

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

**DETERMINAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS
PERSISTENTES (POPs) EM LEITE MATERNO:
DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO EMPREGANDO GC-NCI-MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GIOVANA FERRONATO

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**DETERMINAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS
PERSISTENTES (POPs) EM LEITE MATERNO:
DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO EMPREGANDO GC-NCI-MS**

Giovana Ferronato

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **MESTRE EM QUÍMICA.**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Ferronato, Giovana
DETERMINAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES
(POPs) EM LEITE MATERNO: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE
MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO GC-NCI-MS / Giovana
Ferronato.-2014.
107 f.; 30cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientadores: Martha Adaime, Osmar D. Prestes,
Manoel L. Martins
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2014

1. GC-MS 2. Ionização Química 3. Leite Materno 4. POPs
5. Resíduos I. Zanella, Renato II. Adaime, Martha III. D.
Prestes, Osmar IV. L. Martins, Manoel V. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES (POPs) EM
LEITE MATERNO: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO EMPREGANDO GC-NCI-MS**

elaborado por
Giovana Ferronato

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tatiana Emanuelli
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 12 de março de 2014

Aos meus primeiros mestres,
meus pais, com amor!

AGRADECIMENTOS

E nessa hora as palavras somem e o choro surge, não tem como não agradecer por todos que me apoiaram ao longo desses dois anos de mestrado e antes ainda! Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças para levantar todos os dias e persistir, mesmo quando tudo parecia dar errado.

Agradeço àquiles que já partiram, mas que sempre estiveram do meu lado torcendo pelo meu futuro e acreditando que era possível.

Agradeço aos meus pais, seu Sergio e dona Araci, pelo apoio incondicional, pelos telefonemas nas horas certas, pelos puxões de orelha mais que merecidos, por sempre me fazerem acreditar que devo fazer o que acho certo e me apoiarem em todas as loucuras que proponho nas nossas “reuniões familiares”. Pai, Mãe, amo muito vocês e desculpem se não estou tão presente quanto vocês merecem!!

Aos meus irmãos, Renan José e Samuel Josué, que passaram boa parte do tempo morando comigo aqui em Santa Maria, agradeço por toda paciência, colaboração e carinho. Também agradeço por fazerem minhas atividades de limpeza na casa! Amo vocês manolos!

Agradeço ao Professor Renato Zanella, por ter me aceitado como aluna de mestrado, por ter acompanhado meu trabalho de perto, comprado muitas peças, reagentes e financiado nossas coletas. Profe, obrigada por não ter desistido!!

Agradeço a Professora Martha B. Adaime, agora minha futura orientadora de Doutorado, sempre perguntando como estavam as coisas, dando uma olhadinha nos resultados quando possível. Profe espero que essa parceria se fortaleça e que consigamos ótimos resultados no doc.

Ao meu queridíssimo coorientador Professor Osmar D. Prestes, indescritível. Pela perseverança, porque, o que foi esse trabalho se não um ato de fé! Muito obrigada por ter se empenhado tanto, ter ficado horas reajustando método comigo, partido para um plano B utilizando CI, que aliás, me deixou receosa, já que, metano é bem explosivo!! Obrigada pelas idéias e pelas críticas também, afinal, às vezes é melhor aprender obedecendo aos mais experientes...

Quero agradecer em especial à minha colega e amiga Mariela S. Viera, colega de projeto, amiga pra qualquer indiada. Entrou nessa com a maior dedicação possível, era sempre a parte organizada da dupla. Topava cada teste

ou ideia que surgiam dos artigos que líamos. Mas o melhor de tudo foram as coletas: o que dizer das nossas aventuras, sem gps, com gps, desbravando. Mari, não conseguiria sem a tua ajuda, muito obrigada por tudo, principalmente por ficar dizendo que ia dar tudo certo, até mesmo quando acho que nem tu acreditava mais nisso!! Agora só faltam as águas!! Hehehe...

Agradeço ao Manoel L. Martins, Gerete Técnico do LARP, que nos deu bastante liberdade e prioridade no uso do GC-MS/MS, ensinou a limpar, verificar, fazer as calibrações e métodos. Obrigada Manu, nem sempre as coisas aconteciam como esperávamos, por exemplo, o toxafeno, mas tu estava lá pra testar alternativas e nos ajudar!

Agradeço a minha colega de lab e amiga Juliana S. Munaretto, sempre um ombro amigo pra falar sobre assuntos do trabalho, assuntos da vida, coisas que costumam não dar certo e outras mais legais... Ju, to torcendo muito por ti, coisas boas irão acontecer!

Agradeço ao nosso colega Filipe F. Donato, até nos levou fazer coletas, ajudou com as tabelas, com a parte de SPE e vai ajudar com o próprio método nas nossas análises de água. Fi, tu é um baita amigo, obrigado pela parceria sempre! Sucesso na tua carreira Sr Engenheiro!

Agradeço aos demais colegas e amigos do LARP, não me alongando muito, Danieli, Débora, Fábio, Gabrieli, Janice, Lucila, Magali, Mariele, Nathália, Nelson, Pimperelli e Tiele. Cada um de vocês foi importante, dando sugestões, trocando experiências, falando bobagem na cozinha, saindo pra jantar, pra beber... Somos um grupo, e, não teria a mesma graça se vocês não estivessem comigo!!!

Agradeço aos meus amigos, aí sim, não vou citar mesmo! Quem é meu amigo sabe, mora no meu coração, obrigada por cada conversa, cada abraço, palavras de incentivo e reclamações sobre minha ausência, tudo vai melhorar, ou não, mesmo assim, estamos juntos!!!

Agradeço à banca, Professora Dra. Renata Pereira Limberger e Professora Dra. Tatiana Emanuelli, pelas sugestões e observações. Tenho certeza que foram fundamentais para o enriquecimento do trabalho!

Agradeço ainda ao Ademir e a Valéria, da coordenação do PPGQ por me lembrarem dos prazos e sempre darem um jeitinho nas minhas matrículas!!

Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES (POPs) EM LEITE MATERNO: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO GC-NCI-MS

AUTOR: GIOVANA FERRONATO

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: 12 de março de 2014, Santa Maria.

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) recebem essa denominação devido ao tempo que permanecem inalterados no meio ambiente. A partir dos anos 1960 já havia indícios da presença desses compostos em sedimentos, leite materno, peixe e ovos. A cadeia alimentar pode ser considerada uma fonte de contaminação do ser humano por esses compostos devido à bioacumulação. A gordura contida no leite materno pode acumular os POPs, por isso esta matriz vem sendo utilizada como bioindicador ambiental. Os métodos disponíveis atualmente para a determinação desses compostos em leite materno envolvem, em geral, várias etapas de preparo de amostra e quantificação por técnicas pouco seletivas, apresentam alto custo e demanda de tempo. Assim, esse trabalho visou o desenvolvimento de um método rápido e eficiente baseado no preparo de amostra empregando o método QuEChERS combinado a Cromatografia à Gás, acoplada à Espectrometria de Massas com ionização química negativa (GC-NCI-MS). Neste trabalho otimizou-se a etapa de preparo de amostra para a determinação de 15 POPs em leite materno (HCH alfa, HCH beta, HCH gama, hexaclorobenzeno, heptacloro, andrin, dieldrin, endrin, 2,4 DDE, DDT, endosulfan alfa, endosulfan beta, endosulfan sulfato e mirex) utilizando 6 mL de amostra e extração com 6 mL de acetonitrila. Na etapa de partição utilizou-se 2,6 g de $MgSO_4$ e 0,6 g de NaCl. A limpeza do extrato foi realizada por extração em fase sólida dispersiva de 4 mL de extrato e 600 mg de $MgSO_4$ e 200 mg de C_{18} . O extrato foi evaporado em sistema Turbovap e redissolvido em 200 μL de acetonitrila para determinação por GC-(NCI)-MS. O método foi validado apresentando linearidade para os 15 compostos em estudo. As recuperações dos analitos variaram entre 62 e 120%, com valores de precisão dentro da faixa aceitável ($RSD < 19\%$). Os limites de detecção do método para leite materno em termos de percentual de gordura variaram de 0,75 a 7,5 $ng\ g^{-1}$ e os limites de quantificação do método variaram de 2,5 a 25 $ng\ g^{-1}$. O método foi aplicado para 20 amostras de leite materno de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, das quais, apenas 25% não apresentaram contaminação pelos POPs estudados e as demais apresentaram valores menores que o LQ. É importante destacar que trata-se de um trabalho inédito na área de determinação de POPs em leite materno empregando GC-NCI-MS, podendo servir de base para trabalhos futuros nessa área.

Palavras chave: GC-MS, ionização química, leite materno, POPs.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

DETERMINATION OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) IN BREAST MILK: DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN ANALYTICAL METHOD USING GC-NCI-MS

AUTHOR: GIOVANA FERRONATO
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Santa Maria, 12th March, 2014

Persistent Organic Pollutants (POPs) receive this designation because of the time that remain unchanged in the environment. From the 1960s there was already evidence of the presence of these compounds in sediment, breast milk, fish and eggs. The food chain can be considered a source of contamination of humans by these compounds due to bioaccumulation. The fat contained in milk can accumulate POPs, so this matrix has been used as environmental bioindicator. The currently available methods for the determination of these compounds in breast milk involve, in general, multi-step sample preparation and quantification techniques with low selectivity, have high cost and are time consuming. Thus, this study aimed to develop a fast and efficient method based on sample preparation using the QuEChERS method combined Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry with negative chemical ionization (GC-NCI-MS). In this work we optimized the sample preparation step for the determination of 15 POPs in breast milk (Alpha HCH, beta HCH, gamma HCH, hexachlorobenzene, heptachlor, andrin, dieldrin, endrin, 2,4 DDE, DDT, endosulfan alpha, beta endosulfan, endosulfan sulfate and mirex) using 6 mL of sample extracted with 6 mL of acetonitrile. In the partition step was used 2.6 g MgSO₄ and 0.6 g of NaCl. The extract clean-up was performed by dispersive solid-phase extraction of 4 mL of extract and 600 mg of MgSO₄ and 200 mg of C₁₈. The extract was evaporated in a Turbovap system and redissolved in 200 µL acetonitrile for the determination by GC-NCI-MS. The method was validated showing linearity for the 15 evaluated compounds. Recoveries of the analytes ranged between 62 and 120% with precision within the acceptable range (RSD <19%). The limits of detection for breast milk, in terms of fat percentage, ranged from 0.75 to 7.5 ng g⁻¹ and the method limits of quantification ranged from 2.5 to 25 ng g⁻¹. The method was applied to 20 samples of breast milk from different regions of the Rio Grande do Sul state, of which only 25% were not contaminated by the studied POPs and the others showed values below the LQ. It is important to emphasize that this is an unpublished work in the area of POPs determination in breast milk by GC-NCI-MS, and could be a basis for future works in this area.

Keywords: GC-MS, chemical ionization, breast milk, POPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: “Virgem Maria amamentando Jesus” pintura de Leonardo da Vinci.....	4
Figura 2: Campanha de amamentação 2013 promovida pelo Ministério da Saúde.	9
Figura 3: Rota dos produtos químicos do meio ambiente para o homem	20
Figura 4: Esquema de um cromatógrafo a gás.	24
Figura 5: Componentes de um injetor split-splitless.	25
Figura 6: Modos de aquisição de um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo.	28
Figura 7: Sistema GC-MS/MS triploquadrupolo utilizado no estudo.....	42
Figura 8: Pontos de coleta de amostra de leite materno no estado do Rio Grande do Sul.....	52
Figura 9: Cromatograma no modo full scan do composto DDT obtido por GC-MS no modo EI (A) e no modo CI (B).	54
Figura 10: Cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS variando a corrente de ionização do filamento.: (A) 100 mA, (B) 150 mA e (C) 200 mA.....	55
Figura 11: Cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS na otimização da tensão de detecção dos analitos: (A) 900 V, (B) 1100 V e (C) 1200 V.....	57
Figura 12: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS para leite bovino: (A) amostra branco da matriz e (B) amostra branco da matriz fortificada na concentração de 20 µg L ⁻¹ . Em destaque: Padrão Interno.....	59
Figura 13: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS para leite materno: (A) amostra branco da matriz e (B) amostra branco da matriz fortificada na concentração de 20 µg L ⁻¹ . Em destaque: Padrão Interno.....	60
Figura 14: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS no modo TIC para: (A) solução preparada no solvente (acetonitrila) e (B) solução preparada no extrato da matriz (leite bovino).....	62
Figura 15: Cromatograma gerado por GC-NCI-MS em uma amostra branco fortificada na concentração de 50 µg L ⁻¹ (A) HCH alfa e (B) hexaclorobenzeno, destacando os respectivos espectros de massa.	63
Figura 16: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-NCI-MS a partir de uma amostra branco fortificada em 50 µg L ⁻¹ com os analitos selecionados.....	64

Figura 17: Número de compostos recuperados para cada ensaio dentro da faixa de aceitação (70 a 120%).	67
Figura 18: Percentual de recuperação para os testes avaliados.	68
Figura 19: Fluxograma do preparo de amostra otimizado.	70
Figura 20: Avaliação da presença de interferentes nos solventes e reagentes apresentando cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS: (A) do "branco de reagente" e (B) da amostra branco fortificada no extrato da matriz (leite bovino) na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Em destaque: Padrão interno.	71
Figura 21: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite bovino.	77
Figura 22: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite materno para o nível de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.	79
Figura 23: Percentuais de recuperação e RSD _{PI} do método de extração de POPs em leite materno para o nível de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.	82
Figura 24: Efeito matriz para o composto hexaclorobenzeno.	85
Figura 25: Efeito matriz para o composto heptacloro.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do leite materno maduro comparada ao leite bovino.	7
Tabela 2: Características toxicológicas dos POPs	12
Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos POPs	14
Tabela 4: Lista dos POPs condenados pela CE até 2011	17
Tabela 5: Comparação dos valores máximos permitidos de POPs para diferentes matrizes.	23
Tabela 6: Testes de extração baseados no método QuEChERS.....	46
Tabela 7: Programação de temperatura do injetor PTV	47
Tabela 8: Programação da válvula <i>split</i> do injetor PTV.....	48
Tabela 9: Programação de temperatura do forno da coluna.	48
Tabela 10: POPs e agrotóxicos determinados por GC-MS com ionização química negativa (NCI), no modo SIM, apresentados na ordem de eluição e destacando íons monitorados para cada analito.	61
Tabela 11: Valores de recuperação para os testes de extração baseados no método QuEChERS.....	66
Tabela 12: Custo aproximado, em reais, dos solventes utilizados para os testes de limpeza do extrato.....	68
Tabela 13: Regressão linear para a curva analítica preparada em acetonitrila. .	72
Tabela 14: Regressão linear para a curva analítica preparada em amostra branco de leite bovino.....	73
Tabela 15: Regressão linear para a curva analítica preparada em amostra branco de leite materno.	74
Tabela 16: Limites de quantificação e de detecção do instrumento e do método para leite bovino.	75
Tabela 17: Limites de quantificação e de detecção do instrumento e do método para leite materno.....	76
Tabela 18: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite bovino.	78
Tabela 19: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite materno.....	79
Tabela 20: Regressão linear para a curva analítica preparada em extrato da matriz (leite bovino)	81

Tabela 21: Percentuais de RSD_{PI} e recuperação do método de extração de POPs em leite bovino.	82
Tabela 22: Avaliação do efeito matriz dos POPs determinados por GC-NCI-MS em extrato de leite bovino comparados com soluções preparadas em acetonitrila.	83
Tabela 23: Avaliação do efeito matriz dos POPs determinados por GC-NCI-MS em extrato da matriz leite materno comparados com extrato da matriz leite bovino.	84
Tabela 24: Resultado da análise das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido diclorofenoxiacético;

A – Acaricida;

a – Coeficiente angular;

ACN – acetonitrila;

AMAP – Programa de Avaliação e Monitoramento do Ártico;

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária;

AOAC - Association of Official Agricultural Chemists;

b – Coeficiente linear;

C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear (octadecilsilano);

CE – Convenção de Estocolmo;

CI – Ionização Química, do inglês Chemical Ionization;

CNUMAH - Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento;

CNUMAH - Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente Humano;

CV – coeficiente de variação;

d.i. – Diâmetro interno;

DDD – Diclorodifenildicloroetano;

DDE – Diclorodifeniletileno;

DDT – Diclorodifeniltricloroetano;

ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês Electron-Capture Detection;

EI – Ionização por Elétrons, do inglês Electron Ionization;

EUA – Estados Unidos da América;

eV – Elétrons volt;

F – Fungicida;

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations;

FID – Detector por Ionização em Chama, do inglês Flame Ionization Detector;

GC – Cromatografia a Gás, do inglês Gas Chromatography;

GC-ECD - Cromatografia a Gás com Detecção por Captura de Elétrons;

GC-MS - Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas;

GC-MS/MS – Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês Gas Chromatography coupled to tandem Mass spectrometry;

GC-NCI-MS – Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas com ionização química negativa;

GPC – Cromatografia com Permeação em Gel, do inglês Gel Permeation;

H – Herbicida;

HCB – hexaclorobenzeno;

HCH – hexaclorociclohexano, do inglês Hexachlorocyclohexane;

HeBB – hexabromobenzeno;

HPAs – Hidrocarbonetos Poliaromáticos;

I – Inseticida;

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;

ISO – Organização Internacional para Padronização;

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry;

Kow – Coeficiente de partição octanol água;

K_{PS} – Produto de solubilidade;

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas;

LD - Limite de Detecção;

LDi - Limite de Detecção do instrumento,

LDm - Limite de Detecção do método;

LMR – Limite Máximo de Resíduo;

LQ - Limite de Quantificação;

LQi - Limite de Quantificação do instrumento;

LQm – Limite de Detecção do método;

m/z – Razão massa carga;

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MgSO₄ - sulfato de magnésio anidro;

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês Multiple Reaction Monitoring;

MS – Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry;

MS/MS - Espectrometria de Massas em serie, do inglês Tandem Mass Spectrometry;

n – Número de replicatas;

N.A. – não analisado;

n.d. – não detectado;

NIP – Plano Nacional de Implementação;

OCPs – Agrotóxicos Organoclorados;

p.a. – Grau pró-análise;

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos;

PBDE – difenil éter polibromado;

PC – Padrão de Controle;

PCBs – Bifenilas Policloradas, do inglês Polychlorinated Biphenyls;

PCDD – dioxinas policloradas;

PCDF – furanos policlorados;

PE – Ponto de ebulição;

PF – Ponto de Fusão;

PFOS – ácido sulfônico perfluorooctano;

PFOSF – ácido sulfônico perfluorooctano fluorado;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

PI – Padrão Interno;

PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente;

PNUMA – Programa das Nações Unidas para o meio Ambiente;

Pool – produto resultante da mistura de doações de leite materno;

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes;

PSA - Amina primária secundária, do inglês Primary secondary amine;

PTFE - Politetrafluoretileno ou Teflon, do inglês Polytetrafluoroethylene;

PTV – Vaporização com temperatura programada, do inglês Programmed Temperature Vaporization;

Q1 ou MS1 – Primeiro quadrupolo;

Q3 ou MS3 – Terceiro quadrupolo;

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe;

r - coeficiente de correlação;

r² - coeficiente de determinação;

Rec – Recuperação;

RS – Rio Grande do Sul;

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation;

RSDpi - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária;

SANCO – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês Santé et protection des consommateurs;

SIM - Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês Selected Ion Monitoring;

SPE - Extração em Fase Solida, do inglês Solid Phase Extraction;

TBB – tetrabromobenzeno;

TCD – Detector por Condutividade Térmica, do inglês Thermal Conductivity Detector;

TIC - cromatograma de íons totais, do inglês total ion chromatogram;

TQ – Triploquadrupolo;

t_R - tempo de retenção;

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria;

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância;

v/v – Volume por volume;

OMS - Organização Mundial da Saúde, do inglês World Health Organization (WHO);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	LEITE MATERNO	3
2.1.1	<i>Leite materno e a história</i>	3
2.1.2	<i>Importância do aleitamento materno</i>	5
2.1.3	<i>Composição e características do leite materno</i>	6
2.1.4	<i>Aleitamento materno no Brasil.....</i>	8
2.2	AGROTÓXICOS	9
2.3	POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES (POPS)	10
2.3.1	<i>Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs).....</i>	11
2.3.1.1	Propriedades físico-químicas dos POPs	13
2.3.2	<i>Convenções sobre POPs</i>	16
2.3.2.1	Convenção de Basiléia.....	16
2.3.2.2	Convenção de Roterdã	16
2.3.2.3	Convenção de Estocolmo	17
2.3.2.4	Conferência Rio 92.....	19
2.3.3	<i>Acumulação dos POPs.....</i>	19
2.4	OCORRÊNCIA DE POPS EM LEITE MATERNO	21
2.5	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE OS POPS	22
2.6	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE POPS	23
2.6.1	<i>Cromatografia à Gás</i>	23
2.6.1.1	Modo de operação do injetor na Cromatografia a Gás.....	24
2.6.1.2	Espectrometria de Massas	26
2.6.1.2.1	Técnicas para obtenção do Espectro de Massas	27
2.7	DETERMINAÇÃO DE POPS EM LEITE MATERNO POR GC-MS.....	28
2.8	PADRÃO INTERNO E PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO (SURROGATE) ...	33
2.9	VALIDAÇÃO	34
2.9.1	<i>Seletividade e sensibilidade</i>	34
2.9.2	<i>Linearidade e curva analítica.....</i>	35
2.9.3	<i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	36
2.9.4	<i>Precisão e exatidão</i>	37
2.9.5	<i>Robustez</i>	38
2.9.6	<i>Efeito matriz</i>	39

3	MATERIAL E MÉTODO	41
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	41
3.2	MATERIAIS, REAGENTES, SOLVENTES E GASES	42
3.3	PADRÕES ANALÍTICOS	43
3.4	AMOSTRAS BRANCO	43
3.5	ESCOLHA DOS POPS E AGROTÓXICOS.....	44
3.6	PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS	44
3.7	ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO E PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO.....	45
3.8	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E LIMPEZA PARA ANÁLISE DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO	45
3.8.1	<i>Ensaio com o método QuEChERS</i>	45
3.9	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO	47
3.9.1	<i>Otimização do sistema de detecção</i>	48
3.10	ANÁLISE DE SOLVENTES E REAGENTES	48
3.11	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO	49
3.11.1	<i>Seletividade e sensibilidade</i>	49
3.11.2	<i>Linearidade e curva analítica</i>	49
3.11.3	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	50
3.11.4	<i>Exatidão</i>	50
3.11.5	<i>Precisão</i>	50
3.11.6	<i>Robustez</i>	51
3.11.7	<i>Efeito matriz</i>	51
3.12	COLETA DE AMOSTRAS REAIS E APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS PARA A ANÁLISE DE POPS E AGROTÓXICOS EM LEITE MATERNO POR GC-MS.	53
4.1.1	<i>Avaliação da corrente de ionização em GC-NCI-MS</i>	54
4.1.2	<i>Avaliação da tensão de detecção para os compostos selecionados em GC-NCI-MS</i>	56
4.1.3	<i>Comparação utilizando cromatograma de íons totais entre as amostras “branco” e as amostras branco fortificadas</i>	58

4.1.4	<i>Seleção dos POPs e agrotóxicos determinados por GC-NCI-MS</i>	61
4.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DA ETAPA DE LIMPEZA DO EXTRATO	64
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	70
4.3.1	<i>Seletividade e sensibilidade</i>	71
4.3.2	<i>Linearidade e curva analítica</i>	72
4.3.3	<i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	74
4.3.4	<i>Precisão e exatidão</i>	77
4.3.5	<i>Precisão intermediária</i>	80
4.3.6	<i>Efeito matriz</i>	83
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	86
5	CONCLUSÃO	89
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
7	ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	92
8	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	101

“Há sempre uma razão
para cada fato da natureza”

Aristóteles

1 INTRODUÇÃO

A busca do homem pelo aumento na produção de alimentos impulsionou a descoberta por agentes anti-pragas. Inicialmente, fazia-se uso de soluções de metais pesados e extratos de plantas. Com o desenvolvimento de agrotóxicos sintéticos houve um aumento significativo de produtividade e melhoria na qualidade dos produtos. Os primeiros agrotóxicos utilizados foram DDT, aldrin, e hexaclorobenzeno. Naquela época acreditava-se na baixa toxicidade desses compostos. Porém, com o passar dos anos pôde-se perceber a influência negativa sobre os seres vivos e o meio ambiente. Alguns desses compostos são atualmente proibidos devido a sua persistência e toxicidade no meio, sendo denominados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs).

Na Conferência de Estocolmo, em 1972, os POPs foram tratados como um problema mundial devido à persistência e bioacumulação no ambiente. Nessa conferência surgiram medidas para minimização de seu uso e prazos para que fossem banidos definitivamente os 12 principais POPs. No Brasil a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento tratou de questões ambientais focando na contaminação pelos POPs propondo que esses produtos fossem produzidos e utilizados de maneira a minimizar os danos à saúde.

Estando presentes no ambiente, principalmente no solo e em sedimentos, esses compostos acabam sendo transferidos para a fauna e flora e, por consequência, tendem a se acumular nos níveis mais altos da cadeia trófica. Dessa forma, o homem pode ser considerado um bioindicador da presença dos POPs no meio ambiente. A amostragem destes compostos pode ser realizada através da coleta de fios de cabelo, urina e leite materno. A coleta de leite materno não é considerada invasiva sendo a amostragem facilitada quando comparada a biopsia de tecidos adiposos e coleta de sangue.

O leite materno vem sendo utilizado como bioindicador da contaminação ambiental, já que é uma matriz rica em gordura e, portanto, tende a acumular compostos lipofílicos como os POPs. Ainda que o leite materno seja considerado o principal alimento para o recém-nascido. Estudos demonstram que este apresenta contaminação devido a presença de resíduos e contaminantes, sendo um reflexo da utilização de compostos sintéticos em várias atividades humanas.

Tendo em vista a importância de determinar se esses compostos ainda persistem no meio ambiente e de alguma maneira entram em contato com o homem, o objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método analítico eficaz para a determinação em nível de traço dos POPs em leite materno. Para isso, empregou-se uma variação do método QuEChERS seguido de uma etapa de evaporação e análise por Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas com ionização química negativa (GC-NCI-MS). Objetivou-se, também, a aplicação do método desenvolvido em amostras de leite materno provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. A partir dos resultados obtidos serão avaliadas possíveis correlações com informações obtidas através de questionários aplicados às mães, indicando possíveis meios de contaminação do leite materno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite materno

O leite é uma substância que contém enzimas e nutrientes balanceados para ajudarem o recém-nascido a se desenvolver com saúde. Dentre essas substâncias pode-se destacar grande quantidade de agentes imunológicos, os quais são necessários inclusive para a boa formação da biota do indivíduo em desenvolvimento (RICCO, CIAMPO & ALMEIDA, 2004).

