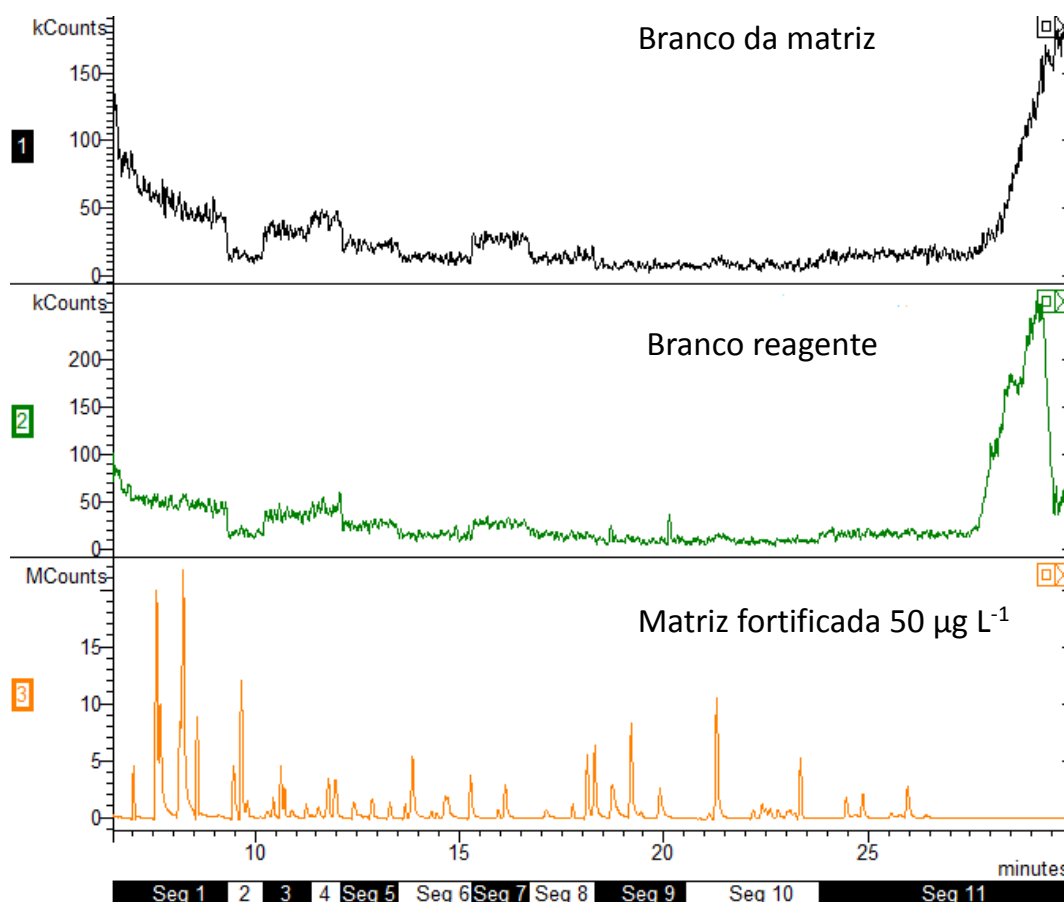


### 4.3.2 Seletividade

A seletividade de um método garante que o procedimento analítico é capaz de discriminar os componentes que possam gerar interferência nos compostos analisados. A avaliação da seletividade foi realizada através da comparação dos cromatogramas da amostra branco da matriz, branco reagente e matriz fortificada, como apresentada na Figura 9, onde é possível afirmar que não existem interferentes com os mesmos íons de quantificação no mesmo tempo de retenção dos analitos avaliados, evidenciando a seletividade do método.



Figura 9- Avaliação da presença de interferentes nos cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS: branco da matriz, branco dos reagentes e matriz fortificada em  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .



Com relação a separação cromatográfica o método não foi seletivo para seis analitos, por apresentarem mesmos íons de quantificação e mesmo tempo de retenção. A quantificação foi calculada como o somatório dos mesmos, foi o caso dos analitos HCH beta e HCH gama, PCB 28 e 31, PCB 118 e 149.

#### 4.3.3 Linearidade e curva analítica

A faixa linear para cada agrotóxico foi avaliada através das injeções em duplicata das soluções preparadas em branco da matriz fortificada nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ . A utilização de curva analítica extraída é uma forma alternativa para obter a curva analítica, onde as amostras branco são fortificadas com diferentes concentrações antes da etapa de extração. Devido ao método ter uma etapa de enriquecimento dos analitos, esse tipo

de calibração se torna interessante pois permite analisar a curva e as amostras nas mesmas condições. Além disso, o efeito matriz e os valores de recuperação podem ser compensados (SANTE, 2015).

A adequação das curvas analíticas foi confirmada através dos cálculos da análise da variância para o ajuste de um modelo, pelo método dos mínimos quadrados para cada analito, apresentados no Apêndice 4. Para a exclusão de réplicas foi respeitado o valor máximo de 22,2% do conjunto de dados (BAZILIO et al., 2012), sendo excluídos os pontos com valor residual extremo identificados pelo teste de *Grubbs*. Para compostos que obtiveram faixa linear de 5 a 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o máximo de pontos excluídos foram quatro. As curvas analíticas foram consideradas adequadas desde que compreendessem no mínimo sete níveis e mantendo-se pelo menos uma réplica de todas as concentrações da faixa linear.

De acordo com os resultados o composto propiconazol não obteve uma regressão significativa e os compostos cresoxim metílico e parationa etílica, apesar de obterem uma regressão significativa avaliadas pelo teste F e com  $r^2$  de 0,989 e 0,964, respectivamente, foi identificado falta de ajuste do modelo, pois os resíduos não estão distribuídos aleatoriamente ao longo da curva analítica.

#### **4.3.4 Limite de quantificação e detecção**

Para determinação do LOQ foi adotado como sendo o menor nível de fortificação em que a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis. O LOD foi calculado dividindo-se o valor do LOQ por 3,33. Cabe ressaltar o fator de concentração do método de extração de 16,7 vezes possibilitou a quantificação dos compostos em níveis de  $\text{ng g}^{-1}$ . Os valores de LOD e LOQ estão apresentados na Tabela 13. Os limites de quantificação foram considerados adequados para monitoramentos de resíduos de agrotóxicos em leite materno, visto a diversidades dos compostos validados.

#### 4.3.5 Exatidão e precisão

Os parâmetros de exatidão e precisão foram avaliados através da análise de quatro níveis de fortificação em seis repetições, por meio do cálculo de recuperação e desvio padrão relativo, respectivamente, e os resultados estão apresentados na Tabela 13. Para obter a concentração na forma de  $\text{ng g}^{-1}$ , levou-se em consideração o teor de lipídeos presente na fórmula infantil para lactantes reconstituída (3,5 g/100 mL) e o fator de concentração do método de extração de 16,66, então os níveis 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  são equivalentes a 9, 17, 43, e 86  $\text{ng g}^{-1}$ . Os resultados mostraram que o procedimento tem boa recuperação para a todos os compostos estudados, porém alguns compostos apresentam valores de RSD acima de 20% refletindo a instabilidade do sinal analítico.

A precisão intermediária foi realizada através de ensaios com níveis de fortificação de 43 e 86  $\text{ng g}^{-1}$ , podendo assim avaliar todos os compostos. As análises foram realizadas em diferentes dias, lotes de hexano e  $\text{MgSO}_4$ . Os resultados estão apresentados na Tabela 13. Para os compostos cipermetrina, ciflutrina, esfenvalerato, fenvalerato e deltametrina não foi possível determinar a precisão intermediária devido à instabilidade do sinal analítico, sendo esses compostos não validados.

O método foi validado para 54 compostos e devido a oscilações instrumentais vários compostos obtiveram um RSD maior que 20% (entre 20 – 29%), são eles 2,4 DDE, aldrin, bioaletrina, clorpirifós etílico, endossulfam alfa, endossulfam sulfato, fenitrotiona, HCH alfa, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, oxifluorfem, PCB 118 + 149, PCB 153, PCB 209, permetrina, protiofos e quintozeno. Porém como os resultados de recuperação estão dentro da faixa aceitável, esses compostos foram considerados validados.

Tabela 13- Resultados da validação para os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e precisão intermediária.

	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Precisão e exatidão				Precisão intermediária	
				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )	
				9	17	43	86	43	86
				Rec $\pm$ RSD (%)				Rec $\pm$ RSD (%)	
2,4 DDD	10 -250	5	17	-	119,8 $\pm$ 17,0	117,4 $\pm$ 16,3	116,9 $\pm$ 2,4	95,4 $\pm$ 0,8	90,1 $\pm$ 12,1
4,4 DDD	10 -250	5	17	-	118,1 $\pm$ 5,6	105,0 $\pm$ 8,2	78,0 $\pm$ 6,6	98,8 $\pm$ 5,1	93,2 $\pm$ 11,7
Azoxistrobina	5 - 300	3	9	98,3 $\pm$ 13,0	99,6 $\pm$ 16,9	98,3 $\pm$ 18,9	101,8 $\pm$ 6,5	90,2 $\pm$ 0,7	86,1 $\pm$ 12,5
Bifentrina	5 - 250	3	9	102,4 $\pm$ 15,7	93,7 $\pm$ 19,7	102,4 $\pm$ 1,7	97,7 $\pm$ 18,7	105,5 $\pm$ 12,0	102,4 $\pm$ 13,2
Bromofós etílico	5 - 250	3	9	96,0 $\pm$ 11,9	94,0 $\pm$ 2,3	96,0 $\pm$ 6,6	96,4 $\pm$ 1,2	91,1 $\pm$ 2,0	91,7 $\pm$ 15,7
Bromofós metílico	5 - 250	3	9	103,7 $\pm$ 16,6	78,3 $\pm$ 18,0	103,7 $\pm$ 12,5	103,1 $\pm$ 8,6	94,8 $\pm$ 1,8	95,8 $\pm$ 18,8
Cialotrina lambda	10 - 250	5	17	-	98,2 $\pm$ 6,3	97,8 $\pm$ 12,7	100,2 $\pm$ 3,5	97,8 $\pm$ 4,9	95,5 $\pm$ 12,5
Clordano	5 - 250	3	9	105,7 $\pm$ 7,2	72,9 $\pm$ 7,1	105,7 $\pm$ 6,7	105,3 $\pm$ 3,7	94,7 $\pm$ 0,9	95,2 $\pm$ 13,8
Clorpirifós metílico	10 - 300	5	17	-	93,1 $\pm$ 11,8	105,0 $\pm$ 6,2	98,8 $\pm$ 5,4	99,7 $\pm$ 2,4	100,3 $\pm$ 12,3
DDT	10 - 300	5	17	-	88,7 $\pm$ 19,9	113,7 $\pm$ 5,9	93,3 $\pm$ 16,9	103,6 $\pm$ 0,2	102,4 $\pm$ 19,8
Dicofol	5 - 300	3	9	94,4 $\pm$ 15,4	93,7 $\pm$ 9,8	92,3 $\pm$ 6,7	107,5 $\pm$ 14,9	97,5 $\pm$ 9,9	93,3 $\pm$ 15,6
Dieldrim	5 - 300	3	9	78,9 $\pm$ 7,3	91,1 $\pm$ 13,7	71,9 $\pm$ 12,4	86,5 $\pm$ 15,9	94,3 $\pm$ 3,7	96,3 $\pm$ 20,4
Endossulfam beta	5 - 300	3	9	110,1 $\pm$ 12,4	109,8 $\pm$ 7,1	110,1 $\pm$ 6,1	106,2 $\pm$ 2,6	97,8 $\pm$ 18,9	98,6 $\pm$ 18,7
Endrim	5 - 250	3	9	99,7 $\pm$ 14,7	96,1 $\pm$ 12,0	99,7 $\pm$ 8,5	112,4 $\pm$ 15,9	100,4 $\pm$ 1,5	101,1 $\pm$ 11,2
Epoxiconazol	5 - 250	3	9	89,1 $\pm$ 7,6	91,2 $\pm$ 10,2	89,1 $\pm$ 12,8	78,8 $\pm$ 6,9	100,4 $\pm$ 0,1	97,3 $\pm$ 12,3
Fempropatrina	5 - 300	3	9	101,5 $\pm$ 15,8	95,4 $\pm$ 18,3	101,5 $\pm$ 10,6	113,6 $\pm$ 4,5	112,7 $\pm$ 3,2	93,9 $\pm$ 15,0
Fipronil	5 - 250	3	9	111,5 $\pm$ 12,5	102,4 $\pm$ 7,0	111,5 $\pm$ 4,2	101,0 $\pm$ 3,0	98,4 $\pm$ 2,9	96,8 $\pm$ 12,0
HCH beta + gama	5 - 300	3	9	106,7 $\pm$ 9,3	104,9 $\pm$ 8,2	106,7 $\pm$ 13,8	98,0 $\pm$ 5,5	83,7 $\pm$ 5,0	82,2 $\pm$ 13,0
Heptacloro	5 - 300	3	9	111,3 $\pm$ 13,6	98,7 $\pm$ 11,6	111,3 $\pm$ 10,0	109,2 $\pm$ 3,6	89,5 $\pm$ 2,2	88,7 $\pm$ 12,3
Malationa	5 - 250	3	9	102,1 $\pm$ 12,4	98,0 $\pm$ 5,6	102,1 $\pm$ 6,0	90,5 $\pm$ 3,5	101,4 $\pm$ 2,1	94,0 $\pm$ 12,6
Miclobutanil	5 - 250	3	9	112,8 $\pm$ 18,1	104,6 $\pm$ 20,0	112,8 $\pm$ 18,5	113,1 $\pm$ 19,6	92,4 $\pm$ 0,9	98,6 $\pm$ 10,6
Mirex	5 - 250	3	9	97,9 $\pm$ 18,9	92,5 $\pm$ 13,7	107,9 $\pm$ 1,2	103,2 $\pm$ 6,0	110,6 $\pm$ 1,7	109,1 $\pm$ 10,6

