



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-NORTE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS

Mestrado em Ciências Forenses

Determinação de metabolitos piretróides na urina

Isabel Cristina Meneses Monteiro da Silva



Isabel Cristina Meneses Monteiro da Silva

Determinação de metabolitos piretróides na urina

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Forenses pelo Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte**

Trabalho de tese realizado sob a orientação de.
Maria Begoña Criado
Valentina Fernandes Domingues

**Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte
Departamento de Ciências
2011**

Agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Begoña Criado pela pronta disponibilidade, ajuda, apoio, orientação e correcção da tese.

À Professora Doutora Valentina Fernandes Domingues por todos os ensinamentos, pela pronta disponibilidade, ajuda, orientação, correcção da tese e todo o apoio prestado durante toda a minha estadia no laboratório GRAQ. O carinho, a amizade e a ternura foram sentimentos sempre demonstrados pela Professora que sem dúvida foram fundamentais para a realização deste trabalho e criação de uma nova amizade.

À Professora Doutora Cristina Delerue-Matos pela amizade e boa disposição que sempre demonstrou perante todos os elementos do GRAQ, por todos os novos conhecimentos que adquiri devido à oportunidade que me concedeu em frequentar o laboratório do GRAQ para a realização de toda a parte experimental da tese de mestrado, pelo incentivo no início e na conclusão deste trabalho, pelo carinho, amizade e ternura sempre demonstrada.

A todos os elementos do GRAQ pela amizade, alegria e ajuda, nomeadamente a Maria Luísa, Virgínia Fernandes, José Luís, Paula Paíga e Sónia Rocha.

Aos amigos e à minha família pelo amor, amizade, carinho e apoio.

Agradecimentos Institucionais:

Ao GRAQ, grupo de reacções e análises químicas pelo espaço, equipamento e reagentes necessários para a realização do trabalho prático.

À CESP, pelo financiamento de material necessário para a realização do trabalho prático.

Índice

Capítulo I: Introdução	1
1.1. Pesticidas.....	2
1.1.1. Pesticidas na História.....	2
1.1.2. Importância no Mundo do Uso de Pesticidas, aplicações e impacto ambiental	4
1.2. Venda de Produtos fitofarmacêuticos em Portugal.....	6
1.3. Classificação de pesticidas.....	8
1.3.1. Classificação de acordo com o risco envolvido	8
1.3.2. Classificação de acordo com o organismo alvo.....	8
1.3.3. Classificação de pesticidas de acordo com a origem	8
1.3.4. Classificação de pesticidas de acordo com a estrutura química	9
1.4. Inseticidas.....	9
1.4.1. Definição e classificação de Inseticidas Piretróides	10
1.4.2. Estrutura química dos inseticidas piretróides.....	11
1.4.3. Aplicações.....	12
1.4.4. Fatores que influenciam a intoxicação	13
1.5. Classificação segundo o Potencial Tóxico e Dose Letal.....	14
1.6. Toxicologia dos Inseticidas Piretróides nos mamíferos e humanos.....	15
1.6.1. Mecanismo de ação e Toxicidade em mamíferos:.....	16
1.7. Metabolitos piretróides.....	17
1.8. Métodos de extração	20
1.8.1. Extração em fase sólida (SPE)	20
1.9. Métodos de análise - Cromatografia	22
1.9.1. Cromatografia gasosa	23
1.9.2. Detetores de cromatografia gasosa.....	24
1.9.3. Espectrometria de massa	26
1.9.3.1. Analisador de Massa.....	26
1.9.3.2. Detetor	28
1.9.3.3. Deteção por espectrometria de massa.....	28
1.10. Outros métodos de análise de metabolitos de piretróides na urina	29
Capítulo II. Objetivos	31
Objetivos	32
Capítulo III: Material e métodos.....	34

3.1.	Introdução.....	35
3.2.	Reagentes.....	35
3.3.	Preparação de soluções:.....	36
3.4.	Amostragem e conservação das amostras	37
3.5.	Equipamento	37
3.6.	Metodologia Analítica	38
3.6.1.	Desconjugação dos metabolitos	38
3.6.2.	Extração em Fase Sólida	38
3.6.3.	Derivatização	39
3.6.4.	Extração Líquido-Líquido	40
3.6.5.	Cromatografia.....	40
3.7.	Validação da metodologia analítica:.....	41
3.8.	Metodologia de análise estatística:.....	42
3.9.	Tratamento dos resíduos gerados e medidas preventivas:	43
	Capítulo IV: Resultados:	44
4.1.	Otimização do Método GC-MS:.....	45
4.1.1.	Otimização de extração em Fase Sólida	47
4.2.	Validação do Método:	48
4.2.1.	Curva de calibração direta/ reta de calibração matriz.....	49
4.2.2.	Limite de deteção e quantificação:.....	49
4.3.	Análise de questionários e correlação com os resultados:.....	50
4.3.1.	Caracterização de amostras:	51
4.3.1.	Resultados das amostras outono/inverno	52
4.3.2.	Resultados das amostras primavera / verão.....	53
4.3.3.	Correlação dos resultados com a localização	54
4.3.4.	Correlação dos resultados com a profissão	55
4.3.5.	Correlação dos resultados com a alimentação:.....	56
4.3.6.	Correlação dos resultados com o uso de tratamento para piolhos:	57
4.3.7.	Correlação dos resultados com as respostas às questões sobre o uso de pesticidas em casa.....	57
4.3.8.	Questões indiretamente relacionadas com a exposição aos pesticidas piretróides	60
	Capítulo V: Discussão	63
5.1.	Discussão.....	64
	Capítulo VI: Conclusão	70

6.1. Conclusão:.....	71
Capítulo VII: Referências bibliográficas.....	72
Referências bibliográficas:	73
Capítulo VIII: Anexos	79
Anexo A: Informações sobre os piretróides autorizados em Portugal em 2011.....	80
Anexo B: Inquérito colocado aos voluntários do grupo em estudo	83
Anexo C: Declaração de consentimento informado	85
Anexo E: Procedimento	88
Anexo F: Formulário de resíduo Trelab	89

Índice de figuras:

Figura 1 Mosquito <i>Anapholes spp</i> responsável pela transmissão da Malária (25).	4
Figura 2: Venda de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal ano 2010 (32)	7
Figura 3: Mecanismo de destoxificação da permetrina nos mamíferos.(Adaptado de (48)).	18
Figura 4: Piretróides e os seus metabolitos (48).	19
Figura 5: Reação do ácido 3-fenoxibenzoico com álcool hexafluorisopropanol.....	20
Figura 6: Separação cromatográfica de duas substâncias (A e B)	23
Figura 7: Vista longitudinal da seringa e injetor	24
Figura 8: Diagrama de espectrometria de massa	26
Figura 9: Esquema de funcionamento do analisador quadrupolo (adaptação da referência (63))	27
Figura 10: Equipamento de cromatografia gasosa, GC Trace Ultra (1), com deteção através do espectrómetro de massa tandem (MS/MS9 com armadilha iónica, MS Polaris Q da Thermo (2) acoplado ao injetor automático AI-AS 3000 (3) (74).....	37
Figura 11: Aquecimento da amostra para a desconjugação de metabolitos.....	38
Figura 12: Sistema de SPE utilizado com cartuchos Strata X-C	39
Figura 13 - Cromatograma obtido após a injeção de uma amostra contaminada com o metabolito 2-PBA (10.95min.) e 3-PBA (11.07min.).....	45
Figura 14: Cromatograma obtido após a injeção da amostra contaminada com o metabolito 2-PBA (tempo de retenção (t_R): 10.91 min) e 3-PBA (t_R : 11.07 min), em modo de monitorização seletiva de iões (<i>SIM</i>).....	46
Figura 15: espectro de massa do metabolito 3-PBA obtido no GC Thero Trace GC Ultra acoplado ao MS Thermo Polaris Q.....	46
Figura 16: espectro de massa do metabolito 2-PBA obtido no GC Thermo Trace GC Ultra acoplado ao MS Thermo Polaris Q.....	47
Figura 17: Estudo das percentagens de recuperação do metabolito 3-PBA, utilizando diferentes cartuchos de SPE.....	48
Figura 18: Curva de calibração matriz.....	49
Figura 19: Número de amostras nas diferentes estações do ano	51
Figura 20: Concentrações encontradas nas amostras do outono e inverno	53
Figura 21: Concentrações das amostras estudadas durante a primavera e verão	53

Figura 22: Número de amostras estudadas provenientes do meio rural e urbano nas diferentes estações do ano.....	55
Figura 23: Tipo de água ingerida pelo grupo em estudo.....	56
Figura 24: Tipo de roupa usada pelo grupo em estudo.....	57
Figura 25: Respostas à pergunta uso de inseticidas.....	58
Figura 26: Comparação do uso de inseticidas em casa no meio rural e urbano.	58
Figura 27: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmavam usarem inseticidas.	59
Figura 28: Respostas ao uso de produtos antitraças.....	59
Figura 29: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmaram usarem difusores automáticos	60
Figura 30: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmaram usarem tratamentos anti-pulgas e carrças nos seus animais.....	62

Índice de tabelas:

Tabela 1: Valores de mercado obtidos em Dezembro de 2010* (33).....	7
Tabela 2: Estrutura química dos diferentes tipos de pesticidas piretróides atualmente com venda permitida em Portugal, Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos (29, 43, 44).....	12
Tabela 3: Classificação de pesticidas de acordo com a perigosidade (34).....	15
Tabela 4: Diferentes tipos de detetores.....	25
Tabela 5: Metodologias utilizadas na deteção do metabolito 3-PBA na urina (adaptado referência (48)).....	30
Tabela 6: características GC utilizados e programa utilizado	41
Tabela 7: Teste Kolmogorov - Smirnov para as variáveis idade e concentrações.	50
Tabela 8: caracterização da população estudada.	52
Tabela 9: Valores máximos, mínimos e médias obtidas nas diferentes estações do ano.	54

Resumo:

Inseticidas são pesticidas usados contra um amplo espectro de pragas (insetos), normalmente são usados com o objectivo de aumentar a produção agrícola. Devido à acumulação de organoclorados no ambiente e nos animais estes pesticidas foram banidos desde 1970. Após esta proibição, os inseticidas organofosforados (atualmente também proibidos) e os piretróides (PYRs) começaram a ser aplicados em maiores quantidades, devido ao seu baixo nível de toxicidade para os humanos.

PYRs sintéticos são inseticidas mais potentes e eficazes que as piretrinas naturais. Devido ao seu vasto leque de aplicações: uso doméstico (tapetes, têxteis, plantas), veterinário (ectoparasiticidas) e saúde pública, não são apenas agricultores e trabalhadores da indústria química que estão expostos a este tipo de pesticidas, mas também os consumidores.