Cada espécie possui um leite diferente que se adequa às etapas de desenvolvimento do recém-nascido. Por isso, o indicado para o homem é que os bebês se alimentem somente do leite produzido por sua espécie, preferencialmente direto do peito, para que não ocorram interferências causadoras de contaminação ou perda de componentes voláteis desse alimento tão importante (UNICEF, 2007).

2.1.1 Leite materno e a história

Os povos da Babilônia, cerca de 2500 a.C. e do Egito, 1500 a.C., já sabiam que o aleitamento materno evitava doenças e por isso, suas crianças deveriam ser amamentadas por um período de 2 a 3 anos. Naquela época algumas mães também não conseguiam amamentar seus filhos, e, dessa maneira surgiram as amas de leite, as quais fundamentaram a criação dos bancos de leite atuais (CRESPIN, 1992).

Entre os povos gregos e romanos essa prática não era tão comum, porém havia o hábito da utilização de amas de leite para nutrição dos recém-nascidos. O cristianismo (315 d.C.) impulsionou a proteção às crianças e, por consequência o aleitamento materno. Os povos nativos das Américas eram os que mais impressionavam quanto ao aleitamento materno, pois tinham por hábito amamentar as crianças por um período que variava entre 3 a 4 anos. Nessa mesma época, na Europa a amamentação deixou de ser uma prática comum e a mortalidade infantil aumentou, principalmente devido à ausência das amas de leite (SHORT, 1997).

Por não existir conhecimento suficiente sobre as reais necessidades nutricionais das crianças, o leite de vaca foi utilizado como alimento para os recém-nascidos a partir do século XIX, apesar de apresentar uma quantidade maior de proteínas que o leite materno. Pasteurizado em 1859, deu origem ao ambulatório “Gota de Leite” em Paris. Já no ano de 1911, o alimento artificial mais utilizado para os bebês era esse leite em pó (GREINER, 1998).

Conta a mitologia grega que o próprio Hércules, filho bastardo de Hera, mamou de seu peito enquanto essa dormia. Ao sugar forte demais, gotas de leite escorreram pelo céu formando a Via láctea, o “caminho do leite” (Vasconcellos, 1998). Na renascença, o próprio Leonardo da Vinci retratou em suas pinturas a Virgem Maria alimentando o menino Jesus, mostrando o vínculo que a amamentação estabelecia entre mãe e filho (Figura 1) (CAMARA, 2009).



Figura 1: “Virgem Maria amamentando Jesus” pintura de Leonardo da Vinci

Atualmente, no Brasil, existe a rede nacional de Bancos de Leite (REDEBHL, 2013). A rede é responsável por estimular o aleitamento materno, bem como informar os pontos onde existem Bancos de Leite no País. No estado do Rio Grande do Sul são encontrados oito bancos de Leite em funcionamento. A existência desses bancos tem proporcionado a sobrevivência de muitos recém-nascidos que não podem contar com o leite de suas mães e não podem se alimentar de leites industrializados do tipo NAN[®], por exemplo.

2.1.2 Importância do aleitamento materno

O aleitamento materno tem se tornado uma prática cada vez mais difundida entre a sociedade. Entidades como o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, 2013) e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) recomendam o leite materno como único alimento para o bebê até os seis meses e após esse período com alimentação complementar até os dois anos de idade.

A amamentação é necessária a fim de garantir qualidade de vida e mesmo a sobrevivência da criança no primeiro ano de vida. Os benefícios para o bebê amamentado são visíveis na vida adulta, contribuindo para a formação de um ser humano mais saudável, com melhor qualidade de vida. São cada vez mais frequentes os estudos que demonstram que crianças amamentadas exclusivamente ao seio materno são menos acometidas de doenças. Isso implica, inclusive, na redução das taxas de mortalidade infantil, principalmente nos países menos desenvolvidos (REGO, 2006).

Alimentar o bebê pelo seio materno implica na não utilização de chupetas que podem deformar a arcada dentária e o palato. Isso se torna um exercício para o recém-nascido que acaba fortalecendo os músculos da face, o que facilita o desenvolvimento da fala. Como a sucção acaba fatigando a criança ela mama somente o necessário para estar saciada. Assim, crianças que mamam no peito materno tendem a ter menos chance de desenvolverem obesidade infantil.

Em termos de nutrientes, o leite materno possui alta quantidade de gordura de fácil digestão e absorção. Seu baixo teor de sódio ajuda a prevenir a hipertensão arterial nas crianças. Ainda pode-se destacar a prevenção de doenças alérgicas e nutricionais. Quando se tem a alimentação exclusiva com leite materno, pode-se descartar a oferta de água e chás ao bebê, visto que este contém água suficiente para manter o lactante hidratado (RICCO, CIAMPO & ALMEIDA, 2004).

2.1.3 Composição e características do leite materno

A composição do leite materno varia com o passar dos meses de lactação. Existem três principais fases: a primeira é a produção do colostro, seguida do leite de transição e finalmente o leite maduro, ou definitivo.

O colostro é uma secreção mais viscosa que o leite normal, principalmente caracterizado por suas propriedades anti-infecciosas e pela grande quantidade de proteínas como imunoglobina, lactoferrina e lisozimas. Tais enzimas, somadas a grande número de leucócitos, ajudam na proteção do feto contra diversas infecções que já possam ter ocorrido na mãe. O colostro possui ainda ação laxativa, o que garante que seja excretado o excesso de bilirrubina que pode provocar icterícia durante os primeiros dias de vida (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.

O leite maduro é o leite definitivo que alimentará o recém-nascido por pelo menos seis meses após o parto. Quando comparado ao leite bovino, o leite maduro apresenta algumas semelhanças como teor de água, por exemplo. Já os níveis e composição proteicos são bem diversos: no leite materno 20% das proteínas estão na forma de caseína e 80% como proteínas do soro, proporção que no leite bovino é de 82 e 18%, respectivamente. Pode-se observar essas diferenças na Tabela 1 (REGO, 2006). Ainda em termos de proteína, as do leite materno fornecem todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas para o recém-nascido.

Tabela 1: Composição do leite materno maduro comparada ao leite bovino.

Composição	Leite materno	Leite bovino
Água (mL/100 mL)	87,1	87,2
Energia (kcal/100 mL)	70	67
Proteínas (g/100 mL)	1,1	3,3
Gorduras (g/100 mL)	4,5	3,8
Açúcar (g/100 mL)	7	4,8
Caseína (% total de proteína)	20	82
Seroproteínas (% total de proteína)	80	18
Sais minerais totais / 100 mL	0,2	0,7
Cálcio (mg L ⁻¹)	340	1170
Fósforo (mg L ⁻¹)	140	920
Sódio (mEq L ⁻¹)	7	30
Potássio (mEq L ⁻¹)	13	35
Cloreto (mEq L ⁻¹)	11	30
Magnésio (mg L ⁻¹)	40	120
Zinco (mg L ⁻¹)	1,2	3,9
Ferro (mg L ⁻¹)	0,5	0,5
Tiamina (mg L ⁻¹)	0,14	0,4
Riboflavina (mg L ⁻¹)	0,38	1,5
Niacina (mg L ⁻¹)	1,8	0,7
Piridoxina (mg L ⁻¹)	0,1	0,6
Pantotenato (mg L ⁻¹)	2,46	3,46
Folato (mg L ⁻¹)	0,4	0,55
Vitamina A (U.I. L ⁻¹)	1898	1025
Vitamina B12 (mcg L ⁻¹)	Traços	6
Vitamina C (mg L ⁻¹)	50	11
Vitamina D (U.I. L ⁻¹)	22	14
Vitamina E (mg L ⁻¹)	2	0,5
Vitamina K (mcg L ⁻¹)	15	60

U.I. – Unidades internacionais;
mEq – mili equivalente;
Fonte: REGO, 2006.

Por apresentar atividade anabólica intensa, o recém-nascido necessita de uma quantidade proteica elevada nos primeiros meses de vida. As proteínas do soro (seroproteínas) constituem a principal fração proteica do leite materno. São exemplos as proteínas alfa-lactalbumina, lactoferrina, lisozima, soroalbumina e as imunoglobulinas. Essas proteínas são responsáveis pelo transporte, síntese e proteção no recém-nascido. Existe ainda numa menor proporção no leite materno a caseína, principal proteína do leite bovino, que tem a função de formar micelas estáveis com cálcio e fósforo, conferindo a cor esbranquiçada ao leite. A caseína precipita em pH menor que 5.

Os carboidratos do leite representam um teor energético que varia entre 45 e 50%. Seu principal componente é a lactose, representando cerca de 70% do teor de carboidratos do leite materno. Trata-se de um dissacarídeo acumulador de água livre, evitando que essa seja eliminada com os sais pelos rins. É de grande importância para a formação do bebê, pois seu produto metabólico, a galactose, faz parte da constituição do sistema neurológico do recém-nascido.

Entretanto, a fonte energética principal do lactante é a gordura presente no leite materno. Essa é menor no colostro e vai aumentando ao longo dos dias. São as próprias células mamas que sintetizam a gordura do leite, sendo essa estimulada pelo esvaziamento da mama. Aproximadamente 98% da gordura é de triglicerídeos, mas coexistem ainda, fosfolipídeos, colesterol e alguns ácidos graxos livres. Os principais ácidos graxos do leite materno variam entre 12 e 18 carbonos em suas cadeias, sendo importantes para o crescimento, desenvolvimento do sistema nervoso central e precursores de mediadores anti-inflamatórios.

2.1.4 Aleitamento materno no Brasil

No Brasil, em 1982, foi criado o Programa Nacional de Aleitamento Materno. No entanto, nessa data o primeiro banco de leite materno, o Banco de Leite materno do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, fundado em 1943, já completava quase quarenta anos. Esse centro é atualmente considerado de referência em toda América Latina. Em 1988 a constituição brasileira foi modificada a fim de garantir mais um direito trabalhista às mães: a amamentação e os primeiros

cuidados do bebê. Então a licença maternidade passou de 90 para 120 dias (REGO, 2006).

No País existem ainda fortes programas de incentivo ao aleitamento materno apoiados pelo Ministério da Saúde através de campanhas anuais (Figura 2) e em todo país são encontrados Bancos de Leite que além de realizarem a coleta e distribuição de leite materno a quem precisa, fornecem informações às mães sobre essa prática.



Fonte: <<http://www.saude.gov.br/>>

Figura 2: Campanha de amamentação 2013 promovida pelo Ministério da Saúde.

2.2 Agrotóxicos

As primeiras práticas agrícolas datam de aproximadamente 10 mil anos, na região chamada de Crescente Fértil, na Mesopotâmia (KISLEV, WEISS & HARTMANN, 2004). Até então, praticava-se a coleta como fonte de alimentação. Ao longo dos anos os povos aprenderam a plantar sementes às margens dos rios Tigre e Eufrates. Essas plantações eram sujeitas a inúmeras pragas, o que deu início a busca de artifícios que diminuíssem as perdas na produção iniciando assim a era dos agrotóxicos.

Segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2001) toda substância capaz de controlar, prevenir, destruir ou repelir qualquer tipo de praga, sendo essa animal ou

planta, durante qualquer etapa do processo produtivo, de armazenagem, estocagem ou distribuição de alimentos, rações e comodites, ou ainda, qualquer substância que possa ser administrada como controle de parasitas externos é chamada de agrotóxico. Não compõe essa definição produtos como fertilizantes, nutrientes, aditivos alimentares e medicamentos.

Os primeiros agrotóxicos sintéticos foram desenvolvidos a partir de 1940, sendo eles: DDT (diclorodifeniltricloroetano), HCH, aldrin, dieldrin, endrin, clordano, parationa, captana e 2,4-D. Na época foram considerados além de baratos muito eficazes. A maioria desses compostos foi utilizada com inseticida e são denominados como agrotóxicos organoclorados (OCPs) contendo carbono, hidrogênio e cloro.

Atualmente muitos dos primeiros agrotóxicos desenvolvidos são classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), devido a sua persistência no ambiente, entre eles: DDT, DDE (diclorodifenildicloroetano), hexaclorociclohexano (HCH), dieldrin, aldrin, endrin, mirex, dicofol, metoxicloro, heptacloro, clordano, pentaclorofenol e endosulfam.

2.3 Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)

Tendo em vista os impactos nocivos à saúde e ao meio ambiente por agrotóxicos e determinadas substâncias químicas, a partir dos anos 80 o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) juntamente com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) apoiaram três convenções que tratam do manejo ambiental saudável dessas substâncias:

- Convenção de Basiléia;
- Convenção de Roterdã;
- Convenção de Estocolmo.

No Brasil a Conferência Rio 92 abordou esse tema, o qual foi adotado pela Agenda 21.

2.3.1 Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são assim denominados devido ao tempo que permanecem inalterados no meio ambiente. Os primeiros indícios dessa persistência foram detectados no ambiente a partir dos anos 1960. Tratava-se do DDT, utilizado após a segunda guerra mundial no combate à malária. Nessa mesma época, outros compostos persistentes já podiam ser encontrados em leite materno, sedimentos, peixe e ovos (BOER & FIEDLER, 2013).

Há muito se sabe dos danos causados pelos POPs. Na década de 70, porém, acreditava-se que esses não eram nocivos ao homem na proporção em que eram encontrados, como por exemplo: DDT total na concentração de 12 mg kg^{-1} (FOOD AND COSMETIC TOXICOLOGY, 1964). GEYER, SCHEUNER e KORTE (1986) verificaram a concentração de 11 POPs em tecidos gordurosos em diferentes cidades, calculando os fatores responsáveis pela bioacumulação nos seres humanos. Media-se a razão em que esses compostos se acumulavam nos tecidos comparando-a com a quantidade de poluentes ingerida. Segundo os autores, a concentração dos POPs nos organismos decresce na seguinte ordem: organismos aquáticos >> humanos > animais terrestres > plantas terrestres. A maior parte desses compostos organoclorados (OCPs) é lipofílica, não biodegradável e possui atividade residual resultando em bioacumulação e biomagnificação (DEWAN *et al.*, 2013).

A crescente preocupação em relação aos POPs se dá principalmente devido ao seu amplo espectro de toxicidade e efeitos ambientais adversos (DEWAN *et al.*, 2013). A Tabela 2 apresenta algumas características dos principais POPs quanto a sua toxicidade. A maioria deles é carcinogênico, mutagênico, disruptor endócrino, neurotóxico, causa problemas de reprodução, além de ser irritante à pele, olhos e nariz (IUPAC, 2013).

Tabela 2: Características toxicológicas dos POPs

NOME	CARCINOGÊNICO	MUTAGÊNICO	DISRUPTOR ENDÓCRINO	REPRODUÇÃO/ EFEITOS DE DESENVOLVIMENTO	NEUROTÓXICO	IRRITANTE AO TRATO RESPIRATÓRIO	IRRITANTE À PELE	IRRITANTE AOS OLHOS
Aldrin	sim	-	?	?	sim	?	?	?
Dieldrin	?	sim	?	-	sim	-	-	-
Endrin	?	-	?	?	sim	x	x	x
Clordano	?	x	?	?	sim	?	sim	sim
Heptacloro	?	x	?	sim	sim	-	-	-
HCB	sim	x	?	?	-	-	sim	x
Mirex	sim	-	sim	?	-	x	sim	x
Toxafeno	?	-	?	?	x	?	?	?
DDT	?	sim	sim	x	?	x	x	-
PCBs	sim	?	sim	sim	sim	sim	sim	?
Clordecona (kepone)	sim	-	?	?	?	sim	sim	sim
Lindano (γ - HCH)	?	x	?	?	sim	?	sim	sim
α -HCH	sim	-	x	x	?	?	?	?
Endosulfam	?	sim	?	-	sim	-	-	-
4,4 DDT	?	sim	sim	x	?	x	x	-

- : sem dados;

Sim - causa problemas;

x – não causa problemas

? – possível, mas não identificado

2.3.1.1 Propriedades físico-químicas dos POPs

Os POPs são característicos por sua baixa solubilidade em água e pela alta afinidade por tecidos gordurosos que é explicada pelos coeficientes de partição octanol/água (K_{OW}) apresentados na Tabela 3. A estrutura química desses compostos é apresentada no anexos.

O K_{OW} é definido pela equação 1.

$$K_{OW} = \frac{[S]_{\text{octanol}}}{[S]_{\text{água}}} \quad \text{Equação 1}$$

Na equação, os colchetes denotam a concentração em molaridade ou unidades em mg L^{-1} . O valor de K_{OW} costuma ser expresso como uma função logarítmica, $\log K_{OW}$ devido a sua magnitude (BAIRD, 2002). Quanto maior o K_{OW} , maior a probabilidade de encontrar o produto químico na matéria orgânica de solos e sedimentos e por consequência, de haver a migração desses para tecidos gordurosos de organismos vivos.

Quando se coloca um composto químico pouco solúvel em água, parte dele se dissocia e outra parte permanece inalterada, a proporção entre essas partes é conhecida como produto de solubilidade (K_{ps}) e é expressa pela equação 2.

$$K_{ps} = \frac{[\text{cátion}^+]}{[\text{ânion}^-]} \quad \text{Equação 2}$$

NOME	MASSA MOLAR (g mol ⁻¹)	FÓRMULA MOLECULAR	CLASSE	GRUPO	SOLUBILIDADE EM ÁGUA 20°C (mg L ⁻¹)	PONTO FUSÃO (°C)	PONTO EBULIÇÃO (°C)	COEFICIENTE DE PARTIÇÃO OCTANOL/ÁGUA (Log K _{ow})
PFOSF								
Pentaclorobenzeno								
Endosulfam	406.93	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	I, A	O, mix de isômeros	0.32	80	-	4,75
2,4 DDD			I	O				
4,4 DDD			I	O				
2,4 DDE			I	O				
4,4 DDE			I	O				
4,4 DDT	354.49	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	I	O	0.006	109	185	6,91

A – acaricida;

Ci – Ciclodienos;

Dec – Decompõe antes da ebulição;

I – inseticida;

F- fungicida;

Hc – Hidrocarbonetos clorados;

Hca – Hidrocarbonetos clorados aromáticos;

Oct – outro produto constituinte (Other product constituent)

O – Organoclorado;

Pb – Produto de biotransformação

R – raticida

Fonte: IUPAC FOOTPRINT(2013)

2.3.2 Convenções sobre POPs

2.3.2.1 Convenção de Basiléia

Ocorrida em 1989, a Convenção de Basiléia (Suíça) tratou sobre o controle de movimentos transfronteiriços de resíduos perigosos e seu depósito. Os países que aderiram à convenção estabeleceram mecanismos de controle desses movimentos, baseados no princípio do consentimento prévio e explícito para a importação, exportação e o trânsito de resíduos perigosos. Essa passou a vigorar em 5 de maio de 1992 (CONVENÇÃO DE BASILÉIA, 2013).

A convenção objetivava coibir o tráfico ilegal e previa a intensificação da cooperação internacional para a gestão ambientalmente adequada desses resíduos. 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. 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).

2.3.2.2 Convenção de Roterdã

Tendo em vista o aumento da produção de substâncias químicas e agrotóxicos e seu comércio, a Convenção de Roterdã (Holanda) visou estabelecer procedimentos de consentimento prévio informado para o comércio internacional dessas substâncias. Apesar de ter ocorrido em 1998 (CONVENÇÃO DE ROTERDÃ, 2013) só entrou em vigor no ano de 2004, após a ratificação de mais de 50 países.

O objetivo dessa convenção foi 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 meio ambiente contra potenciais danos, contribuindo assim para o uso correto desses produtos. No Brasil a Convenção de Roterdã foi promulgada pelo decreto Nº 5.360 de 31 de janeiro de 2005 (DECRETO DE LEI, 2013).

2.3.2.3 Convenção de Estocolmo

A Convenção de Estocolmo (CE) (Suécia) é um tratado mundial para proteger a saúde humana e o ambiente dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). É também conhecida como a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente Humano (CNUMAH). O primeiro evento ocorreu em Estocolmo em 1972 envolvendo discussões sobre desenvolvimento sustentável.

Em 2001, na Conferência de Plenipotenciários (Suécia), foi adotada a Convenção de Estocolmo para Poluentes Orgânicos Persistentes. Essa entrou em vigor no dia 17 de maio de 2004 (CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, 2013). Foi estabelecida 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 (UNIDO, 2013).

Não obstante, em agosto de 2009, nove outros compostos químicos foram adicionados à lista (os chamados novos POPs) através de uma emenda que passou a vigorar um ano depois. Em 2011, durante o quinto encontro da CE foi ainda adicionado à lista o agrotóxico endosulfam (Tabela 4). Assim, foi estabelecido que cada país signatário deveria ter o seu Plano Nacional de Implementação (NIP) o qual deixaria estabelecidas as propostas do país para cumprir o acordo estabelecido pela Convenção de Estocolmo. A isso é incluso o monitoramento ambiental e humano da presença dos POPs (LAL *et al.*, 2013).

Tabela 4: Lista dos POPs condenados pela CE até 2011.

Nome Químico	Número CAS	Tipo/Usos	Isômeros e homólogos
2001			
Aldrin	309-00-2	Agrotóxico	Aldrin e isodrin
Dieldrin	60-57-1	Agrotóxico	-
Endrin	72-20-8	Agrotóxico	-
Clordano	57-74-9	Agrotóxico	α e β isômeros
Heptacloro	76-44-8	Agrotóxico	-
HCB	118-74-1	Agrotóxico e Industrial	-
Mirex	2385-85-5	Agrotóxico	-
Toxafeno	8001-35-2	Agrotóxico	Centenas de isômeros

Nome Químico	Número CAS	Tipo/Usos	Isômeros e homólogos
DDT	50-29-3	Agrotóxico	p,p'-DDT; o,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD
PCBs	-	Industrial e subproduto	209 congêneres
PCDD	-	Subproduto	75 congêneres
PCDF	-	Subproduto	135 congêneres
2009			
Clordecona (decacloroacetona)	143-50-0	Agrotóxico	-
Lindano (γ -HCH)	58-89-9	Agrotóxico	-
α -HCH	319-84-6	Agrotóxico e subproduto	-
β -HCH	319-85-7	Agrotóxico e subproduto	-
Hexabromobifenila	36355-01-8	Industrial	42 congêneres
Tetra-BDE e Penta-BDE	-	Industrial	Coexistem no penta-BDE comercial
Hexa-BDE e Hepta-BDE	-	Industrial	Coexistem no octa-BDE comercial
PFOS e seus sais	1763-23-1	Industrial	Isômeros de cadeia lateral
PFOSF	307-35-7	Industrial	Isômeros de cadeia lateral
Pentaclorobenzeno	608-93-5	Agrotóxico, industrial e subproduto	-
2011			
Endosulfam	115-29-7	Agrotóxico	α - e β - isômeros

Adaptado de Xu *et al.* (2013) & UNEP (2010)

2.3.2.4 Conferência Rio 92

Baseada na CNUMAH (Etocolmo, 72), a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD), também chamada de Rio 92, ECO 92 ou Cúpula da Terra, foi realizada em 1992 no Rio de Janeiro e é considerada um dos eventos mais importantes do final do século 20. Isso ocorreu devido ao levantamento de uma problemática global: os perigos que ameaçavam a vida no Planeta. Nesse contexto foi lançado um documento sistematizando em um plano de ações com o objetivo de alcançar o desenvolvimento sustentável mundial, a Agenda 21.

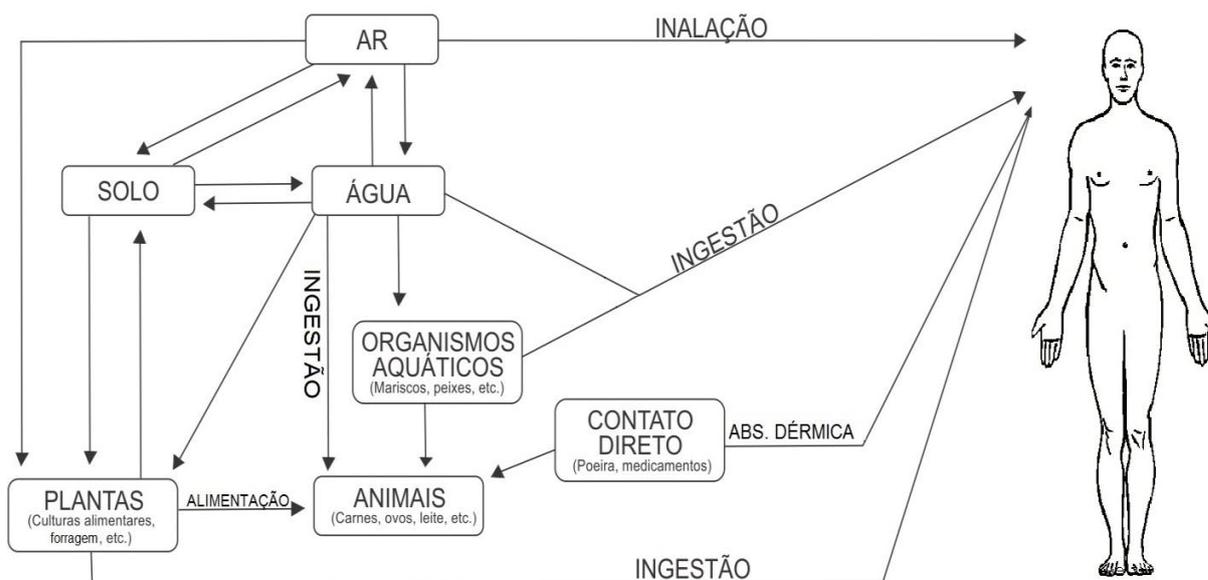
Logo que foi estabelecida, contou com a participação de 179 países, os quais assumiram o lema “Pensar globalmente, agir localmente” com o objetivo de preservar o meio ambiente. Cada país deveria estabelecer quais seriam os eixos temáticos que focaria. O Brasil incluiu: Gestão de recursos naturais, Agricultura sustentável, Cidades sustentáveis, Ciência e Tecnologia para o desenvolvimento sustentável, Redução das desigualdades sociais, Infra-estrutura e Integração regional (CNUMAD, 1995).

Passados 10 anos da Rio 92 ocorreu no ano 2002 a “Rio + 10” em Joanesburgo, África do Sul, a fim de reafirmar os objetivos propostos em 1992 para o desenvolvimento sustentável e propor que os produtos químicos fossem utilizados e produzidos de maneira a minimizar os danos à saúde (DINIZ, 2002). Já a “Rio + 20” realizada no Rio de Janeiro em junho de 2012, preocupou-se com a saúde dos ambientes marinhos e terrestres devido a detritos como plásticos, poluentes orgânicos persistentes, metais pesados e compostos nitrogenados. Os países Comprometeram-se a tratar dessa problemática com mais eficiência até 2025 (THE FUTURE WE WANT, 2012).

2.3.3 Acumulação dos POPs

A bioacumulação se dá através da cadeia alimentar (Figura 3), por isso esses poluentes representam um risco tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. Como os organoclorados são muito mais solúveis em meios semelhantes a hidrocarbonetos, como tecidos gordurosos, acabam sendo transferidos muito mais

do ambiente para os peixes ou sedimentos orgânicos do que para a água (BAIRD, 2002). Devido a evidências que comprovam o transporte dessas substâncias a longas distâncias, inclusive para regiões onde nunca foram utilizados, órgãos internacionais visam limitar seu poder poluente através da proibição, limites de produção, importação e exportação (LANG, 1999).