	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Precisão e exatidão				Precisão intermediária	
				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )	
				9	17	43	86	43	86
				Rec $\pm$ RSD (%)				Rec $\pm$ RSD (%)	
Pendimetalina	10 - 300	5	17	-	85,6 $\pm$ 8,4	104,0 $\pm$ 5,4	92,9 $\pm$ 3,4	100,5 $\pm$ 1,8	100,9 $\pm$ 15,8
Procimidona	50 -300	26	86	-	-	-	93,4 $\pm$ 3,6	-	104,9 $\pm$ 13,6
Teflutrina	5 - 300	3	9	94,1 $\pm$ 14,2	80,6 $\pm$ 5,5	94,1 $\pm$ 15,4	88,8 $\pm$ 4,7	101,3 $\pm$ 1,9	94,4 $\pm$ 15,0
Tetradifona	5 - 250	3	9	100,4 $\pm$ 4,9	84,6 $\pm$ 7,3	100,4 $\pm$ 7,2	93,8 $\pm$ 4,2	103,3 $\pm$ 0,9	101,9 $\pm$ 12,5
Transflutrina	5 - 300	3	9	105,6 $\pm$ 6,0	102,7 $\pm$ 13,5	115,6 $\pm$ 7,0	112,3 $\pm$ 5,7	100,1 $\pm$ 1,7	102,1 $\pm$ 10,2
Trifluralina	5 - 300	3	9	90,4 $\pm$ 11,1	109,2 $\pm$ 15,7	90,4 $\pm$ 6,8	76,7 $\pm$ 18,7	88,9 $\pm$ 13,6	90,5 $\pm$ 19,7
PCB 18	5 - 250	3	9	113,8 $\pm$ 3,0	102,4 $\pm$ 6,8	113,8 $\pm$ 6,7	103,6 $\pm$ 2,9	98,9 $\pm$ 3,5	100,9 $\pm$ 10,7
PCB 28 + 31	5 - 300	3	9	93,6 $\pm$ 14,7	96,4 $\pm$ 14,6	93,6 $\pm$ 11,0	98,2 $\pm$ 13,1	103,7 $\pm$ 2,5	92,6 $\pm$ 15,9
PCB 44	5 - 250	3	9	104,7 $\pm$ 3,2	100,0 $\pm$ 5,9	104,7 $\pm$ 3,5	93,1 $\pm$ 3,2	99,0 $\pm$ 3,3	98,5 $\pm$ 1,5
PCB 52	5 - 250	3	9	102,6 $\pm$ 13,4	110,6 $\pm$ 12,0	112,6 $\pm$ 15,8	118,0 $\pm$ 14,9	102,6 $\pm$ 1,1	93,8 $\pm$ 18,4
PCB 101	5 -250	3	9	95,4 $\pm$ 19,6	92,5 $\pm$ 16,9	95,4 $\pm$ 7,2	105,3 $\pm$ 8,6	97,9 $\pm$ 1,1	85,7 $\pm$ 17,6
PCB 138	5 - 250	3	9	87,9 $\pm$ 3,7	88,5 $\pm$ 14,8	87,9 $\pm$ 11,6	89,0 $\pm$ 17,6	104,6 $\pm$ 2,6	104,7 $\pm$ 19,6
PCB 170	5 - 250	3	9	95,7 $\pm$ 13,2	77,7 $\pm$ 11,3	75,7 $\pm$ 6,6	83,3 $\pm$ 9,2	101,4 $\pm$ 0,3	101,0 $\pm$ 16,5
PCB 180	10 - 250	5	17	-	111,9 $\pm$ 6,1	103,3 $\pm$ 5,1	98,1 $\pm$ 3,4	94,9 $\pm$ 3,4	91,3 $\pm$ 15,0
PCB 194	10 - 250	5	17	-	93,9 $\pm$ 7,3	93,5 $\pm$ 6,4	89,8 $\pm$ 3,5	99,6 $\pm$ 2,4	98,9 $\pm$ 18,8

### Compostos com RSD (%) >20, porém validados

2,4 DDE	10 -250	5	17	-	106,2 $\pm$ 22,9	86,8 $\pm$ 15,1	86,6 $\pm$ 23,2	77,1 $\pm$ 7,6	83,5 $\pm$ 22,3
Aldrin	5 - 300	3	9	85,8 $\pm$ 18,5	93,2 $\pm$ 15,5	79,4 $\pm$ 2,3	94,7 $\pm$ 24,6	97,0 $\pm$ 1,2	95,0 $\pm$ 12,1
Bioaletrina	5 - 300	3	9	108,8 $\pm$ 14,8	102,2 $\pm$ 4,9	108,8 $\pm$ 3,0	99,5 $\pm$ 3,3	103,9 $\pm$ 15,0	104,1 $\pm$ 26,0
Clorpirifós etílico	5 - 250	3	9	93,1 $\pm$ 12,8	84,8 $\pm$ 12,2	109,8 $\pm$ 13,9	99,0 $\pm$ 25,4	96,0 $\pm$ 1,2	96,2 $\pm$ 21,6
Endossulfam alfa	5 - 250	3	9	87,5 $\pm$ 15,4	107,7 $\pm$ 14,5	87,5 $\pm$ 8,2	113,0 $\pm$ 24,0	95,9 $\pm$ 2,5	95,0 $\pm$ 12,0
Endossulfam sulfato	5 - 250	3	9	108,0 $\pm$ 14,1	109,1 $\pm$ 5,7	108,0 $\pm$ 1,8	96,2 $\pm$ 3,1	85,5 $\pm$ 21,4	85,2 $\pm$ 21,3
Fenitrotona	5 - 300	3	9	117,3 $\pm$ 11,3	93,6 $\pm$ 24,6	117,3 $\pm$ 7,1	117,5 $\pm$ 16,6	93,4 $\pm$ 29,0	95,3 $\pm$ 13,8
HCH alfa	5 - 300	3	9	80,7 $\pm$ 9,8	85,8 $\pm$ 25,7	80,7 $\pm$ 7,2	114,5 $\pm$ 22,9	97,7 $\pm$ 22,5	96,5 $\pm$ 12,1

	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Precisão e exatidão				Precisão intermediária	
				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )				Níveis de fortificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )	
				9	17	43	86	43	86
				Rec $\pm$ RSD (%)				Rec $\pm$ RSD (%)	
Heptacloro epóxido	10 - 300	5	17	-	76,7 $\pm$ 18,4	85,9 $\pm$ 7,5	75,7 $\pm$ 23,0	96,9 $\pm$ 26,9	73,9 $\pm$ 19,5
Hexaclorobenzeno	5 - 300	3	9	96,0 $\pm$ 9,0	89,0 $\pm$ 20,4	96,0 $\pm$ 7,3	94,4 $\pm$ 7,8	91,1 $\pm$ 2,9	88,0 $\pm$ 13,3
Oxifluorfem	5 - 250	3	9	83,8 $\pm$ 13,5	92,4 $\pm$ 23,7	83,8 $\pm$ 16,8	78,9 $\pm$ 17,1	81,7 $\pm$ 6,6	82,0 $\pm$ 21,0
Permetrina	10 - 300	5	17	-	96,9 $\pm$ 13,8	105,2 $\pm$ 6,6	97,2 $\pm$ 8,3	98,5 $\pm$ 0,4	100,6 $\pm$ 20,7
Protiofós	25 - 250	13	43	-	-	108,2 $\pm$ 6,6	91,6 $\pm$ 22,0	104,6 $\pm$ 0,4	105,1 $\pm$ 13,2
Quintozeno	5 - 300	3	9	85,2 $\pm$ 20,9	89,5 $\pm$ 17,6	85,2 $\pm$ 18,8	100,5 $\pm$ 8,4	108,9 $\pm$ 24,5	81,0 $\pm$ 20,6
PCB 118 + 149	10 - 300	5	17	-	103,4 $\pm$ 15,1	97,2 $\pm$ 3,1	85,6 $\pm$ 24,3	99,8 $\pm$ 0,7	93,7 $\pm$ 16,3
PCB 153	5 - 300	3	9	100,4 $\pm$ 16,1	113,8 $\pm$ 13,5	100,4 $\pm$ 6,7	98,7 $\pm$ 24,7	103,9 $\pm$ 2,6	92,8 $\pm$ 21,3
PCB 209	5 - 300	3	9	104,6 $\pm$ 7,3	105,5 $\pm$ 6,0	104,6 $\pm$ 7,7	102,1 $\pm$ 3,6	107,5 $\pm$ 1,7	104,7 $\pm$ 20,5

### Compostos não validos

Ciflutrina	25 - 300	13	43	-	-	107,7 $\pm$ 3,0	101,8 $\pm$ 13,3	-	-
Cipermetrina	25 - 300	13	43	-	-	70,5 $\pm$ 18,7	76,7 $\pm$ 4,9	-	-
Deltametrina	5 - 300	3	9	104,0 $\pm$ 3,5	97,7 $\pm$ 6,1	104,0 $\pm$ 5,3	96,3 $\pm$ 13,1	-	-
Esfenvalerato	25- 300	13	43	-	-	111,3 $\pm$ 7,5	102,6 $\pm$ 3,0	-	-
Fenvalerato	25- 300	13	43	-	-	103,7 $\pm$ 2,5	100,8 $\pm$ 6,8	-	-

LOD: Limite de detecção.

LOQ: Limite de quantificação.

Rec: Recuperação.

RSD: Desvio padrão relativo.

#### 4.4 ANÁLISE DOS QUESTIONÁRIOS

Os resultados dos questionários aplicados às nutrizes foram organizados em forma de frequência relativa das repostas, apresentando uma descrição dos dados obtidos durante a coleta das amostras, descritos nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14- Caracterização das nutrizes.

Frequência relativa (%)		Frequência relativa (%)	
<b>Nutrizes primíparas</b>		<b>Reside próximo a indústria química</b>	
Sim	55	Sim	0
Não	45	Não	100
<b>Reside na mesma área a mais de 10 anos</b>		<b>Reside na zona rural com atividade agropecuária</b>	
Sim	75	Sim	50
Não	25	Não	50
<b>Idade da nutriz</b>		<b>Idade do filho (Tempo de lactação)</b>	
<20	10	(-) 3 semanas	25
Entre 20 e 29	55	3-4 semanas	15
Entre 29 e 30	35	5-8 semanas	35
		(+) 8 semanas	25

Além de coletar informações que possam ser correlacionadas com os resultados das análises, os questionários servem para selecionar se as amostras estão de acordo com os requisitos especificados pela WHO. Porém, devido à grande dificuldade em se obter amostras reais, para este trabalho os critérios do WHO não puderam ser seguidos, principalmente com relação ao número de gestação, pois 45% das nutrizes não eram primíparas, e tempo de lactação, visto que 25% das amostras foram coletadas com tempo de lactação inferior a 3 semanas e 25% superior a 8 semanas.

Tabela 15- Hábitos alimentares das nutrizes.

Hábitos alimentares (Frequência relativa %)				
	Consumo de Peixe	Leite e derivados	Carne, aves, derivados	Ovos
Nunca	10	-	-	-
(-)1x p semana	65	-	-	5
1 x p semana	20	-	-	35
2x p semana	5	10	-	10
(+) 2x p semana	-	45	10	45
Todos os dias	-	45	90	5

<b>Hábitos alimentares (Frequência relativa %)</b>	
<b>Origem do pescado</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Água doce	80
Água salgada	20

De acordo com a análise de frequência relativa dos dados obtidos das repostas dos questionários, pode-se observar que a alimentação das nutrízes é caracterizada pelo alto consumo de carnes, aves e derivados e baixa ingestão de peixes. Quando declarado o consumo de peixe, esse em 80% provém de água doce. Outro dado importante observado nas respostas foi com relação ao uso de inseticidas domésticos, 65% das nutrízes declararam ter utilizado algum produto do gênero em suas residências até 8 meses antes da coleta das amostras. Estes inseticidas eram principalmente da classe dos piretróides, aplicados na forma de spray.