O ser humano pode estar exposto aos pesticidas através da inalação, da ingestão e da exposição dérmica. O metabolismo dos PYRs em seres humanos ocorre rapidamente através das enzimas carboxilesterases (essencialmente a nível hepático). Os metabolitos são eliminados na urina como forma de destoxificação do organismo. Foi demonstrado que após a exposição à ciflutrina, 93% dos metabolitos deste composto são eliminados durante as primeiras 24h.

Na exposição de curto prazo podem-se observar uma variedade de sintomas reversíveis, tais como tonturas, dor de cabeça, irritação da pele e nariz e parestesia. A exposição a longo prazo pode estar relacionada com a doença de Parkinson.

Os principais metabolitos encontrados com mais frequência na urina são o ácido 3 fenoxibenzóico (3-PBA), o ácido 3 - (2,2-diclorovinil) -2,2 dimetilciclopropano-1-carboxílico (DCCA) e o ácido crisântemo dicarboxílico (CDCA). O metabolito 3-PBA é um metabolito não específico, mas é o mais frequentemente encontrado em pesticidas piretróides como a permetrina, cipermetrina, deltametrina, sumitrin, etofenprox, e cialotrina, Este metabolito tem sido usado como o biomarcador mais sensível para determinar a exposição a este tipo de pesticidas.

O principal objetivo deste estudo foi a otimização e validação do método para a determinação de metabolitos de pesticidas piretróides na urina; quantificação da exposição a este tipo de pesticidas num grupo de 87 voluntários do Norte de Portugal com idades até aos 35 anos. A metodologia utilizada foi: extração em fase sólida (SPE),

derivatização e quantificação utilizando a cromatografia gasosa com espectrometria de massa. O limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para o metabolito estudado é 0,2 µg/L e 0,6 µg/L, respectivamente.

As concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina na população estudada variaram entre <LOD e 114,5 µg / L.

Ao comparar as concentrações obtidas nas estações de outono/inverno e primavera/verão concluiu-se que as concentrações de 3-PBA nas estações outono/inverno (1,07 mg/L) foram significativamente inferiores às encontradas nas estações primavera/verão (4,15 mg/L).

As urinas de pessoas que fizeram o tratamento para piolhos apresentaram concentrações que variaram entre 14,6 mg/L e 114,5 mg/L.

Os resultados obtidos indicam que as pessoas que vivem no meio rural apresentaram concentrações do metabolito 3-PBA mais elevadas do que a população que vive no meio urbano.

Compararam-se os níveis de 3-PBA em dois grupos de profissões. Um grupo com profissões de risco de exposição a pesticidas e outro grupo com profissões que não têm exposição aos pesticidas. As concentrações encontradas nas urinas do grupo com provável exposição aos pesticidas apresentaram concentrações superiores às urinas do grupo com profissões sem exposição aos pesticidas.

Após a análise estatística pelo SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16 para Windows, usando testes específicos (Shapiro Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Spearman e Kolmogorov-smirnov), concluímos que algumas fontes de exposição têm impacto significativo nas concentrações encontradas na urina. Estas fontes são: local de residência, alimentação, profissão, tratamento para piolhos e uso de alguns produtos contra traças.

Abstract:

Insecticides are pesticides used against a wide spectrum of insects usually used to increase agricultural crop and maintain a good hygienic condition. Due the accumulation of organochlorines in the environment and in the wild life, these pesticides were banished from 1970. After this time the organophosphorous and pyrethroids (PYRs) insecticides began to be applied in larger quantities, because for humans, these pesticides are much less toxics than other insecticides.

Synthetic PYRs are more potent then pyretrines and are effective insecticides, once it can be used in home (carpets, textiles, and plants), veterinary (ectoparasiticides) and public health. Due to the wide range of applications with this type of pesticides, not just farmers and workers of chemical industry are exposed to this type of pesticides, but also consumers.

Human can be exposed to the pesticides by the skin, inhalation and from the gastrointestinal tract. The metabolism of PYRs in humans is fast by the carboxilesterases enzymes (mainly in the liver), that have an important role in this process. The detoxified metabolites are eliminated thought urine. It was shown that after exposure to the PYR cyfluthrin, 93% of the metabolites of this compound are eliminated during the first 24h.

The symptoms observed can be differentiated in short-term effect and effect of long term exposure. Associated with short-term exposure can be observed a variety of reversible symptoms such as headache dizziness, nausea, irritation of the skin and nose and paraesthesia, associated with–long-term exposure can be related with Parkinson disease.

The main metabolites found with higher frequency in urine are 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA), 3-(2,2 -Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane- 1-carboxylic acid (DCCA) and chrysanthemumdicarboxylic acid (CDCA).

3-PBA is non-specific metabolite, but the most frequently found pyrethroids pesticides including permethrin, cypermethrin, deltamethrin, sumithrin, etofenprox, and cyhalothrin, this metabolite have been used as the most sensitive biomarker for environmental PYR exposure since the late 1990s.

The main objective of this study was the optimization and validation of the method to determine metabolites pyrethroids pesticides in urine; quantification the exposition of these pesticides in a 87 samples from a volunteer group of healthy people until 35 years old of the North of Portugal. The, 3-PBA was the selected pyrethroid metabolite. The achieved limit of detection in urine sample is 0.2µg/ L and a limit of quantification 0.6 µg/L, using the following methodology: solid phase extraction (SPE), derivatization and quantification with gas chromatography coupled to mass spectrometry.

The concentrations of 3-PBA in urine of the studied population ranged between <LOD and 114.5 µg/L.

Comparing the concentrations obtained in the seasons autumn/winter and spring/summer, the concentrations found were different. During autumn/winter (1.07 µg/L) concentrations were significantly lower than in the spring/summer (4.15 µg/L).

The samples from people who did the treatment for lice had concentrations ranged between 14.6 µg/L and 114.5 µg/L.

Also we can conclude that people who live in rural area have higher concentrations ~~in~~ comparing with who lives in urban area.

Analysis of two groups of professions and 3-PBA concentration in urine showed that professionals with some exposition to pyrethoids pesticides have higher concentrations than the group of professional without exposition.

After the statistical analyzes by SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 16 for Windows using specifics tests (Shapiro Wilk, Kolmog-Smirnov, Spearman and Kolmogorov-smirnov), we concluded that some sources of exposure have significant relation with concentrations found in urine.

These sources are: place of residence, food, profession, lice treatments and use of some products against moths.

Lista de Abreviaturas:

a.c.	antes de Cristo
ACN	acetoneitrilo
ADI	dose di�ria aceit�vel
ARfD	dose aguda de referência
CDCA	�cido crisântemo-dicarboxílico
CI	ioniza�o química
CV	coeficiente de varia�o
DBCA	�cido cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano1-carboxílico
DA	corrente alternada
DC	corrente contínuo
DCCA	�cido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano1-carboxílico
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DGADR	Direc�o Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DL50	dose letal 50
EI	impacto de electrão
EtOAc	acetato de etilo
FID	ioniza�o de chama
Full	varrimento total de iões
GC	cromatografia gasosa
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa
HCl	�cido clorídrico
HFIP	hexafluorisopropanol
HPLC	cromatografia líquido de alta eficiência
K _{oc}	potencial de lixiva�o
LLE	extra�o líquido-líquido

LOD	limite de deteção
LOQ	limite de quantificação
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massa
NDP	azoto e fósforo
NH ₄ OH	hidróxido de amónia
OMS	Organização Mundial de Saúde
TCD	condutividade térmica
SIM	monitorização selectiva de iões
SPE	extração em Fase Sólida
PYRs	piretróides
3-PBA	ácido 3-fenoxibenzóico

Capítulo I: Introdução

1.1. Pesticidas

Os vegetais estão na base da maioria das cadeias tróficas do nosso planeta. A evolução da população humana tem obrigado a esforços significativos de otimização da produtividade agrícola de forma a suportar as crescentes necessidades alimentares.

Devido ao desenvolvimento, é atualmente possível obter uma maior produção de alimentos a partir de uma menor área de cultivo [1]. A aplicação de sofisticadas técnicas agrícolas como o uso intensivo de pesticidas, e a seleção e melhoramento das variedades vegetais, têm contribuído de forma significativa para este desenvolvimento [2].

A exposição dos vegetais de interesse económico às diversas associações negativas com outras espécies do ecossistema (o herbivorismo e o parasitismo), é responsável por grandes prejuízos económicos [3]. Tendo em conta os prejuízos económicos que podem ocorrer, não é de surpreender que o homem tenha tentado minimizar estes danos, recorrendo ao uso de pesticidas.

O termo pesticida é bastante amplo e advém da palavra peste, podendo ser caracterizado como uma substância ou mistura de substâncias com origem antropogénica produzidos, com o intuito de prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer peste. Essas pestes podem ser de insetos, ervas daninhas, fungos ou micro-organismos (bactérias ou vírus), ratos ou outros animais [2].

Os pesticidas podem ser aplicados contra qualquer animal, planta, ou micro-organismos que viva em locais não desejados [4].

Os pesticidas devem ser escolhidos com critério e só devem ser aplicados quando necessário. O uso desnecessário destes produtos pode levar ao aparecimento de novas pragas, crescimento de outras já existentes e originar fenómenos de resistência [4]. A aplicação deve ter em conta as condições meteorológicas e o ciclo biológico da praga [4].

1.1.1. Pesticidas na História

O uso de substâncias com capacidades tóxicas está presente no ambiente desde há sensivelmente 3 mil anos. As primeiras culturas a utilizar pesticidas foram a Chinesa, Grega e Romana, que utilizavam alguns sais inorgânicos no combate aos insetos nas suas colheitas [5].

A primeira estratégia usada para eliminar ervas daninhas, usando para esse efeito cinza e sal, data de 1200 a.c., e a utilização de enxofre como acaricida e fungicida, do ano 100 a.c.[6].

Já no séc. XV, começaram a ser utilizados elementos químicos tóxicos, tais como, o arsénio e o mercúrio, com o intuito principal de combater pragas nas colheitas.

A síntese e utilização dos primeiros pesticidas organoclorados ocorreram durante a Segunda Guerra Mundial. No fim da Guerra, a utilização militar deixa de ser necessária mas as estruturas laboratoriais e o conhecimento científico da manipulação de substâncias químicas letais foram reaproveitados para outros fins, nomeadamente para o combate aos insetos que causavam perdas na produção agrícola [7].

Em 1874, o químico Alemão Zeidler, descobriu as propriedades químicas do diclorodifeniltricloroetano (DDT), no entanto, este foi armazenado durante algumas décadas, e foi em 1939 que Paul Müller (químico Suíço) descobriu que o DDT era um inseticida muito eficaz [8].