Fonte: GEYER, SCHEUNERT & KORTE (1986)

Figura 3: Rota dos produtos químicos do meio ambiente para o homem

Devido à alta solubilidade com gorduras, essas espécies tendem a se acumular nos animais, principalmente os que se encontram no topo da cadeia alimentar. Apesar disso, também podem ser encontradas em sedimentos, ar ambiental, águas de superfície e solos. Porém, quando se trata de informações sobre a persistência desses compostos em humanos, ainda existe pouca informação e não há legislação para tal.

É evidenciada a acumulação progressiva dos POPs menos voláteis nos pólos, pois esses tendem a evaporar nas regiões temperadas e migrar para regiões mais frias, onde condensam. O Programa de Avaliação e Monitoramento do Ártico (AMAP) fiscaliza e monitora esses poluentes bem como seus efeitos em todo o ambiente Ártico. Esse programa se baseia em dados já publicados na literatura, dados e informações obtidas pelo programa de monitoramento e o conhecimento tradicional da população da região (AMAP, 2013).

2.4 Ocorrência de POPs em leite materno

Considerado o principal alimento para o recém-nascido, o leite materno contém propriedades que vão além da simples nutrição. Porém, devido a fatores ambientais e a alimentação da mãe, esse leite pode conter alguns contaminantes em sua composição. Dessa maneira, o estudo da possível presença de poluentes orgânicos persistentes e agrotóxicos no leite é de fundamental importância para se garantir a qualidade da saúde humana, bem como monitorar regiões nas quais essa incidência pode ser maior.

Apesar de ser a formulação ideal para atender todas as necessidades dos recém-nascidos, o leite materno vem sofrendo alterações pelo avanço da utilização de compostos químicos, principalmente os sintéticos, em várias atividades humanas. Assim, é possível utilizar o leite materno como um indicador de toda a contaminação ambiental pela Terra (VUKAVIĆ *et al* 2013).

LENG e colaboradores (2009) avaliaram os níveis de POPs em leite materno de duas cidades chinesas e o quanto isso poderia ser influenciado pelo consumo de peixes. Perceberam que a acumulação dos POPs se dava devido à sua persistência e bioacumulação através da cadeia alimentar. Fato que pode ser explicado pela China ser um país agrícola e ter usado intensamente por muito tempo diversos compostos organoclorados.

ÇOK e colaboradores (2012) pesquisaram a presença de POPs em leite materno na Turquia e perceberam que nos últimos anos houve uma diminuição na concentração de poluentes como DDT, assegurando a importância do biomonitoramento desses compostos. Outra questão importante a ser pesquisada ainda é se esses níveis de contaminação podem vir a causar efeitos tóxicos, como por exemplo, danos ao sistema reprodutivo.

Ao analisarem a presença de POPs em leite materno e leite bovino GEBREMICHAEL, BIRHANU & TESSEMA (2013) perceberam a importância do monitoramento não apenas do leite materno, mas dos alimentos ingeridos pela população, principalmente os com altos teores de lipídeos (carne, leite, ovos e peixes) para que se possa determinar as principais vias de exposição para a população. Em todas as amostras foram detectados DDT e seus produtos de biotransformação em nível de 0,389 a 12,7 $\mu\text{g g}^{-1}$.

A exposição a compostos sintéticos persistentes como os POPs é independente do local no qual o homem reside. Em alguns lugares, porém, esses níveis são tão elevados que são potencialmente causadores de danos a saúde humana (DARNERUD *et al.*, 2011). Após a revolução industrial, tanto a exposição do homem quanto do meio que ele vive passou a ser intensificada devido à produção de agentes químicos sintéticos. Nos últimos anos os estudos dos danos que esse contato pode causar vêm se intensificando, principalmente em relação aos POPs (MALARVANNAN *et al.*, 2013)

2.5 Legislação Brasileira sobre os POPs

Segundo o anexo da Convenção de Roterdã (2013), os POPs aldrin, clordano, DDT, dieldrin, hchs, heptacloro, hexaclorobenzeno, toxafeno e PCBs, estão proibidos. O composto lindano ainda é usado como preservativo de madeira, portanto é permitido com restrições. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) regulamentam a utilização de agrotóxicos. Dentre os POPs, somente o endosulfam ainda está em fase de proibição, os demais já são proibidos (MONOGRAFIAS, 2013).

Apesar da proibição desses compostos já ter ocorrido há alguns anos, devido a sua persistência, ainda existem órgãos que estabelecem valores máximos permitidos (Tabela 5). Pode-se perceber a real necessidade de reavaliação desses limites, visto que os valores não foram reduzidos da Portaria brasileira de potabilidade de água 518/2004 para a Portaria 2914/2011, por exemplo. No quesito alimentar, todos os POPs citados pela ANVISA através Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (ANVISA, 2013) não são autorizados para nenhuma das culturas avaliadas. O Ministério da Agricultura e Pecuária através do Programa Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) inspeciona e fiscaliza a produção de origem animal e vegetal disponibilizada ao comércio e consumo. No PNCRC 2013 não são listados limites máximos permitidos nenhum dos POPs, portanto, em conformidade com a ANVISA, nenhum POP é permitido para leite bovino.

Tabela 5: Comparação dos valores máximos permitidos de POPs para diferentes matrizes.

Composto	Portaria 518/2004 ^a	Portaria 2914/2011 ^b	ANVISA ^c (mg kg ⁻¹) Alimentos
	(µg L ⁻¹) Água para consumo humano	(µg L ⁻¹) Água para consumo humano	
Aldrin + Dieldrin	0,03	0,03	NA
Clordano	0,2	0,2	NA
DDT	2	1	NA
Endosulfam	20	20	NA
Endrin	0,6	0,6	NA
Heptacloro	0,03	-	NA
Hexaclorobenzeno	1	-	NA
Lindano (HCH gama)	2	2	NA
Mirex	-	-	NA

NA – Não autorizado.

Fontes: ^aMINISTÉRIO DA SAÚDE (2004);

^bMINISTÉRIO DA SAÚDE (2011);

^cANVISA (PARA) (2013).

2.6 Métodos para determinação de POPs

Existem inúmeras técnicas para determinação de POPs e agrotóxicos nas mais diversas matrizes. Porém, uma das técnicas que se sobressai as demais devido a sua capacidade de separação, identificação e determinação em uma mistura complexa é a cromatografia (SKOOG *et al.*, 2012), principalmente a Cromatografia à Gás (GC) já que é uma técnica ideal para compostos termicamente estáveis e voláteis.

2.6.1 Cromatografia à Gás

Compostos voláteis ou volatilizáveis e termicamente estáveis tendem a ser separados por Cromatografia a Gás. Isso só é possível devido a diferença de interações entre a fase estacionária (sólida ou líquida), a fase móvel (gasosa) e as

substâncias contidas na amostra. A técnica de separação se baseia na eluição dos analitos através do tempo de retenção (Figura 4). É uma técnica com alto poder de resolução e baixos limites de detecção, facilitando o uso de pequenas quantidades de amostra, que pode se tornar limitante em algumas análises (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

Os detectores em cromatografia à gás (GC) devem ter sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade. A resposta linear para os analitos também é essencial. Dentre os detectores mais comumente empregados em GC pode-se destacar os clássicos como o Detector de Ionização de Chama (FID), o Detector de Condutividade Térmica (TCD) e o Detector de Captura de Elétrons (ECD). Um detector que tem ganhado espaço na Cromatografia a Gás é o espectrômetro de massas (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

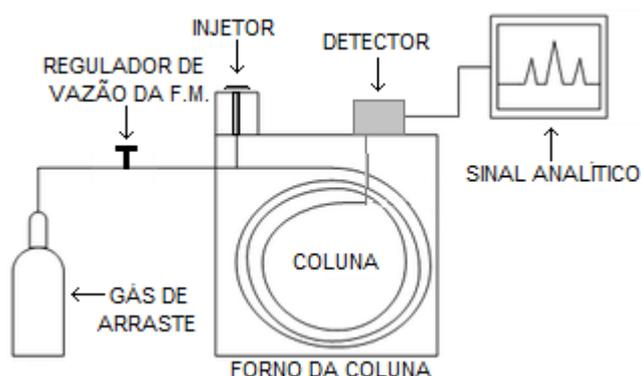


Figura 4: Esquema de um cromatógrafo a gás.

2.6.1.1 Modo de operação do injetor na Cromatografia a Gás

O injetor é parte fundamental do cromatógrafo à gás, pois é através dele que se introduz a amostra no sistema cromatográfico. Os injetores podem ser operados com temperatura constante ou através da programação de temperatura de vaporização do solvente (PTV). Ainda o mecanismo de injeção da amostra pode ser do tipo com e sem divisão de fluxo (split ou splitless).

Em injeções de amostras complexas, que possuem grande quantidade de coextrativos da matriz a PTV é indicada (HOH & MASTOVSKA, 2008). A injeção PTV é usada para aumentar a sensibilidade do método e para minimizar a degradação dos compostos no injetor. Também possibilita a discriminação de certos

analitos quando comparada a injeção clássica split-splitless (POY, VISANI & TERROSI, 1981).

O modo de injeção do tipo Split é utilizado quando a amostra a ser injetada é muito concentrada ou quando essa não pode ser diluída. Logo que a amostra líquida é introduzida no injetor ela vaporiza e apenas uma pequena quantidade desse vapor resultante entra na coluna, o restante é eliminado pela purga (Figura 5) (GRAÑA *et al.*, 2002).

No modo splitless a válvula que regula a purga é ativada. No início ela impede que o vapor gerado saia, pois permanece fechada até que a amostra seja vaporizada no insersor (*liner*) e transferida para a coluna. A válvula é então aberta para remover resquícios de gases restantes no insersor evitando assim a formação de cauda devido ao grande volume de entrada de solvente e baixa vazão na coluna (Figura 5) (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001).

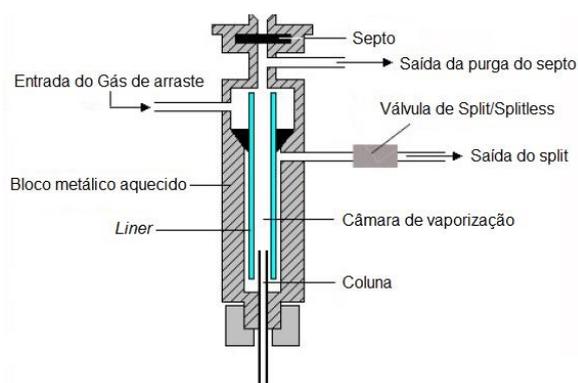


Figura 5: Componentes de um injetor split-splitless.

2.6.1.2 Espectrometria de Massas

Utilizada para detectar e determinar seletivamente analitos, a Espectrometria de Massas é vista como uma técnica micro-analítica na determinação da composição elementar e aspectos estruturais das moléculas dos analitos (WATSON & SARKMAN, 2011). A formação de íons é o ponto de partida em uma análise espectrométrica de massas. Os tipos mais usuais de fontes de íons para fase gasosa (acoplada à Cromatografia a Gás) são: Ionização por Elétrons (EI) e Ionização Química (CI) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009).

Na fonte de ionização por elétrons a amostra é aquecida até produzir vapor molecular que se ioniza pelo bombardeamento de elétrons provenientes de um filamento circundado por um campo magnético. Essa técnica é muito usual e fornece uma biblioteca de dados espectrais de massas, pois a diferença de potencial aplicada entre o filamento e o ânodo é comumente de 70 eV, de modo que, os espectros gerados em diferentes espectrômetros de massas apresentam perfil semelhante. Em média um íon é produzido a cada 1000 moléculas que entram no espectrômetro de massas nas condições usuais. São fornecidos à molécula entre 10 e 20 eV durante a ionização, apesar de o necessário para essa ionização ser cerca de 10 eV. Esse excesso de energia acaba fragmentando excessivamente a molécula. Em alguns casos essa fragmentação é vantajosa, pois fornece informações estruturais da molécula (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

A ionização química produz íons empregando menos energia que EI e, dessa forma, tem-se a formação do íon molecular do composto em estudo. A produção dos íons se dá através da colisão na fonte entre um gás ionizado (normalmente metano) na fonte e o analito. Para que isso ocorra a pressão do gás na fonte deve ser relativamente elevada, permitindo colisões frequentes. Trata-se de uma forma de ionização mais branda que pode produzir tanto fragmentos positivos como negativos (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

2.6.1.2.1 Técnicas para obtenção do Espectro de Massas

Os espectrômetros de massas apresentam diversos modos de operação independente do tipo de equipamento, entre os principais pode-se destacar: Full Scan (ou modo varredura), monitoramento de íons selecionados (SIM) e o monitoramento de reações selecionadas (MRM ou SRM) (Figura 6).

No modo *full scan*, também chamado de *scanning*, o espectrômetro pode ser do tipo simples, com um único quadrupolo. É feita uma varredura de razões massa carga que variam de 50 a 500 Da, rotineiramente. Esses íons são focados pelo espectrômetro em um tempo pré-definido, normalmente a varredura é feita numa taxa de quatro vezes por segundo. Quando acoplado a um cromatógrafo, os íons são detectados conforme seu tempo de retenção. O cromatograma gerado para esses íons é chamado de cromatograma de íons totais (TIC), ele representa a uma medida global da intensidade dos íons produzidos no espectrômetro de massas em função do tempo (GROSS, 2004).

O modo SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*, é muito usado em espectrômetros de massa do tipo íon trap o que não impede seu uso em equipamentos do tipo simples quadrupolo e triploquadrupolo. Esse modo é usado quando já se tem conhecimento do composto alvo, cujas características espectrais já são conhecidas (após ter sido realizado o full scan ou uma busca na biblioteca do equipamento). Detecta-se o composto através do monitoramento de, no mínimo, três fragmentos característicos, o que aumenta muito a sensibilidade de detecção (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2004).

Um ganho maior ainda de sensibilidade é obtido pelo modo MRM ou SRM, pois monitoram-se reações selecionadas baseadas na decomposição de íons característicos dos compostos analisados. Porém, não é qualquer espectrômetro de massas que pode operar nesse modo. Os triploquadrupolos são os mais utilizados para esse tipo de monitoramento. No primeiro quadrupolo seleciona-se o chamado íon precursor (de razão massa carga conhecida), enquanto que no segundo quadrupolo seleciona-se o íon resultante da fragmentação característica gerada pelo gás de colisão. Ou seja, se o íon produto não foi gerado, a detecção não ocorre, dessa maneira a distinção entre os analitos e os compostos da matriz é mais eficiente. (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2004).

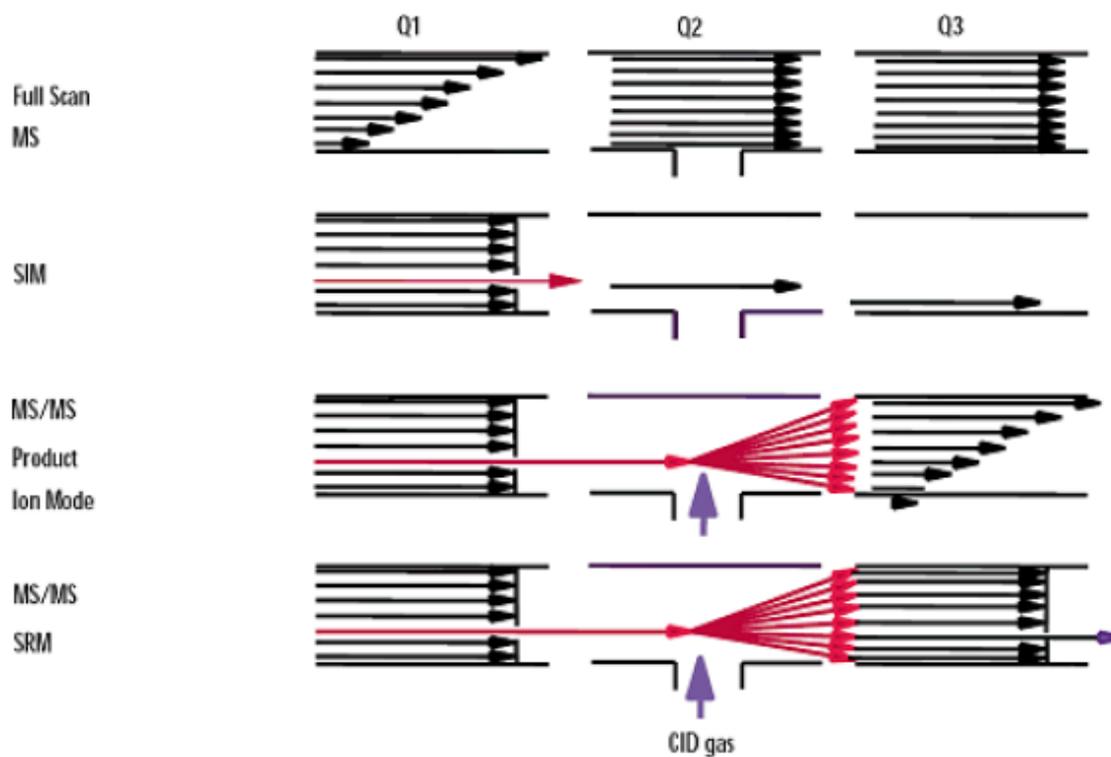


Figura 6: Modos de aquisição de um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo.

2.7 Determinação de POPs em leite materno por GC-MS

Por se tratar de uma matriz de fácil obtenção, não invasiva e adsorvente para compostos lipofílicos, o leite tem se tornado um dos principais bioindicadores da contaminação por POPs (MA *et al.*, 2012). O uso da Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas em série (GC-MS/MS) é uma das ferramentas analíticas mais empregadas nessas determinações. É uma técnica eficiente em termos de separação de compostos com massas moleculares semelhantes e até mesmo isoméricos, pois fornece espécies puras separadamente para identificação (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

Os primeiros trabalhos de análise de POPs em leite materno utilizavam a Cromatografia a Gás com detecção por Captura de Elétrons. (GC-ECD) (GREIZERSTEIN *et al.*, 1999). Por ser um método baseado em um único parâmetro de referência (tempo de retenção - t_R), mais susceptível a interferências, passou a ser substituído pela detecção por Espectrometria de Massas. FOCANT e colaboradores (2002) analisaram dioxinas policloradas (PCDD), furanos policlorados

(PCDF) e bifenilas policloradas (PCBs) em 20 amostras de leite materno na Bélgica, empregando o preparo de amostra modificado a partir de um método padrão da AOAC utilizando extração por *Soxhlet*. As membranas de gordura foram rompidas com adição de oxalato de potássio, acetonitrila e água. O volume de amostra variou entre 50 e 300 mL. O extrato foi evaporado e redissolvido em água morna. A limpeza do extrato foi realizada por Extração em Fase Sólida (SPE) com 25 g de sorvente C₁₈, seguido de análise cromatográfica por GC-MS com limites de quantificação do método da ordem de 0,1 a 0,2 pg g⁻¹ de gordura. Com um volume de amostra menor, 2 g de leite materno, SUN e colaboradores (2006), com amostras coletadas no interior da China, conseguiram atingir os mesmos limites para PCBs através da filtração com sorvente Isolute®, 15h de secagem a frio e extração com hexano/acetona (4:1, v/v) seguida de agitação de 10 min por duas vezes à 150 °C. A limpeza do extrato foi realizada percolando-se o extrato por uma coluna empacotada com sílica, nitrato de prata, carvão ativado e sulfato de sódio anidro.

Outra metodologia empregada para remoção de gorduras é a Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). SUDARYANTO e colaboradores (2006) empregaram o seguinte procedimento: 10 g de leite materno foram previamente extraídos com um sorvente de terra diatomácea e eluídos com éter dietílico. O teor de gordura foi determinado gravimetricamente através de uma alíquota do extrato, o restante foi submetido à GPC para remoção da gordura utilizando uma mistura 1:1 (v/v) de hexano/diclorometano para eluição. O solvente de eluição foi percolado por uma coluna de 12 g de Florisil para separação. A primeira fração eluída com hexano continha os PCBs, hexaclorobenzeno e 4,4-DDE. Já a segunda fração, eluída com a mistura de hexano/diclorometano (8:2, v/v) carregou compostos como clordano, DDTs e HCHs. O extrato foi concentrado e injetado tanto em GC-ECD como GC-MS para confirmação. SUDARYANTO e colaboradores (2008) desenvolveram um trabalho semelhante para a determinação de difenil éter polibromado (PBDE) em amostras da Indonésia utilizando 40 g de leite materno, GC-MS com ionização por elétrons (EI) e monitoramento do íon selecionado (SIM). Os limites de detecção do método ficaram na faixa de 0,01 a 0,05 ng g⁻¹ de gordura. A GPC também foi usada para o monitoramento de organoalogenados nas Filipinas, com o preparo de amostra similar aos anteriores. Foram avaliadas 33 amostras de diferentes regiões. DDT e PCBs foram os analitos predominantemente encontrados, porém foi determinada

também uma alta concentração ($7,5 \text{ ng g}^{-1}$ de gordura) de PBDE nessas amostras (MALARVANNAN *et al.*, 2009).

Com o objetivo de investigar a contaminação de mães que trabalhavam no tratamento de lixo eletrônico por compostos como PCBs, PBDEs e HBCDs, TUE e colaboradores (2010), desenvolveram um método de extração para amostras de leite materno a partir de aproximadamente 40 g de amostra liofilizada extraída via *Soxhlet* com 100 mL de hexano e 300 mL de éter dietílico por 7 h. Desse extrato, 10% foram utilizados para determinação gravimétrica do teor de gordura. O restante foi adicionado de padrão deuterado e submetido à GPC para remoção de gorduras a partir uma mistura de hexano/diclorometano (1:1, v/v). O extrato resultante foi percolado por uma coluna de 4g de sílica ativada para limpeza, evaporado até a secura e redissolvido em metanol. Os limites de detecção foram calculados como sendo três vezes a relação sinal/ruído em relação ao branco e ficaram na faixa de 0,01 a $0,05 \text{ ng g}^{-1}$ de gordura.

SOMEYA e colaboradores (2010) estabeleceram uma ligação direta entre o aumento na concentração de PCBs totais e dioxinas com o passar dos anos no leite materno em mães que residiam próximo a um local de despejo de lixo na Índia. O método de extração escolhido para esse acompanhamento utilizou 40 g de leite materno por mãe. As amostras foram percoladas por um cartucho contendo terra diatomácea e eluídas com 250 mL de éter dietílico. A limpeza do extrato foi realizada por GPC e o extrato resultante foi percolado por uma coluna de sílica gel. A primeira fração foi eluída com hexano e percolada por uma coluna de alumina, sendo que a primeira fração, eluída com hexano, continha a maioria dos mono e orto PCB. A segunda fração foi removida com uma mistura de hexano/diclorometano (1:1, v/v), contendo o restante dos mono e orto PCBs, e PCDD. Essa segunda fração foi submetida à outra etapa de limpeza com sílica gel e carvão ativado empacotados em coluna de vidro. A primeira fração dessa nova etapa foi eluída com hexano/diclorometano (1:4, v/v) e combinada com a primeira fração que havia sido separada com alumina. Os demais PCBs e PCDDs foram eluídos com tolueno. Todos os extratos foram evaporados até secura e redissolvidos. A detecção foi feita no modo SIM, com ionização por elétrons (EI).

Moçambique foi conhecida por apresentar casos frequentes de malária, e, por isso, diversas campanhas eram realizadas aplicando DDT nas residências visando o controle dos vetores dessa doença. 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 no ambiente. Volumes de 0,5 a 1 mL de leite materno foram fortificados com tetrabromobenzeno (TBB) e PCB 209, seguido de agitação em vortex por 1 min. Alíquotas de 3 mL de n-hexano foram adicionadas seguidas de 2 mL de ácido sulfúrico concentrado para remoção da gordura. Aguardou-se a reação e em seguida a amostra foi agitada por 30 s. O sobrenadante n-hexano foi removido após centrifugação. O ácido sulfúrico restante foi re-extraído com 2 frações de 2 mL de n-hexano. O extrato orgânico resultante foi combinado e lavado com 2 mL de ácido sulfúrico. Separou-se a fase de n-hexano e essa foi evaporada até a secura com fluxo suave de nitrogênio seguido de redissolução em 25 µL de isooctano e análise cromatográfica. O teor de gordura não pode ser determinado devido ao volume insuficiente de amostra que foi coletado. A quantificação foi feita por GC-MS empregando calibração externa. Os limites de detecção e quantificação foram calculados em relação aos brancos.

TSANG e colaboradores (2011) compararam a concentração de PAHs, OCPs e PCB em sangue do cordão umbilical, soro e leite materno, e relataram que o resultado para leite materno foi bem maior. Isso pode ser explicado pela adsorção facilitada desses compostos à gordura, o que resulta em dados mais confiáveis. A extração das amostras de leite materno consistiu na pesagem de 1 até 3 g, seguida de secagem a frio e extração por *Soxhlet* com uma mistura de 80 mL de acetona/diclorometano (1:1, v/v) a 65 °C por 18h. A fase orgânica foi coletada e evaporada até 2 mL em evaporador rotativo com a uma temperatura constante de 60 °C. A limpeza do extrato foi realizada com o uso de uma coluna de florisil. O extrato foi eluído com 100 mL de uma mistura de diclorometano/hexano (1:1, v/v). O extrato foi então concentrado a 5 mL em evaporador rotativo a 60 °C. A concentração de lipídios foi determinada gravimetricamente a partir de 1/5 do extrato obtido. A remoção dos lipídios do extrato restante foi executada por GPC. Evaporou-se o extrato resultante que foi redissolvido em 240 µL de n-hexano e analisado por GC-ECD e GC-MS para confirmação e quantificação.

FUJII e colaboradores (2012) desenvolveram um método baseado na remoção de lipídeos por GPC, limpeza do extrato com coluna de sílica gel e determinação por Cromatografia a Gás com Ionização Química Negativa e Espectrometria de Massas para PBDE e hexabromobenzeno (HeBB) em leite

materno. Foram extraídos 5 mL de leite materno com n-hexano, seguido de adição de uma solução de oxalato de potássio/etanol/éter etílico (1:1:1, v/v/v). O extrato foi lavado com água e seco com sulfato de sódio anidro. A determinação de lipídeos foi feita gravimetricamente. Uma alíquota de lipídeos foi redissolvida em uma mistura de diclorometano/n-hexano (1:1, v/v) e sujeita a GPC. Utilizou-se a mesma mistura de solventes para a eluição dos analitos a uma vazão de 4 mL min⁻¹. Os primeiros 90 mL foram descartados, os 80 mL seguintes foram coletados, e percolados em uma coluna de sílica gel. O extrato foi concentrado, resultando num volume final de 200 µL para análise cromatográfica. Os limites de quantificação para os compostos avaliados ficaram na faixa de 0,01 a 0,2 ng g⁻¹ de gordura.