Resultados apresentados por Kowalski e colaboradores (2013) realizaram um estudo com amostras de leite materno coletadas em diferentes regiões do Brasil para fins de correlacionar, através de rede neural de *Kohonen* (também denominados de mapas auto-organizados, que são redes competitivas e possuem a habilidade de formar mapeamentos que preservam a topologia entre os espaços de entrada e de saída, é um algoritmo robusto e não-linear, sendo sugerido como alternativa à análise de componentes principais, pois possuem a capacidade de organizar dimensionalmente dados complexos em grupos, de acordo com suas relações), a presença de PCBs com as respostas dos questionários aplicados as nutrízes. Foi possível verificar que as amostras com maior concentração de PCBs eram de nutrízes que residem em grandes centros industrializados, especialmente São Paulo, próximos a rios ou mares poluídos. Constatou-se também que os níveis mais altos de PCBs são detectados, geralmente, em amostras de leite materno maduro e em nutrízes primíparas.

#### 4.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

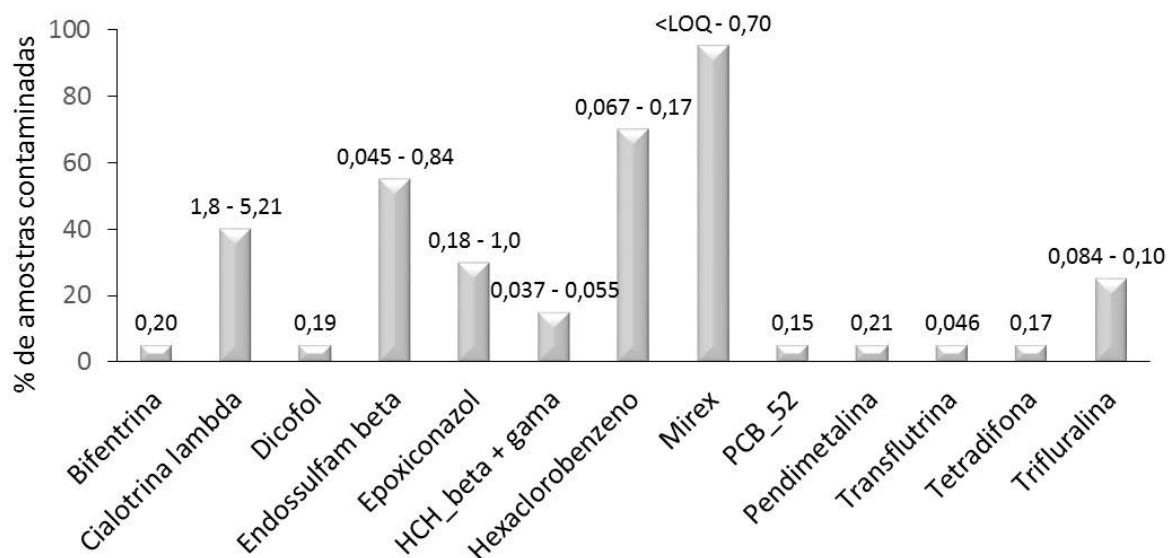
O método proposto foi aplicado em 20 amostras coletadas em cidades do estado do Rio Grande do Sul e os resultados encontrados nas amostras de leite materno estão apresentados na Tabela 16 e Figura 10.



Tabela 16- Compostos detectados nas análises das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul (resultados em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

	P30	P32	P36	P37	P38	P39	P41	P42	P44	P45	P54	P55	P56	P62	P66	P68	P88	P90	P92	P95
Bifentrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20
Cialotrina lambda	3,19	1,79	-	-	-	-	5,21	-	-	5,18	-	-	4,93	-	2,99	3,82	-	-	-	3,38
Dicofol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
Endossulfam beta	0,15	0,045	-	0,13	-	0,13	-	-	0,24	-	-	0,84	0,21	0,083	0,16	0,10	-	-	0,081	-
Epoxiconazol	-	-	-	-	-	-	0,18	0,37	-	0,88	-	-	-	-	-	-	0,83	0,64	-	1,0
HCH beta + gama	0,037	0,040	-	-	-	-	-	-	-	0,055	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexaclorobenzeno	0,18	0,14	0,13	-	0,13	0,067	-	-	0,13	0,17	-	0,12	0,13	0,13	0,12	0,14	-	0,14	0,13	-
Mirex	0,070	0,046	0,11	0,10	0,70	0,21	0,48	<LOQ	0,05	0,11	0,10	0,47	0,66	-	0,11	0,18	0,069	0,21	0,048	0,088
PCB_52	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pendimetalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-
Transflutrina	-	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetradifona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trifluralina	0,087	0,084	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	0,085	-	-	-	-	-	0,089	-	-

Figura 10- Resultado da análise das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul (resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).



Foram detectados 14 agrotóxicos nas amostras de leite materno, e todas as amostras apresentaram contaminação por pelo menos um composto. O agrotóxico com concentração mais elevada foi a cialotrina lambda, sendo seu uso permitido, detectada em 40% das amostras na faixa de 1,8 a 5,21  $\mu\text{g g}^{-1}$ , de acordo com o índice monográfico (ANVISA, 2016) seu uso é o mais amplo dentre os agrotóxicos detectados, sendo permitido a aplicação foliar, em produtos de armazenamento e sementes em cereais, verduras e frutas. Outros agrotóxicos do grupo dos piretróides foram detectados a bifentrina e a transflutrina, ressaltando a importância do desenvolvimento de métodos cada vez mais abrangentes. O dicofol que está sob revisão para ser incluído na lista dos POPs foi detectado em uma amostra na concentração de 0,19  $\mu\text{g g}^{-1}$ . O endossulfam beta foi detectado em 55% das amostras, cabe ressaltar que esse passou a integrar o grupo dos POPs em 2011 e no Brasil seu uso foi permitido até 2013.

Resultados obtidos por Ferronato (2014) o hexaclorobenzeno foi detectado em 75% das amostras analisadas, seguido de HCH gama (40%), heptacloro (30%), HCH beta (25%), mirex (20%) e HCH alfa (10%). Com relação ao hexaclorobenzeno encontrou-se resultados similares pois foi detectado em 70% das amostras

Resultados semelhantes foram relatados na literatura em estudos realizados na Bélgica (COLLES et al., 2008), que analisou 190 amostras de leite materno e o

hexaclorobenzeno e HCH beta foram detectados em 86 e 22% das amostras respectivamente. Na Croácia, o estudo desenvolvido por KLINCIC, (2014) detectou em 100% das amostras o HCB e HCH ao analisar 38 amostras. Em ambos os estudos também foi detectado em 100% das amostras o p,p-DDE que é produto de degradação do DDT.

No Brasil, estudos realizados por Mesquita (2001) com 50 amostras, foi evidenciado a contaminação de 100% para o p,p'DDE, 90% para o p,p'DDT, 84% para o  $\beta$ -HCH, 82% para o p,p'DDD, 78% para o  $\alpha$ -endossulfam, 74% para o  $\gamma$ -clordano, 56% para o  $\alpha$ -HCH, 32% para o HCH gama, 54% para o aldrim, 52% para o dieldrim, HCB (12%), endrim (20%),  $\beta$ -endossulfam (14%), metoxicloro (20%) e mirex (38%). Os resultados apresentados por Palma (2011), todas as amostras (n= 62) foram detectados algum agrotóxico, sendo o composto p,p'- DDE (0,32 – 12,03  $\mu\text{g g}^{-1}$  de gordura) detectado em 100% delas, em 44% das amostras foi detectado o endossulfam beta (0,54 – 0,61  $\mu\text{g g}^{-1}$  de gordura) e 13% o p,p'-DDT (2,62 – 12,41  $\mu\text{g g}^{-1}$  de gordura). Os outros agrotóxicos analisados foram encontrados abaixo do limite de quantificação (0,0013 – 0,108  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Deltametrina foi detectada em 37% das amostras, aldrim e endossulfam alfa, ambos em 32%, HCH alfa em 18%, trifluralina em 11% e lindano em 6%, apenas a cipermetrina não foi detectada.

Diferente de outros trabalhos, nas amostras analisadas não foram detectados o composto DDT e seus metabolitos. Porém com relação aos outros agrotóxicos os níveis encontrados estão em concentrações similares. Apesar de diferentes métodos analíticos e número de amostras utilizados nos estudos pode-se observar que os POPs ainda estão presentes no meio ambiente, e podem acumular-se nos seres humanos além de outros agrotóxicos que tem seu uso permitido.

Embora tenha sido detectado a presença de agrotóxicos em todas as amostras, o leite materno não deve ser substituído, pois este possui propriedades indispensáveis para o desenvolvimento do lactante.

#### 4.6 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS E OS RESULTADOS DAS AMOSTRAS POR MEIO DA PCA

Foi observado a formação de grupos entre os resultados das amostras e as respostas dos questionários com relação a cidade em que foi coletada a amostra e se as nutrízes eram primíparas ou múltíparas. Na tabela 17 estão apresentados

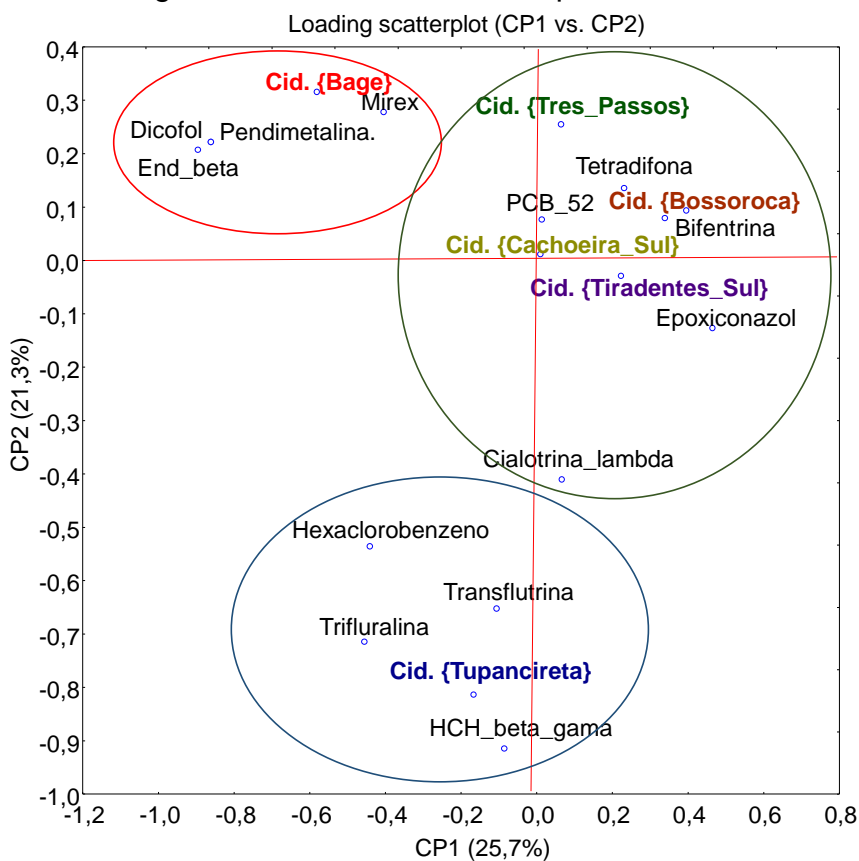
variância acumulada em cada componente principal para as duas PCA elaboradas, uma com relação a cidade de coleta das amostras e outra com relação ao número de gestações da nutriz.

Tabela 17- Resultados da variância obtida pela PCA.

Componente Principal	Com relação a cidade de origem da amostra		Com relação ao n° de gestações da nutriz	
	Variância (%)	Variância Acumulada (%)	Variância (%)	Variância Acumulada (%)
1	25,7	25,7	20,1	20,1
2	21,3	47,0	18,8	38,9
3	13,4	60,4	12,4	51,3
4	9,5	69,9	10,3	61,6
5	8,5	78,4	8,5	70,1
6	6,8	85,2	7,1	77,2

A Figura 11 apresenta o gráfico dos pesos da PCA demonstrando os grupos formados com relação a cidade de origem das amostras e os compostos detectados.

Figura 11- Gráfico dos pesos PC1xPC2 demonstrando os grupos formados com relação a cidade de origem das amostras e os compostos detectados.