O DDT transformou-se rapidamente no pesticida mais usado no mundo, utilizado para eliminar o mosquito vetor da malária (Figura 1) e mais tarde no controlo de pragas na agricultura. O uso do DDT teve as suas vantagens, uma vez que salvou milhões de italianos da febre tifóide e foi também responsável pela erradicação da malária na Europa e América do Norte. Isto levou à atribuição do prémio Nobel da Medicina no ano de 1948 a Paul Müller [8, 9]. No entanto, à semelhança de todos os organoclorados, a eficácia do DDT foi diminuindo ao longo do tempo, obrigando o uso de doses maiores [10].

O DDT acumulou-se em grandes quantidades nos organismos, com consequências nocivas para a sobrevivência de várias espécies selvagens. Na década de 60, descobriu-se que o DDT provocava alterações na reprodução, colocando riscos para a biodiversidade. Rachel Carson escreveu o livro best-seller *Silent Spring* [9] que criticava o uso deste pesticida, alertando o público em geral para esta problemática.

De 1964 a 1970, a Organização Mundial de Saúde (OMS) testou cerca de 2.000 compostos para possível uso como inseticidas contra a malária. Mas, nenhuma das substâncias testadas foi tão persistente e eficiente como o DDT. Por exemplo, o malatião e o carbaril foram utilizados como substitutos, mas revelaram-se muito mais tóxicos que o DDT. Apesar de atualmente o DDT estar proibido em muitos países, continua a ser usado em algumas nações no combate à malária e outras doenças tropicais, eliminando mosquitos e outros insetos transmissores [11].

O uso de pesticidas duplicou desde a década de 50, e cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são usadas agora todos os anos. Estes podem ser usados com diferentes finalidades, tais como, a agricultura, veterinária, uso doméstico ou institucional [12, 13].



Figura 1 Mosquito *Anapholes spp* responsável pela transmissão da Malária [14].

1.1.2. Importância no Mundo do Uso de Pesticidas, aplicações e impacto ambiental

A primeira regra para o controlo de uma peste é o conhecimento do problema como um todo. O ecossistema agrícola integra uma complexa rede de interações envolvendo relações entre os seres vivos e os fatores do habitat (temperatura, solo, água).

O uso dos pesticidas apresenta vantagens no controlo de pragas, preservação de alimentos e de materiais, mas também, como a maioria dos produtos, tem importantes desvantagens, tais como, a toxicidade para os humanos e o impacto negativo provocado no ambiente e ecossistemas [12].

Entre os pesticidas mais utilizados encontram-se os piretróides desenvolvidos a partir das flores *Chrysanthemum cinerariaefolium* atualmente denominadas *Tanacetum cinerariaefolium*. Esta espécie é originária da China e utilizada como inseticida desde o I século a.c. [15].

Destas plantas são extraídos dois tipos de substâncias: o piretro - pó das plantas, utilizados há mais de 60 anos como substância impeditiva de pragas em produtos

armazenados e cereais (inseticida natural), e a piretrina – é um constituinte ativo do piretro, por este motivo, é utilizado como inseticida há centenas de anos [16, 17].

Os pesticidas piretróides sintéticos são amplamente utilizados, visto que, atuam sobre um largo espectro de pragas, é necessário apenas o uso de uma pequena quantidade de substância ativa (10g ingrediente ativo/ha), é uma substância seletiva, apresenta um reduzido risco para o utilizador (rápida biotransformação e excreção pelos mamíferos) e apresenta um baixo impacto ambiental [18].

Dos piretróides inicialmente produzidos, atualmente alguns têm a sua comercialização proibida (fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato e permetrina). Estes piretróides foram retirados do mercado por desinteresse por parte das empresas em notificá-los ou por decisão desfavorável da Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) após reavaliação, por se ter reconhecido que representavam um risco para o homem, animais ou ainda por serem ambientalmente inaceitáveis. A segurança em termos ambientais, o efeito em organismos alvo e a exposição do homem a outras vias sem ser a cadeia alimentar, são critérios determinantes na aceitação de comercialização de novos pesticidas assim como na manutenção de venda de pesticidas anteriormente autorizados. No entanto alguns destes pesticidas podem ser utilizados para outros fins nomeadamente a permetrina que é usada na indústria têxtil para tratamento contra as traças [5].

Atualmente em Portugal são autorizados os seguintes pesticidas para uso na agricultura: acrinatrina, cipermetrina, bifentrina, β -ciflutrina, ciflutrina, deltametrina, teflutrina, λ - cialotrina, tau-fluvalinato, esfenvalerato e peritrina. Em relação ao uso doméstico, estão atualmente presentes em produtos comercializados em Portugal os seguintes pesticidas piretróides: tetrametrina, ciflutrina, cipermetrina, fenvalerato e deltametrina [19]. No anexo A é possível ver as substâncias ativas referidas por ordem alfabética. Para cada substância ativa, e sempre que disponível, estão reunidas informações sobre o seu nome vulgar ISO resultante da aplicação da Norma Portuguesa NP 1136, a família química e o modo de acção. Para os produtos fitofarmacêuticos com base na substância ativa, se indica o tipo de formulação, o teor em substância ativa, o número de autorização da venda, marca comercial, classificação e a empresa detentora do título. São ainda apresentadas as frases de risco, no âmbito físico-químico, toxicológico e ambiental, assim como os intervalos de segurança aplicáveis para cada produto.

Os pesticidas piretróides são atualmente o quarto maior grupo de inseticidas utilizados, tornaram-se assim a classe mais significativa de inseticidas agrícolas, sobretudo após a restrição dos organofosforados. A utilização crescente de piretróides foi notável nas últimas décadas. Entre 1989 e 1990 foram produzidas cerca de 1000 toneladas de fenvalerato, 600 toneladas de permetrina, 340 toneladas de cipermetrina, 250 toneladas de deltametrina e algumas centenas de toneladas de tetrametrina [20]. Consequentemente as flores que permitem a produção dos PYRs (*Tanacetum cinerariaefolium*) atingiram um grande valor comercial. Os grandes produtores destas espécies são países africanos como o Quênia, e a Tanzânia [15].

Em relação ao impacto ambiental, o uso em grande escala de pesticidas aumenta significativamente a probabilidade de permanência dos mesmos no meio ambiental. As emissões associadas à produção industrial de pesticidas, à sua utilização de um modo não adequado, à limpeza de equipamentos de aplicação e ao descarte de resíduos, são fatores que influenciam a contaminação ambiental por pesticidas [21].

As características físico-químicas dos pesticidas, assim como, os habitats e as interações entre ambos influenciam a permanência e dispersão destas substâncias no meio ambiente. Quanto mais volátil for um pesticida mais fácil é a sua dispersão pelo ambiente. A solubilidade e o potencial de lixivação (K_{oc}) podem determinar a afinidade na dispersão no meio aquático. A biodegradabilidade e a bioacumulação de alguns pesticidas podem ser determinantes para a sua permanência nos habitats [21].

No que diz respeito aos ecossistemas terrestres e aquáticos, fatores como a composição química, o pH, a temperatura, o vento, a humidade, a profundidade, as correntes e as partículas em suspensão, entre outros, irão afetar o modelo de dispersão do pesticida [21].

1.2. Venda de Produtos fitofarmacêuticos em Portugal

Em 2010 as vendas dos produtos fitofarmacêuticos totalizaram 118 milhões de Euros, representando uma quebra de 1% em comparação com o ano 2009. Igual variação (-1%) verificou-se ao nível das quantidades vendidas, que em 2010 somaram 21.057 toneladas.

O comportamento da evolução das vendas dos produtos fitofarmacêuticos ao longo do ano 2010 é observável através do gráfico abaixo exposto (Figura 2).

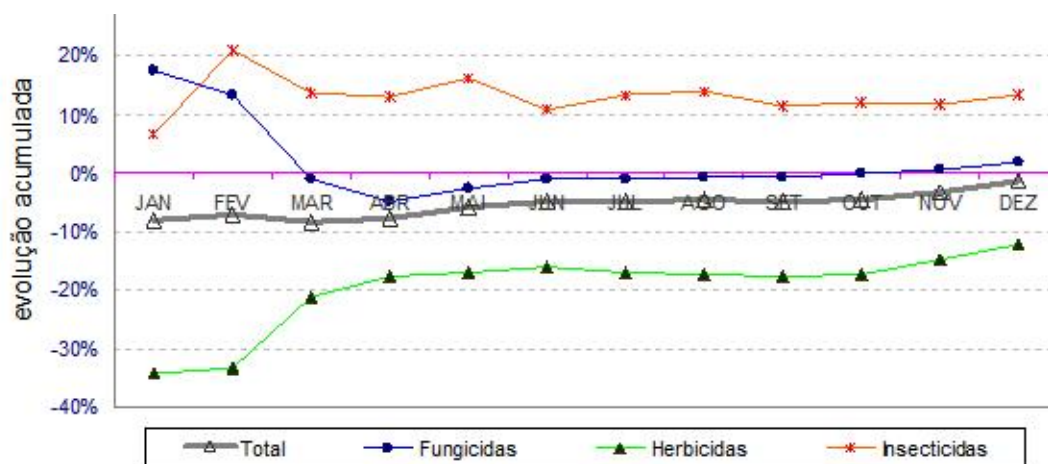


Figura 2: Venda de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal ano 2010 [22]

Na Figura 2 mostra-se que os pesticidas com maior índice de crescimento durante o ano de 2010 foram os inseticidas, seguindo-se os fungicidas.

Os inseticidas piretróides tiveram uma evolução de 18% refletindo-se em mais de 850K€ de vendas no ano 2010.

Tabela 1: Valores de mercado obtidos em Dezembro de 2010* [23]

Mercado Segmentos	Valor (mil euros)	Variação % (1)	Quantidade (t)	Variação % (1)
Fungicidas	51.488	2%	11.844	1%
Inseticidas	23.565	13%	2.496	-5%
Herbicidas	39.298	-12%	5.167	9%
Diversos	4.146	2%	1.551	-9%
TOTAL	118.497	-1%	21.057	1%

* *Coordenação da Comissão de Dados e Estatística da ANIPLA*

1.3. Classificação de pesticidas

A classificação de pesticidas pode ser feita de acordo com o risco envolvido (classificação feita pela OMS), a sua funcionalidade (organismo alvo), a sua origem ou ainda quanto à estrutura química dos compostos.