Um método que utiliza água para diluir o leite antes de extraí-lo apresentou resultados interessantes: 5 mL de leite foram homogeneizados em tubos de teflon e deixados “overnight” para atingirem o equilíbrio. Uma alíquota de 5 mL de água foi adicionada para diluir a amostra. A fim de causar a desnaturação proteica 1 mL de uma solução aquosa de oxalato de potássio saturada e 10 mL de etanol foram adicionados. A extração foi realizada com uma sequência de 5 mL de uma mistura de éter dietílico/n-pentano (1:1, v/v), 5 mL de n-pentano e 5 mL de n-pentano. As três soluções extratoras foram recombinaadas e evaporadas até secura com fluxo suave de nitrogênio. Determinou-se a concentração de lipídeos gravimetricamente. O extrato seco foi redissolvido em 4 mL de n-hexano e tratado com 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. A fase ácida foi extraída três vezes com 1 mL de n-hexano. Juntou-se as frações de fase orgânica e concentrou-se as mesmas até 2 mL de extrato. A limpeza foi efetuada empregando o sistema Rapidtrace[®] SPE com cartucho SPE contendo 200 mg de sulfato de sódio anidro e 1000 mg de sílica ácida (ácido sulfúrico/sílica 2:1, m/m). O extrato final foi eluído com 5 mL de n-hexano e 3 mL de uma mistura de diclorometano:n-hexano (1:1, v/v). O eluato foi concentrado a 20 µL e analisado por GC-MS (MA *et al.*, 2012).

Num estudo visando avaliar os possíveis riscos da ingestão de leite materno contaminado por POPs em recém-nascidos, HERNIK e colaboradores (2014), desenvolveram um método que coletou o leite da mama até a exaustão, centrifugou esse a 3000 rpm por 15 min a fim de separar a camada de gordura do leite. Uma porção de 0,5 g desse era adicionada de 5 g de sulfato de sódio anidro e 50 mL de hexano. Essa mistura foi fervida por 10 min e evaporada até 5 mL. Percolou-se o extrato em coluna de sílica acidificada e eluiu-se com hexano. As amostras foram

concentradas a 1 mL e realizou-se a limpeza do extrato por GPC com eluição através de uma mistura de hexano:diclorometano (1:1, v/v) seguido de análise cromatográfica por GC-MS.

Um método desenvolvido inicialmente por Anastassiades e colaboradores (2003) para a determinação de agrotóxicos em alimentos vem sendo empregado nas mais diversas matrizes de alimentos é denominado método QuEChERS. LUZARDO e colaboradores (2013) propuseram uma modificação desse método para determinação de POPs em amostras de leite materno. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de leite maduro e colostro. Em um tubo de polipropileno, foram adicionados 5 mL de leite materno, 5 mL de água ultrapura e agitou-se vigorosamente o tubo. 10 mL de acetonitrila saturada em n-hexano foram adicionados e agitou-se a mistura por 10 min. Para a etapa de partição foram utilizados 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio, 0,5 g de hidrogeno citrato dissódico e 1 g de hidrogeno citrato trissódico. A mistura foi agitada por 1 min e centrifugada a 5000 rpm por 5 min a 20 °C. Uma segunda extração foi realizada com o sedimento restante utilizando 5 mL de acetonitrila saturada com n-hexano. As duas frações de fase orgânica foram unidas e a limpeza do extrato foi realizada com 0,9 g de sulfato de magnésio anidro e 0,5 g de amina primária e secundária (PSA). A mistura foi vigorosamente agitada por 1 min e centrifugada a 5000 rpm por 5 min a 20 °C. O extato resultante foi filtrado em membrana microporosa (0,2 µm) de PTFE e o extrato foi então evaporado até a secura e redissolvido em 1 mL de cicloexano para a análise por GC-MS. Os limites de quantificação do método foram de 0,05 µg L⁻¹.

2.8 Padrão interno e padrão de substituição (surrogate)

Em análises instrumentais podem ocorrer pequenas variações nos resultados obtidos causadas por pequenas oscilações do sistema. Esse tipo de variação pode ser verificado e corrigido pela adição às soluções analisadas de um padrão de concentração conhecida chamado padrão interno (PI). Através da análise da área desse padrão pode-se verificar se houve ou não variações significativas da resposta do instrumento durante as análises. O PI deve ter características similares aos padrões analisados naquele tipo de equipamento e amostra, não pode estar contido

nas amostras e nem interagir com essas. Seu tempo de retenção ou transições não podem coincidir com as dos analitos (RIBANI *et al.*, 2004).

O padrão de adição, também chamado de padrão de substituição, *surrogate* ou controle é um padrão que é adicionado à amostra antes da extração dos analitos. Serve para avaliar as possíveis perdas de analito durante a extração, corrigindo possíveis variações nos resultados durante as etapas de diluição, evaporação e injeção da amostra (SANCO, 2011).

2.9 Validação

O termo validação é empregado a fim de demonstrar se o método analítico desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida. Podendo ser uma determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa dos analitos de interesse na matriz pretendida (ANVISA, 2003). Os parâmetros fundamentais para a validação de um método analítico são exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade e estabilidade (RIBANI, 2004; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

2.9.1 Seletividade e sensibilidade

A seletividade, também denominada especificidade é a capacidade do método em medir exatamente um composto em presença de outros tais como componentes da matriz, impurezas e produtos de degradação. Idealmente ela deve ser avaliada para qualquer interferente importante que possa estar presente na amostra (IUPAC, 2002) Na Cromatografia é imprescindível garantir a pureza dos picos, o que pode ser garantido pelo uso de detectores do tipo espectrômetro de massas (ANVISA, 2003).

Pode-se determinar se o método desenvolvido é seletivo comparando-se a matriz isenta dos analitos (matriz branco) com a matriz adicionada dos analitos de interesse. Não assegurar a seletividade pode comprometer a linearidade, a exatidão e a precisão do método desenvolvido (RIBANI, 2004, IUPAC, 2002).

2.9.2 Linearidade e curva analítica

Na maioria dos equipamentos de medição utilizados a resposta em relação à determinado parâmetro é estabelecida de maneira linear. Os modelos lineares são os mais utilizados em Química Analítica (INMETRO, 2010). Essa resposta corresponde à relação direta, dentro de uma faixa específica, entre a resposta (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) do analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007). É essencial saber, portanto em qual faixa o modelo pode ser considerado linear. Para tal utiliza-se uma curva analítica de calibração representada pela equação 3:

$$y = ax + b \qquad \text{Equação 3}$$

Na qual:

- 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 definição clássica diz que uma reta é qualquer ligação entre dois pontos. Porém, devido aos erros associados, na prática essa reta deve ser definida por no mínimo cinco pontos que não incluam o zero (ANVISA, 2003; IUPAC, 2002, INMETRO, 2010). A partir da equação da reta pode-se determinar estatisticamente o coeficiente de inclinação da curva analítica, também chamado de coeficiente angular “a” e o coeficiente de intercepção da curva analítica “b”, que indica o ponto exato no qual a curva corta o eixo y. Esses parâmetros são determinados através do método chamado Regressão Linear o qual pode estimar o desvio padrão relativo (RSD), bem como o coeficiente de correlação entre os pontos “r”. Para o INMETRO (2010) o valor de “r” deve ser superior a 0,9, já a ANVISA (2003) afirma que esse coeficiente deve ser superior a 0,99. Para a IUPAC (2002) o intervalo da curva analítica de calibração deve compreender uma faixa de 0 a 150% do valor mais provável do analito na amostra ou de 50 a 150% desse valor.

2.9.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada, ou seja, pode-se dizer que ele está presente na amostra, porém, não se pode dizer, através do método utilizado, qual sua concentração. É estabelecido por um cálculo de estimativa, em métodos como os cromatográficos, é tido como 3 vezes a relação sinal ruído (ANVISA, 2003). O LD pode ser obtido diretamente em relação à curva analítica através da equação 4 (RIBANI, 2004):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 4}$$

Na qual:

- s – é a estimativa do desvio padrão da resposta;
- S – inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Segundo o INMETRO (2010), no mínimo 7 replicatas são recomendadas para a determinação do LD. Assim, ao se analisar 7 alíquotas, tem-se $7-1 = 6$ graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99% de confiança, é 3,143. O LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral.

O limite de quantificação (LQ), ao contrário do LD, é a menor concentração do analito na amostra que pode ser medida. Esse limite é testado através de ensaios de recuperação. No caso de análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2010). Pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como LQ a concentração que produz uma relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003). O LQ pode ser expresso pela equação 5:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 5}$$

Na qual:

- s – é a estimativa do desvio padrão da resposta;
- S – inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

2.9.4 Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico representa a dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (INMETRO, 2010; IUPAC, 2002). É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (ANVISA, 2003). É expressa pelo desvio padrão relativo (RSD%), usualmente também chamado de coeficiente de variação (CV) (equação 6).

$$CV = RSD\% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Na qual:

DP – Desvio Padrão;

CMD – Concentração Média Determinada.

A repetibilidade, também chamada de repetitividade, pode ser verificada através de três diferentes concentrações do padrão na amostra (baixa, média e alta) repetidas três vezes, ou no mínimo 6 determinações de uma dada concentração. Consiste no mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível (ANVISA, 2003; INMETRO 2010).

A precisão intermediária é a repetibilidade aplicada em dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes em um mesmo laboratório. Para sua execução recomendam-se no mínimo dois dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003). O objetivo da precisão intermediária é confirmar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004).

A reprodutibilidade não é um componente essencial de validação de método, mas é muito útil quando um laboratório visa averiguar o desempenho de seus métodos com o de outros laboratórios. Essa comparação é feita através de ensaio Inter-laboratoriais (INMETRO, 2010).

O grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro é chamado de exatidão, a qual é expressa em porcentagem e avaliada em termos de recuperação

(INMETRO, 2010). A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos analitos. É calculada segundo a equação 7.

$$\text{Recuperação\%} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Na qual:

- C1 – concentração do analito na amostra fortificada;
- C2 – concentração do analito na amostra não fortificada
- C3 – concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. O fator limitante deste procedimento é que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2010). Para tanto é importante que os analitos tenham um tempo de contato adequado antes da extração das amostras fortificadas

2.9.5 Robustez

A robustez de um método é a capacidade do método de fornecer resultados similares apesar de pequenas variações. Um método robusto não é afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus parâmetros. Em Cromatografia, pode-se testar a robustez de um método variando a concentração do solvente orgânico, pH, programação de temperatura, natureza do gás de arraste, tempo de extração e agitação, por exemplo. Quando há mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação de um método, sem alterar significativamente os resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003).

2.9.6 Efeito matriz

O efeito matriz não é uma propriedade físico-química, pois varia dependendo do tipo de amostra, tipo de analito e tipo de equipamento utilizado nas análises. Dessa maneira, não existem tabelas prontas que indiquem a ocorrência e a extensão do efeito matriz para determinadas amostras. O que existe são informações empíricas a respeito de determinadas classes de compostos avaliadas em condições relativamente específicas. Assim, o efeito matriz deve ser avaliado para cada caso específico. Uma maneira muito comum de calculá-lo é através da comparação dos valores de inclinação das curvas analíticas preparadas no solvente e no branco da matriz (equações 8 e 9). Para que o efeito matriz seja considerado desprezível, a relação entre essas curvas deve ser menor ou igual a 20% (CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008).

$$C\% = 100 - \left(1 - \frac{a_1}{a_2}\right) \quad \text{Equação 8}$$

Na qual

C% - efeito matriz;

a₁ – inclinação da curva analítica preparada no extrato da matriz;

a₂ – inclinação da curva analítica preparada no solvente.

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Na qual

X₁ – inclinação da curva analítica preparada no extrato da matriz;

X₂ – inclinação da curva analítica preparada no solvente.

Nas técnicas cromatográficas a identificação dos compostos se dá pela comparação com padrões de referência. Esses compostos devem possuir o mesmo tempo de retenção dos padrões, e, no caso da detecção por espectrometria de massas, as mesmas transições (íon precursor e íons produto) (CHIARADIA, COLLINS, & JARDIM, 2008). O efeito matriz pode ser positivo, quando há um aumento do sinal do analito, ou negativo, quando ocorre uma diminuição do sinal gerado pelo analito quando injetado no extrato da matriz, condição semelhante a das amostras que estão sendo analisadas. Desse modo, sérios problemas podem ocorrer quando se prepara uma curva no solvente para estimar a concentração dos analitos em uma determinada matriz (ZROSTLÍKOVÁ, 2001).

Na Cromatografia a Gás ao preparar-se soluções em solvente puro e injetar no cromatógrafo, parte dos analitos pode ficar retida no insersor, pois esse contém grupamentos silanol que os adsorvem, impedindo sua chegada ao detector. Alguns analitos podem também sofrer degradação térmica devido a altas temperaturas do injetor. Ao injetar-se os analitos em extrato da matriz, os componentes da matriz, que estão em maior quantidade, competem pelos sítios ativos, aumentando assim a quantidade de analito que chega ao detector e também evitando sua degradação (SOUSA *et al.*, 2012).

Algumas alternativas para minimizar o efeito matriz em GC são: o preparo de curvas analíticas em branco da matriz (matriz isenta dos analitos de interesse); a utilização de processos de limpeza (*clean up*) eficientes dos extratos das amostras; a Programação de Temperatura de Vaporização (PTV) do injetor; a injeção direta na coluna “on-column”; a utilização de analitos protetores como hidroxilas, carbonilas e grupamentos nitrogenados; a aplicação de funções de correção através de tratamentos estatísticos; e métodos de adição de padrão interno e padrão de controle (PINHO *et al.*, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODO

O desenvolvimento de um método analítico envolve etapas críticas como pesagem de materiais de referência e utilização de equipamentos de alta complexidade. Para tal, esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria que é acreditado pelo INMETRO pela Norma ISO/IEC 17.025 de Controle de Qualidade.

3.1 Instrumentação

Para o desenvolvimento do método analítico foram empregados os seguintes equipamentos:

- Sistema GC-MS/MS (Figura 7): Cromatógrafo a gás Varian 1200-MS, (Varian, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo a Gás CP 3800;
 - Detector de massas triplo quadrupolo (TQ) 1200;
 - 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, 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);



Figura 7: Sistema GC-MS/MS triploquadrupolo utilizado no estudo

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 150 μ L;
- Vidraria comum de laboratório.

Fez-se uso também dos seguintes reagentes e solventes:

- Sílica (Merck, Alemanha); Octadecilsilano (C_{18}) com tamanho de partículas de 40 μ m – Bondesil (Agilent Technologies, EUA); Amina (Varian, EUA); Amina primária e secundária (PSA) com tamanho de partícula de 40 μ m – Bondesil (Agilent Technologies, EUA), Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão); Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, México); Cloreto de sódio (J.T. Baker, EUA); Adsorvente Supel QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA);

- Hexano (Caledon, Canadá); Álcool Etílico (Fmaia, Brasil); Ácido fórmico (Sigma Aldrich, Brasil); Acetona (Tedia, USA) Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA); Acetonitrila (Tedia, USA), Ácido acético glacial, grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV (resistividade de 18,2 MΩ cm).

Os gases utilizados no sistema cromatográfico e para a etapa de evaporação da amostra foram:

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

3.3 Padrões analíticos

Foram adquiridos padrões analíticos sólidos certificados da empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha) com grau de pureza entre 90 e 99%. Os padrões foram mantidos em freezer e estavam válidos durante todo trabalho efetuado.

3.4 Amostras Branco

Nas análises de leite materno é muito difícil se conseguir volume suficiente de amostra de uma única mãe para uma validação. Por isso, para a etapa de ampliação do escopo para leite materno fez-se um *pool* de leite de mais de uma coleta de mães diferentes. Esse leite foi extraído e injetado no GC-NCI-MS no modo SIM empregando o método proposto a fim de garantir a ausência de contaminantes característicos da análise nos tempos de retenção dos analitos em estudo.

3.5 Escolha dos POPs e agrotóxicos

A escolha dos analitos estudados foi baseada na lista de POPs atualizada e nos padrões analíticos disponíveis no laboratório. Alguns compostos como PCBs e toxafeno foram descartados dessa parte do estudo, pois não tiveram um bom comportamento cromatográfico nas mesmas condições dos demais analitos. Esses compostos serão avaliados em estudos futuros para a matriz leite materno. Os compostos selecionados para esse trabalho foram: HCH alfa; hexaclorobenzeno; atrazina deuterada (PC); HCH beta; HCH gama; heptacloro; aldrin; bromofós etílico (PI); 2,4 DDE; endosulfam alfa; 4,4 DDE; 2,4 DDD; dieldrin; endrin; endosulfam beta; DDT; 4,4 DDD; endosulfam sulfato e mirex.

3.6 Preparo dos padrões analíticos utilizados

Os padrões analíticos desse estudo foram preparados a partir de padrões sólidos de alta pureza. Inicialmente preparou-se uma solução estoque na concentração aproximada de 1000 mg L^{-1} em acetonitrila ou tolueno para cada analito avaliado. A partir dessas soluções individuais, fez-se uma mistura contendo todos os compostos selecionados para o desenvolvimento do método na concentração de 10 mg L^{-1} que teve validade de 3 meses. Após esse período, nova mistura foi preparada nas mesmas condições. Essa solução foi utilizada para o preparo de uma solução na concentração de 1 mg L^{-1} dos analitos e a partir dessa foram realizados os ensaios de fortificação e preparo da curva analítica nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para a determinação do tempo de retenção e íons característicos de cada composto, preparou-se a partir da solução estoque de 1000 mg L^{-1} uma solução de trabalho individual na concentração de 1 mg L^{-1} que foi injetada no GC-MS no modo de varredura total (*full scan*) e posteriormente no modo SIM.

3.7 Escolha do padrão interno e padrão de substituição

Para a escolha dos padrões interno e de substituição procurou-se analitos que não pudessem existir na amostra e que mesmo assim tivessem características similares aos analitos estudados. Como padrão interno (PI) optou-se pelo bromofós etílico, um composto químico estável do grupo dos organofosforados, classificado como inseticida, removido das monografias autorizadas da ANVISA desde 2002. O padrão interno foi utilizado para avaliar pequenas variações do instrumento, não sendo utilizada a sua resposta para os cálculos de recuperação. Foi adicionado ao final da etapa de preparo da amostra, na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Já como padrão de controle (PC), foi possível o uso de um padrão deuterado, sendo escolhida a atrazina d-4 para avaliação do procedimento de extração, não sendo necessário seu uso como corretor de recuperação para nenhum dos analitos estudados. Foi adicionada em todas as amostras de leite materno, resultando uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato final.

3.8 Otimização do método de extração e limpeza para análise de POPs e agrotóxicos em leite materno

Por se tratar de uma matriz complexa de difícil obtenção e devido aos teores elevados de proteína, açúcares e principalmente gorduras, desenvolveram-se testes preliminares com leite bovino UHT integral para delinear o trabalho proposto.

3.8.1 Ensaio com o método QuEChERS

Inicialmente testou-se o método QuEChERS proposto por ANASTASSIADES e colaboradores (2003) e suas variações conforme indicado na Tabela 6.

Duas opções de solvente de extração foram testadas: acetonitrila e hexano. Avaliou-se a quantidade de coextrativos presentes em cada extrato após a etapa de limpeza a partir de técnica gravimétrica para se definir qual o solvente mais adequado.

A Tabela 6 indica também os sorventes utilizados para a limpeza do extrato, os quais foram avaliados segundo as recuperações obtidas para cada teste.

Tabela 6: Testes de extração baseados no método QuEChERS.

Teste	Extração	Partição	Limpeza (1 mL extrato)
T1			150 mg MgSO ₄ 50 g ZSep
T2	10 mL leite 10 mL acetonitrila		150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈
T3			150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈ 50 mg PSA
T4			150 mg MgSO ₄ 50 mg ZSep
T5			150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈
T6		4 g MgSO ₄ 1 g NaCl	150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈ 50 mg PSA
T7	5 mL leite 5 mL água 8 mL hexano 2 mL etanol com 4% ác fórmico		150 mg MgSO ₄ 50 mg Si
T8			150 mg MgSO ₄ 50 mg NH ₂
T9			150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈ 50 mg NH ₂
T10			150 mg MgSO ₄ 50 mg C ₁₈ 50 mg Si
T11	10 mL leite 10 mL acetonitrila		150 mg MgSO ₄ 25 mg PSA
T12	15 mL leite 15 mL acetonitrila com 1% ác fórmico	6 g MgSO ₄ 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ 50 mg PSA
T13	10 mL leite 10 mL acetonitrila	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .1,5H ₂ O	150 mg MgSO ₄ 25 mg PSA

3.9 Otimização do sistema cromatográfico para análise de POPs e agrotóxicos em leite materno

As condições cromatográficas para o método desenvolvido foram baseadas em um estudo desenvolvido por Prestes (2007) para CI e por MUNARETTO (2013) para EI. A partir das informações desses estudos foram escolhidos os melhores parâmetros com o uso de uma solução $100 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos estudados preparada em acetonitrila.

Optou-se pelo modo CI devido à melhora na relação sinal ruído para os analitos selecionados. Variou-se a corrente da fonte de ionização a fim de selecionar a melhor relação sinal/ruído para os analitos em estudo. Também foi otimizada a tensão de operação da eletromultiplicadora. Os demais parâmetros são descritos abaixo:

- Volume de injeção: 2 μL ;
- Injetor operando no modo PTV com programação da válvula *split* conforme Tabela 7 e 8, respectivamente;
- Programação de temperatura do forno da coluna indicada na Tabela 9;
- Gás de arraste hélio numa vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$;
- Tempo total de análise: 25 min.
- Temperatura da linha de transferência (transferline): $275 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Temperatura da fonte de ionização: $230 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Tempo de espera para aquisição de dados: 6 min;
- Modo de aquisição: SIM
- Modo de ionização: CI negativo (NCI);
- Pressão do gás de ionização metano: 9 mTorr;

Tabela 7: Programação de temperatura do injetor PTV

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Taxa de aquecimento ($^\circ\text{C min}^{-1}$)	Temperatura Constante (min)	Total (min)
80	0	0,10	0,10
300	200	12,00	13,20
80	resfriamento	-	25,00

Tabela 8: Programação da válvula *split* do injetor PTV.

Tempo (min)	Estado da válvula <i>Split</i>	Razão da válvula <i>split</i>
Inicial	aberta	1:10
0,01	fechada	-
2,00	aberta	1:40

Tabela 9: Programação de temperatura do forno da coluna.

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Temperatura Constante (min)	Total (min)
80	0	1,00	1,00
180	25,00	0,00	5,00
280	5,00	0,00	25,00

3.9.1 Otimização do sistema de detecção

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 1000 µg L⁻¹ no modo *full scan*. A partir dos resultados obtidos definiram-se os segmentos do método e o monitoramento dos íons característicos de cada analito. Preferencialmente os íons escolhidos devem possuir massas elevadas a fim de que se minimize a ação de interferentes no sistema de detecção (GROSS, 2004).

3.10 Análise de solventes e reagentes

A fim de verificar a presença de contaminantes nos solventes e reagentes fez-se uma avaliação dos mesmos a partir do processo de extração utilizado para validação do método, porém sem a presença da amostra de leite. Esse procedimento foi chamado de extração branco de solventes e reagentes.

3.11 Validação do método para análise de POPs e agrotóxicos em leite materno

O método proposto foi validado inicialmente para leite bovino UHT integral obedecendo aos parâmetros de seletividade, linearidade, curva analítica, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão avaliada através de ensaios de recuperação e avaliação do efeito matriz. Posteriormente foi feita uma ampliação do escopo do método desenvolvido para os mesmos analitos, porém para a matriz leite materno, obedecendo aos mesmos critérios acima mencionados.

3.11.1 Seletividade e sensibilidade

A avaliação da seletividade do método foi realizada injetando-se extratos de amostras branco, isentas dos analitos em estudo, no sistema cromatográfico e amostras fortificadas com esses analitos. Os cromatogramas foram comparados a fim de verificar se algum interferente poderia estar coelúndo com os analitos selecionados e se isso afetaria a análise por GC-NCI-MS.

3.11.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método proposto foi avaliada através da injeção cromatográfica de soluções analíticas nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e no extrato do branco da matriz (leite bovino e leite materno). Essas soluções foram preparadas previamente conforme item 3.5. Foram preparadas 3 curvas analíticas em extrato branco da matriz (leite bovino), uma curva em solvente orgânico (acetonitrila) e uma curva no extrato branco da matriz (leite materno). Com esses dados foi possível calcular a equação da curva analítica para cada um dos compostos avaliados bem como o RSD% e o coeficiente de determinação (r^2) de cada curva.

3.11.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo o menor ponto da curva analítica para cada composto avaliado levando-se em conta a relação sinal/ruído (INMETRO, 2010). Para tal, o limite de detecção (LD) pode ser calculado como derivado do LQ, sendo, portanto 3,33 vezes menor que esse.

No método proposto houve etapas de diluição e concentração da amostra, desse modo, os limites em relação ao instrumento e ao método foram diferentes. O LD_i e o LQ_i referem-se aos limites em relação ao instrumento, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o LD_m e LQ_m referem-se aos limites do método, ou seja, a concentração real nas amostras e são obtidos através da relação entre o fator de concentração/diluição do método e os limites do instrumento, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.11.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada em 4 níveis de fortificação (0,1; 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para cada nível de fortificação foram feitas 7 réplicas nas amostras “branco” de leite bovino. Para o leite materno fez-se um nível de fortificação na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os cálculos de recuperação foram realizados conforme a equação 7.

3.11.5 Precisão

Em termos de repetibilidade, a precisão foi avaliada extraindo-se 7 amostras fortificadas para cada nível de concentração ($n=6$) injetado uma vez no equipamento. A variação entre as réplicas foi então determinada pela equação 6.

Para a verificação da precisão intermediária, foram feitas injeções de uma curva analítica na matriz “branco” (leite bovino UHT integral) e um nível de fortificação na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2 $\mu\text{g L}^{-1}$ na matriz) cinco dias após a validação do método. Esse procedimento foi realizado por diferentes analistas.

3.11.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada durante o processo de validação e precisão intermediária, pois foi efetuada a troca da eletromultiplicadora do detector equipamento, bem como troca do insensor, limpeza da fonte de ionização e troca da marca dos solventes extratores (acetonitrila).

3.11.7 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada comparando-se a inclinação das curvas analíticas no solvente (acetonitrila) e na matriz (tanto em leite bovino como em leite materno) a partir da equação 9. Foi considerado que um efeito superior a 20% confirma a ocorrência de efeito matriz (CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008).

3.12 Coleta de amostras reais e aplicação do método desenvolvido

As amostras de leite materno foram coletadas em diversos pontos do estado do Rio Grande do Sul no intuito de se obter um panorama geral da presença de POPs e agrotóxicos nesse. As coletas foram realizadas no segundo semestre de 2013 e primeiro semestre de 2014 seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (WHO, 2007).