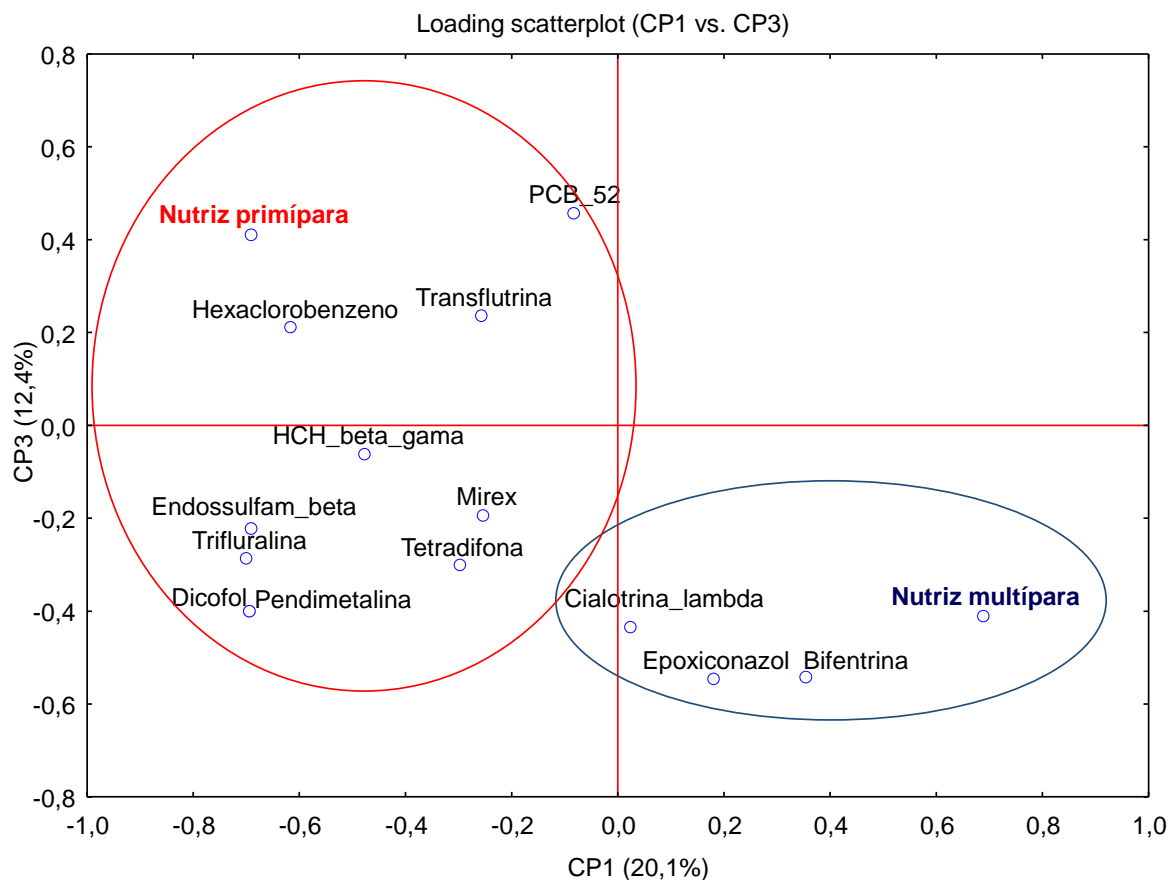


Com 47% das informações acumuladas pelas CP1 e CP2, foi possível observar a separação de três grupos apresentados na Figura 11. Com a CP1 ocorreu a separação de dois grupos, um formado pela cidade de Bagé, e outro formado pelas cidades de Três Passos, Bossoroca, Cachoeira do Sul e Tiradentes do Sul. Já as informações da CP2 separaram o terceiro grupo formado pela cidade de Tupanciretã.

Os agrotóxicos dicofol e pendimetalina foram detectados somente nas amostras de Bagé, e as maiores concentrações dos POPs endossulfam beta e mirex também foram detectadas nas amostras desta cidade, justificando a formação do grupo. O segundo grupo formado pelo conjunto de cidades, o epoxiconazol foi detectado em amostras de Tiradentes do Sul e Bossoroca, as maiores concentrações de cialotrina lambda foram detectadas nas amostras e Tiradentes do Sul e Cachoeira do Sul, os compostos tetradifona e PCB52 foram detectados somente nas amostras de Tiradentes do Sul e a bifentrina em uma amostra de Bossoroca.

O Grupo formado por Tupanciretã está presente a transflutrina, detectada somente em uma amostra desta cidade, trifluralina que foi detectada em 100% das amostras de Tupanciretã, e os POPs hexaclorobenzeno e HCH alfa + beta detectados em concentrações maiores do que as outras cidades. Pode ser observado também que ocorreu um agrupamento por região geográfica, exceto para a cidade de Cachoeira do Sul, pertencente a região central, que está no grupo das cidades do noroeste do estado. Com relação ao número de gestações da nutriz ocorreu a formação de dois grupos conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12- Gráfico dos pesos PC1xPC3 demonstrando os grupos formados com relação ao número de gestações da nutriz cidade e os compostos detectados.



Ao analisar o gráfico de pesos com a CP1 contendo 20,1% da variância dos dados e a CP3 com 12,4%, verifica-se a formação dos grupos. O fato da nutriz ser primípara está associado a detecção de mais compostos e a presença de POPs. Os compostos transflutrina, tetradifona, trifluralina e pendimetalina, apesar do uso ser autorizado pela Anvisa, possuem indicação de uso mais restrita que os compostos cialotrina lambda, epoxiconazol e bifentrina, que estão relacionados com as amostras de nutrizes múltiparas. Esse resultado reforça a importância de as amostras serem de nutrizes primíparas para a realização de monitoramento de POPs em amostras de leite materno.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o método utilizado no preparo da amostra apresenta vantagens em relação aos métodos que vem sendo utilizados em análise de POPs em leite materno, por ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros. O preparo de amostra foi otimizado de acordo com os resultados do planejamento fatorial  $3^2$  que permitiram por meio de avaliação do gráfico das interações visualizar quais os fatores que tem influência significativa no preparo de amostra.

Os resultados de efeito matriz evidenciaram a necessidade de usar curvas preparadas em branco da matriz e a curva analítica extraída compensa os resultados de recuperação além de manter as mesmas condições de preparo das amostras. A fórmula infantil para lactantes pode ser utilizada como branco, visto a dificuldade de coletar grandes volumes de amostras de leite materno e amostras isentas de contaminação, facilitando o emprego do método.

Portanto, o método proposto para a determinação de POPs e agrotóxicos em leite materno utilizando GC-NCI-MS mostrou-se eficaz por atender as os parâmetros de validação de métodos cromatográficos, apresentando uma alta detectabilidade, permitindo atingir limites de detecção adequados para a aplicação do método.

O método foi aplicado em 20 amostras coletadas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, e demonstrou que além dos POPs outros compostos estão presentes no leite materno, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais abrangentes. Com o uso da PCA foi possível obter uma correção entre a cidade de origem da amostra e os agrotóxicos detectados bem como a presença dos POPs em leite materno de nutrízes primíparas.

Considerando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram atingidos e o método pode ser aplicado em análises de leite materno visando a determinação de POPs e agrotóxicos.

## 6 REFERÊNCIAS

Agilent Enhanced Matrix Removal—Lipid. LOSE THE LIPIDS, FIND YOUR ANALYTES. **Agilent Technologies**, Inc., Published in the USA, jul. 27, 2015 5991-6052EN. 2015a.

Agilent. Enhanced Matrix Removal - Lipid - Recommended Protocols, 2015b. Disponível em: <http://www.agilent.com>. Acesso em: 18 jan. 2016.

ALONSO, M. B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? **Environment International**, vol. 47, p. 99–106, 2012.

AMAP. **AMAP Assessment 2009: Radioactivity in the Arctic**. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway, 2010.

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

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Monografias de produtos agrotóxicos, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 27 mar. 2016.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos, 2005. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, vol. 877, p. 2224–2234, 2009

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 13th ed. DC 210, p. 1–117, 2007.

AZEREDO, A. et al. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. **Chemosphere**, vol. 73, p. S246–S251, 2008.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6.

BALLABIO, D. A MATLAB toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, vol. 149, p. 1-9, 2015.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa, UFV. 2004, 215 p.

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, p. 60-67, 2012.



BEDI, J. S. Pesticide residues in human breast milk: Risk assessment for infants from Punjab, India. **Science of the Total Environment**, vol. 463, p. 720–726, 2013.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Cap. 4 – Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. OLIVEIRA, M. A. L. et al. 1º ed. Editora LTC. Rio de Janeiro, 2015.

BORTOLOZO E. A. F. Q.; TIBONI E. B.; CÂNDIDO L. M. B. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. **Pan American Journal of Public Health**, vol. 16, nº 3, p. 199–205, 2004.

BRASIL. Decreto n. 875, de 19 de julho de 1993. Promulga o texto da Convenção sobre o Controle de Movimentos Transfronteiriços de Resíduos Perigosos e seu Depósito. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 jul. 1993, p. 10050.

BRASIL. Decreto n. 5.360, de 31 de janeiro de 2005. Promulga a Convenção sobre Procedimento de Consentimento Prévio Informado para o Comércio Internacional de Certas Substâncias Químicas e Agrotóxicos Perigosos, adotada em 10 de setembro de 1998, na cidade de Roterdã. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 fev. 2005, p. 4.

BRASIL. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal. Portaria nº 393, de 05 de outubro de 1972. Proibiu o uso de organoclorados na cultura do fumo. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 06 out. 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 356, de 14 de outubro de 1971. Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 15 out. 1971, seção 1, p. 8318.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 357, de 14 de outubro de 1971. Regulamento de defesa sanitária vegetal, aprovado pelo Decreto n. 24.114, de 12 de abril de 1934. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 15 out. 1971, seção 1, p. 8318.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 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. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. Brasília, DF, 03 de set. 1985. Seção 1, p. 12941.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Grupo de Trabalho Interinstitucional (GTI) do Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo. **Inventário nacional preliminar de novos poluentes orgânicos persistentes (novos POPs) de uso industrial**. Brasília, mar. 2013.

BRITO, N. M., et al. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, vol. 13, p. 129-146, 2003.

BURATINI, S.V. & BRANDELLI, A. **Bioacumulação. In: Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Zagatto P. A & Bertoletti, E.(eds). São Carlos: Rima. 2006. 478 p.

CALADO, V. & MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Editora E-Papers Serviços Editoriais Ltda. Rio de Janeiro, 2003.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. Tradução: MARTINS, C. S. A. Ed. Gaia Ltda. São Paulo 1º ed. 327p. 2010.

CERRILLOA, I. et al. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental Research**, vol. 98, p. 233–239, 2005.

CHEN, X. et al. Method for the quantification of current use and persistent pesticides in cow milk, human milk and baby formula using gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, vol. 970, p. 121–130, 2014.

CHERTA, L., et al. Application of gas chromatography–(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, vol. 1314, p. 224– 240, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, vol. 31, p. 623-636, 2008.

CHUI, Q. S. H.; BARROS, C. B.; SILVA, T. D. Parâmetros *r* e *R* obtidos de programa interlaboratorial - como usá-los. **Química Nova**, vol. 32, p. 2209-2213, 2009.

Convenção de Basiléia. Texto da Convenção. Disponível em: <<http://www.basel.int/>> Acesso em: 03 dez. 2015.

Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento: de acordo com a Resolução n. 44/228 da Assembleia Geral da ONU, de 22 de dez. de 1989, estabelece uma abordagem equilibrada e integrada das questões relativas a meio ambiente e desenvolvimento: a **Agenda 21** – Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 1995, p. 472.

Conselho Nacional Do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução 452, de 02 de julho de 2012. Dispõe sobre os procedimentos de controle da importação de resíduos, conforme as normas adotadas pela Convenção da Basiléia sobre o Controle de Movimentos Transfronteiriços de Resíduos Perigosos e seu Depósito. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jul. 2012, p. 84.

Convenção de Estocolmo. Texto da Convenção. Disponível em <<http://www.chm.pops.int/>> Acesso em: 03 dez. 2015.

Convenção de Roterdã. Texto da Convenção. Disponível em <<http://www.pic.int/>> Acesso em: 03 dez. 2015.

ÇOK, I. et al. Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey. **Environment International**, vol. 40, p. 63–69, 2012.

COLLES, A. et al. Fourth WHO-coordinated survey of human milk for persistent organic pollutants (POPs): Belgian results. **Chemosphere**, vol. 73. p. 907–914, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

CORCELLAS, C. et al. Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment International**, vol 47, p. 17–22, 2012.