1.3.1. Classificação de acordo com o risco envolvido

Com o objetivo de distinguir o grau de toxicidade, desde 1975 a OMS classifica os pesticidas de acordo com a **perigosidade** que apresentam para o ser humano durante o seu manuseamento. A classificação toxicológica é baseada na identificação do componente de risco referente a uma substância química. A toxicidade aguda após exposição oral, dérmica (DL50) e inalatória (CL50) em ratos foram os princípios fundamentais da classificação.

A OMS agrupa os pesticidas em quatro classes, nomeadamente, em extremamente perigoso (classe Ia), muito perigoso (classe Ib), moderadamente perigoso (classe II) e ligeiramente perigoso (classe III). Segundo esta organização a classificação toxicológica de uma substância ou formulação não depende de que todos os dados toxicológicos se situam na mesma classe; o produto será classificado segundo o dado mais agravante [24].

1.3.2. Classificação de acordo com o organismo alvo

A classificação mais usual é em relação ao **organismo alvo**. Pesticidas que atuam contra micro-organismos podem ser fungicidas, bactericidas ou algicidas. Pesticidas que atuam nas plantas são os herbicidas. Se os organismos alvo são vertebrados, os pesticidas podem ser rodenticidas, avicidas e piscicidas. Finalmente os que controlam invertebrados podem ser classificados como inseticidas, acaricidas, moluscidas e nematocidas [7, 12].

1.3.3. Classificação de pesticidas de acordo com a origem

Em relação à **origem** podem ser distinguidos os seguintes grupos: botânicos, são obtidos a partir das plantas (por exemplo o piretro e os nicotinóides), ~~ou~~ antibióticos

obtidos a partir da fermentação do *Streptomyces avermitilis*, com propriedades insecticidas, e sintéticos [12].

1.3.4. Classificação de pesticidas de acordo com a estrutura química

Quimicamente, os pesticidas são classificados como compostos inorgânicos ou orgânicos.

Os compostos que possuem na sua fórmula a presença de um átomo de carbono, são designados de compostos orgânicos; constituem o grupo de maior importância e estão divididos em sintéticos (compostos produzidos pelo homem) e naturais.

Os compostos orgânicos naturais, eram frequentemente utilizados na antiguidade, apresentam baixa toxicidade e baixa permanência no ambiente (como por exemplo: o piretro e a rotenona). A descoberta dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou o aparecimento de uma vasta gama de produtos orgânicos classificados como organoclorados, clorofosforados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas e cloronitrofenol, entre outros [18].

1.4. Inseticidas

Um inseticida ideal deve responder aos seguintes critérios: grande especificidade para o inseto alvo; baixa toxicidade para os humanos; baixa dose letal e baixo custo [25].

Existem 3 tipos de classificação de inseticidas, quanto à acção, origem e quanto ao grupo químico a que pertencem. A classificação é também útil para o diagnóstico das intoxicações e consequentemente a escolha de um tratamento adequado à gravidade da intoxicação.

Os inseticidas podem ser classificados de acordo com a sua origem em:

- Inseticidas orgânicos
- Inseticidas inorgânicos
- Inseticidas naturais com origem vegetal
- Inseticidas sintéticos

Podem também ser classificados de acordo com a sua estrutura química em:

- Organofosforados, compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ácido ditofosfórico (folidol, malatião);
- Carbamatos, são derivados do ácido carbâmico (carbaril);
- Organoclorados, são compostos à base de carbono, com radicais de cloro, derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno (aldrina, endrina, lindano, endossulfão)
- Piretróides, são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Tanacetum cinerariaefolium* (aletrina, resmetrina, cipermetrina, deltametrina) [26, 27].

1.4.1. Definição e classificação de Inseticidas Piretróides

As piretrinas (piretróides naturais), obtidas a partir do piretro, são muito instáveis à luz. Devido a este facto a sua utilização é bastante limitada. No entanto devido às suas características naturais esta substância despertou um enorme interesse em alguns químicos orgânicos. Foi em meados do ano 1910 que surgiu o primeiro estudo acerca das piretrinas, e em 1958 ficou concluído, e com ele a descoberta das estruturas de seis compostos ativos: piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I e jasmolina II [15].

No período seguinte, foram sintetizados vários piretróides, a partir das piretrinas. Desde essa época passaram a designar-se por piretróides, as piretrinas naturais e os seus derivados sintéticos.

Foi demonstrado que os centros fotoestáveis da estrutura molecular dos piretróides poderiam ser substituídos por unidades alternativas, produzindo compostos mais estáveis à luz, mas mantendo a sua capacidade inseticida e continuando a ser pouco nocivos para os mamíferos, denominando-se estas substâncias de piretróides sintéticos [28].

A classificação deste tipo de inseticidas pode ser feita de acordo com a altura em que foram criados (4 gerações) ou ainda pela presença ou ausência do grupo ciano (tipo I ou tipo II). A primeira geração de piretróides era constituída apenas pela aletrina (um duplicado sintético da cinerina I), a aletrina foi comercializada pela primeira vez no ano

de 1949, a partir deste momento deu-se início a uma era de síntese muito complexa, envolvendo 22 reações químicas [3].

Com novos desenvolvimentos surgiu a segunda geração de piretróides, mais eficazes que os piretróides naturais uma vez que eram fotoestáveis e eficientes para serem utilizados na agricultura e uso doméstico. Em 1976 descobriu-se o primeiro piretróide sintético fotoestável, o fenvalerato, seguindo a permetrina, já em 1977. Estes dois tipos de inseticidas são classificados também como inseticidas de terceira geração, uma vez que nas suas características constam a estabilidade à luz solar e a sua pouca volatilidade.

Já na década de 80 teve início a quarta geração de piretróides. Esta nova etapa diferencia-se das anteriores, porque se sintetizam a partir do ciclopropano e porque a quantidade necessária para a produção dos mesmos é muito inferior às das anteriores gerações. Exemplos de piretróides de quarta geração são: ciflutrina (1980), flumetrina (1982), fenpropatião e fluvalinato (1983), cialotrina e bifentrina (1985) e por último a teflutrina (1987) [28].

Relativamente à presença ou ausência do grupo ciano, os piretróides podem ser classificados como sendo de tipo I (ausência do grupo ciano) e tipo II (presença do grupo ciano e mais fortes). Esta classificação está também baseada nos sintomas que os animais de laboratório apresentaram após a exposição aos diferentes tipos de pesticidas PYRs, uma vez que o grupo ciano influencia o modo de atuação do inseticida. Dos piretróides tipo I fazem parte a bifentrina e a permetrina, já do tipo II podem ser considerados a fenpropatrina, λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina [29, 30].

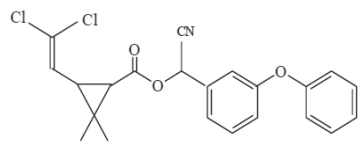
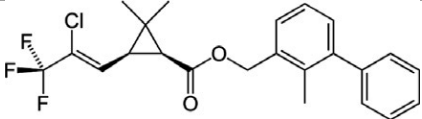
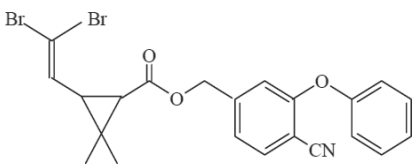
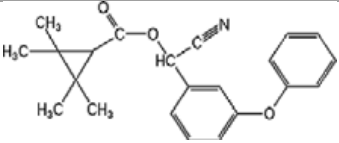
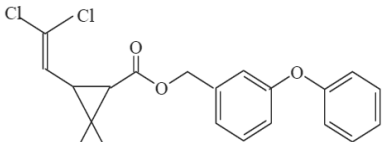
A eficiência inseticida destes compostos deve-se à estereoisomeria dos mesmos. Vários piretróides têm diferentes formas isoméricas, demonstrando assim toxicidades e intensidades diferentes [31, 32].

1.4.2. Estrutura química dos inseticidas piretróides

As características físico-químicas dos piretróides são determinantes para a sua dispersão ambiental, transporte, metabolização e toxicidade.

Na Tabela 2 estão representados a nomenclatura, estrutura química de alguns piretróides, o tipo e a massa molecular.

Tabela 2: Estrutura química dos diferentes tipos de pesticidas piretróides atualmente com venda permitida em Portugal, Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos [19, 33, 34].

Nomenclatura	Estrutura Química	Tipo	Massa Molecular
α -cipermetrina		II	416.3
Bifentrina		I	422.9
Deltametrina		II	505.2
Fenpropatrina		II	349.4
Permetrina		I	391.3

1.4.3. Aplicações

Como já foi referido os inseticidas são químicos usados com diversas finalidades nomeadamente melhorar a produção agrícola, melhorar condições de higiene e muitas vezes são usados também com finalidades de uso veterinário e humano.

Os piretróides compreendem um importante grupo na classe dos inseticidas habitualmente usados na agricultura e preservação de têxteis e madeira, no entanto, também tem desempenhado uma importante função na saúde pública e medicina veterinária como ectoparasiticidas [16].

1.4.4. Fatores que influenciam a intoxicação

A exposição, em conjunto com outros fatores, determina as consequências da intoxicação por pesticidas. De acordo com a OMS ocorrem 3 milhões de intoxicações com pesticidas por ano, com 220.000 mortes.

Após a penetração do tóxico no organismo, a gravidade da intoxicação depende de fatores tais como: grau de toxicidade da substância em questão, a dose que tenha sido absorvida, a idade, o peso do corpo e o estado físico do intoxicado; assim como o tempo de exposição.

Se a substância for muito tóxica, como é o caso do cianeto, basta que o organismo absorva quantidades mínimas para que ocorra uma intoxicação grave, por outro lado, caso a substância seja pouco tóxica, é necessário que o organismo absorva doses elevadas para que, de facto, se produza uma intoxicação.

A absorção de doses iguais de um determinado tóxico provoca intoxicações mais graves nos bebés, idosos e nas pessoas que sofrem de insuficiência renal, insuficiência hepática ou outros problemas que perturbem os processos de metabolização, depuração e eliminação da substância responsável.

O tempo a que o organismo se encontra exposto a uma determinada substância tóxica determina a rapidez de evolução do quadro clínico consequente. Assim é possível distinguir dois quadros: a intoxicação aguda e a intoxicação crónica. A intoxicação aguda é provocada pela exposição pontual e breve a uma substância tóxica, normalmente é caracterizada por ser acidental ou pontual.

Por outro lado, a intoxicação crónica é provocada pela exposição persistente a uma substância tóxica. Neste caso, é possível que, embora as doses de tóxico que penetram no corpo sejam relativamente baixas, com o passar do tempo se acumulem no interior do organismo provocando danos acumulados até que, chegado um determinado ponto, as manifestações da intoxicação começam a evidenciar-se e a intensificar-se progressivamente. Correspondem normalmente a intoxicações com mais gravidade [35].