Todas as mães selecionadas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, o qual certificava que estavam participando como voluntárias do experimento, falando das vantagens e aspectos importantes do projeto. Juntamente com o termo foi aplicado às mães um questionário para se obter informações relevantes à possível presença de agrotóxicos e POPs no leite das voluntárias e também para que se pudesse fazer uma correlação entre as amostras avaliadas. Esse questionário também se encontra anexo a esse trabalho (Anexo 2). A Figura 8 apresenta o mapa do Rio Grande do Sul com as regiões de coleta demarcadas. Foram realizadas coletas de mães diferentes em vários pontos do estado. Dessas,

foram analisadas 20 amostras de leite materno: 2 de Tupanciretã, 6 de Tiradentes do Sul e Três Passos, 5 de Bagé, 3 de Cachoeira do Sul e 4 de Bossoroca.

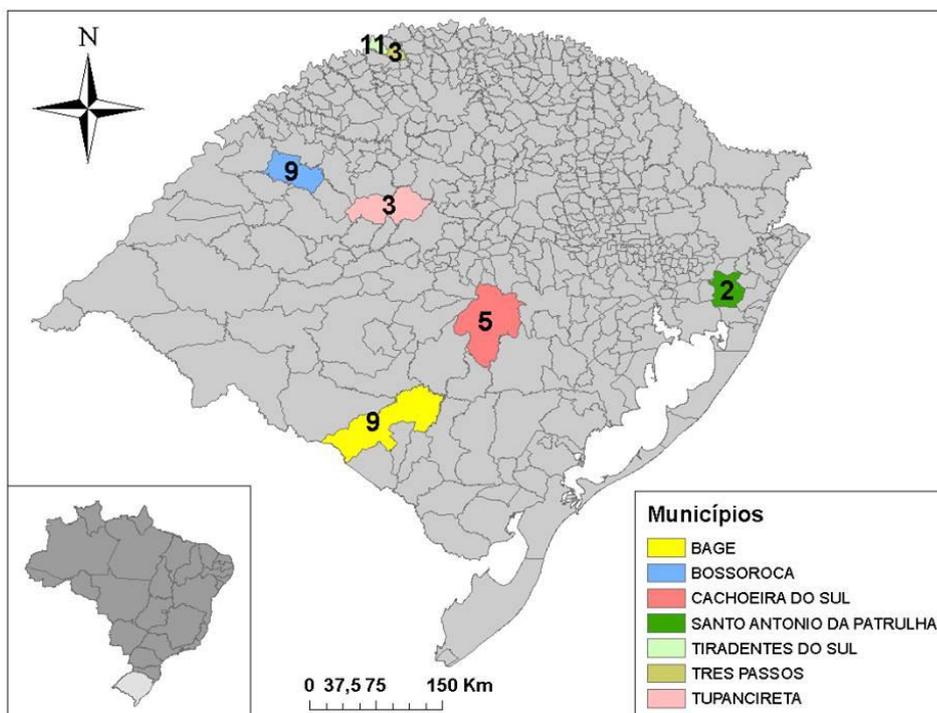


Figura 8: Pontos de coleta de amostra de leite materno no estado do Rio Grande do Sul

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se discute sobre a presença dos POPs no ambiente, pensa-se muito em matrizes ambientais como solo e águas subterrâneas. Porém, um bioindicador para essa persistência é o homem, já que sua alimentação provém dos mais diversos solos, e, por consequência das águas, pluviais e subterrâneas. Portanto, a análise de POPs e agrotóxicos em leite materno pode ser considerada uma fonte de informação valiosa sobre a presença e a persistência desses compostos no ambiente.

4.1 Condições cromatográficas empregadas para a análise de POPs e agrotóxicos em leite materno por GC-MS.

Quando se utiliza Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas, há a possibilidade de utilização de duas técnicas de ionização: por elétrons (EI) e química (CI). Num primeiro momento o método foi desenvolvido utilizando ionização por elétrons (EI), porém, devido às fragmentações excessivas causadas por essa ionização, algumas informações sobre os analitos eram perdidas, principalmente para os compostos como DDT (Figura 9).

PATEL e colaboradores (2005) também perceberam um aumento na relação sinal-ruído para compostos como lindano e DDT ao utilizarem EI. Portanto, optou-se pela ionização química (CI), que é uma ionização mais branda, já que a reação com um gás reagente ocorre com uma transferência de energia, que geralmente não excede 5 eV, gerando espectros de massas de íons menos fragmentados do que em EI. Isso melhora a seletividade e a sensibilidade para alguns compostos (PORTOLÉS *et al.*, 2012). Além disso, a probabilidade de os cromatogramas gerados por CI apresentarem interferência dos componentes da matriz é bem menor, bem como a relação sinal-ruído é maior, melhorando os limites de detecção e quantificação do método (PIZZUTTI *et al.*, 2012).

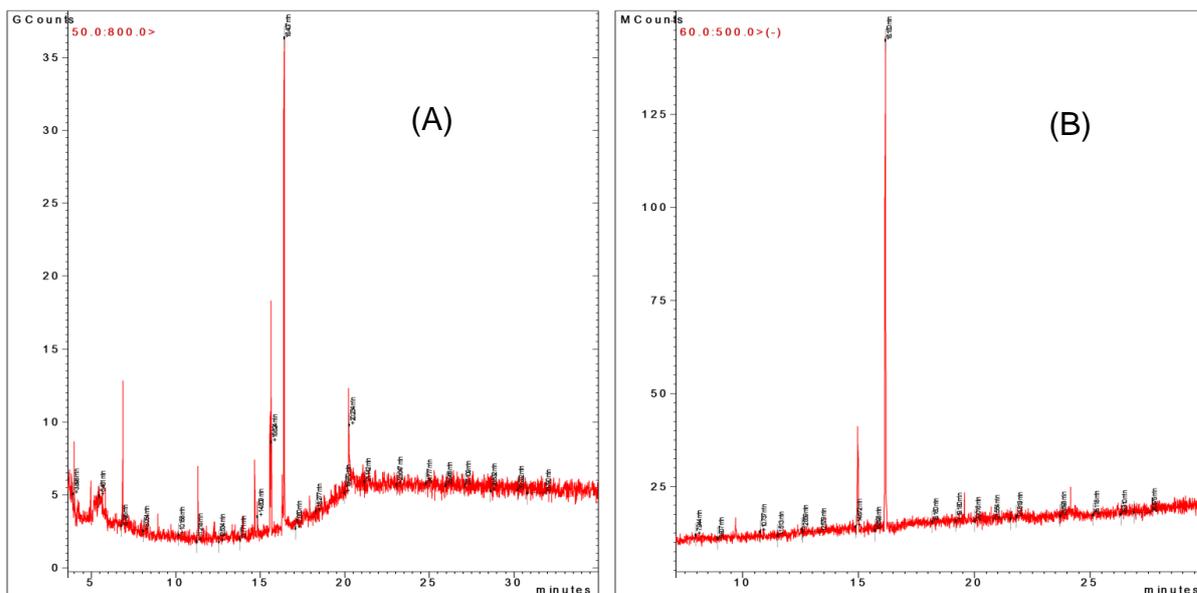


Figura 9: Cromatograma no modo full scan do composto DDT obtido por GC-MS no modo EI (A) e no modo CI (B).

4.1.1 Avaliação da corrente de ionização em GC-NCI-MS.

A corrente aplicada ao filamento pode influenciar na formação dos íons em GC-NCI-MS, por isso variou-se a corrente do filamento em: 100, 150 e 200 mA. Os melhores resultados foram obtidos ao se aplicar 150 mA ao filamento, ocasionando um ganho no sinal analítico (Figura 10).

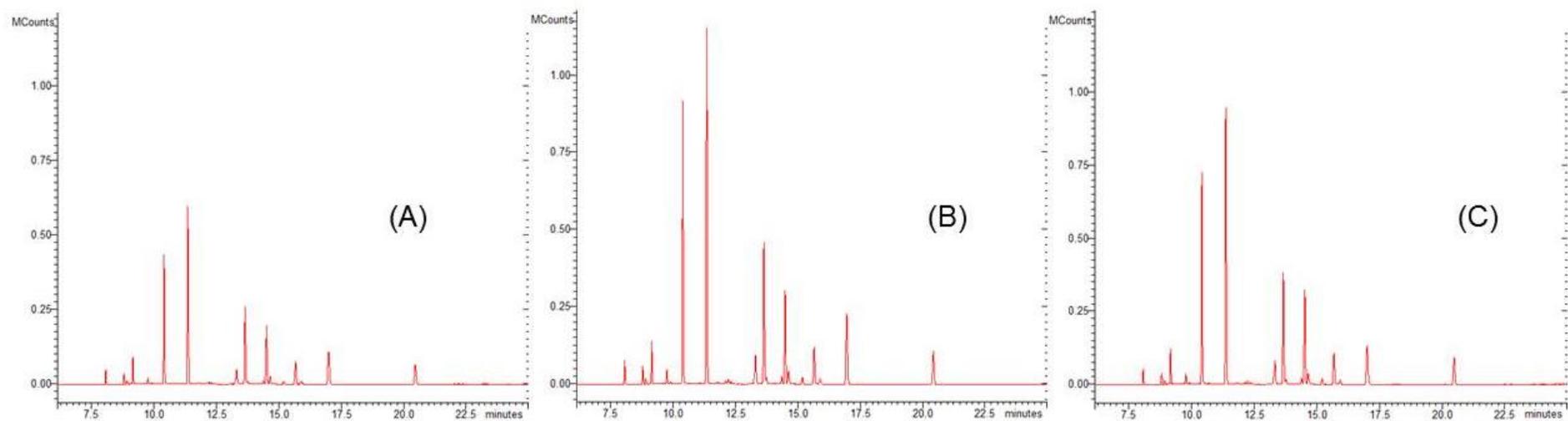


Figura 10: Cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS variando a corrente de ionização do filamento.: (A) 100 mA, (B) 150 mA e (C) 200 mA.

4.1.2 Avaliação da tensão de detecção para os compostos selecionados em GC-NCI-MS

A tensão de operação do detector é um parâmetro muito importante na relação sinal-ruído dos compostos avaliados. Uma maior tensão gera um aumento no sinal, porém, isso ocasiona também um aumento do ruído. Foram testadas as tensões de 900, 1100 e 1200 V para a eletromultiplicadora (Figura 11). Conforme pode-se perceber, com o aumento de tensão houve um incremento na relação do sinal analítico que não foi prejudicado pelo aumento do ruído. Um aumento da tensão para valores acima de 1200 V poderia causar um desgaste excessivo da eletromultiplicadora. Portanto, optou-se por manter a tensão em 1200 V.

As demais condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método analítico proposto estão descritas no item 3.8.

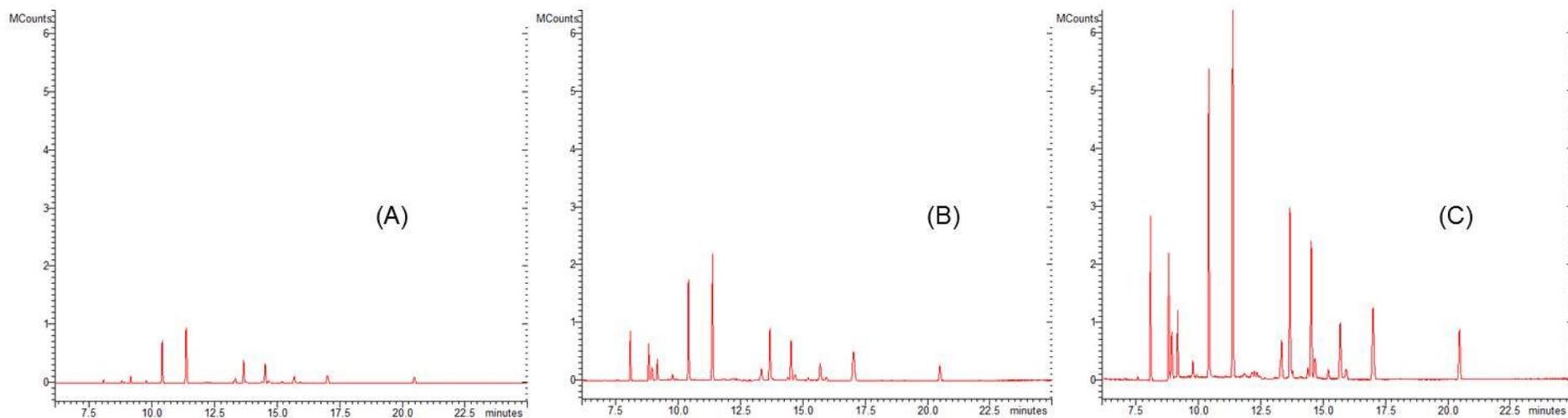


Figura 11: Cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS na otimização da tensão de detecção dos analitos: (A) 900 V, (B) 1100 V e (C) 1200 V.

4.1.3 Comparação utilizando cromatograma de íons totais entre as amostras “branco” e as amostras branco fortificadas

Para a etapa de validação foi injetado no cromatógrafo uma amostra branco de leite bovino e comparada com uma amostra branco fortificada na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 12). Esse mesmo procedimento foi repetido para a amostra de leite materno. Como não havia disponível quantidade suficiente de leite materno de uma única mãe, optou-se por fazer um *pool* das amostras que apresentaram nível de contaminação inferior ao LQ quando comparadas à curva no solvente. Os resultados do “branco” e o branco fortificado na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ podem ser observados na Figura 13.

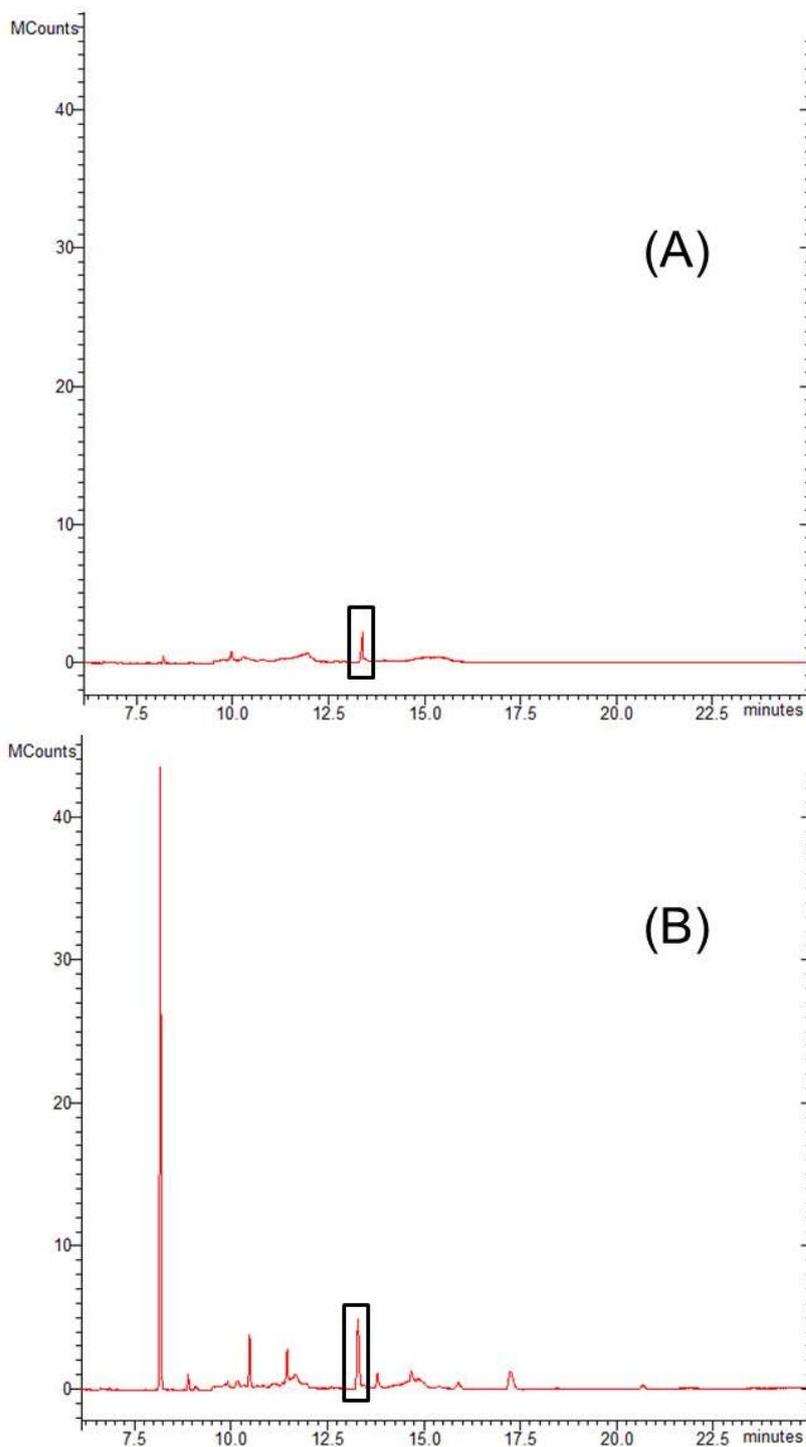


Figura 12: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS para leite bovino: (A) amostra branco da matriz e (B) amostra branco da matriz fortificada na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Em destaque: Padrão Interno.

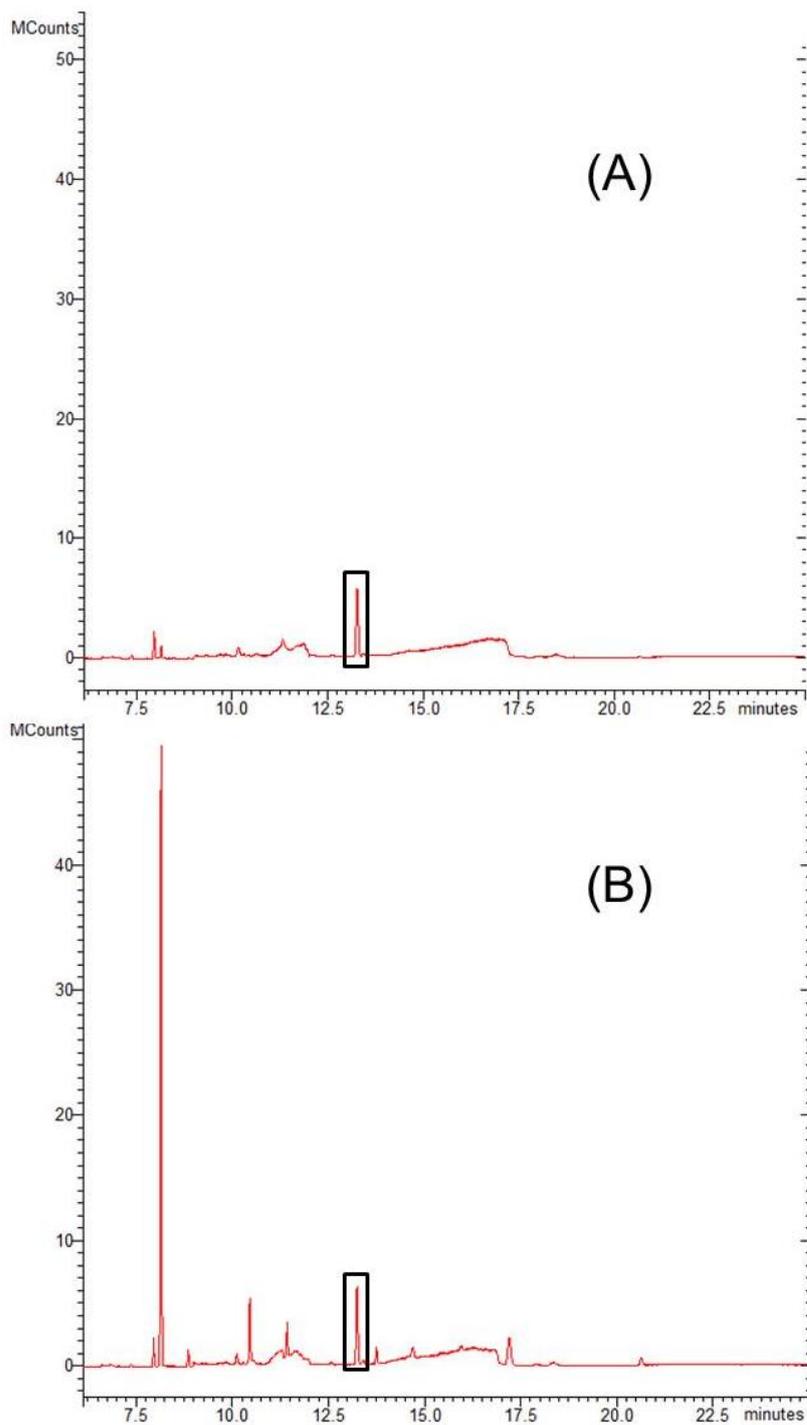


Figura 13: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS para leite materno: (A) amostra branco da matriz e (B) amostra branco da matriz fortificada na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Em destaque: Padrão Interno.

4.1.4 Seleção dos POPs e agrotóxicos determinados por GC-NCI-MS

Foram selecionados 17 POPs para o desenvolvimento do método analítico proposto. Além desses utilizou-se o agrotóxico deuterado atrazina D4 como padrão de controle e o agrotóxico bromofós etílico como padrão interno. Esses compostos, o segmento no qual foram monitorados, tempo de retenção e íons monitorados no modo SIM são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: POPs e agrotóxicos determinados por GC-MS com ionização química negativa (NCI), no modo SIM, apresentados na ordem de eluição e destacando íons monitorados para cada analito.

Segmento	COMPOSTO	t_R	TRANSIÇÕES			
1	HCH ALFA	8,0	71,2	255	70,2	
	HEXACLORO	8,1	286	288	284	282
	ATRAZINA deuterada (PC)	8,8	66	65	63,9	66,8
2	HCH BETA	8,8	71,1	70	255	72
	HCH GAMA	8,9	255	257	71,2	
3	HEPTACLORO	10,4	266	264	268	235
	ALDRIN	11,3	237	239	235	
	BROMOFÓS ETÍLICO (PI)	13,2	81,4	252	356	
4	2,4 DDE	13,3	246	247	248	237
	ENDOSULFAM ALFA	13,6	406	239	235	237
5	4,4 DDE+2,4 DDD	14,4	281	283	248	246
	DIELDRIN	14,5	237	239	235	
	ENDRIN	15,2	237	239	235	346
6	ENDOSULFAM BETA	15,7	405,9	408	404	234,8
	4,4 DDD	15,9	248	250	71	283
	ENDOSULFAM SULFATO	17,0	386	388	384	97,4
7	DDT I	16,4	283,1	281	71,2	
	MIREX	20,5	404	402	439	71

PC – Padrão de Controle;

PI – Padrão interno;

t_R – tempo de retenção.

Na Figura 14 pode-se perceber um aumento do sinal analítico no cromatograma de soluções preparadas diretamente no solvente orgânico, acetonitrila, em relação ao cromatograma gerado a partir de soluções preparadas no extrato da matriz (leite bovino) na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 15 apresenta um cromatograma no modo SIM para os compostos HCH alfa e hexaclobenzeno,

evidenciando a eficiência na separação e identificação dos picos cromatográficos através do modo SIM, destacando os respectivos espectros de massas com os íons característicos. A Figura 16 apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-NCI-MS a partir de uma amostra branco de leite bovino fortificada em $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

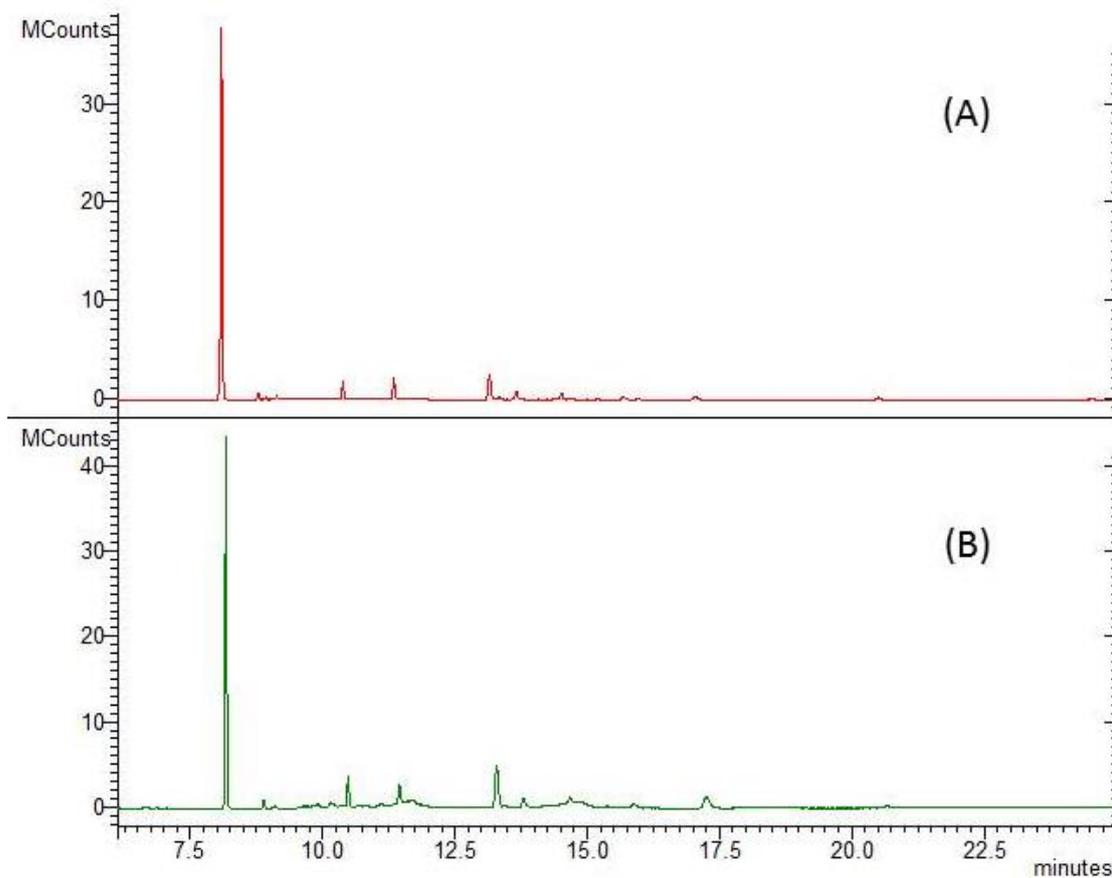


Figura 14: Cromatograma obtido por GC-NCI-MS no modo TIC para: (A) solução preparada no solvente (acetonitrila) e (B) solução preparada no extrato da matriz (leite bovino).