CROES, K. et al. Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). **Chemosphere**, vol. 89, p. 988–994, 2012.

CRUZ, S.; LINO, C.; SILVEIRA, M. I. Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. **The Science of the Total Environment**, vol. 317, p. 23–35, 2003.

DEME, P., et al. An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography–negative chemical ionisation tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils. **Food Chemistry**, vol. 142, p. 144–151, 2014.

ENNACEUR, S.; GANDOURA, N.; DRISS, M. R. Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. **Environmental Research**, vol. 108, p. 86– 93, 2008.

FEO, M. L. et al. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by house holds for other pests and home garden use. **Environment International**, vol. 38, p. 67–72, 2012.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, vol. 22, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, A. P.; KRAUSS, T. M.; BRAGA, A.M.C.B. Integrated Environmental and Health Risk Assessment: A Case Study of Persistent Organic Pollutants (POPs) in Humans and Wildlife. In: Carolina Bilibio; Oliver Hensel; Jeferson Francisco Selbach. (Org.). **Sustainable Water Management in the Tropics and Subtropics - and Case Studies in Brazil** : Fundação Universidade Federal do Pampa, vol. 3, p. 11-25, 2012.

FERRONATO, G. Determinação de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em leite materno: desenvolvimento e aplicação de método analítico empregando GC-NCI-MS. **Dissertação de Mestrado, UFSM**, Santa Maria, 2014.

GUARIEIRO, L. L. N.; PINTO, A. C.; AGUIAR, P. F.; Ribeiro N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Química Nova**, vol. 31, p. 421-426, 2008.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**. A textbook. 1<sup>a</sup> ed. Springer, Alemanha, 2004.

Hajslova, J.; Zrostlikova, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, vol. 1000, p. 181–197, 2003.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7<sup>a</sup> ed., LTC, Rio de Janeiro, 2008, cap. 25.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry. Principles and Applications**. 3 ed. England: Wiley, 2007. 489 p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise instrumental. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CGCRE-008**, Rev. 4, 2011.

KLINCIC, D. Polychlorinated biphenyls and organochlorinepesticides in human milk samples from tworegions in Croatia. **Environmental toxicology and pharmacology**, vol. 37, p. 543–552, 2014.

KOLBERG, D. I. et al. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, vol. 125, p. 1436–1442, 2011.

KOWALSKI, C. H. et al. Application of Kohonen neural network for evaluation of the contamination of Brazilian breastmilk with polychlorinated biphenyls. **Talanta**, vol.116, p. 315–321, 2013.

LAL, V.; et al. Capacity building for persistent organic pollutant (POP) analysis in the Pacific and POP trends in the Pacific Islands. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 46, p. 173-177, 2013.

LANG, Sandra. **Aleitamento do Lactente - Cuidados Especiais**. Livraria Santos Editora. São Paulo. 1<sup>a</sup> ed. 1999. 179p.

LEEUWEN, S. P. J. V.; BAVEL, B. V & BOER, J. D. First worldwide UNEP interlaboratory study on persistente organic pollutants (POPs), with data on

polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 46, p. 110-117, 2013.

LYRA, W. S. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, vol. 33, p. 1594-1597, 2010.

LUZARDO, O. P.; et al. Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 405, p. 9523–9536, 2013.

MALISCH, K.; FIEDLER, H. UNEP-coordinated Survey of Mothers' Milk for Persistent Organic Pollutants Guidelines for Organization. **Sampling and Analysis Chemicals Branch United Nations Environment Programme (UNEP)**, 2012.

MANACA, M. N. et al. Concentration of DDT compounds in breast milk from African women (Manhiça, Mozambique) at the early stages of domestic indoor spraying with this insecticide. **Chemosphere**, vol. 85, p. 307–314, 2011.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: 17 out. 2015.

MARTINS, J. G. et al. Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. **Chemosphere**, vol. 92, p. 233–246, 2013.

MESQUITA AS. Avaliação da contaminação do leite materno por agrotóxicos organoclorados persistentes em mulheres doadoras do Banco de leite do Instituto Fernandes Figueira, RJ. **Dissertação de Mestrado**, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

Ministério do Meio Ambiente. Convenção de Basiléia. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

MUELLER, J. F.; et al. Persistent organochlorine pesticides in human milk samples from Australia. **Chemosphere**, vol. 70, p. 712–720, 2008.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, vol. 29, p. 1401-1406, 2006.

NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed., Bookman, 2010, cap. 26.

PALMA, D. C. A. Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT, **Dissertação de Mestrado**, UFMT, Cuiabá, 2011.

PPDB: Pesticide Properties Data Base. **University of Hertfordshire**. Versão: mar. 2016. Disponível em: < <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>> Acesso em: 25 mar. 2016.

PENTEADO, J. C. P.; Vaz, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, vol. 24, p. 390-398, 2001.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para Químicos. **Química Nova**, vol. 19, p. 268-277, 1996.

PORTOLÉS, T., et al. Improved gas chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues making use of atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of Chromatography A**, vol. 1260, p. 183– 192, 2012

PRESTES, O. D. Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean up dispersivo e GC-MS (NCI), **Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria**, 2007.

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

RAMOS, L.; HERNANDEZ, L. M.; GONZALEZ, M. J. Elution pattern of planar chlorinated biphenyls 2,3,7,8-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans on chromatographic adsorbents and factors affecting the mechanism of retention. Possibilities of selective separation of both families. **Journal of Chromatography A**, vol. 759, p. 127–137, 1997.

REGO, J. D. **Aleitamento Materno**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

ROSÁRIO, C. R.; KIPPER, L. M.; FERRÃO, M. F. Modelo para aplicação de análise multivariada através de técnicas estatísticas PCA e HCA sobre questionário de avaliação da satisfação de clientes: estudo de caso em uma empresa metalúrgica de embalagens metálicas. **Tecno-lógica**, vol. 16, p. 30-39, 2012.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, vol. 1158, p. 111-125, 2007.

SANTE (EUROPEAN COMMISSION) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Documento N° SANTE/11945/2015**, 1 dez. rev. 0, 2015.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, vol. 758, p. 80-92, 2013.

SCHANTZ, M. M. et al. Milk and serum standard reference materials for monitoring organic contaminants in human samples. **Anal Bioanal Chem**, vol. 405, p. 1203–1211, 2013.

SILVA, M. C.; SILVA, J. D. G.; BORGES, E. F. Análises de componentes principais para elaborar índices de desempenho no setor público. **Revista Brasileira de Biometria**, vol.33, p.291-309, 2015.

SILVA, R. C.; et al. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, vol. 30, p. 1535-1538, 2007.

Software Action. **Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade**, São Carlos - SP, Brasil, 2014. Disponível em: <[www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br)> Acesso em: 16 nov. 2015.

SOUZA, A. M. S.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, vol. 35, p. 223-229, 2012.

SQUELLA, X. R. et al. Presence of organochlorine pesticides in breast milk samples from Colombian women. **Chemosphere**, vol. 91, p. 733–739, 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de un analizador de masas, ¿para qué? **Scientia Chromatographica**, vol. 2, p. 25-48, 2010.

Stockholm Convention. Disponível em: <<http://chm.pops.int/>> Acesso em: 15 dez. 2015.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, vol. 29, p. 338-350, 2006.

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

UNEP- United Nations Environment Programme. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. **Draft revised guidance on the global monitoring plan for persistent organic pollutants**, 2011.

UNEP- United Nations Environment Programme. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. **Results of the global survey on concentrations in human milk of persistent organic pollutants by the United Nations Environment Programme and the World Health Organization**, 2013.

UNICEF. Fundo das Nações Unidas para a Infância. **Promovendo o Aleitamento Materno**. 2 ed. 18p. Brasília: 2007.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry. instrumentations, applications and strategies for data interpretation**. 4 ed. England: Wiley, 2011, 819 p.

WHO. Fourth WHO-Coordinated Survey of Human Milk for Persistent Organic Pollutants in Cooperation with UNEP. **Guidelines for Developing a National Protocol**. Geneva, Switzerland, 2007.

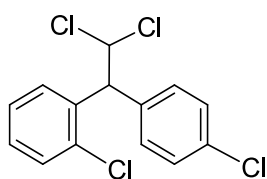
XU, W.; WANG, X.; CAI, Z. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. **Analytica Chimica Acta**, vol. 790, p. 1–13, 2013.

ZANELLA, R. et al. High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis, editado por Tomasz Tuzimski e Joseph Sherma. CRC Press Taylor & Francis Group 2015 (582 Hal). Chapter 13 – Quantitative Analysis and Method Validation, p. 303-324, 2015.

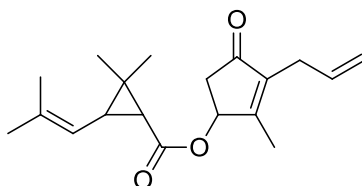
ZHANG, J. et al. Exposure to pyrethroids insecticides and sérum levels of thyroid-related measures in pregnant women. **Environmental Research**, vol. 127, p. 16–21, 2013.



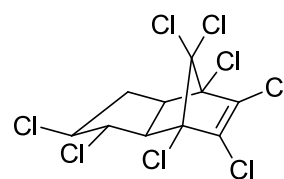
## APÊNDICE 1 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO



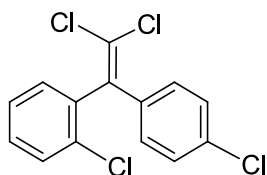
2,4 DDD



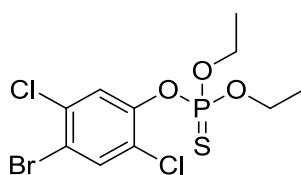
Bioaletrina



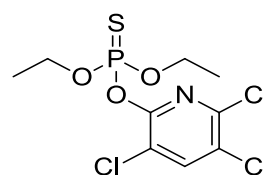
Clordano



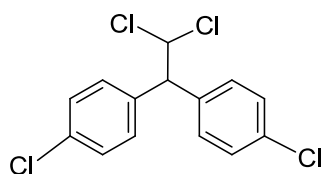
2,4 DDE



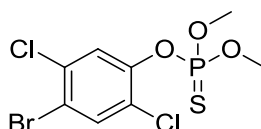
Bromofós etil



Clorpirifós etil



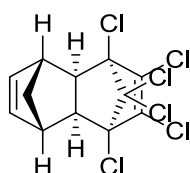
4,4 DDD



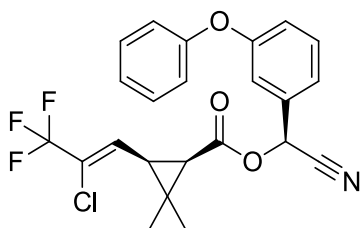
Bromofós metil



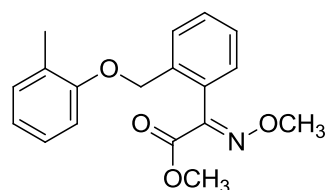
Clorpirifós metil



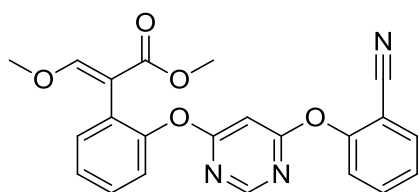
Aldrin



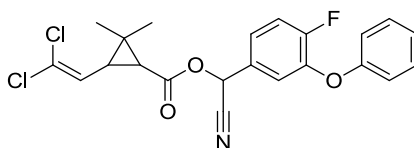
Cialotrina Lambda



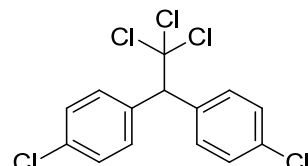
Cresoxim metil



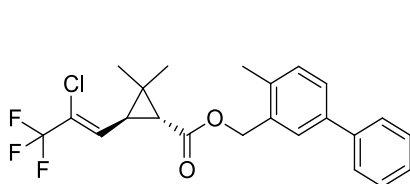
Azoxistrobina



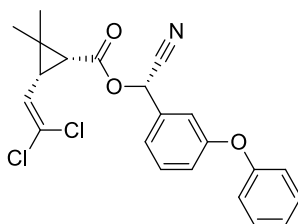
Ciflutrina



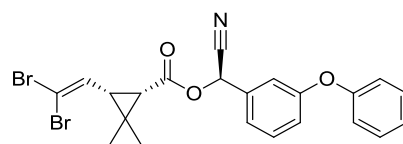
DDT



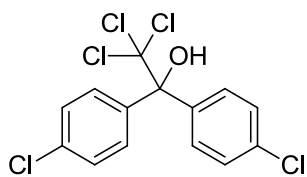
Bifentrina



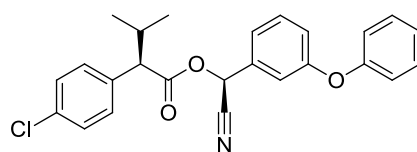
Cipermetrina



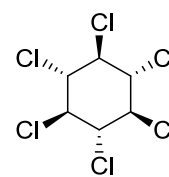
Deltametrina



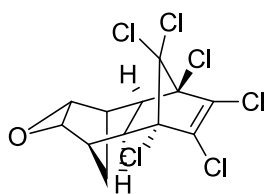
Dicofol



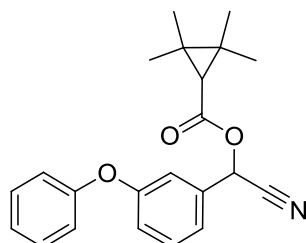
Esfenvalerato



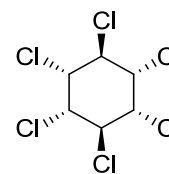
HCH beta



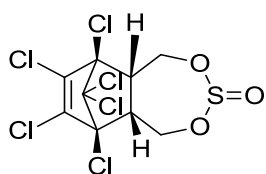
Dieldrin



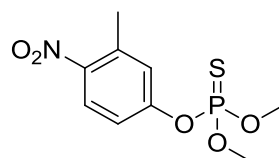
Fempropatrina



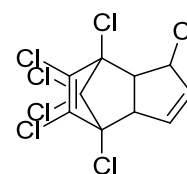
HCH gama



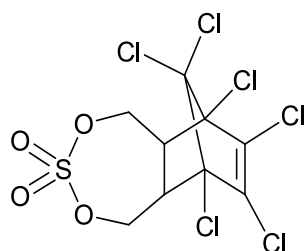
Endossulfam



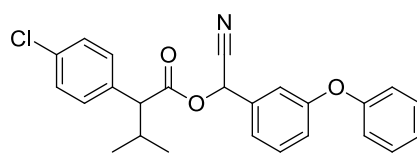
Fenitrotiona



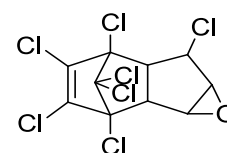
Heptacloro



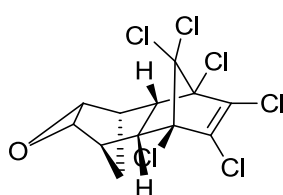
Endossulfam sulfato



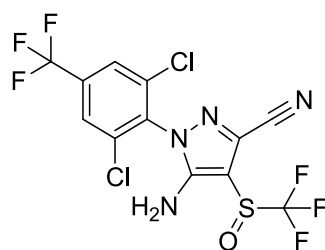
Fenvalerato



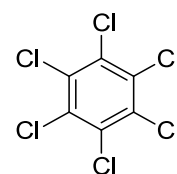
Heptacloro epoxido



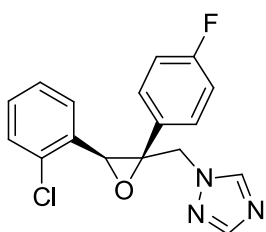
Endrin



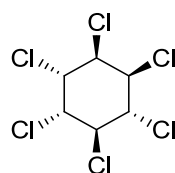
Fipronil



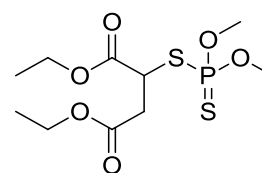
Hexaclorobenzeno



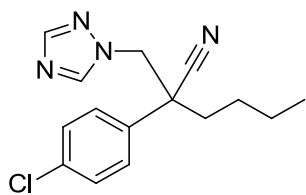
Epoxiconazol



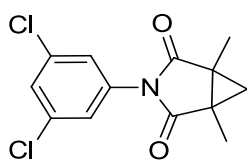
HCH alfa



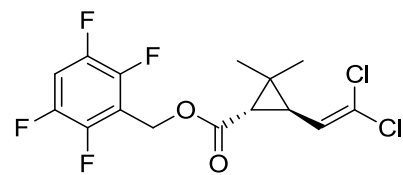
Malationa



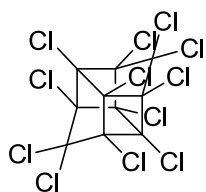
Miclobutanil



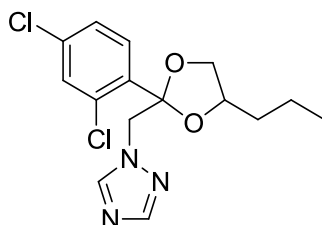
Procimidona



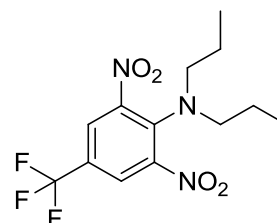
Transflutrina



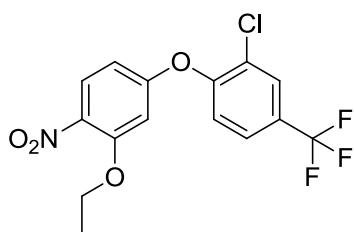
Mirex



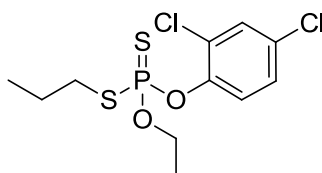
Propiconazol



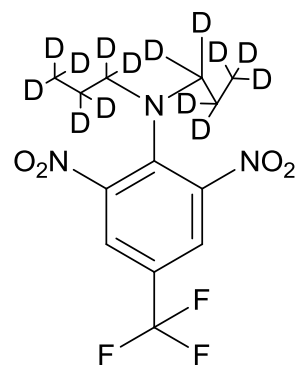
Trifluralina



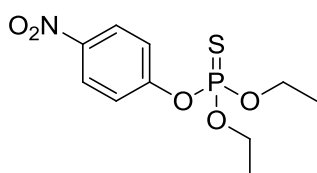
Oxifluorfen



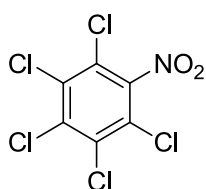
Protiofós



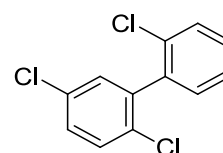
Trifluralina deuterateda



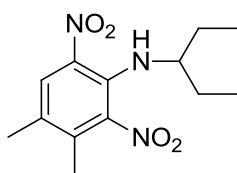
Parationa etílica



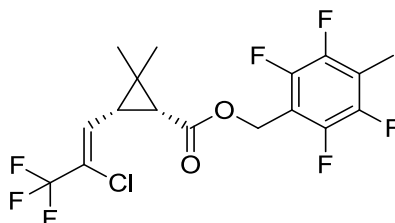
Quintozeno



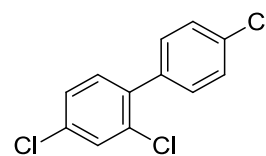
PCB 18



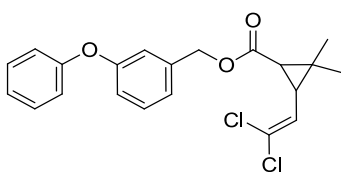
Pendimetalina



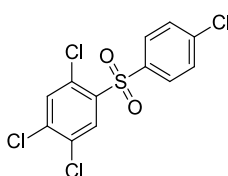
Teflutrina



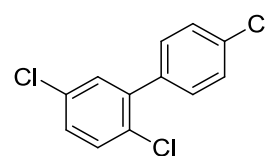
PCB 28



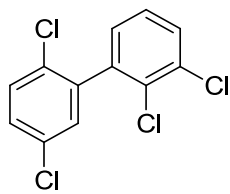
Permetrina



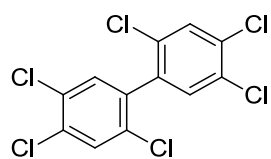
Tetradifona



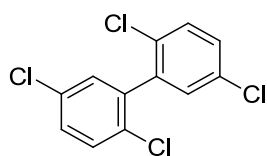
PCB 31



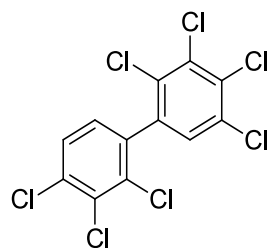
PCB 44



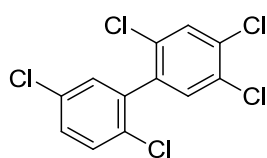
PCB 153



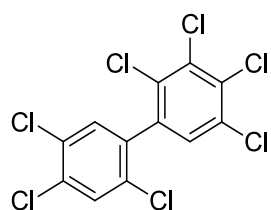
PCB 52



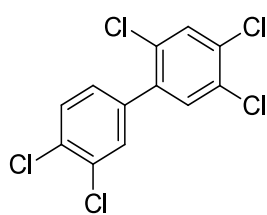
PCB 170



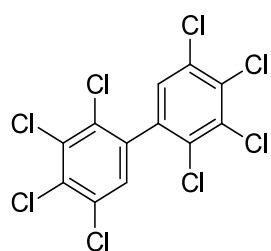
PCB 101



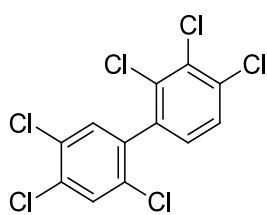
PCB 180



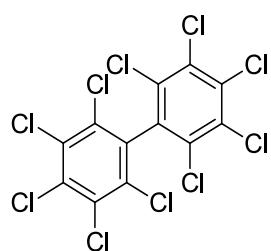
PCB 118



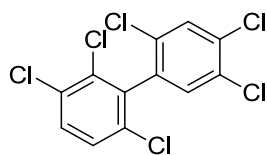
PCB 194



PCB 138



PCB 209



PCB 149

## APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Monitoramento de resíduos de agrotóxicos e Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em água e leite materno, em zonas rurais do estado do RS, visando inter-relacionar questões ambientais e sanitárias

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Renato Zanella

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria/Centro de Ciências Naturais e Exatas/Departamento de Química

Telefone para contato: (55) 32209531/ (55) 99751531

Pesquisadores participantes: Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Telefones para contato: (55) 32209531 / (55) 99751531

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

◆ Esta pesquisa tem como objetivo geral o desenvolvimento de métodos para o monitoramento de resíduos e contaminantes em águas de consumo de populações de zona rural, bem como em leite materno. E, neste contexto, inter-relacionar os resultados.

◆ Esta pesquisa implica em riscos mínimos inerentes a ordenha (extração) do leite materno da nutriz (mulher que está amamentando), uma vez que a doadora receberá orientações de como fazê-la. Para as doadoras que desejarem participar os benefícios esperados, reportam a um aumento do conhecimento sobre o nível de contaminação e formas de evitá-la.

◆ Da aplicação do método analítico desenvolvido, teremos um panorama da situação, em termos de contaminação por resíduos, nas amostras. Também, permitirá a implementação de programas de monitoramento possibilitando avaliar a variação dos níveis de resíduos em função de diferentes fatores como: épocas de produção agrícola, regiões produtoras e diferentes formas de produção.

Também, será realizado um trabalho de conscientização da comunidade estudada, no sentido de usar as Boas Práticas Agrícolas, importante ação a ser tomada junto aos agricultores no caso de resultados positivos no monitoramento.

A disponibilização dos resultados e do método adequado para obtê-los permitirá que os órgãos de fiscalização possam tomar as decisões cabíveis caso ocorra excessos dos resíduos, com relação aos respectivos LMRs, resultando num avanço no sentido de preservação da saúde bem como do meio ambiente.

◆ Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Entendemos que a pesquisa praticamente não oferecerá riscos as mulheres que participarem, no entanto, é necessário dizer que quem sentir algum desconforto em participar, a qualquer momento de sua participação, poderá desistir.

◆ Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo).

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar desse estudo como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Monitoramento de resíduos de agrotóxicos e Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em água e leite materno, em zonas rurais do estado do RS, visando inter-relacionar questões ambientais e sanitárias”** Eu discuti com o **Dr. Renato Zanella** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de

esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas.

Local e data: \_\_\_\_\_

**Assinatura do sujeito:** \_\_\_\_\_

(Somente para o pesquisador responsável pelo contato e tomada do TCLE)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009 Email: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/cep.

## APÊNDICE 3- QUESTIONÁRIO PARA POTENCIAIS DOADORAS DE LEITE MATERNO

### QUESTIONÁRIO PARA POTENCIAIS DOADORAS DE LEITE MATERNO

CONFIDENCIAL

NÃO PREENCHER

Número da amostra:

\_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone:( ) \_\_\_\_\_ Telefone cel.:( ) \_\_\_\_\_

email: \_\_\_\_\_

#### 1ª parte

1. Você está planejando/planejou amamentar seu filho?

( ) Sim ( ) Não

2. É seu primeiro filho?