1.5. Classificação segundo o Potencial Tóxico e Dose Letal

Em 1973 a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu uma classificação de pesticidas de acordo com o seu potencial tóxico. O risco referido nesta classificação é relacionado com o perigo para a saúde humana.

A classificação é baseada na forma química e toxicidade do composto.

A dose letal 50 (LD50) define-se como o valor em mg de substância tóxica por kg do peso corporal, capaz de matar pelo menos 50% da população dos animais testados [24]. Quando é referida a LD50 é necessário indicar o tipo de exposição a que se refere, exposição oral e dérmica [24]. A exposição oral tem sempre valores LD menores do que a exposição dérmica. A Tabela 3 mostra a variação entre os valores LD de acordo com o tipo de exposição.

Tabela 3: Classificação de pesticidas de acordo com a perigosidade [24]

Classificação	LD 50 (mg/kg massa corporal)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia Extremamente perigoso	≤5	≤20	10	40
Ib Altamente perigoso	5 - 50	20-200	10 – 100	40 - 400

1.6. Toxicologia dos Inseticidas Piretróides nos mamíferos e humanos

Os inseticidas piretróides apresentam baixa toxicidade para os mamíferos devido à eficaz biotransformação pelas enzimas hidrolíticas carboxilesterases e à oxidação pelo citocromo p450, têm por isso LD50 relativamente baixa. Assim, para ocorrer a morte de um mamífero por intoxicação por inseticidas piretróides são necessários valores compreendidos entre 20mg (ratinho) e 500mg (ratazana) por kg (valores que dependem do mamífero e dos piretróides envolvidos) [36, 37].

Em relação aos humanos, os piretróides são rapidamente metabolizados no fígado pelas carboxilesterases [16]. Dados toxicológicos da Organização Mundial de Saúde (WHO) foram utilizados para estabelecer valores de limite de exposição: “**Acceptable daily intake**” **Dose diária aceitável (ADI)** e “**Acute reference dose**” **Dose aguda de referência (ARfD value)**. ADI é o valor correspondente à inalação, durante um longo período de tempo, de substâncias com baixa toxicidade aguda. O ARfD são valores correspondentes a exposições únicas ou de curta duração, no entanto devido à elevada toxicidade aguda da substância, são prejudiciais à saúde.

Baseados em resultados obtidos em diferentes investigações, foram estabelecidos os seguintes valores de referência para a população humana [37]:

cis- DCCA 1µg/L

trans- DCCA 2 µg/L

3-PBA 2µg/L

Os efeitos observados nos humanos podem começar por tremores, dor, calor, irritação da pele e olhos, aumento da salivação, irritação no trato respiratório e dor de cabeça. Na maioria das vezes o tipo e a gravidade dos efeitos dependem do tipo de exposição (dérmica, inalatória ou oral) e da dose da concentração dos piretróides encontrada nas células nervosas [37].

Alguns estudos apontam uma correlação entre a exposição a piretróides e o aparecimento da doença de Parkinson [38-40].

1.6.1. Mecanismo de ação e Toxicidade em mamíferos

Antes de 1970, existia pouca informação disponível sobre a toxicidade aguda resultante da exposição aos inseticidas piretróides (naturais e sintéticos) em mamíferos [41]. Estudos publicados em 1970 concluíram a existência de duas síndromes associadas à exposição aguda a piretróides em ratos [42]. No entanto, os piretróides têm vindo a ser objeto de alguma controvérsia relativamente aos possíveis efeitos tóxicos ao longo do tempo no homem [27, 43]. Alguns estudos sugerem a relação entre a exposição a piretróides e o aparecimento da doença de Parkinson [38-40].

Os piretróides não são inibidores das colinesterases como os inseticidas organofosforados e carbamatos mas atuam como tóxicos de contacto ou ingestão afetando o sistema nervoso central e periférico dos insetos, mesmo em doses reduzidas [44].

A ação dos piretróides ocorre num ambiente lipofílico da membrana e consistem em excitar os canais de sódio da bomba de sódio e potássio, presentes nas membranas das células nervosas dos insetos e mamíferos interferindo assim na permeabilidade aos iões de sódio, resultando em descargas sinápticas repetitivas, despolarização da membrana e por último a morte.

Os efeitos tóxicos são causados essencialmente através de uma indução repetitiva da atividade nervosa, mediada pela interação do piretróide com os canais de sódio da membrana. Os efeitos adversos induzidos pelos piretróides são consequência da hiperexcitabilidade neuronal [45].

A presença ou ausência do grupo α -ciano vai-se refletir na duração e eficácia do efeito dos inseticidas nos canais de sódio.

A ausência do grupo α -ciano (piretróides tipo I), como por exemplo a permetrina, resulta num efeito mais curto. A permetrina está associada à síndrome T (tremor) [42], que é caracterizado pela sua pouca agressividade uma vez que os sintomas correspondem a um aumento da sensibilidade a estímulos externos e pequenos tremores [37]. O LD₅₀ obtido em ratos após a exposição oral à permetrina é $> 6000\text{mg/kg}$ [46].

A presença do grupo α -ciano (piretróides tipo II), como por exemplo a deltametrina está associada ao aparecimento da síndrome CS (coreatetose com salivação) [42], caracterizado pela salivação excessiva, ataxia, convulsões e hiperatividade. Este tipo de inseticidas tem assim um efeito mais longo e duradouro do que o efeito provocado pela exposição à permetrina [37]. O LD₅₀ obtido em ratos após a exposição oral à deltametrina varia entre 200-800 mg/kg [46].

No entanto, existem inseticidas como a fenpropatrina que provocam ambos os efeitos, tremores e salivação excessiva [37].

Ambos os tipos de piretróides I e II, inibem o sistema nervoso dos insetos assim como uma despolarização na célula nervosa, a diferença entre eles reside no modo como se ligam aos canais de sódio. Os de tipo I, originam sinais repetitivos com variações de potencial; os piretróides de tipo II, originam uma despolarização mais longa após cada variação de potencial, tendo como consequência sinais não repetitivos, mas um aumento da despolarização, resultando numa falência na transmissão nervosa [45].

1.7. Metabolitos piretróides

Diversos estudos em animais permitiram a identificação de importantes metabolitos dos inseticidas piretróides [47].

Nos humanos após a exposição aos piretróides, ocorre uma rápida metabolização, há uma quebra provocada pelas enzimas carboxilesterases presentes na sua maioria no fígado, resultando substâncias não tóxicas denominadas de metabolitos.

A destoxificação do organismo ocorre rapidamente uma vez que os metabolitos originados são excretados na urina, nas horas que se seguem, em diferentes formas: 1-10% sobre a sua forma livre, 7-15% conjugados com o glucorínídeo e os restantes sobre a forma de metabolitos [16]. Na Figura 3 está representado o esquema de metabolização de um piretróide nos mamíferos.

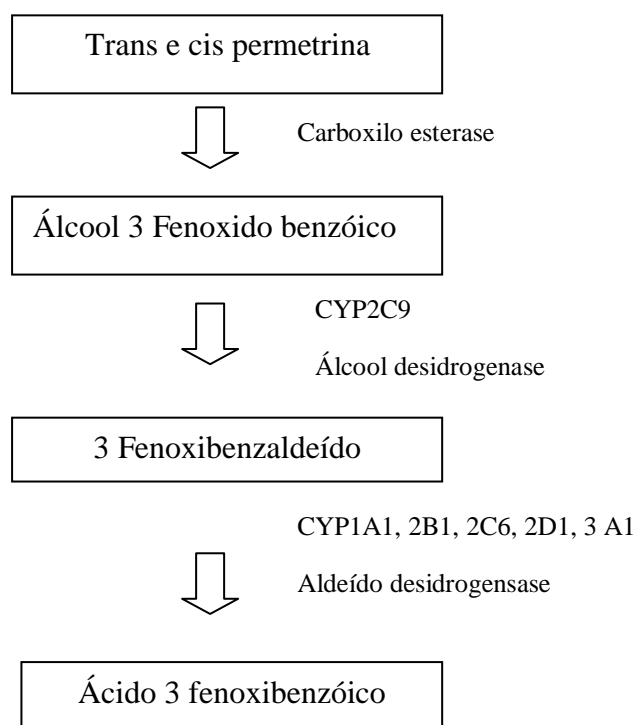


Figura 3: Mecanismo de destoxificação da permetrina nos mamíferos.(Adaptado de [39]).

Os metabolitos piretróides mais frequentemente encontrados na urina, e derivados dos principais inseticidas piretróides são: o ácido 3-fenoxibenzóico (“*3-phenoxybenzoic acid*”) (3-PBA) e ácido crisântemo-dicarboxílico (“*chrysanthemumdicarboxylic acid*”) (CDCA).

O ácido 3- (2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano1-carboxílico (“*3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane1-carboxylic acid*”) (DCCA) é menos específico, no entanto, deriva de vários piretróides presentes em produtos atualmente comercializados como a ciflutrina, cipermetrina e a permetrina. Por outro lado o ácido 4-fluoro3-fenoxibenzóico (“*4-fluoro 3-phenoxybenzoic acid*”) (F-PBA) e o ácido cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano1-carboxílico (“*cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane1-carboxylic acid*”) (DBCA), são metabolitos específicos dos piretróides e derivam dos pesticidas ciflutrina e da deltametrina. (Figura 4) [39].

O 3-PBA, DCCA e o CDCA, são considerados os mais relevantes, uma vez que são encontrados na urina em maior quantidade.

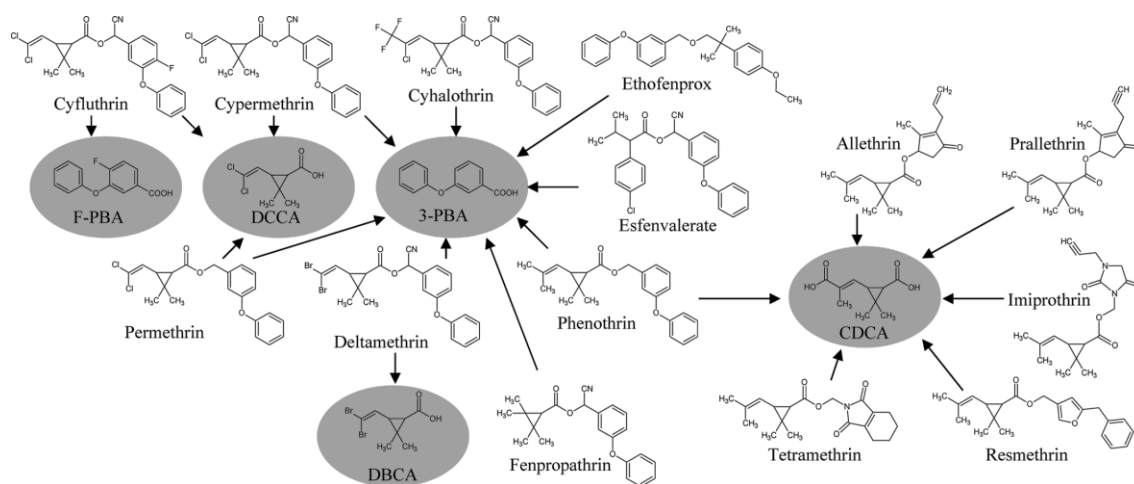


Figura 4: Piretróides e os seus metabolitos [39].