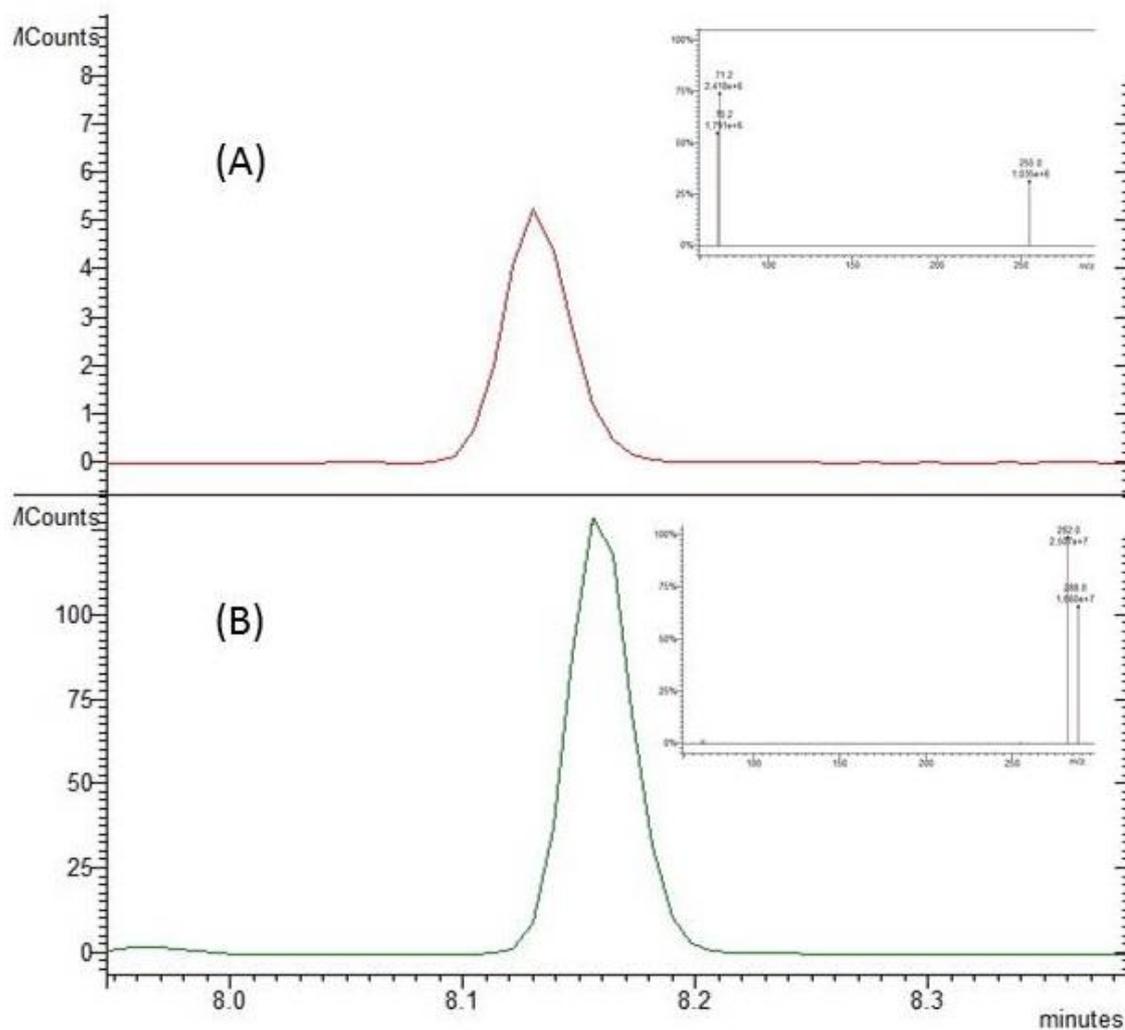


Figura 15: Cromatograma gerado por GC-NCI-MS em uma amostra branco fortificada na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) HCH alfa e (B) hexaclorobenzeno, destacando os respectivos espectros de massa.

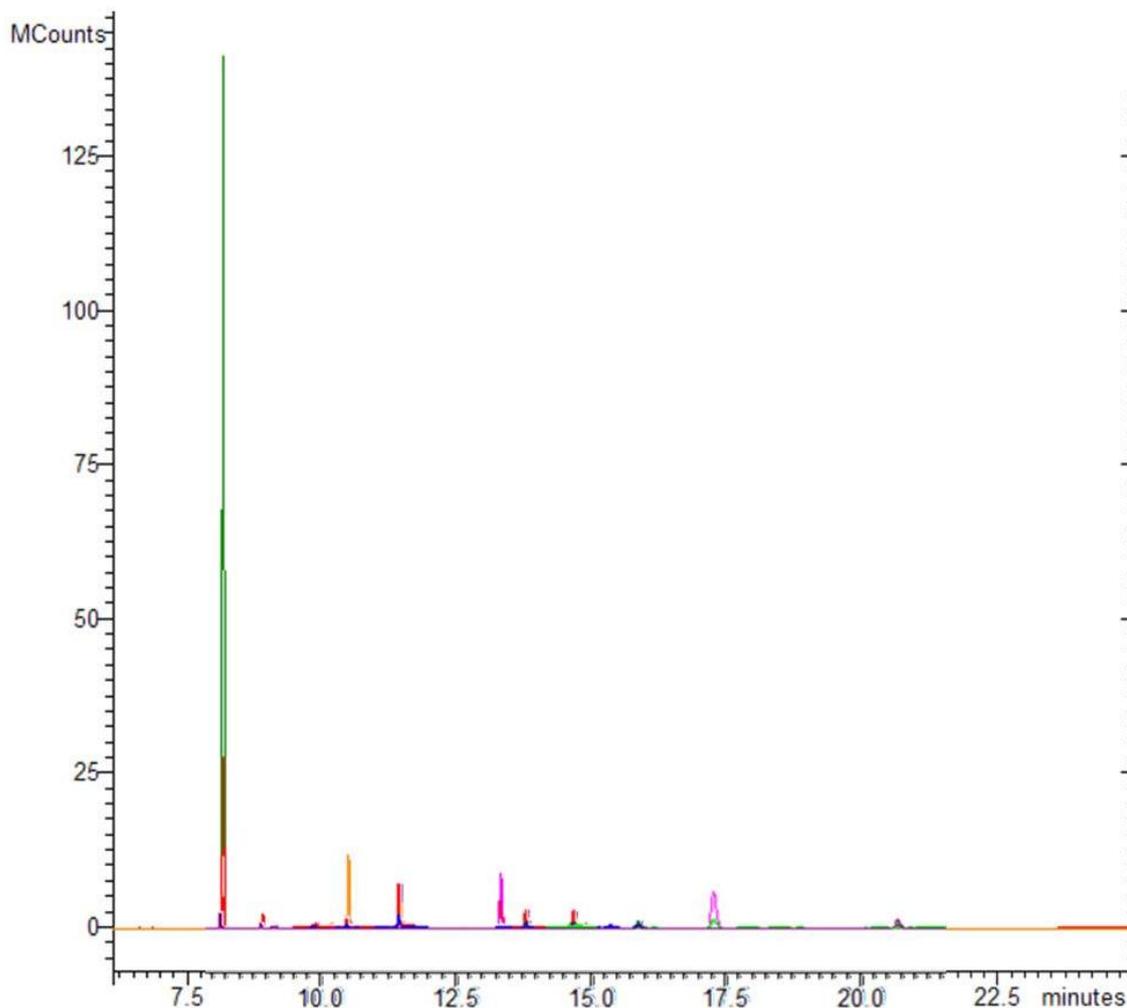


Figura 16: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-NCI-MS a partir de uma amostra branco fortificada em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ com os analitos selecionados.

4.2 Otimização do método de extração e da etapa de limpeza do extrato

Além dos testes de extração com acetonitrila, típicos dos ensaios do método QuEChERS, fez-se alguns testes com hexano, baseados em trabalhos descritos por SUDARYANTO *et al.* (2006), FOCANT *et al.* (2002), SOMEYA *et al.* (2010) e MA *et al.* (2012), devido a alta afinidade dos POPs com gordura, objetivando uma maior eficiência na extração dessas. Também se fez a utilização de álcool etílico acidificado para precipitação das proteínas.

Anteriormente aos 13 testes descritos (item 3.7.1) fez-se um teste comparando a utilização de álcool etílico acidificado com 4% de ácido fórmico e outro sem nas extrações com hexano. Através de testes gravimétricos pôde-se constatar que a utilização do álcool etílico diminui os coextrativos da matriz.

A etapa de partição foi realizada com a adição de sais a fim de promover o efeito *salting out*, pois diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa, fazendo-os migrarem para o solvente orgânico (PRESTES, ADAIME & ZANELLA, 2011). O $MgSO_4$ é considerado um dos mais eficientes removedores de água do meio, sua reação de hidratação é exotérmica, provocando um aquecimento da amostra junto com a solução extratora até uma temperatura de 45 °C, facilitando a extração de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Os 13 ensaios de recuperação foram realizados na concentração de 50 $\mu g L^{-1}$ comparando-se um ponto na matriz com as amostras branco da matriz leite bovino fortificadas. Os resultados foram calculados segundo a Equação 7 e são apresentados na Tabela 11. Os testes com acetonitrila foram os que apresentaram maior percentual de recuperação. O composto mirex não foi recuperado dentro da faixa de aceitação de 70 a 120% (SANCO, 2010) em nenhum dos testes realizados e isso pode ser justificado por se tratar de um composto muito estável e persistente. Por apresentar um K_{OW} de 5,28, o mirex é pouco solúvel em água e se acumula nos tecidos adiposos, o que dificulta sua extração (PINTO, PINTO & FILHO, 2007).

Na etapa de limpeza da amostra foram testados diversos sorventes e combinações desses. Um sorvente que vem sendo usado para matrizes gordurosas é o Zsep[®], porém, os testes realizados com esse sorvente nesse trabalho não foram satisfatórios. Resultados semelhantes foram obtidos por SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY (2013), empregando testes com C_{18} , Zsep[®] e PSA.

A utilização de PSA também é indicada para matrizes gordurosas, já que esse é um sorvente de troca aniônica fraca que tem como principal característica a remoção de coextrativos da matriz como açúcares e gorduras que são capazes de formar ligações de hidrogênio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). Nesse mesmo sentido realizaram-se testes com o sorvente aminopropil (NH_2). Segundo LEHOTAY e colaboradores (2010), a utilização de C_{18} diminui os coextrativos da matriz quando usado na etapa de limpeza dispersiva.

Tabela 11: Valores de recuperação para os testes de extração baseados no método QuEChERS

Compostos	%Rec												
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
2,4 DDD	56	52	45	127	6	219	8	175	190	207	77	83	141
2,4 DDE	59	65	56	180	147	167	155	167	156	208	79	79	76
4,4 DDD	63	72	46	102	134	174	166	139	154	234	75	73	76
4,4 DDE	68	64	56	170	143	166	146	139	149	189	68	67	78
Aldrin	75	73	66	123	114	130	128	112	135	137	66	73	71
Clordano	86	89	82	128	239	125	120	115	121	131	76	83	84
DDT	48	49	43	168	126	173	155	131	146	218	53	56	48
Dieldrin	88	89	79	129	249	136	133	122	132	152	81	88	85
Endosulfam alfa	98	76	65	198	13	348	181	148	166	234	76	78	84
Endosulfam beta	109	76	65	197	159	212	179	148	167	220	78	82	86
Endosulfam sulfato	120	99	88	116	107	181	187	142	167	216	91	102	104
Endrin	75	74	63	168	143	171	164	144	171	204	75	83	79
HCH alfa	35	87	79	175	145	177	170	139	151	187	83	95	98
HCH beta	95	81	86	207	154	177	185	149	168	225	86	85	90
HCH gama	44	81	58	207	153	173	187	152	170	232	86	93	88
Heptacloro	57	83	76	123	117	71	125	119	125	137	75	85	79
Hexaclorobenzeno	85	83	79	119	109	116	112	107	109	118	87	93	89
Mirex	45	39	32	155	142	145	156	124	144	187	40	54	56
Total Comp. Rec.	9	13	7	3	4	2	2	4	1	1	14	15	15

A recuperação em termos de número de compostos em relação à faixa de recuperação estão apresentadas nas Figuras 17 e 18, respectivamente. É importante ressaltar que, em um primeiro momento, os testes com hexano parecem ter apresentado piores recuperações. Em geral essas recuperações foram muito acima da faixa de recuperação aceita para compostos em nível de traço, que é entre 70 e 120% (SANCO, 2010). Porém, a SANCO (2013) em sua nova diretriz para controle de qualidade e validação de métodos para agrotóxicos em alimentos estabelece que para rotina pode-se considerar aceitável uma faixa de recuperação entre 60 e 140%. As altas recuperações na extração com hexano ocorrem devido a grande quantidade de coextrativos que ele é capaz de remover da matriz, afetando a resposta cromatográfica, como pode ser visualizado na Figura 18. Por isso, a acetonitrila é o solvente mais indicado para a extração de compostos de diferentes polaridades e minimiza a extração de compostos lipofílicos da matriz como ceras, gorduras e pigmentos (PRESTES *et al.*, 2009).

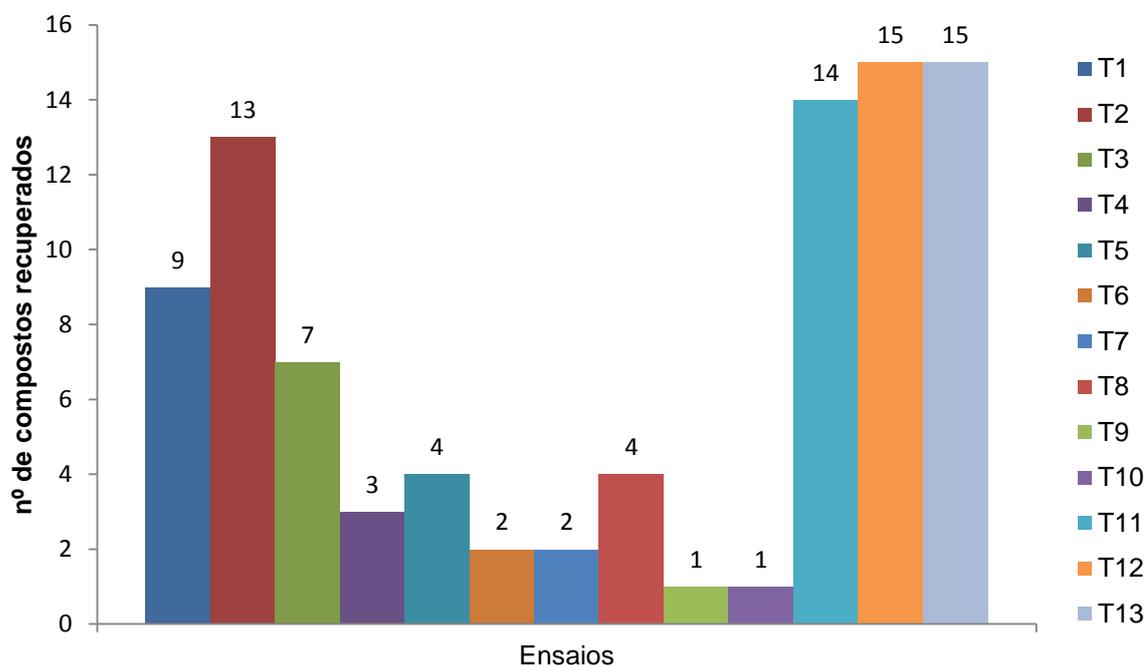


Figura 17: Número de compostos recuperados para cada ensaio dentro da faixa de aceitação (70 a 120%).

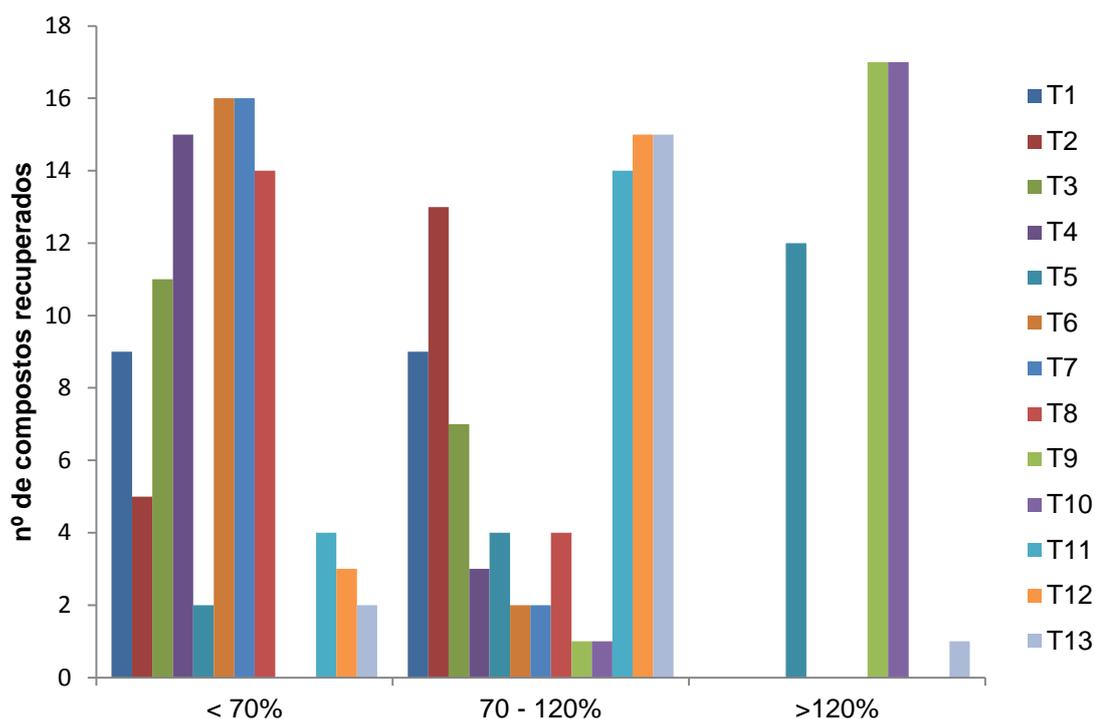


Figura 18: Percentual de recuperação para os testes avaliados.

Baseado nesses resultados e considerando as orientações da SANCO (2013), os melhores resultados apresentaram recuperações similares. Portanto, optou-se pelo teste 2 devido ao menor consumo de sorvente e pelo custo do mesmo. Assim, o método selecionado poderia ser facilmente aplicado em análises de rotina por ser prático, rápido e oferecer baixo custo por amostra. O custo aproximado dos sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato está apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Custo aproximado, em reais, dos sorventes utilizados para os testes de limpeza do extrato.

Sorvente	Valor aproximado (R\$) para 100 g
C ₁₈	900,00
PSA	1200,00
Z-SEP	2400,00
NH ₂	900,00
Si	450,00

Fonte: Sigma Aldrich (2013)

Assim sendo, o método QuEChERS modificado utilizado na validação do método analítico proposto está apresentado na Figura 19. Uma alíquota de 6 mL de leite materno foi extraída com 6 mL de Acetonitrila sob agitação por um minuto em vortex. A etapa de partição foi realizada com a adição de sais (2,6 g $MgSO_4$ e 0,6 g NaCl) seguida de agitação por um minuto e posterior centrifugação a 3400 rpm (2369 x g) por 8 min a 0 °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 C_{18} . Agitou-se por 1 min e centrifugou-se por 10 min a 3500 rpm (1591 x g) a 0 °C. Todo extrato foi filtrado e desse coletou-se 2 mL que foram submetidos a etapa de evaporação em fluxo suave de nitrogênio (Turbovap[®]) por 30 min a 60 °C. O extrato foi redissolvido em 200 μ L de acetonitrila e analisado por GC-NCI-MS.

Cabe ressaltar que na etapa de extração foi realizada a adição de 50 μ L de uma mistura de água: ácido fórmico (1:1, v/v) a fim de facilitar a precipitação das proteínas. Esse método de extração foi utilizado tanto para as amostras de leite bovino quanto de leite materno.

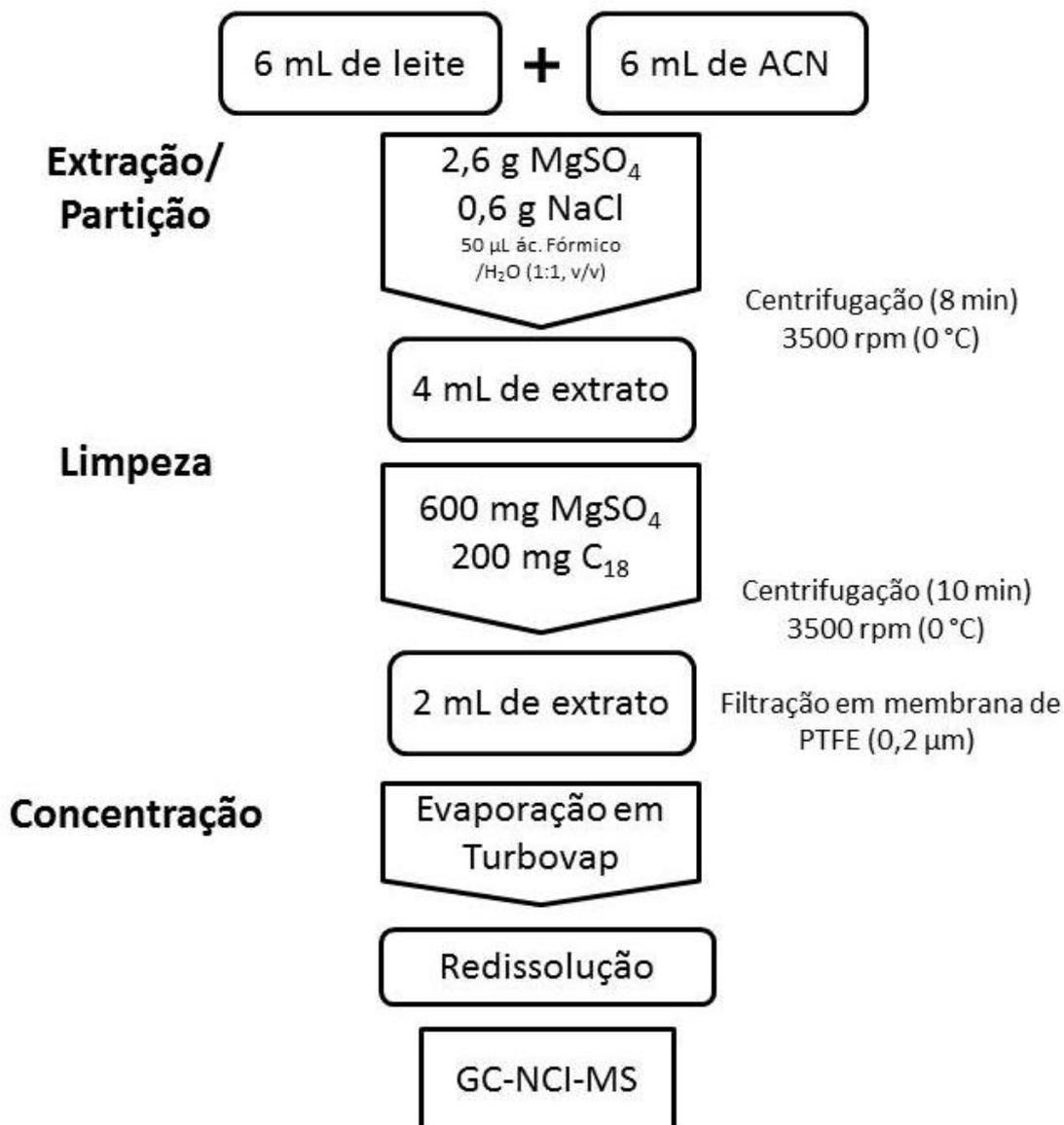


Figura 19: Fluxograma do preparo de amostra otimizado.

4.3 Validação do método

O processo de validação do método proposto seguiu o procedimento de preparo de amostra descrito na Figura 19, com determinação por GC-NCI-MS. Os compostos determinados estão descritos no item 3.4. O método foi inicialmente validado para leite bovino e posteriormente a validação foi expandida para leite materno.

4.3.1 Seletividade e sensibilidade

A seletividade do método foi assegurada pela comparação das amostras branco da matriz com as amostras fortificadas tanto para leite bovino quanto para leite materno. Esses resultados são apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Também foram avaliados os solventes e reagentes através da aplicação do método de extração proposto sem a amostra e comparados com um padrão fortificado na matriz, não sendo detectada a presença de nenhum coextrativo que pudesse coeluir com os analitos de interesse (Figura 20).

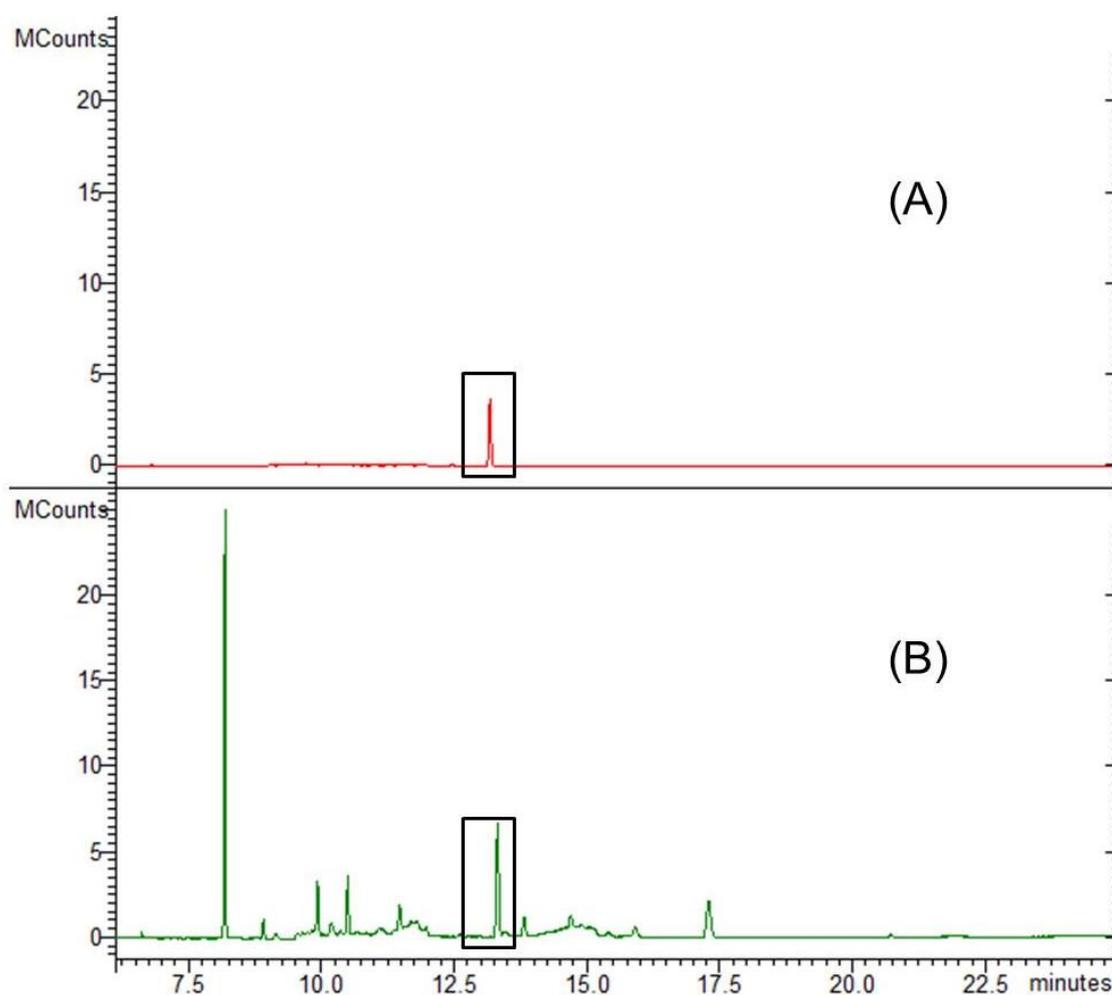


Figura 20: Avaliação da presença de interferentes nos solventes e reagentes apresentando cromatogramas obtidos por GC-NCI-MS: (A) do "branco de reagente" e (B) da amostra branco fortificada no extrato da matriz (leite bovino) na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Em destaque: Padrão interno.