( ) Sim ( ) Não

3. Você está esperando/esperou um único filho?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

4. Você está tendo/teve uma gravidez normal e saudável?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

5. Você mora nessa mesma área a mais de 10 anos?

( ) Sim ( ) Não

Se não, há quanto tempo: \_\_\_\_\_

6. Tem menos de 30 anos de idade?

( ) Sim ( ) Não



Se não, qual a data de nascimento: \_\_\_\_\_

7. Você mora perto de indústrias de papel e celulose, indústrias de metal, incineradores ou onde há produção de produtos químicos?

( ) Sim ( ) Não

8. Você mora perto de zona rural ou nas proximidades de plantações ou áreas de criação de animais?

( ) Sim ( ) Não

### 2ª parte

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos Altura: \_\_\_\_ m

Peso médio antes da gravidez: \_\_\_\_ kg

Onde você residiu nos últimos 10 anos?

( ) zona urbana ( ) zona rural

Como você descreveria seus hábitos alimentares antes da gravidez?

( ) Dieta mista ( ) Vegetariana, mas com leite e ovos

( ) Estritamente vegetariana ( ) Outra

Quantas vezes, em média, você comeu seguintes alimentos antes da gravidez?

	Peixe e derivados	Alimentos marinhos (ex: camarão, sardinha)	Leite e derivados	Carne, aves e produtos derivados	Ovos
Nunca					
Menos de uma vez por semana					
Uma vez por semana					
Duas vezes por semana					
Mais de duas vezes por semana					
Todos os dias					

Quais tipos de peixes você consome com maior frequência?

Peixes do mar       Peixes de água doce

Você foi amamentada quando bebê? Por quanto tempo?

Sim, \_\_\_ meses       Não       Não sei

Você estava envolvido em trabalhos não domésticos antes da gravidez?

Sim, \_\_\_\_\_  Não

O interior da sua casa já foi pulverizado com Detefon® (DDT)? Há quanto tempo?

Sim, \_\_\_ meses       Não

Ou outro produto por exemplo: SBP®, RAID®, BAYGON®, MORTEIN® ou MAT INSET®?

Sim, \_\_\_ meses, qual: \_\_\_\_\_

De que tipo é a água que você consome?

Da CORSAN       De poço artesiano       Fonte natural

De rio       Água mineral, marca \_\_\_\_\_.

### 3ª parte

1. Você consente a doação de leite para essa pesquisa?

Sim       Não

2. Qual a idade do seu filho (a)?

menos de 3 semanas       3-4 semanas

5-8 semanas       mais de 8 semanas

3. Qual o sexo da criança?

Masculino       Feminino       Não sei

4. O seu peso atual já é o mesmo de antes da gravidez?

Sim       Não, qual: \_\_\_ kg.

## OBSERVAÇÕES:

- O bebê deve ter no mínimo 3 semanas para a coleta.

### Coleta e armazenamento da amostra de leite

- A coleta deve ser realizada após a amamentação e/ou quando a criança estiver mamando no outro peito. Pode-se usar um esgotador de leite materno se a mãe preferir;
- Devem ser recolhidos pelo menos 50 mL de leite materno;
- A amostra deve ser armazenada em um frasco de vidro limpo, com tampa de rosca;
- A amostra deve ser rotulada conforme o código registrado nesse questionário;
- O frasco deve ser armazenado em freezer/congelador, por tempo indeterminado.

### Coleta e armazenamento da amostra de água

- As amostras de água devem ser as mesmas que a consumida pela gestante;
- Caso a gestante consuma água mineral industrializada, indicar apenas a marca no questionário;
- As amostras devem ser coletadas em frasco de vidro âmbar com tampa de rosca e capacidade de 1L;
- O armazenamento deve ser feito em refrigerador/geladeira.

## APÊNDICE 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DA CURVA ANALÍTICA PARA OS COMPOSTOS ESTUDADOS.

Composto: 2,4 DDE

Faixa linear: 10- 250 ug/L

Nº de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,09E+21	1	1,09E+21	0,998	4395,7	4,8	Regressão significativa
Residual	2,72E+18	11	2,47E+17				
Falta de Ajuste	4,63E+17	6	7,72E+16		0,2	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	2,26E+18	5	4,52E+17				
Total	1,09E+21	12					

Composto: 2,4 DDD

Faixa linear: 10 -250 ug/L

Nº de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,39E+21	1	1,39E+21	0,991	91,2	4,8	Regressão significativa
Residual	1,68E+20	11	1,53E+19				
Falta de Ajuste	1,44E+20	6	2,41E+19		0,1	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	8,89E+20	5	1,78E+20				
Total	1,41E+21	12					

Composto: 4,4 DDD

Faixa linear: 10 -250 ug/L

Nº de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,01E+21	1	1,01E+21	0,981	575,0	4,5	Regressão significativa
Residual	1,94E+19	11	1,76E+18				
Falta de Ajuste	3,14E+20	6	5,24E+19		0,8	3,7	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,19E+20	5	6,37E+19				
Total	1,03E+21	12					

Composto: Aldrin

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

Nº de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,20E+21	1	2,20E+21	0,986	981,1	4,6	Regressão significativa
Residual	3,13E+19	14	2,24E+18				
Falta de Ajuste	1,62E+21	8	2,03E+20		0,8	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,60E+21	6	2,66E+20				
Total	2,23E+21	15					

Composto: Azoxistrobina

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	4,33E+19	1	4,33E+19	0,972	490,8	4,6	Regressão significativa
Residual	1,24E+18	14	8,83E+16				
Falta de Ajuste	7,09E+17	8	8,86E+16		1,0	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,27E+17	6	8,78E+16				
Total	4,46E+19	15					

Composto: Bifentrina

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,80E+19	1	5,80E+19	0,998	5759,8	4,7	Regressão significativa
Residual	1,21E+17	12	1,01E+16				
Falta de Ajuste	4,03E+19	7	5,75E+18		0,7	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,11E+19	5	8,23E+18				
Total	5,81E+19	13					

Composto: Bioaletrina

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,53E+21	1	6,53E+21	0,981	812,0	4,5	Regressão significativa
Residual	1,29E+20	16	8,04E+18				
Falta de Ajuste	6,16E+19	8	7,71E+18		0,9	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	6,70E+19	8	8,38E+18				
Total	6,66E+21	17					

Composto: Bromofós

etilico

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,16E+20	1	3,16E+20	0,983	806,0	4,6	Regressão significativa
Residual	5,48E+18	14	3,92E+17				
Falta de Ajuste	2,35E+18	7	3,35E+17		0,7	3,8	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,13E+18	7	4,48E+17				
Total	3,21E+20	15					

Composto: Bromofós metílico

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	8,51E+21	1	8,51E+21	0,970	452,2	4,6	Regressão significativa
Residual	2,64E+20	14	1,88E+19				
Falta de Ajuste	1,39E+20	7	1,98E+19		1,1	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,25E+20	7	1,78E+19				
Total	8,77E+21	15					

Composto: Cialotrina lambda

Faixa linear: 10 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,67E+20	1	6,67E+20	0,994	1954,1	4,8	Regressão significativa
Residual	3,76E+18	11	3,41E+17				
Falta de Ajuste	1,79E+18	6	2,98E+17		0,8	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,96E+18	5	3,93E+17				
Total	6,71E+20	12					

Composto: Ciflutrina

Faixa linear: 25 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,33E+21	1	3,33E+21	0,969	347,9	4,8	Regressão significativa
Residual	1,05E+20	11	9,56E+18				
Falta de Ajuste	4,78E+19	6	7,97E+18		0,7	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,73E+19	5	1,15E+19				
Total	3,43E+21	12					

Composto: Cipermetrina

Faixa linear: 25 -300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	7,83E+21	1	7,83E+21	0,974	376,6	5,0	Regressão significativa
Residual	2,08E+20	10	2,08E+19				
Falta de Ajuste	1,53E+20	6	2,55E+19		1,9	6,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,49E+19	4	1,37E+19				
Total	8,04E+21	11					

Composto: Clordano Faixa linear: 5- 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	4,60E+19	1	4,60E+19	0,983	733,4	4,7	Regressão significativa
Residual	8,15E+17	13	6,27E+16				
Falta de Ajuste	3,29E+17	7	4,70E+16		0,6	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,86E+17	6	8,10E+16				
Total	4,68E+19	14					

Composto: Clorpirifós etílico Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 1

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,10E+22	1	1,10E+22	0,989	1311,5	4,5	Regressão significativa
Residual	1,26E+20	15	8,37E+18				
Falta de Ajuste	7,02E+19	7	1,00E+19		1,4	3,5	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,54E+19	8	6,93E+18				
Total	1,11E+22	16					

Composto: Clorpirifós metílico Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,09E+23	1	1,09E+23	0,990	1374,8	4,6	Regressão significativa
Residual	1,11E+21	14	7,91E+19				
Falta de Ajuste	8,55E+20	7	1,22E+20		3,4	3,8	Modelo Ajustado
Erro Puro	2,53E+20	7	3,61E+19				
Total	1,10E+23	15					

Composto: Cresoxim metílico Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,11E+22	1	5,11E+22	0,989	1257,1	4,6	Regressão significativa
Residual	5,69E+20	14	4,06E+19				
Falta de Ajuste	4,78E+20	7	6,83E+19		5,3	3,8	Falta de Ajuste
Erro Puro	9,07E+19	7	1,30E+19				
Total	5,17E+22	15					

Composto: Deltametrina Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,52E+21	1	1,52E+21	0,978	582,7	4,7	Regressão significativa
Residual	3,39E+19	13	2,61E+18				
Falta de Ajuste	2,45E+19	7	3,50E+18		2,2	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	9,45E+18	6	1,57E+18				
Total	1,55E+21	14					

Composto: Dicofol Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,41E+23	1	6,41E+23	0,947	286,7	4,5	Regressão significativa
Residual	3,58E+22	16	2,24E+21				
Falta de Ajuste	2,58E+22	8	3,23E+21		2,6	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	9,95E+21	8	1,24E+21				
Total	6,77E+23	17					

Composto: DDT Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,49E+24	1	2,49E+24	0,994	1857,4	4,7	Regressão significativa
Residual	1,61E+22	12	1,34E+21				
Falta de Ajuste	1,60E+22	7	2,29E+21		2,8	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,02E+21	5	8,04E+20				
Total	2,51E+24	13					

Composto: Dieldrin Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,30E+20	1	3,30E+20	0,985	916,5	4,6	Regressão significativa
Residual	5,04E+18	14	3,60E+17				
Falta de Ajuste	4,77E+17	8	5,96E+16		0,1	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,56E+18	6	7,61E+17				
Total	3,35E+20	15					



Composto: Endossulfam alfa

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,11E+20	1	1,11E+20	0,958	299,9	4,7	Regressão significativa
Residual	4,80E+18	13	3,69E+17				
Falta de Ajuste	2,61E+18	7	3,73E+17		1,0	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	2,19E+18	6	3,65E+17				
Total	1,16E+20	14					

Composto: Endossulfam beta

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,47E+20	1	2,47E+20	0,986	1015,2	4,6	Regressão significativa
Residual	3,40E+18	14	2,43E+17				
Falta de Ajuste	3,45E+18	8	4,31E+17		0,6	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,55E+18	6	7,59E+17				
Total	2,50E+20	15					

Composto: Endossulfam sulfato

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,71E+20	1	2,71E+20	0,967	355,6	4,7	Regressão significativa
Residual	9,16E+18	12	7,63E+17				
Falta de Ajuste	1,87E+18	7	2,68E+17		0,2	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	7,28E+18	5	1,46E+18				
Total	2,80E+20	13					

Composto: Endrin

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 1

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,62E+19	1	6,62E+19	0,932	205,0	4,5	Regressão significativa
Residual	4,85E+18	15	3,23E+17				
Falta de Ajuste	3,50E+18	7	5,00E+17		3,0	3,7	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,34E+18	8	1,68E+17				
Total	7,11E+19	16					

Composto: Epoxiconazol

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,22E+20	1	6,22E+20	0,985	855,2	4,7	Regressão significativa
Residual	9,45E+18	13	7,27E+17				
Falta de Ajuste	2,17E+18	7	3,09E+17		0,3	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	7,29E+18	6	1,21E+18				
Total	6,31E+20	14					

Composto: Esfenvalerato

Faixa linear: 25 -300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,32E+21	1	1,32E+21	0,954	207,7	5,0	Regressão significativa
Residual	6,37E+19	10	6,37E+18				
Falta de Ajuste	4,69E+19	6	7,82E+18		1,9	6,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,68E+19	4	4,20E+18				
Total	1,39E+21	11					