Os metabolitos DCCA, o trans-DCCA e F-PBA têm um tempo de semivida de 6,4 horas sendo excretados nas primeiras 24 horas após a exposição. Para o metabolito trans-DCCA, após 72 horas a sua concentração já está abaixo do limite de detecção ($0,1\mu\text{g}/\text{L}$) [48]. O tempo de semivida para diferentes piretróides no sangue, após a exposição pelas diferentes vias, foi determinado entre 2,5 horas e 12 horas em mamíferos. Como consequência do rápido metabolismo, as concentrações de componentes intactos no sangue e soro são consideravelmente mais baixas do que os metabolitos encontrados na urina. Assim, a determinação de metabolitos piretróides encontrados na urina tem sido útil para compreender a exposição a este tipo de pesticidas [49].

A etapa da desconjugação de metabolitos é realizada seguindo um método previamente descrito [47], recomendado para a determinação dos metabolitos de piretróides totais excretados (conjugados e livres) [39] (Figura 11).

Cerca de 98 % dos metabolitos são excretados na urina após as primeiras 48 horas após a exposição [48]. Após a exposição à ciflutrina, 93% dos metabolitos são eliminados na urina durante as primeiras 24 horas [17].

No estudo destes metabolitos, para além da desconjugação, é necessário a realização da derivatização, esta etapa tem como objectivo promover a volatilização e assim poder-se utilizar a GC para a sua quantificação. Na Figura 5 está representada uma reacção de derivatização entre o 3-PBA e o hexafluoroisopropanol.

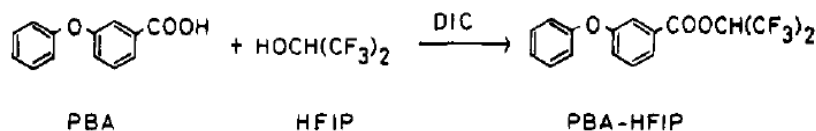


Figura 5: Reação do ácido 3-fenoxibenzoico com álcool hexafluoroisopropanol

1.8. Métodos de extração

A análise de metabolitos de piretróides em urinas não pode ser efetuada sem uma prévia preparação da amostra. Por um lado, a urina é uma matriz complexa, e por outro, os metabolitos encontram-se em concentrações muito baixas para as técnicas analíticas vulgarmente utilizadas.

É necessário extrair os analitos do meio em que se encontram, neste caso urina, concentrando-os e removendo outros compostos que possam interferir na análise. Os métodos recomendados para a extração e concentração de piretróides em urina são a extração liquido-liquido (LLE) [48, 50] e a extração em fase sólida (SPE) [51, 52].

1.8.1. Extração em fase sólida (SPE)

Uma das etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas consiste na extração e no isolamento dos analitos de interesse, para que seja efetuada a sua determinação qualitativa e quantitativa por intermédio de uma técnica analítica adequada. A extração consiste na transferência de uma substância existente numa fase, na qual está dissolvida ou suspensa, para uma outra fase.

A extração em fase sólida surgiu no mercado no ano de 1978 como alternativa à técnica LLE, sendo atualmente uma das técnicas mais utilizadas na extração e/ou pré-concentração e purificação (“*clean-up*”) de amostras complexas, permitindo que os analitos de interesse, presentes em concentrações muito baixas, sejam detetados por métodos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), a Cromatografia Gasosa (GC) e Eletroforese Capilar.

De um modo geral, esta técnica de separação líquido-sólido consiste em concentrar e purificar um analito de uma solução através da sua retenção após o contacto com uma fase sólida e posterior eluição com um solvente apropriado,

seguindo-se a sua análise instrumental. A fase sólida é constituída por pequenas partículas porosas de sílica funcionalizada com uma fase orgânica.

As fases sólidas usadas em SPE encontram-se dispostas em três formatos básicos: discos, cartuchos (polipropileno ou vidro) e seringas. Em particular, quanto aos cartuchos, o seu tamanho varia em função da quantidade de fase sólida utilizada, assim como o diâmetro das partículas de enchimento. Os cartuchos podem conter pequenos estreitamentos nas extremidades, de modo a serem adaptados em seringas, colunas cromatográficas e sistemas em linha. O disco possui enchimentos com tamanho de partícula inferior à dos cartuchos. Esta característica proporciona uma maior capacidade de retenção e maior reprodutibilidade, com redução do tempo analítico quando são analisados grandes volumes da amostra.

A técnica SPE é uma técnica simples que confere maior seletividade à extração, melhores recuperações, e pode resultar numa maior segurança para quem trabalha e para o ambiente de laboratório, por possibilitar automatização [29, 52]. São atualmente muito numerosas as publicações que referem o recurso a esta técnica para a extração, concentração e limpeza do analito de diversos tipos de matrizes [52].

Quando se decide utilizar a técnica de SPE como metodologia, a primeira etapa é escolher o formato e capacidade do dispositivo de SPE e a seleção do enchimento adequado. Os enchimentos podem genericamente ser classificados como apolares, polares, de troca iónica e de adsorção. A escolha do enchimento está relacionada com as características do analito. O procedimento de SPE é constituído por 4 etapas:

- 1- Condicionamento que consiste na solvatação dos grupos funcionais do sorbente, por passagem de um ou mais solventes orgânicos que irão promover a sua ativação e melhorar a superfície de contacto entre as fases;
- 2- Introdução e retenção do analito. A amostra líquida é adicionada ao dispositivo e a sua passagem pela fase sólida é feita com o auxílio de vácuo. É necessário controlar a velocidade do fluxo, que deve ser constante e ininterrupto para evitar que a fase sólida seque e a presença de bolhas de ar na coluna diminua a eficiência de contacto entre as fases sólida e líquida. Normalmente quanto mais lento o fluxo, maior o tempo de contacto entre as fases e maior a retenção do analito. Pode ainda ser vantajoso o controlo do pH ou força iónica para uma retenção mais efetiva do(s) analito(s) no enchimento.

- 3- Lavagem que permite a remoção de alguns interferentes que tenham ficado retidos, podendo usar-se o próprio solvente da amostra ou um solvente mais fraco, que não promove a remoção prévia do analito;
- 4- Eluição do analito, sendo uma das etapas mais importantes em todo este processo. Nesta etapa pretende-se remover o analito retido no enchimento com o mínimo de solvente, a fim de obter uma solução concentrada para posterior análise. O solvente mais forte e seletivo, pode ser constituído por um único solvente ou mistura deles.

1.9. Métodos de análise - Cromatografia

A cromatografia é um método eficaz de separação, identificação e determinação de componentes químicos que encontra aplicação em todos os ramos da ciência. Começou a ser utilizada no início do século XX pelo botânico russo *Mikhail Tswett*. O nome de cromatografia provem do grego *chroma* que significa cor e *graphein* que significa escrever. O nome surgiu na sequência do uso da técnica para separar vários pigmentos de plantas como a clorofila e a xantofila. As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna [30, 53].

O uso da cromatografia aumentou exponencialmente nos últimos anos, na sequência da necessidade de separação de compostos de matrizes complexas, identificação de compostos por comparação com padrões previamente existentes e purificação de compostos, resultando no desenvolvimento de vários tipos de técnicas cromatográficas (possibilidade de diversas combinações entre as fases estacionárias e móveis) [30].

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluído supercrítico. A fase móvel é forçada através da fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e estacionária em diferentes graus.

Como consequência os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. O contrário acontece com os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente.

A figura 6 mostra de forma esquemática, como duas substâncias A e B são separadas numa coluna por eluição cromatográfica (lavagem de uma espécie através da coluna por adição continua de novos volumes de solvente) utilizando uma fase móvel líquida.

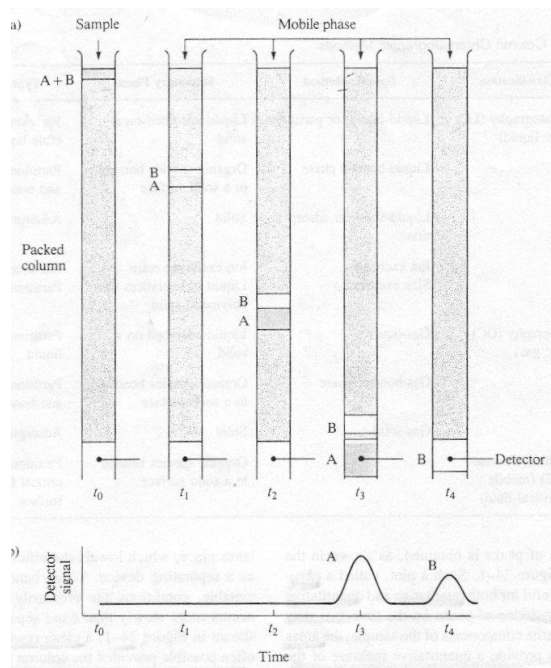


Figura 6: Separação cromatográfica de duas substâncias (A e B)

Algumas variáveis físicas e químicas influenciam a separação dos componentes da amostra. Para melhorar a separação desses componentes podem ser realizados testes com as variáveis de modo a compreender qual a melhor maneira de obter resultados mais fidedignos [53].

1.9.1. Cromatografia gasosa

A Cromatografia Gasosa (GC) é uma técnica de separação química em que os componentes são separados em duas fases, estacionária e móvel. A cromatografia ocorre como resultado de processos repetidos de adsorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária. A separação é devida à diferença constante de distribuição de cada um dos componentes da amostra.

A GC é a técnica de eleição e a mais utilizada para a determinação de piretróides em variadas matrizes: água [54], sangue [16, 50], urina [16, 51, 55], ovos [56], frutos [57, 58], vegetais, chá [31] e lixo doméstico [54].

A constituição básica deste equipamento é uma coluna, um forno, um detetor, uma fase móvel gasosa (chamada de gás de arraste) e uma fase estacionária líquida ou sólida. Na GC, a amostra é vaporizada e injetada numa coluna.