4.3.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método proposto foi assegurada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica. As Tabelas 13, 14 e 15 apresentam os valores de coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear para os compostos selecionados para a curva em acetonitrila, em extrato da matriz leite bovino e em extrato da matriz de leite materno, respectivamente.

Tabela 13: Regressão linear para a curva analítica preparada em acetonitrila.

Compostos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r^2
2,4 DDD	10 - 50	3509,12	436	0,992
2,4 DDE	10 - 50	56514,84	-129782,40	0,993
4,4 DDD	5 - 50	25380,75	-16603,08	0,998
4,4 DDE	10 - 50	8303,16	-18820,40	0,997
Aldrin	1 - 50	329446,15	-289549,26	0,998
DDT I	5 - 50	23207,39	58528,27	0,989
Dieldrin	1 - 50	74695,08	-33932,68	0,997
Endosulfam alfa	1 - 5-	114803,28	-122963,72	0,997
Endosulfam beta	5 - 50	63173,71	-99094,33	0,996
Endosulfam sulfato	5 - 50	121720,20	-349392,81	0,979
Endrin	5 - 50	9827,36	-4834,43	0,988
HCH alfa	1 - 50	160230,54	-109577,76	0,998
HCH beta	5 - 50	77698,11	-81387,24	0,995
HCH gama	10 - 50	51682,92	-21999,60	0,986
Heptacloro	1 - 50	245022,59	-173485,69	0,994
Hexaclorobenzeno	1 - 50	4731770,31	-4687024,26	0,997
Mirex	5 - 50	70846,68	-164582,22	0,992

Tabela 14: Regressão linear para a curva analítica preparada em amostra branco de leite bovino.

Composto	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r^2
2,4 DDD	10 - 50	120825,71	549876,19	0,997
2,4 DDE	1 - 50	1009437,94	1828311,65	0,994
4,4 DDD	1 - 50	362512,30	305170,47	0,940
4,4 DDE	1 - 50	939490,14	80381122,73	0,967
Aldrin	5 - 50	4599955,34	-7984763,01	0,990
DDT I	1 - 50	920511,90	157413,32	0,991
DDT II	1 - 50	358953,07	-243985,81	0,954
Dieldrin	5 - 50	1858006,16	-5677034,25	0,986
Endosulfam alfa	5 - 50	2622897,26	-1890595,89	0,993
Endosulfam beta	1 - 50	495691,04	-442435,45	0,992
Endosulfam sulfato	1 - 50	6031291,25	-1354812,11	0,996
Endrin	5 - 50	210831,39	23542,52	0,965
HCH alfa	1 - 50	3904988,37	-5432426,60	0,991
HCH beta	1 - 50	3405745,23	-4543750,73	0,990
HCH gama	1 - 50	3720382,13	-6548087,41	0,988
Heptacloro	1 - 50	4019405,05	-3321483,90	0,983
Hexaclorobenzeno	1 - 50	7640841,43	-12313097,00	0,988
Mirex	1 - 50	4395671,27	110632183,19	0,969

Tabela 15: Regressão linear para a curva analítica preparada em amostra branco de leite materno.

Compostos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r^2
2,4 DDE	5 - 50	125291,30	41890,55	0,904
Aldrin	5 - 50	353741,92	-108832,88	0,996
DDT I	5 - 50	151469,21	-344429,81	0,991
Dieldrin	5 - 50	171167,19	-357673,29	0,994
Endosulfam alfa	5 - 50	199592,42	-245512,14	0,999
Endosulfam beta	1-50	23207,90	204048,53	0,984
Endosulfam sulfato	1-50	709984,48	-1090796,50	0,998
Endrin	10 - 50	28131,60	-11123,60	0,996
HCH alfa	1-50	221200,88	-173919,22	0,999
HCH beta	1-50	130174,92	-85506,78	0,999
HCH gama	5 - 50	82321,98	-96990,85	0,996
Heptacloro	1-50	599156,33	-597103,85	0,998
Hexaclorobenzeno	1-50	3212621,57	-2724280,64	0,999
Mirex	5 - 50	120666,56	168710,66	0,998

A maioria dos compostos apresentou faixa linear entre 1 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de determinação maior que 0,9 para todas os compostos, o que está de acordo com o estabelecido pelo INMETRO (2010).

4.3.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de quantificação do instrumento (LQ_i) foi adotado como sendo o menor ponto da curva analítica. Conforme descrito no item 3.10.3, o limite de detecção (LD_i) foi calculado dividindo-se o valor do LQ_i por 3,33. Para determinação do LQ_m e LD_m do método dividiu-se o valor do instrumento pelo fator de concentração do método (fator = 10). Os valores de LD e LQ do instrumento e do método estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Limites de quantificação e de detecção do instrumento e do método para leite bovino.

Composto	LQi ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDi ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDm ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4 DDD	10	3,0	1,0	0,30
2,4 DDE	1	0,3	0,1	0,03
4,4 DDD	1	0,3	0,1	0,03
4,4 DDE	1	0,3	0,1	0,03
Aldrin	5	1,5	0,5	0,15
DDT I	1	0,3	0,1	0,03
DDT II	1	0,3	0,1	0,03
Dieldrin	5	1,5	0,5	0,15
Endosulfam alfa	5	1,5	0,5	0,15
Endosulfam beta	1	0,3	0,1	0,03
Endosulfam sulfato	1	0,3	0,1	0,03
Endrin	5	1,5	0,5	0,15
HCH alfa	1	0,3	0,1	0,03
HCH beta	1	0,3	0,1	0,03
HCH gama	1	0,3	0,1	0,03
Heptacloro	1	0,3	0,1	0,03
Hexaclorobenzeno	1	0,3	0,1	0,03
Mirex	1	0,3	0,1	0,03

LQi – Limite de quantificação do instrumento;

LDi – Limite de detecção do instrumento;

LQm – Limite de quantificação do método;

LDm – Limite de detecção do método.

Tabela 17: Limites de quantificação e de detecção do instrumento e do método para leite materno.

Compostos	LQi ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDi ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDm ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4 DDE	5	1,5	0,5	0,15
Aldrin	5	1,5	0,5	0,15
DDT I	5	1,5	0,5	0,15
Dieldrin	5	1,5	0,5	0,15
Endosulfam alfa	5	1,5	0,5	0,15
Endosulfam beta	1	0,3	0,1	0,03
Endosulfam sulfato	1	0,3	0,1	0,03
Endrin	10	3,0	1,0	0,30
HCH alfa	1	0,3	0,1	0,03
HCH beta	1	0,3	0,1	0,03
HCH gama	5	1,5	0,5	0,15
Heptacloro	1	0,3	0,1	0,03
Hexaclorobenzeno	1	0,3	0,1	0,03
Mirex	5	1,5	0,5	0,15

LQi – Limite de quantificação do instrumento;

LDi – Limite de detecção do instrumento;

LQm – Limite de quantificação do método;

LDm – Limite de detecção do método.

Visto que não há legislação para POPs em leite materno, atingir baixos limites de quantificação é importante para se ter um panorama da contaminação em nível de traço. Os limites de detecção do método para leite bovino variaram de 0,03 a 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se for avaliado esse limite em termos de gordura, considerando que a cada 100 g de leite integral tem-se 3 g de gordura, os limites de detecção variariam de 0,001 a 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ de gordura para o leite bovino.

No caso do leite materno, os limites de detecção do método variaram de 0,03 a 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, mas o leite materno contém em média 4 g de gordura a cada 100 mL. Assim, nesse caso, os limites de detecção são mais baixos, variando entre 0,00075 e 0,0075 $\mu\text{g g}^{-1}$. Estes valores são bastante adequados para a aplicação do método em monitoramentos de POPs em leite materno.

4.3.4 Precisão e exatidão

Os ensaios de recuperação para avaliar a precisão do método foram realizados em 4 níveis de fortificação (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), cada nível com 7 réplicas. A Tabela 18 apresenta os resultados de recuperação para os compostos avaliados bem como os respectivos RSD%, esses dados podem ser melhor visualizados na figura 21. Para a ampliação do escopo em leite materno foi realizado um nível de fortificação (2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), os resultados de recuperação e RSD% para esta matriz estão apresentados na Tabela 19 e também na figura 22. A recuperação foi calculada a partir da equação 7 e o RSD% conforme Equação 6. Os critérios de aceitação foram baseados na faixa de aceitação entre 70 e 120% de recuperação e RSD% < 20% (SANCO, 2010).

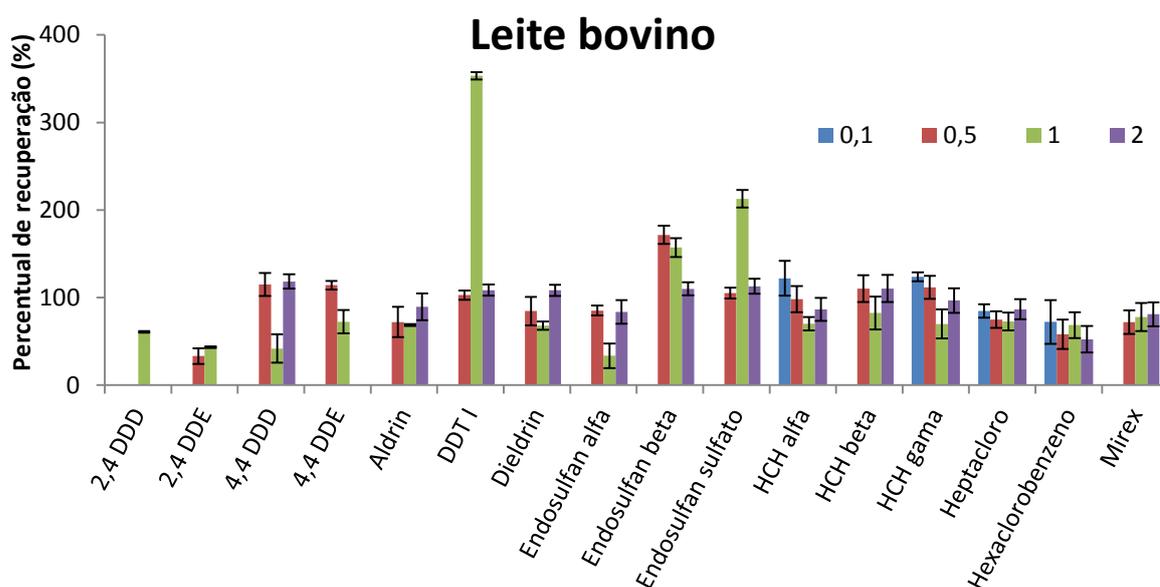


Figura 21: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite bovino.

Tabela 18: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite bovino.

Compostos	Nível de Fortificação							
	0,1 µg L ⁻¹		0,5 µg L ⁻¹		1,0 µg L ⁻¹		2,0 µg L ⁻¹	
	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%
2,4 DDD	n.d.		n.d.		61		n.d.	
2,4 DDE	n.d.		33	9	43		n.d.	
4,4 DDD	n.d.		115	13	42	16	118	8
4,4 DDE	n.d.		114	5	73	13		
Aldrin	n.d.		72	17	69	0	90	15
DDT I	n.d.		103	5	353	4	109	6
Dieldrin	n.d.		85	16	68	5	108	6
Endosulfam alfa	n.d.		85	6	33	14	84	13
Endosulfam beta	n.d.		171	10	157	11	110	8
Endosulfam sulfato	n.d.		105	6	213	10	113	9
Endrin	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
HCH alfa	122	20	98	15	70	8	87	13
HCH beta	n.d.		110	15	82	19	110	15
HCH gama	124	5,	112	13	70	17	96	14
Heptacloro	85	8	75	10	73	10	87	11
Hexaclorobenzeno	72	25	58	17	69	15	52	15
Mirex	n.d.		72	13	78	16	81	14

n.d. – não detectado.

Tabela 19: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite materno.

Compostos	Rec %	RSD %
2,4 DDE	120	4,89
Aldrin	96	4,87
Dieldrin	103	4,63
Endosulfam alfa	104	2,38
Endosulfam beta	78	1,63
Endosulfam sulfato	101	18,92
Endrin	96	9,66
HCH alfa	115	1,50
HCH beta	114	0,94
Heptacloro	102	2,50
Hexaclorobenzeno	78	1,45
Mirex	62	16,45

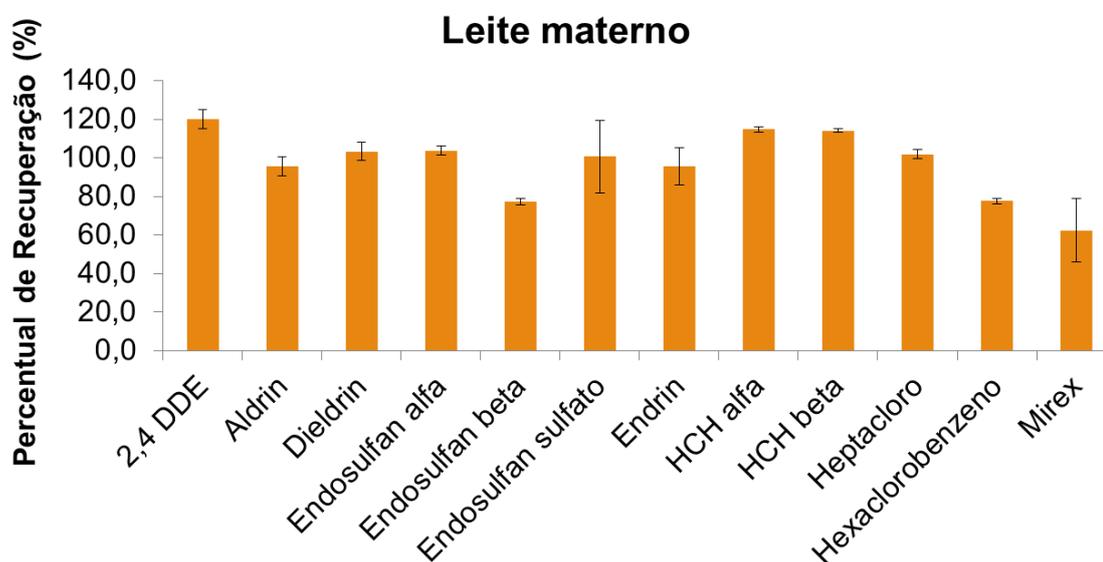


Figura 22: Percentuais de recuperação e RSD% do método de extração de POPs em leite materno para o nível de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Em termos de recuperação os compostos derivados do DDT não tiveram bons resultados tanto para o leite bovino, como para o leite materno. JEONG e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes, visto que esses compostos

são mais lipofílicos e podem ter sido removidos junto com a gordura na etapa de limpeza com C_{18} .

No caso do leite bovino, a fortificação de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ teve resultados baixos de recuperação para quase todos os compostos avaliados, isso pode ser devido a algum erro instrumental. O composto mirex apresentou baixa recuperação para o leite materno, mas isso é explicado pelo seu elevado K_{OW} que faz com que esse seja de difícil remoção dos tecidos gordurosos com o uso de acetonitrila (PINTO, PINTO & FILHO, 2007).

Uma nova classe de POPs foi avaliada nesse trabalho. Os chamados novos POPs incluem endosulfam alfa e beta e o produto de biotransformação endosulfam sulfato. Esses compostos ainda não são frequentemente determinados nos estudos de POPs nas mais diversas matrizes, ou analisa-se apenas o produto de biotransformação como pode ser visto em MANNETJE e colaboradores (2013). Os valores de recuperação e RSD% para esses compostos ficaram dentro da faixa aceitável (SANCO, 2010) tanto para o leite bovino como para o leite materno.

4.3.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária (RSD_{PI}) foi avaliada realizando-se nova etapa de extração de amostra fortificada e confecção da curva analítica no extrato da matriz em dias diferentes da repetibilidade. Nessa etapa do processo de validação um nível de fortificação foi realizado na concentração de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 20 apresenta os valores de faixa linear, inclinação, interceptação e coeficiente de correlação para a precisão intermediária. Os valores de recuperação e RSD_{PI} estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 20: Regressão linear para a curva analítica preparada em extrato da matriz (leite bovino)

Compostos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r^2
2,4 DDE	20 - 50	32959,06	29024,90	0,981
Aldrin	1 - 50	290431,41	245008,78	0,999
DDT I	1 - 50	102327,76	153517,86	0,994
Dieldrin	5 - 50	152523,26	-91483,89	0,998
Endosulfam alfa	1 - 50	175781,70	493001,84	0,998
Endosulfam beta	1 - 50	68193,03	149775,68	0,972
Endosulfam sulfato	1 - 50	539226,84	-275893,59	0,996
Endrin	5 - 50	20647,52	12107,68	0,965
HCH alfa	1 - 50	208500,56	-112764,87	0,998
HCH beta	1 - 50	118551,66	-66353,13	0,998
HCH gama	1 - 50	62745,71	27403,08	0,980
Heptacloro	1 - 50	444826,22	-70455,05	0,998
Hexaclorobenzeno	1 - 50	2909116,20	-1900161,02	0,998
Mirex	5 - 50	88305,55	91183,72	0,989

Tabela 21: Percentuais de RSD_{PI} e recuperação do método de extração de POPs em leite bovino.

Compostos	Rec%	$RSD_{PI}\%$
2,4 DDE	56	15
Aldrin	62	2
DDT I	104	6
Dieldrin	79	4
Endosulfam alfa	80	5
Endosulfam beta	60	4
Endosulfam sulfato	88	7
Endrin	82	5
HCH alfa	75	2
HCH beta	90	3
HCH gama	76	2
Heptacloro	76	6
Hexaclorobenzeno	46	1
Mirex	46	4

Apesar dos valores do coeficiente de correlação da curva analítica terem se mantido acima de 0,9 na precisão intermediária e o $RSD_{PI}\%$ bem abaixo de 20% (SANCO, 2013), a recuperação para o nível de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi menor para alguns compostos (figura 23). Ainda assim, algumas melhoras foram percebidas, como a recuperação do composto endrin que na etapa anterior não foi detectado.

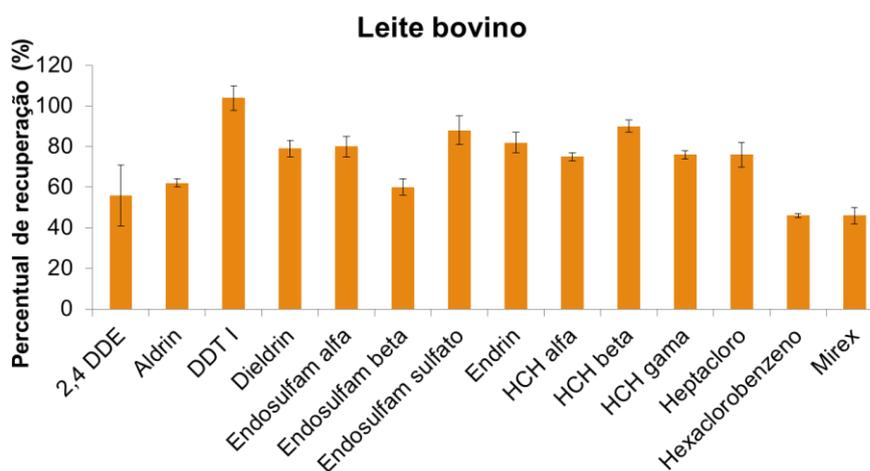


Figura 23: Percentuais de recuperação e RSD_{PI} do método de extração de POPs em leite materno para o nível de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.6 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado utilizando-se a Equação 9. Nesse caso, os analitos que apresentam resultados de efeito matriz superior a 20% sofrem efeito significativo da matriz sob sua resposta cromatográfica (CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008). Também foi feita a comparação entre a curva no extrato da matriz leite bovino com a curva no extrato da matriz leite materno, buscando verificar o comportamento de cada matriz. Os resultados dessa avaliação estão descritos nas Tabelas 22 e 23.

Quando se tem valores de efeito matriz superiores a 50% as curvas em solvente não são adequadas para determinação dos analitos na matriz em questão, já que são fontes de erro quantitativo bastante importantes (ECONOMOU et al., 2009). Quanto menor a concentração dos analitos, mais significativo é o efeito da matriz sobre eles.

Tabela 22: Avaliação do efeito matriz dos POPs determinados por GC-NCI-MS em extrato de leite bovino comparados com soluções preparadas em acetonitrila.

Compostos	Efeito Matriz (%) leite bovino em relação ao solvente
2,4 DDE	-42
Aldrin	-12
DDT I	341
Dieldrin	104
Endosulfam alfa	53
Endosulfam beta	8
Endosulfam sulfato	343
Endrin	110
HCH alfa	30
HCH beta	53
HCH gama	21
Heptacloro	82
Hexaclorobenzeno	-38
Mirex	25

Tabela 23: Avaliação do efeito matriz dos POPs determinados por GC-NCI-MS em extrato da matriz leite materno comparados com extrato da matriz leite bovino.

Compostos	Efeito Matriz (%) leite materno em relação ao leite bovino
2,4 DDE	280,14
Aldrin	21,80
DDT I	48,02
Dieldrin	12,22
Endosulfam alfa	13,55
Endosulfam beta	-65,97
Endosulfam sulfato	31,67
Endrin	36,25
HCH alfa	6,09
HCH beta	9,80
HCH gama	31,20
Heptacloro	34,69
Hexaclorobenzeno	10,43
Mirex	36,65

As figuras 24 e 25 apresentam as curvas preparadas no solvente, no extrato da matriz leite bovino e no extrato da matriz leite materno para os compostos hexaclorobenzeno e heptacloro, respectivamente. No caso do hexaclorobenzeno, percebe-se um efeito matriz significativo da curva preparada em extrato da matriz (leite bovino) em relação à curva no solvente (acetoneitrila). Esse efeito é menos pronunciado quando comparadas ambas as curvas no extrato da matriz. Para o heptacloro houve um efeito matriz positivo em relação ao solvente, sendo esse bem pronunciado, da ordem de 80% para o leite bovino. Na avaliação do leite materno em relação ao leite bovino também ocorreu um efeito positivo de cerca de 30%.

Como era esperado, o efeito matriz frente ao solvente foi significativo, pois somente dois dos compostos tiveram um efeito abaixo de 20%. Para a comparação entre leite bovino e leite materno, esperava-se uma semelhança maior entre as matrizes, o que não foi evidenciado. O efeito matriz apresentou-se bem pronunciado para alguns compostos que tem maior afinidade com a gordura, como no caso do

2,4 DDE (JEONG, 2012). Nesse caso, uma curva no solvente (acetonitrila) ou mesmo uma curva no extrato da matriz leite bovino não seriam indicadas para a determinação de POPs em leite materno.

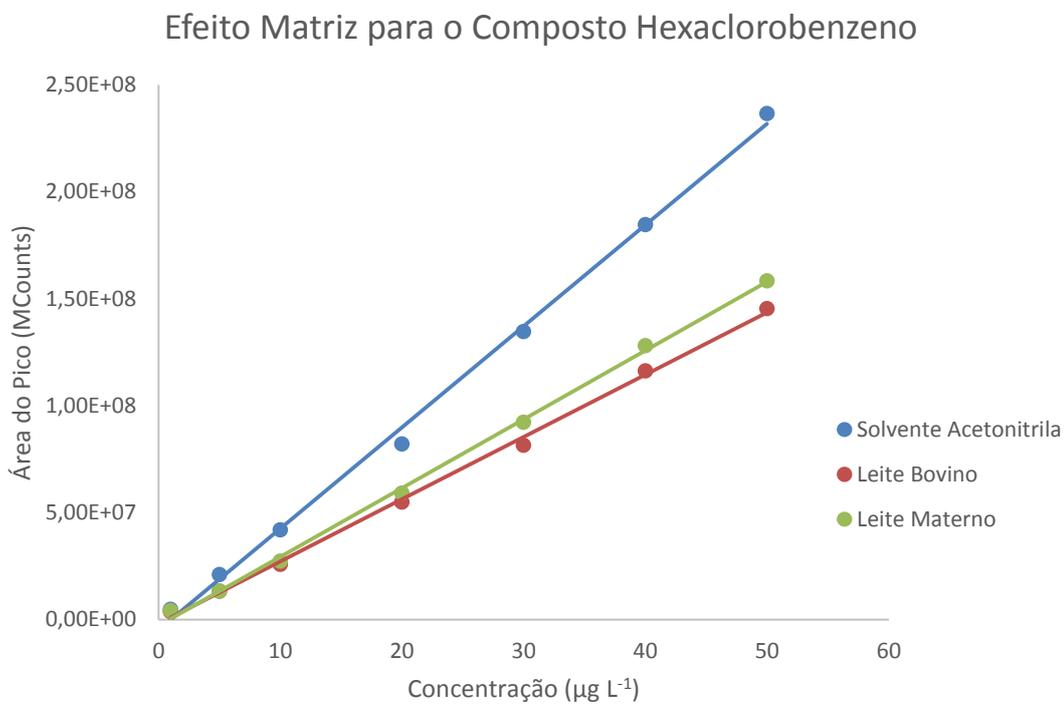


Figura 24: Efeito matriz para o composto hexaclorobenzeno.