Composto: Fenitrotiona

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,82E+22	1	5,82E+22	0,987	1176,5	4,5	Regressão significativa
Residual	7,91E+20	16	4,94E+19				
Falta de Ajuste	4,43E+20	8	5,54E+19		0,7	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	6,10E+20	8	7,63E+19				
Total	5,90E+22	17					

Composto: Fempropatrina

Faixa linear: 50 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,11E+20	1	5,11E+20	0,956	193,4	5,1	Regressão significativa
Residual	2,38E+19	9	2,64E+18				
Falta de Ajuste	6,77E+18	5	1,35E+18		0,3	6,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,70E+19	4	4,25E+18				
Total	5,35E+20	10					

Composto: Fenvalerato

Faixa linear: 25 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	4,04E+21	1	4,04E+21	0,990	946,4	5,0	Regressão significativa
Residual	4,27E+19	10	4,27E+18				
Falta de Ajuste	7,22E+18	6	1,20E+18		0,1	4,5	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,55E+19	4	8,87E+18				
Total	4,09E+21	11					

Composto: Fipronil

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,09E+20	1	5,09E+20	0,972	415,9	4,7	Regressão significativa
Residual	1,47E+19	12	1,22E+18				
Falta de Ajuste	6,42E+18	7	9,18E+17		0,6	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	8,27E+18	5	1,65E+18				
Total	5,24E+20	13					

Composto: HCH alfa

Faixa linear: 5 -300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,45E+23	1	3,45E+23	0,990	1629,0	4,5	Regressão significativa
Residual	3,39E+21	16	2,12E+20				
Falta de Ajuste	1,84E+21	8	2,30E+20		1,2	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,55E+21	8	1,94E+20				
Total	3,48E+23	17					

Composto: HCH beta\_gama

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	9,38E+23	1	9,38E+23	0,982	855,4	4,5	Regressão significativa
Residual	1,75E+22	16	1,10E+21				
Falta de Ajuste	3,33E+21	8	4,16E+20		0,2	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,42E+22	8	1,78E+21				
Total	9,55E+23	17					

Composto: Hexaclorobenzeno Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	7,13E+22	1	7,13E+22	0,990	1587,6	4,5	Regressão significativa
Residual	7,18E+20	16	4,49E+19				
Falta de Ajuste	3,09E+22	8	3,86E+21		0,8	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,64E+22	8	4,55E+21				
Total	7,20E+22	17					

Composto: Heptacloro Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,01E+20	1	3,01E+20	0,985	926,8	4,6	Regressão significativa
Residual	4,55E+18	14	3,25E+17				
Falta de Ajuste	2,70E+18	8	3,38E+17		1,1	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,85E+18	6	3,08E+17				
Total	3,06E+20	15					

Composto: Heptacloro epoxido Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,53E+21	1	5,53E+21	0,997	3539,5	4,7	Regressão significativa
Residual	1,88E+19	12	1,56E+18				
Falta de Ajuste	8,12E+18	7	1,16E+18		0,5	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,06E+19	5	2,13E+18				
Total	5,55E+21	13					

Composto: Malationa Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	9,53E+22	1	9,53E+22	0,987	914,4	4,7	Regressão significativa
Residual	1,25E+21	12	1,04E+20				
Falta de Ajuste	6,30E+20	7	9,00E+19		0,7	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	6,21E+20	5	1,24E+20				
Total	9,66E+22	13					

Composto: Miclobutanil

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	8,31E+21	1	8,31E+21	0,989	1156,8	4,7	Regressão significativa
Residual	9,34E+19	13	7,18E+18				
Falta de Ajuste	4,64E+19	7	6,62E+18		0,8	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,70E+19	6	7,84E+18				
Total	8,40E+21	14					

Composto: Mirex

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,44E+19	1	3,44E+19	0,995	2194,7	4,7	Regressão significativa
Residual	1,88E+17	12	1,57E+16				
Falta de Ajuste	9,98E+16	7	1,43E+16		0,8	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	8,83E+16	5	1,77E+16				
Total	3,46E+19	13					

Composto: Oxifluorfem

Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 1

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,33E+22	1	1,33E+22	0,985	954,9	4,5	Regressão significativa
Residual	2,09E+20	15	1,40E+19				
Falta de Ajuste	1,28E+20	7	1,83E+19		1,8	3,5	Modelo Ajustado
Erro Puro	8,11E+19	8	1,01E+19				
Total	1,35E+22	16					

Composto: Parationa etílica

Faixa linear: -

N° de pontos excluídos: -

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,23E+22	1	1,23E+22	0,964	240,0	5,1	Regressão significativa
Residual	4,61E+20	9	5,13E+19				
Falta de Ajuste	4,10E+20	5	8,20E+19		7,8	6,3	Falta de Ajuste
Erro Puro	4,18E+19	4	1,05E+19				
Total	1,28E+22	10					

Composto: Permetrina Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,03E+20	1	1,03E+20	0,931	161,9	4,7	Regressão significativa
Residual	7,63E+18	12	6,36E+17				
Falta de Ajuste	2,79E+18	7	3,98E+17		0,3	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	6,26E+18	5	1,25E+18				
Total	1,11E+20	13					

Composto: Pendimetalina Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,00E+20	1	5,00E+20	0,983	691,5	4,7	Regressão significativa
Residual	8,67E+18	12	7,23E+17				
Falta de Ajuste	3,79E+18	7	5,42E+17		0,6	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,88E+18	5	9,76E+17				
Total	5,08E+20	13					

Composto: Procimidona Faixa linear: 50 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,26E+21	1	1,26E+21	0,997	3051,3	5,0	Regressão significativa
Residual	4,13E+18	10	4,13E+17				
Falta de Ajuste	9,57E+17	5	1,91E+17		0,3	5,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,17E+18	5	6,34E+17				
Total	1,26E+21	11					

Composto: Propiconazol Faixa linear: -

N° de pontos excluídos: -

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,22E+20	1	2,22E+20	0,275	2,5	4,7	Regressão não significativa
Residual	1,06E+21	12	8,81E+19				
Falta de Ajuste	1,48E+20						
Erro Puro	5,73E+20						
Total	8,08E+20	13					

Composto: Protiofós Faixa linear: 25 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,22E+22	1	1,22E+22	0,981	461,5	5,2	Regressão significativa
Residual	2,37E+20	9	2,63E+19				
Falta de Ajuste	2,24E+20	5	4,48E+19		4,4	6,3	Modelo Ajustado
Erro Puro	4,08E+19	4	1,02E+19				
Total	1,24E+22	10					

Composto: Quintozeno Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	8,56E+22	1	8,56E+22	0,981	833,4	4,5	Regressão significativa
Residual	1,64E+21	16	1,03E+20				
Falta de Ajuste	2,11E+20	8	2,64E+19		0,1	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,43E+21	8	1,79E+20				
Total	8,72E+22	17					

Composto: Teflutrina Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,97E+23	1	2,97E+23	0,990	1635,6	4,5	Regressão significativa
Residual	2,90E+21	16	1,82E+20				
Falta de Ajuste	1,98E+21	8	2,48E+20		2,2	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	9,20E+20	8	1,15E+20				
Total	3,00E+23	17					

Composto: Tetradifona Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 1

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,49E+21	1	5,49E+21	0,973	548,3	4,5	Regressão significativa
Residual	1,50E+20	15	1,00E+19				
Falta de Ajuste	7,97E+19	7	1,14E+19		1,3	3,5	Modelo Ajustado
Erro Puro	7,03E+19	8	8,79E+18				
Total	5,64E+21	16					

Composto: Transflutrina  
Faixa linear: 5- 300 ug/L  
N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	8,09E+23	1	8,09E+23	0,990	1598,8	4,5	Regressão significativa
Residual	8,10E+21	16	5,06E+20				
Falta de Ajuste	5,25E+21	8	6,56E+20		0,0	3,4	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,64E+23	8	4,56E+22				
Total	8,17E+23	17					

Composto: Trifluralina  
Faixa linear: 5 - 300 ug/L  
N° de pontos excluídos: 2

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	4,17E+23	1	4,17E+23	0,991	1685,4	4,5	Regressão significativa
Residual	3,96E+21	16	2,47E+20				
Falta de Ajuste	2,49E+21	8	3,12E+20		1,7	3438,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,46E+21	8	1,83E+20				
Total	4,21E+23	17					

Composto: PCB 18  
Faixa linear: 5 - 250 ug/L  
N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	6,06E+20	1	6,06E+20	0,986	754,7	4,8	Regressão significativa
Residual	8,83E+18	11	8,03E+17				
Falta de Ajuste	2,46E+18	6	4,10E+17		0,3	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	6,37E+18	5	1,27E+18				
Total	6,15E+20	12					

Composto: PCB 28\_31  
Faixa linear: 5 - 300 ug/L  
N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	2,78E+20	1	2,78E+20	0,976	573,0	4,6	Regressão significativa
Residual	6,80E+18	14	4,85E+17				
Falta de Ajuste	2,90E+20	8	3,62E+19		0,7	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,05E+20	6	5,08E+19				
Total	2,85E+20	15					



Composto: PCB 44 Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,89E+20	1	1,89E+20	0,971	396,0	4,7	Regressão significativa
Residual	5,73E+18	12	4,78E+17				
Falta de Ajuste	5,96E+20	7	8,52E+19		0,8	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,41E+20	5	1,08E+20				
Total	1,95E+20	13					

Composto: PCB 52 Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,37E+21	1	3,37E+21	0,985	922,2	4,6	Regressão significativa
Residual	5,12E+19	14	3,66E+18				
Falta de Ajuste	1,95E+19	7	2,78E+18		0,6	3,8	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,17E+19	7	4,53E+18				
Total	3,42E+21	15					

Composto: PCB 101 Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 1

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	1,74E+21	1	1,74E+21	0,975	583,1	4,5	Regressão significativa
Residual	4,47E+19	15	2,98E+18				
Falta de Ajuste	2,01E+19	7	2,87E+18		0,9	3,5	Modelo Ajustado
Erro Puro	2,46E+19	8	3,08E+18				
Total	1,78E+21	16					

Composto: PCB 118\_149 Faixa linear: 10 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	8,88E+20	1	8,88E+20	0,993	1050,8	4,7	Regressão significativa
Residual	1,01E+19	12	8,45E+17				
Falta de Ajuste	5,66E+20	7	8,09E+19		0,7	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	5,77E+20	5	1,15E+20				
Total	8,94E+20	13					

Composto: PCB 138 Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	4,64E+19	1	4,64E+19	0,953	244,5	4,7	Regressão significativa
Residual	2,28E+18	12	1,90E+17				
Falta de Ajuste	9,29E+17	7	1,33E+17		0,5	4,9	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,35E+18	5	2,69E+17				
Total	4,87E+19	13					

Composto: PCB 153 Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	9,95E+19	1	9,95E+19	0,964	370,7	4,6	Regressão significativa
Residual	3,76E+18	14	2,68E+17				
Falta de Ajuste	3,58E+18	8	4,47E+17		0,4	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	7,46E+18	6	1,24E+18				
Total	1,03E+20	15					

Composto: PCB 170 Faixa linear: 5 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	3,61E+20	1	3,61E+20	0,980	632,8	4,7	Regressão significativa
Residual	7,42E+18	13	5,71E+17				
Falta de Ajuste	4,00E+18	7	5,71E+17		1,0	4,2	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,43E+18	6	5,71E+17				
Total	3,69E+20	14					

Composto: PCB 180 Faixa linear: 10 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	r <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Resultado
Modelo	5,52E+20	1	5,52E+20	0,983	619,2	4,8	Regressão significativa
Residual	9,81E+18	11	8,92E+17				
Falta de Ajuste	3,80E+20	6	6,33E+19		0,9	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	3,44E+20	5	6,87E+19				
Total	5,62E+20	12					

Composto: PCB 194

Faixa linear: 10 - 250 ug/L

N° de pontos excluídos: 3

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$r^2$	$F_{calc}$	$F_{tab}$	Resultado
Modelo	1,59E+21	1	1,59E+21	0,988	876,8	4,8	Regressão significativa
Residual	1,99E+19	11	1,81E+18				
Falta de Ajuste	4,69E+18	6	7,81E+17		0,3	5,0	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,52E+19	5	3,04E+18				
Total	1,60E+21	12					

Composto: PCB 209

Faixa linear: 5 - 300 ug/L

N° de pontos excluídos: 4

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$r^2$	$F_{calc}$	$F_{tab}$	Resultado
Modelo	1,68E+20	1	1,68E+20	0,971	462,3	4,6	Regressão significativa
Residual	5,08E+18	14	3,63E+17				
Falta de Ajuste	1,10E+19	8	1,38E+18		0,5	4,1	Modelo Ajustado
Erro Puro	1,60E+19	6	2,67E+18				
Total	1,73E+20	15					