Em contraste com a maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, apenas tem a função de transporte do analito através da coluna. O gás de arraste mais frequentemente utilizado na GC é o hélio, contudo podem também ser utilizados o argon, nitrogénio e o hidrogénio.

Podem ser diferenciados 2 tipos de cromatografia gasosa: cromatografia gasosa e líquida (GLC) e cromatografia gasosa e sólida. A GLC é também vulgarmente conhecida como cromatografia gasosa (GC), apresenta muitas aplicações, sendo por isso a mais utilizada.

As microseringas (Figura 7), são utilizadas para injetar amostras líquidas através de uma borracha, diafragma ou septo. A amostra é aquecida e mantida a uma temperatura superior à temperatura de ebulição do composto menos volátil até à entrada da substância na coluna. A quantidade de amostra a ser analisada pode variar entre alguns décimos de microlitro até 20 μ L.

Um “splitter” é muitas vezes necessário uma vez que permite apenas ter conhecimento de uma fração da amostra injetada, sendo a restante amostra eliminada.

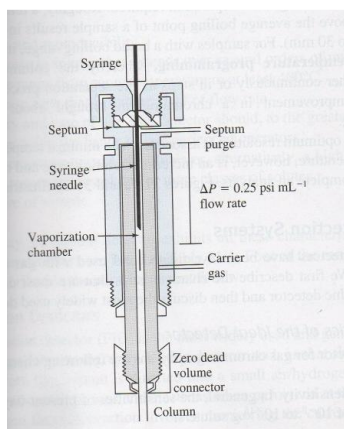


Figura 7: Vista longitudinal da seringa e injetor

1.9.2. Detetores de cromatografia gasosa

Diversos detetores podem ser utilizados usando o GC. As características que um detetor ideal deve apresentar são: sensibilidade adequada, normalmente variando entre 10⁻⁸ e 10⁻¹⁵ g por soluto, boa sensibilidade e reprodutibilidade, resposta linear a diversos

solutos, temperatura pelo menos 400⁰C, resposta num curto período de tempo; confiança em cada utilização, não destruir a amostra, entre outros. Dos diversos detetores atualmente disponíveis para a cromatografia gasosa, um dos mais eficazes é o espectrómetro de massas. A espectrometria de massa (MS) tem a capacidade de garantir, com um elevado grau de segurança, a identidade do analito. A Tabela 4 mostra tipos de detetores, assim como o tipo de analito mais adequado a cada um.

Tabela 4: Diferentes tipos de detetores.

<u>Detetores de Cromatografia Gasosa</u>	<u>Amostras</u>	<u>Limite de deteção</u>
Ionização de chama (FID)	Hidrocarbonetos	0.2 pg/s
Condutividade térmica (TCD)	Detetor universal	500 pg/mL
Captura de eletrões (ECD)	Compostos Halogenados	5 fg/s
Espectrometria de massa (MS)	Qualquer amostra	0.25-100 pg
Azoto e fósforo (NPD)	Nitrogénio e compostos fosforados	1 pg/s (N) 0.1 pg/s (P)
Condutividade eletrolítica	Compostos contendo halogénios, enxofre ou nitrogénio	0.5 pg Cl/s 2 pg S/s 4 pg N/s
Fotoionização	Compostos ionizados com radiação ultra violeta (UV)	2 pg C/s
Transformada de Forrier IR	Compostos orgânicos	1a 40ng

1.9.3. Espectrometria de massa

Espectrometria de massa (MS) é um dos mais poderosos detetores para o GC. A combinação de cromatografia gasosa e espectrometria de massa é conhecida como GC-MS. As amostras provenientes do cromatógrafo gasoso, no estado gasoso, são bombardeadas por eletrões e são fragmentadas gerando iões positivos, negativos e radicais, que posteriormente serão separados a partir da diferença entre massa/carga dos iões gerados. O detetor de massas determina a massa molecular da carga em relação aos iões produzidos na amostra (m/z). A amostra entra (inlet) na fonte de ionização onde pode ser distinguido o impacto de eletrão (EI) e a ionização química (CI), nesta etapa as ligações químicas das moléculas da amostra são quebradas e convertidas em iões moleculares, iões fragmentados e moléculas não ionizadas (Figura 8). Os iões fragmentados e as moléculas ionizadas normalmente são excluídos pela bomba de vácuo e posteriormente fragmentadas pela fonte de ionização [32].

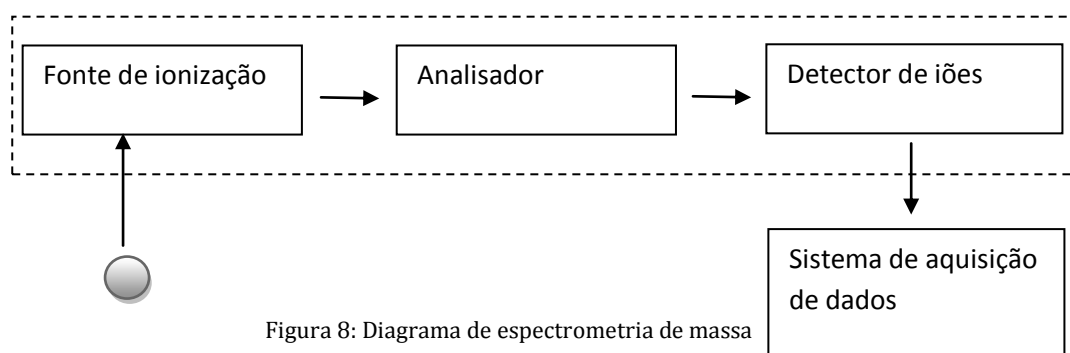


Figura 8: Diagrama de espectrometria de massa

A espectrometria é constituída por 4 componentes principais: introdução da amostra, ionização, analisador e deteção.

1.9.3.1. Analisador de Massa

O analisador de massa separa as espécies ionizadas de acordo com a razão (m/z). Esta separação é obtida através do uso de campos magnéticos ou setores elétricos, numa armadilha de iões (*Ion trap*), num campo magnético quadropolar.

Existe um grande número de métodos de separação de iões, no entanto, neste trabalho é utilizado o quadrupolo e a armadilha iónica. Assim sendo, somente estes serão abordados mais detalhadamente.

O quadrupolo é essencialmente um filtro de massa, que, num determinado conjunto de parâmetros, somente os iões com m/z estipulada passam através do quadrupolo e atingem o detetor.

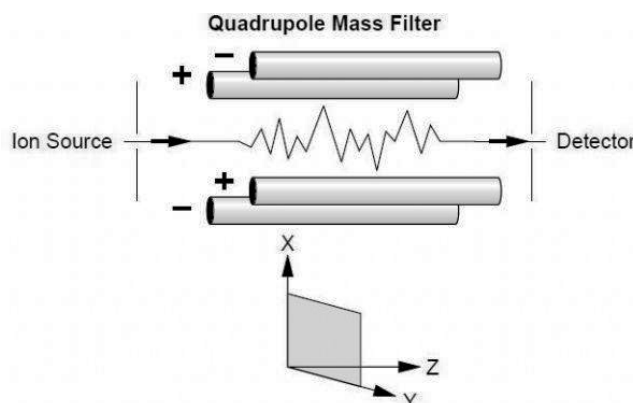


Figura 9: Esquema de funcionamento do analisador quadrupolo (adaptação da referência [59])

O analisador quadrupolo (Figura 9) consiste em quatro elétrodos metálicos paralelos, arrançados em dois pares opostos. Uma corrente contínua (DC) e uma corrente alternada (AC) são aplicadas a cada um dos pares de iões.

A utilização da corrente contínua e alternada, altera a trajetória centralizada de iões. Com a alteração dos potenciais, apenas os iões com determinada razão m/z irão atravessar no centro do quadrupolo, enquanto que os outros serão desviados da trajetória central. Num determinado domínio, os iões com razão (m/z) definida podem passar através do quadrupolo seguindo o percurso oscilante, sendo denominados por **iões ressonantes**, sendo estes os que atingem o detetor. Todos os iões não ressonantes são parados pelo quadrupolo. Se o objetivo for obter um espectro com todas as razões (m/z), o potencial da corrente contínua e a amplitude da corrente alternada são aumentados e todos os iões tornam-se sequencialmente ressonantes, atingindo conseqüentemente o detetor.

Os analisadores de quadrupolo são caracterizados pelo fácil manuseamento e pela sua robustez. Atingem razões (m/z) até valores de 4000 [60, 61].

A armadilha iónica é constituída por um elétrodo central (forma anelar) e dois elétrodos terminais, e é no centro da armadilha iónica que os iões são capturados. Para obter uma maior eficácia os iões deve estar localizados mesmo no centro, é sendo aplicado um potencial RF no elétrodo central, provocando nos iões uma trajetória estável.

Existem dois tipos de armadilha iônica: quadrupolo tridimensionais (captura dinâmica) e ressonância ciclotrônica de íons (captura estática). Ambos funcionam acumulando íons no seu interior, através da manipulação de correntes alternada e de radiofrequência, simultaneamente. A captura permite a libertação controlada de íons, o que permite a sua separação controlada e com uma resolução elevada [61].

1.9.3.2. Detetor

Na maioria dos detetores os íons são detetados após a colisão com a sua superfície, resultando na emissão de elétrons, fótons e outros íons que podem ser medidos por detetores de carga ou radiação. Exemplos de alguns detetores são *Faraday-cup*, multiplicador de elétrons, ressonância ciclotrônica de íons ou uma placa multicanal (MCP).

Os detetores introduzem sinais cujas frequências são inversamente proporcionais aos valores de (m/z) [61].

1.9.3.3. Deteção por espectrometria de massa

Quando a espectrometria de massa for efetuada através de espectro em modo de varrimento total de íons (“Full-scan”), é obrigatória a presença do espectro de referência do padrão de calibração, de todos os íons de diagnóstico analisados (íons moleculares, íons fragmentados característicos e os íons isótopos). Quando a determinação por espectrometria em modo de monitorização seletiva de íons (SIM), o íon molecular deve, de preferência, ser um dos íons de diagnóstico selecionados.

A interpretação dos espectros de massa pode ser realizada através da comparação de espectros.

As intensidades relativas dos íons detetados devem corresponder às do padrão de calibração [62].

1.10. Outros métodos de análise de metabolitos de piretróides na urina

Para além dos principais métodos de determinação de metabolitos de inseticidas piretróides na urina já descritos, existem outros métodos que se descrevem resumidamente.

Na Tabela 5 estão resumidos alguns dos métodos utilizados na deteção do metabolito 3-PBA assim como o LOD obtido e o volume da amostra necessária, utilizados noutros estudos.

Tabela 5: Metodologias utilizadas na detecção do metabolito 3-PBA na urina (adaptado referência [39]).