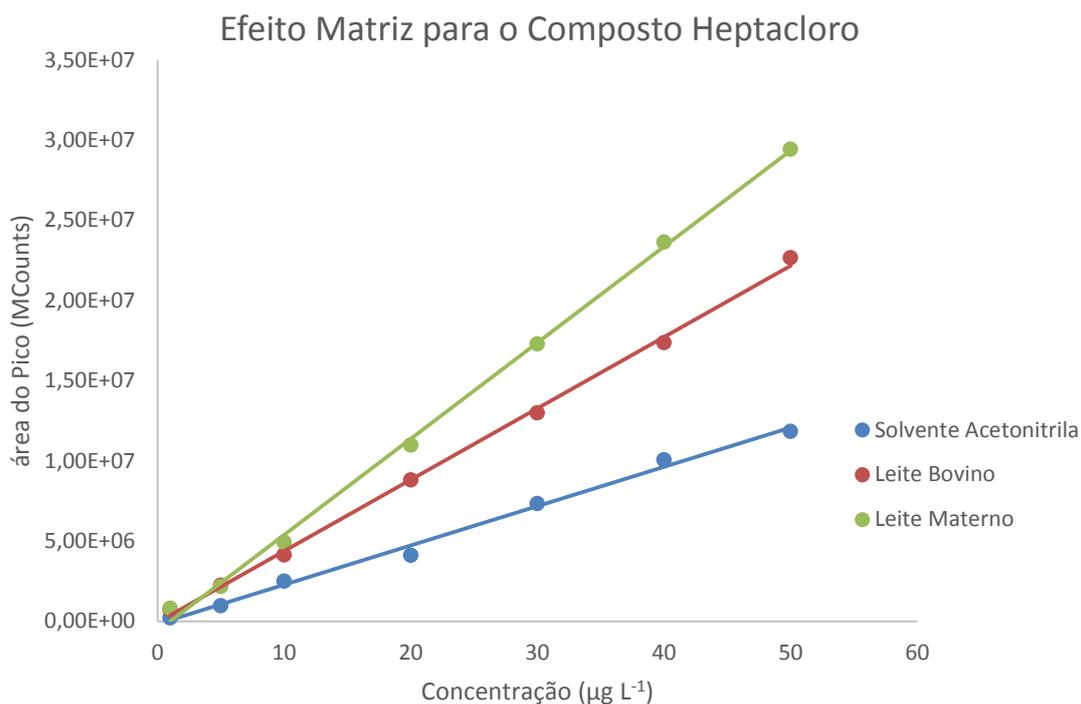


Figura 25: Efeito matriz para o composto heptacloro.

4.4 Aplicação do método desenvolvido

O método proposto foi aplicado em 20 amostras coletadas em cidades do estado do Rio Grande do Sul de acordo com o mapa apresentado na Figura 8. A Tabela 24 apresenta os resultados encontrados para os POPs determinados pelo método. O composto DDT não pode ser avaliado para as amostras devido a uma queda de sinal do equipamento.

Em relação ao questionário aplicado, pôde-se perceber que 75% das mães residiam a mais de 10 anos na zona urbana das cidades onde moravam. Isso pode ser percebido pelos baixos níveis de contaminação encontrados no leite, já que essas não estavam diretamente expostas. Ainda, 65% dessas mães já estavam na segunda ou terceira gravidez. Desse modo, os POPs acumulados em seu organismo já não eram referentes à acumulação durante a vida, mas do tempo entre uma gravidez e outra.

A maioria das mães participantes tinha idade menor ou igual a 30 anos e não residia próximo a indústrias químicas. Ainda assim, 65% delas residem próximas de zonas rurais, o que não implicou, pelos resultados, na contaminação direta.

Mais de 80% das mães alimentavam-se apenas de peixes de água doce e 80% possuíam uma dieta alimentar mista, rica em carne, leite e ovos. Além disso, a água que consumiam era da Corsan ou água mineral. Apenas 10% das mães avaliadas tomavam água de poço.

Quanto ao tipo de leite avaliado, 25% eram amostras de colostro e o restante leite maduro. Apesar disso, notou-se que as amostras de colostro apresentavam maior contaminação em relação as amostras de leite maduro.

Das 20 amostras avaliadas, apenas 5 não tiveram nenhum dos compostos avaliados detectados. As demais apresentaram pelo menos contaminação por um desses compostos, mas todas abaixo do LQ (entre 2,5 e 25 ng g⁻¹ de gordura) do método. Comparado com o trabalho desenvolvido por GEBREMICHAEL, BIRHANU & TESSEMA (2013), as amostras naquela região pesquisada apresentaram resultados com maior concentração desses analitos (entre 0,389 e 12,7 µg g⁻¹ de gordura). Ou seja, apesar do trabalho ter apresentado limites inferiores, as amostras eram menos contaminadas.

LUZARDO e colaboradores (2013) detectaram hexaclorobenzeno em 100% das amostras que avaliaram, tanto em leite maduro como colostro. Que foi, como no caso desse trabalho, o composto que apresentou maior frequência nas amostras avaliadas. Eles também perceberam que as amostras de colostro apresentavam maior presença de POPs. Ao contrário desse trabalho, não encontraram HCH alfa e Heptacloro nas amostras avaliadas, porém, HCH beta e gama também estavam presentes, mas em concentrações mais elevadas. Assim como nesse trabalho, os novos POPs, endosulfan alfa, beta e sulfato não foram detectados nas amostras. Já o composto mirex foi detectado em ambos os métodos.

Esses resultados mostram que, apesar de persistentes, nas amostras de leite materno das mães avaliadas esses compostos não estão significativamente bioacumulados.

Trabalhos futuros, com um número de amostras maior, poderão dar um panorama geral da ocorrência de POPs em leite materno no estado.

Tabela 24: Resultado da análise das amostras de leite materno coletadas no estado do Rio Grande do Sul.

COMPOSTO \ AMOSTRAS	Tupanciretã		Tiradentes do Sul/Três Passo						Bagé					Cachoeira do Sul			Bossoroca			
	P31	P32	P40	P41	P43	P46	P47	P48	P57	P58	P59	P60	P61	P65	P66	P68	P94	P93	P89	P88
HCH ALFA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
HEXACLOROBENZENO	n.d.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	n.d.	<LQ	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ						
HCH BETA	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HCH GAMA	n.d.	<LQ	n.d.	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HEPTACLORO	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ALDRIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,4 DDE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ENDOSULFAM ALFA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DDT	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DIELDRIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ENDRIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ENDOSULFAM BETA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ENDOSULFAM SULFATO	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MIREX	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ

n.d. – Não detectado;

n.a. – Não analisado;

<LQ – menor do que o limite de quantificação

5 CONCLUSÃO

O uso abundante de agrotóxicos e compostos relacionados pode causar a contaminação dos sistemas hídricos, solos e alimentos podendo entrar facilmente em contato com o homem. Apesar de terem sido banidos, os POPs ainda apresentam resíduos no ambiente. Dessa forma, esse estudo foi baseado no desenvolvimento de um método analítico para a determinação de POPs em leite materno por GC-NCI-MS.

Apesar de ter sido inicialmente desenvolvido e validado para leite bovino, pode ser realizada uma avaliação do método proposto para leite materno. A otimização do método mostrou-se eficaz para a análise de leite materno e determinação de 14 POPs utilizando o sistema GC-MS no modo SIM com fonte de ionização química negativa (NCI).

Mesmo apresentando composição semelhante, pôde-se perceber diferenças entre as matrizes leite bovino e leite materno. A maioria dos POPs apresentou efeito matriz significativo quando comparou-se as curvas preparadas em extrato da matriz. Desse modo destaca-se a importância da utilização de uma curva preparada no extrato da matriz leite materno para análise desse tipo de amostra.

Sabe-se que, a limpeza do extrato com C₁₈ contribuiu para as baixas recuperações dos compostos altamente lipofílicos como DDT e seus derivados. Entretanto, para a maioria dos compostos e também para garantir uma limpeza mais eficiente do extrato, o uso de C₁₈ foi necessário.

O método validado apresentou, para leite materno, recuperações entre 62 e 120%, com valores de precisão dentro da faixa aceitável (RSD < 19%). A linearidade da curva analítica foi mantida para todos os POPs em estudo, bem como o coeficiente de determinação que foi superior a 0,9. Os limites de detecção do método para leite materno em termos de percentual de gordura variaram de 0,75 a 7,5 ng g⁻¹ e os limites de quantificação do método variaram de 2,5 a 25 ng g⁻¹ de gordura.

O método foi aplicado para 20 amostras de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Dessas amostras, apenas 25% não apresentaram contaminação pelos POPs estudados. As demais apresentaram valores menores que o LQ. Esses resultados eram esperados, pois a maioria das amostras foi coletada de mulheres

que vivem nas cidades e não tem contato direto com os agrotóxicos. Trata-se de um bom indício de que aos poucos a concentração de POPs no ambiente e nos alimentos está diminuindo.

Dessa forma, o método validado foi eficaz na determinação de POPs em leite materno, atingindo limites da ordem de ng g^{-1} . As figuras de mérito apresentaram-se dentro dos parâmetros de validação exigidos pelos órgãos normativos. O método mostrou ser uma alternativa para aplicação em análises de rotina devido ao rápido e eficiente preparo de amostra, com baixo consumo de solventes e reagentes, bem como com uma determinação sensível e seletiva obtida pelo emprego da GC-NCI-MS.

Os compostos Endosulfam alfa e beta, bem como seu produto de biotransformação endosulfam sulfato são considerados POPs desde 2011, por isso são poucos os trabalhos sobre POPs que incluem esses compostos nos métodos desenvolvidos. Em vista disso, o método validado pode servir de referência para trabalhos futuros sobre desenvolvimento de métodos para determinação de novos POPs.

Cabe destacar que o trabalho é inédito na área de determinação de POPs em leite materno empregando GC-NCI-MS, podendo servir de base para trabalhos futuros nessa área, inclusive com a expansão de escopo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido à impossibilidade de detecção dos compostos derivados do DDT no modo SIM devido a interferentes da matriz que continham os mesmos íons monitorados, poderá ser desenvolvido um método no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) a fim de aumentar a seletividade para esses compostos. Juntamente com isso poderão ser incluídos os compostos do tipo PCBs, toxafeno e clordano que foram suprimidos desse trabalho pelos mesmos motivos. Para o composto toxafeno poderá ser desenvolvido um método exclusivo, já que esse é de difícil detecção e quantificação em métodos multirresíduo.

Em termos de coleta e análise de amostras, um aspecto importante a ser avaliado é a realização de coletas em diferentes épocas do ano, avaliado a possibilidade de aumento ou não da presença de agrotóxicos e POPs devido a, por exemplo, volatilidade desses.

Sugere-se, também, uma avaliação da água potável ingerida pelas mães, já que essa pode ser uma das fontes de contaminação das mesmas.

7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

No LARP os resíduos gerados, tanto sólidos como líquidos, são encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, rotulados e devidamente separados. A destinação correta desses resíduos é feita por uma empresa terceirizada especializada, licenciada para essa finalidade.

8 REFERÊNCIAS

AMAP. **Programa de Avaliação e Monitoramento do Ártico**. Disponível em < <http://www.amap.no>>. Acessado em: novembro 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA (PARA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)** - relatório de atividades de 2011 e 2012. Disponível em < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: dezembro 2013.

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

ARTICLES OF GENERAL INTEREST. How safe are thermal vaporizers? *Food and Cosmetics Toxicology*. v. 2, p. 61-81, 1964.

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

BOER, J.; FIEDLER, H. Persistent organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**. v 46, p. 70-71, 2013.

CAMARA, F. F. M.. **Leonardo da Vinci e Giampietrino: a Virgem amamentando o Menino e São João batista criança em adoração, do museu de arte de São Paulo**. Tese de Doutorado. Unicamp. Campinas. SP. 2009.

CARDOSO, M. H. W. M., NÓBREGA, A. W. & ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso EM tomates. **Revista Analítica**. V. 34, p. 48-5, 2008.

CHIARADIA, M. T., 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**. v. 31, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 2001**. Disponível em < <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y2200E/Y2200E00.HTM>> . Acessado em: fevereiro 2014.

ÇOK, I.; MAZMANCI, B.; MAZMANCI, M. A.; TURGUT, C.; HENKELMANN, B.; SCHRAMM, K. W. Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey. **Environment International**. v. 40. p. 63–69, 2012.

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

CNUMAD. **Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento. Agenda 21**. Rio de Janeiro. 472p. 1995.

Convenção de Basiléia. **Texto da Convenção**. Acessado em outubro de 2013. Disponível em: <<http://www.basel.int/>>.

Convenção de Roterdã. **Texto da Convenção**. Acessado em outubro de 2013. Disponível em <<http://www.pic.int/>>.

CRESPIN, J. **Puericultura: ciência, arte e amor**. Fundação Byk, São Paulo, 921p, 1992.

DARNERUD, P. O.; AUNE, M.; LARSSON, L.; LIGNELL, S.; MUTSHATSHI, T.; OKONKWO, J.; BOTHA, B.; AGYEI, N. Levels of brominated flame retardants and other persistent organic pollutants in breast milk samples from Limpopo province, South Africa. **Science of the Total Environment**. v. 409, p.4048–4053, 2011.

Decreto. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5360.htm>. Acessado em: novembro 2013.

DEWAN, P.; JAIN, V.; GUPTA, P.; BANERJEE, B. D. Organochlorine pesticide residues in maternal blood, cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size. **Chemosphere**. v. 90, p.1704–1710, 2013.

DINIZ, E. M. OS RESULTADOS DA RIO +10. **Revista do Departamento de Geografia**. v. 15, p.31–35, 2002.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solidphase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**. v. 1216, p.5856-5867, 2009.

FOCANT, J.F.; PIRARD, C.; THIELEN, C.; PAUW, E. Levels and profiles of PCDDs, PCDFs and cPCBs in Belgian breast milk. Estimation of infant intake. **Chemosphere**. v. 48, p. 763–770, 2002.

FUJII, Y.; ITO, Y.; HARADA, K. H.; HITOMI, T.; KOIZUMI, A.; HARAGUCHI, K. Regional variation and possible sources of brominated contaminants in breast milk from Japan. **Environmental Pollution**. v. 162, p.269-274, 2012.

GEBREMICHAEL, S.; BIRHANU, T.; TESSEMA, D. A. Analysis of organochlorine pesticide residues in human and cow's milk in the towns of Asendabo, Serbo and Jimma in South-Western Ethiopia. **Chemosphere**. v. 90, p. 1652–1657, 2013.

GEYER, H.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Bioconcentration Potential of Organic Environmental Chemicals in Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 6, p. 313-347, 1986.

GRAÑA, E. C.; CAROU, M. I. T.; LORENZO, S. M.; MAHÍA, P. L.; FERNÁNDEZ, E. F.; RODRÍGUEZ, D. P. Optimisation of a programmed split–splitless injector in the gas chromatographic–mass spectrometric determination of organochlorine pesticides. **Journal of Chromatography A**. v.958, p. 17-24, 2002.

GREINER T. **History of breastfeeding**. Breastfeeding Papers, WABA arquivos, 4p., 1998.

GREIZERSTEIN, H. B.; STINSON, C.; MENDOLA, P.; BUCK, G.M.; KOSTYNIK, P.J.; VENA, J. E. Comparison of PCB congeners and pesticide levels between serum and milk from lactating women. *Environmental Research*. v. 80, p. 280-286, 1999.

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

GROUND COLLECTING OF WILD CEREALS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 101 (9) 2692-2694 (2004).

HERNIK, A.; GÓRALCZYK, K.; STRUCINSKI, P.; CZAJA, K.; KORCZ, W.; MINORCZYK, M.; ŁYCZEWSKA, M.; LUDWICKI, J. K. Characterising the individual health risk in infants exposed to organochlorine pesticides via breast milk by applying appropriate margins of safety derived from estimated daily intakes. **Chemosphere**. v. 94, p. 158–163, 2014.

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

HOH, E.; MASTOVSKA, K. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1186, p. 2-15, 2008.

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. 3, 2010.

IUPAC FOOTPRINT **Pesticides Properties Database**. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>>. Acessado em: setembro 2013.

JEONG, I. S.; KWAK, B. M.; AHN, J. H.; JEONG, S. W. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 133, p. 473–481, 2012.

KISLEV, M. E.; WEISS, E. E HARTMANN, A. Impetus for sowing and the beginning of agriculture levels between serum and milk from lactating women. **Environment Research**. v. 80, p. 280-286, 1999:

LAL, V.; ALBERSBERG, W.; FIEDLER, H.; BAVEL, B. V.; BOER, J. Capacity building for persistent organic pollutant (POP) analysis in the Pacific and POP trends in the Pacific Islands. **Trends in Analytical Chemistry**. vol.46, 2013. 173-177.

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

LENG, J. H.; KAYAMA, F.; WANG, P. Y.; NAKAMURA, M.; NAKATA, T.; WANG, Y. Levels of persistent organic pollutants in human milk in two Chinese coastal cities, Tianjin and Yantai: Influence of fish consumption. **Chemosphere**. v. 75, p. 634–639, 2009.

LUZARDO, O. P.; SUÁREZ, N. R.; GONZÁLEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, L. A. H.; ZUMBADO, M.; BOADA, L. D. Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. **Anal Bioanal Chem**. v. 405, p. 9523–9536, 2013.

MA, S.; YU, Z.; ZHANG, X.; REN, G.; PENG, P.; SHENG, G.; FU, J. Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Shanghai: Implication for exposure route of higher brominated BDEs. **Environment International**. v. 42, p.72–77, 2012.

MALARVANNAN, G.; ISOBE, T.; COVACI, A.; PRUDENTE, M.; TANABE, S. Accumulation of brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk and scalp hair from the Philippines: Levels, distribution and profiles. **Science of the Total Environment**. v. 442, p. 366–379, 2013.

MALARVANNAN, G.; KUNISUE, T.; ISOBE, T.; SUDARYANTO, A.; TAKAHASHI, S.; PRUDENTE, M.; SUBRAMANIAN, A.; TANABE, S. Organohalogen compounds in human breast milk from mothers living in Payatas and Malate, the Philippines: Levels, accumulation kinetics and infant health risk. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 1924–1932, 2009.

MANACA, M. N.; GRIMALT, J. O.; SUNYER, J.; MANDOMANDO, I.; GONZALEZ, R.; SACARLAL, J.; DOBAÑO, C.; ALONSO, P. L.; MENENDEZ, C. Concentration of DDT compounds in breast milk from African women (Manhiça, Mozambique) at the early stages of domestic indoor spraying with this insecticide. **Chemosphere**. v. 85, p. 307–314, 2011.

MANNETJE, A.; COAKLEY, J.; BRIDGEN, P.; BROOKS, C.; HARRAD, S.; SMITH, A. H.; PEARCE, N.; DOUWES, J. Current concentrations, temporal trends and determinants of persistent organic pollutants in breast milk of New Zealand women. **Science of the Total Environment**. v. 458–460, p. 399–407. 2013.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**. v. 1040, p. 259-272, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Campanha amamentação 2013**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/>>. Acessado em: setembro 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 2914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011**. Disponível em:

<http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf>
. Acessado em: dezembro 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 518/GM** Em 25 de março de 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acessado em dezembro 2013.

Ministério do Meio Ambiente. **Convenção de Basiléia**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/>>. Acessado em outubro de 2013.

MONOGRAFIAS. **Anvisa - Monografias autorizadas**. Disponível em: <<portal.anvisa.gov.br>>. Acessado em: agosto 2013.

MUNARETTO, J. S.; FERRONATO, G.; RIBEIRO, L. C.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*. v. 116, p.827–834, 2013.

PATEL, K.; FUSSELL, R. J.; HETMANSKI, M.; GOODALL, D. M.; KEELY, B. J. Evaluation of gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**. v. 1068, p. 289-296, 2005.

PINHO, G. P., *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova** 32 (2009) 987-995.

PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; FILHO, R. M. Avaliação de contaminação ambiental causada por poluentes orgânicos persistentes utilizando simulação computacional. **Química Nova**, v. 30, p. 565-568, 2007.

PIZZUTI, I. R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**. v. 1142, p. 123-136, 2007.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; CARDOSO, C. D.; REICHERT, B.; KROON, M.; WIND, W.; RIGHI, L. W.; SILVA, R. C. A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. **Journal of Chromatography A**. v. 1251, p. 16–26, 2012.

POOJA DEWANA, P.; JAINA, V.; GUPTAA, P.; BANERJEE, B. D. Organochlorine pesticide residues in maternal blood, cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size. **Chemosphere**. v. 90, p.1704–1710, 2013.

PORTOLÉS, T.; CHERTA, L.; BELTRAN, J.; HERNÁNDEZ, F. Improved gas chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues making use of atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of Chromatography A**. v. 1260, p. 183-192, 2012.

POY, F.; VISANI, S.; TERROSI, F. Automatic injection in high-resolution gas chromatography: A programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. **Journal of Chromatography A**, v. 217, p. 81-90, 1981.

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

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

Rede Brasileira de Banco de Leite materno. Acessado em setembro 2013. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br>>.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICCO, R. G., CIAMPO, L. A. D., Almeida, C.A.N. **Aleitamento Materno Passagens e Transferências Mãe-filho**. Capítulo 2: importância do aleitamento humano. 157p. 2004.

The future we want. Disponível em: < <http://www.un.org/en/sustainablefuture/>>. Acessado em: outubro 2013.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Documento N° SANCO/12571/2013, 19 November 2013 rev. 0, Bruxelas, Bélgica. 2013.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Documento N° SANCO/12495/2011, Bruxelas, Bélgica. 2011.

SANCO. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document n° SANCO/10684/2009, 2010.

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**. v.758, p. 80-92, 2013.

SHORT, R. **Amamentação, fertilidade e crescimento populacional**. Unicef/IBFAN, Documentos do Mês, setembro, 17p., 1997.

SigmaAldrich. Acessado em outubro 2013. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html> >.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 20, p. 471-474.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; Fundamentos de Química Analítica. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

SOMEYA, M.; OHTAKE, M.; KUNISUE, T.; SUBRAMANIAN, A.; TAKAHASHI, A.; CHAKRABORTY, P.; RAMACHANDRAN, R.; TANABE, S. Persistent organic pollutants in breast milk of mothers residing around an open dumping site in Kolkata, India: Specific dioxin-like PCB levels and fish as a potential source. **Environment International**. v. 36, p. 27–35, 2010.

SOUSA, F. A., et al. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry** 135 (2012) 179-185.

SUDARYANTO, A.; KAJIWARA, N.; TAKAHASHI, S.; MUAWANAH; TANABE, S. Geographical distribution and accumulation features of PBDEs in human breast milk from Indonesia. **Environmental Pollution**. v. 151, p. 130-138, 2008.

SUDARYANTO, A.; KUNISUE, T.; KAJIWARA, N.; IWATA, H.; ADIBROTO, T. A.; HARTONO, P.; TANABE, S. Specific accumulation of organochlorines in human breast milk from Indonesia: Levels, distribution, accumulation kinetics and infant health risk. **Environmental Pollution**. v. 139, p. 107-117, 2006.

SUN, S. J. ZHAO, J.H.; LIU, H. J.; LIU, D. W.; MA, Y. X.; LI, L.; HORIGUCHI, H.; UNO, H.; IIDA, T.; KOGA, M.; KIYONARI, Y.; NAKAMURA, M.; SASAKI, S.; FUKATU, H.; CLARK, G. C.; KAYAMA, F. Dioxin concentration in human milk in Hebei province in China and Tokyo, Japan: Potential dietary risk factors and determination of possible sources. **Chemosphere**. v. 62, p.1879–1888, 2006.

TSANG, H. L.; WU, S.; LEUNG, C. K. M.; TAO, S.; WONG, M. H. Body burden of POPs of Hong Kong residents, based on human milk, maternal and cord serum. **Environment International**. v. 37, p. 142–151, 2011.

TUE, N. M.; SUDARYANTO, A.; MINH, T. B.; ISOBE, T.; TAKAHASHI, S.; VIET, P. H.; TANABE, S. Accumulation of polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in breast milk from women living in Vietnamese e-waste recycling sites. **Science of the Total Environment**. v. 408, p. 2155–2162, 2010.

UNEP. **The 9 New POPs – An Introduction to the Nine Chemicals Added to the Stockholm Convention by the Conference of the Parties at its Fourth Meeting, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)**. UNEP, Geneva, Switzerland, 2010.

UNICEF. Acessado em outubro 2013. Disponível em: <www.unicef.org>.

UNICEF. **Promovendo o Aleitamento Materno**. 2 ed. 18p. Brasília: 2007.

UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION. **The Stockholm Convention**. Disponível em: <<http://www.unido.org/>>. Acessado em outubro 2013.

US Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acessado em: agosto 2013.

VASCONCELLOS, P. S. **Mitos Gregos**. São Paulo: Objetivo, 1998, 135p.

VINCENT LAL, WILLIAM AALBERSBERG, HEIDELORE FIEDLER, BERT VAN BAVEL, JACOB DE BOER. Capacity building for persistent organic pollutant (POP) analysis in the Pacific and POP trends in the Pacific Islands. **Trends in Analytical Chemistry**. vol.46, 2013. 173-177.

VUKAVIĆ, T.; MILORADOV, M. V.; MIHAJLOVIĆ, I.; RISTIVOJEVIĆ, A. Human milk POPs and neonatal risk trend from 1982 to 2009 in the same geographic region in Serbia. **Environment International**. v. 54, p.45–49, 2013.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentations, Applications and Strategies for Data Interpretation**. 4 ed. England: Wiley, 2011, 819 p.

WEIGUANG XU, XIAN WANGA, ZONGWEI CAIA. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. **Analytica Chimica Acta**. 2013. v. 790. 1-13.

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.

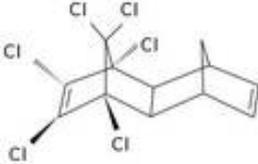
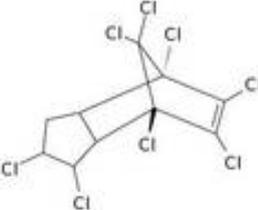
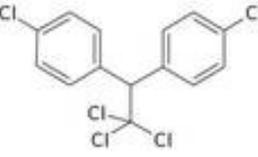
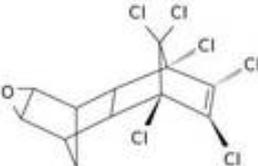
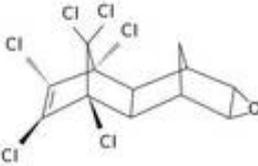
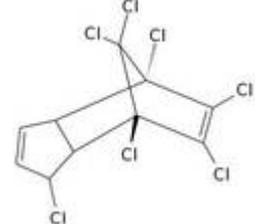
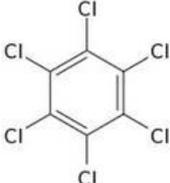
WHO. **Organização Mundial da Saúde**. Acessado em: outubro 2013. Disponível em: <www.who.int>.

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

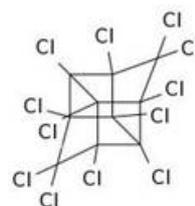
ANEXOS

ANEXO 1

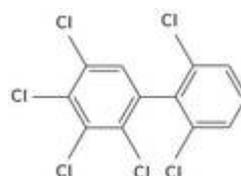
Tabela 1: Nome e estrutura química dos POPs utilizados nesse estudo.

Nome	Estrutura
Aldrin	
Clordano	
DDT	
Dieldrin	
Endrin	
Heptacloro	
Hexaclorobenzeno	

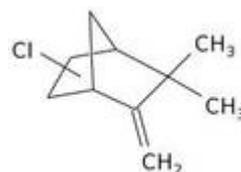
Mirex



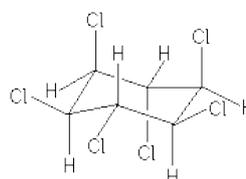
PCBs



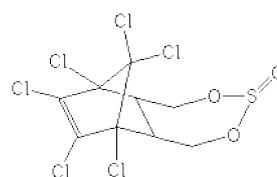
Toxafeno



Lindano, HCH alfa, HCH beta



Endossulfan alfa



ANEXO 2**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

(vertente)

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

Qual o sexo da criança?

Masculino

Feminino

Não sei

3. 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.