<u>Método analítico</u>	<u>Tratamento da amostra</u>	<u>Volume da amostra (mL)</u>	<u>LOD ($\mu\text{g/L}$)</u>	<u>Referência</u>
GC-EI-MS	LLE (n-hexano), derivatização	5	0.3	Khun, 1996 [55]
GC-EI-MS	SPE, derivatização	10	0.5	Angerer, 1997 [29]
LC-APCI-MS/MS	LLE	10	0.5	Baker, 2000[63]
GC-EI-MS	LLE (n-hexano), derivatização (MTBSTFA)	10	0.05	Schettgen, 2002 [46]
LC-APCI-MS/MS	SPE	2	0.1	Olsson, 2004 [41]
LC-APCI-MS/MS	SPE	2	0.1	Baker, 2004 [64]
LC-API-MS/MS	Extração com solução de CaCl_2	75	0,1	Hu, 2004 [43]
GC-EI-MS	LLE, derivatização	2	0.01	Leng, 2005 [50]
ELISA	Ensaio imunoenzimáticos			Kim, 2009 [65]

Capítulo II. Objetivos

Objetivos

Em Portugal, as intoxicações por pesticidas são a causa de um número considerável de mortes. Intoxicações acidentais ou intencionais, alimentos contendo resíduos de pesticidas, proteção indevida aquando da aplicação da substância assim como o risco de bioacumulação são fatores importantes nas intoxicações por pesticidas que foram considerados na escolha deste trabalho.

Entre os mais de 12 milhões de produtos químicos conhecidos, menos de 3000 provocam a maioria das intoxicações acidentais e deliberadas. No entanto, segundo Paracelsus qualquer substância ingerida em grandes quantidades pode ser tóxica [66].

Os pesticidas são constantemente utilizados em todo o mundo, na agricultura, na saúde, para uso doméstico e veterinário. Até a década de 80, os pesticidas organoclorados, foram usados intensivamente, mas, devido à sua bioacumulação e ao impacto ambiental o seu uso passou a ser proibido na maioria dos países desenvolvidos.

Depois dos anos 80 os pesticidas piretróides e os organofosforados começaram a ser utilizados devido principalmente ao vasto leque de aplicações: agricultura, saúde, veterinário e uso doméstico, no entanto a toxicidade dos piretróides é muito inferior à dos organofosforados.

A nível mundial estes pesticidas são utilizados também em têxteis, cereais e outros produtos em armazém.

Atualmente são comercializados em Portugal produtos que têm na sua constituição permetrina, cipermetrina, ciflutrina, deltametrina e fenvalerato. Em Portugal são utilizados também como medida preventiva para a traça (tapetes de Arraiolos), produtos alimentares armazenados, agricultura e uso doméstico.

A exposição aos pesticidas piretróides pode ocorrer através da pele, ingestão ou inalação. Após a exposição são rapidamente metabolizados no organismo pela enzima carboxilesterase e após a metabolização, 90 % dos compostos são excretados entre 6-24 horas seguintes [67]. Os metabolitos escolhidos para a realização deste trabalho foram o ácido 3 fenóxidobenzóico (3-PBA) e ácido 2-fenóxidobenzóico (2-PBA) (padrão interno).

Com exceção da Alemanha não há dados nos restantes países da Europa sobre a exposição da população a estes pesticidas. Sendo Portugal de clima mediterrânico, é de supor uma exposição bastante diferente à de um país como a Alemanha. Existe por isso

uma lacuna no nosso país sobre a avaliação da exposição da população Portuguesa a estes pesticidas.

Para este estudo são necessários métodos analíticos sensíveis para detetar níveis baixos de metabolitos de piretróides em amostras biológicas [67]. Os métodos analíticos para a determinação destes metabolitos têm de ser sensíveis para a determinação da exposição da população em geral a este tipo de pesticidas. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é a técnica eleita na maioria dos estudos já realizados para deteção destes metabolitos em amostras biológicas [39].

Este trabalho tem como principais objetivos a otimização das etapas envolvidas na análise de amostras por GC-MS para posterior determinação e quantificação do metabolito piretróide 3-PBA na urina; validação do método otimizado e por último a análise de urinas provenientes de uma amostra da população do Norte de Portugal com idades até aos 35 anos.

Capítulo III: Material e métodos

3.1. Introdução

A parte experimental deste estudo englobou as seguintes fases: i) desenvolvimento de uma metodologia para a extração (SPE), ii) otimização do procedimento de derivatização e por último iii) quantificação de metabolitos de pesticidas piretróides em urinas por GC-MS.

O trabalho iniciou-se com uma pesquisa bibliográfica para a adaptação do método adequado. Também se obtiveram as razões m/z para a deteção dos metabolitos.

Terminada a fase de preparação de soluções foi necessário identificar os iões e o tempo de retenção correspondentes aos metabolitos previamente escolhidos para este estudo.

A parte experimental propriamente dita iniciou-se com a identificação do tempo de retenção do metabolito e os iões identificativos. Seguiu-se a determinação da reta de calibração, passo que foi realizado de acordo com as concentrações referidas na bibliografia.

Com a conclusão da reta de calibração e a validação do método a utilizar, procedeu-se à colheita e análise das urinas.

3.2. Reagentes

Em todo este trabalho a água utilizada foi água desionizada com resistividade (15.0 MΩ cm) produzida por Elix apparatus (Millipore, Molsheim, France).

O metabolito piretróide selecionado foi o ácido 3-fenoxibenzoico (3-Phenoxybenzoic-acid) (3-PBA) pureza 98%, enquanto o ácido 2-fenoxibenzoico (2-phenoxybenzoic acid) (2-PBA) pureza 98% foi utilizado como padrão interno, ambos os compostos foram obtidos da Sigma Aldrich, Madrid®.

Reagentes derivatizantes: 1,1,1,3,3,3 - Hexafluoroisopropanol (HFIP) pureza 99%, N,N disopropilcarbodiimida (DIC) pureza 99%, ambos obtidos da Sigma Aldrich.

Foram testados 4 tipos de cartuchos, Chromabond HR-X com as seguintes características: área 1200 m²/g e adequado para compostos aromáticos, fenóis em águas, compostos nitroaromáticos em águas, pesticidas em águas [68]; o cartucho Strata XC com área 800 m²/g e adequado compostos de matrizes biológicas [69]; o cartucho Strata

C-18 com área 500 m²/g e adequado para compostos hidrofóbicos e com cadeias de carbono na sua constituição[70]; por último o cartucho Techelut para o qual não foi encontrada informação.

Solventes utilizados na SPE: ácido clorídrico (HCl) pureza 37% obtido em Carla Erba Reagents. Rodano Italy; acetato de etilo (EtOAc) pureza >99,5% obtido da Siga Aldrich, França; Amoníaco (NH₄); metanol (CH₃OH) obtido em Valente Ribeiro, Belas Portugal e Carbonato de Potássio (K₂CO₃) pureza 99% obtido na Merck.

Outros compostos necessários neste trabalho: acetonitrilo (ACN) da Merck, Darmstadt Germany; hidróxido de potássio (KOH) pureza 87,5 % obtido em José M. Vaz Pereira, Lisboa Portugal e n-hexano da Sigma Aldrich, Alemanha.

3.3. Preparação de soluções:

Todas as soluções de padrão de metabolitos de pesticidas piretróides foram preparadas por pesagem rigorosa da substância pura e posterior dissolução, em N-hexano para a solução de 2-PBA, e em acetonitrilo (ACN) para a solução de 3-PBA. As concentrações obtidas inicialmente foram 150 mg/L na solução de 2-PBA e 14,6x10² mg/L na solução de 3-PBA. A partir de cada solução foram preparadas por diluição outras soluções com diferentes concentrações.

No caso da solução de 2-PBA foi feita uma solução diluída 200x a partir da solução mãe₁. Esta nova solução passou a ser usada como padrão interno.

A partir da solução mãe₂ (3-PBA), foram realizadas mais 6 soluções com diversas concentrações (0.5; 1; 3; 5; 8 e 10 µg/L), utilizadas para a realização da reta de calibração.

Na avaliação da recuperação por SPE, a concentração utilizada foi 1 µg/L para ambas as soluções.

O material de vidro utilizado foi sempre colocado em lixívia durante 24 horas, posteriormente lavado com solução de detergente By-Prox, passado por água corrente, água desionizada, e por último seco em estufa a 55 °C Raypa® Trade.

3.4. Amostragem e conservação das amostras

A pesquisa de metabolitos de pesticidas piretróides em urinas foi realizada num conjunto de amostras provenientes de população na sua maioria do Norte de Portugal com idades até aos 35 anos.

Foi pedido aos voluntários a colheita da primeira urina do dia. Aos voluntários foi entregue um recipiente adequado para urinas já identificado e um questionário. As informações solicitadas foram a idade, sexo, local de residência, profissão, tipo de alimentação, a existência de animais domésticos em casa, utilização de produtos anti pulgas e carraças, utilização de inseticidas em casa, utilização de algum tratamento para piolhos, entre outros (anexo A). Todos os participantes no estudo assinaram uma declaração de consentimento informado (Anexo B).

Cada amostra era etiquetada com o mês da colheita e um número sequencial. Após esta etapa as amostras foram armazenadas a - 20°C até a realização da análise.

3.5. Equipamento

As análises por GC, foram efetuadas num equipamento Thermo Trace-Ultra, acoplado a detetor de massas Thermo Polaris, funcionando no modo de impacto de eletrões (EI) a 70 eV, estando ligado a um sistema de aquisição e integração de dados Xcalibur (Figura 10).



Figura 10: Equipamento de cromatografia gasosa, GC Trace Ultra (1), com deteção através do espectrómetro de massa tandem (MS/MS9 com armadilha iónica, MS Polaris Q da Thermo (2) acoplado ao injetor automático AI-AS 3000 (3) [71]

3.6. Metodologia Analítica

Neste subcapítulo serão descritos os procedimentos relativos à preparação da amostra, passando pelo processo de desconjugação dos metabolitos, extração em fase sólida, processo de derivatização e por último identificação e quantificação dos metabolitos de pesticidas piretróides em estudo.

3.6.1. Desconjugação dos metabolitos

Foi adicionado 1 mL de hidróxido de potássio à amostra (5mL de urina e 5 mL de água) e posteriormente aquecida num banho a 70⁰C durante 15 minutos [47].



Figura 11: Aquecimento da amostra para a desconjugação de metabolitos

3.6.2. Extração em Fase Sólida

Foram testados 4 cartuchos de SPE Chromabond HR-X, Strata-XC, Starta C18-E e TechElut (descrito na secção 3.2. Reagentes).

Na extração em fase sólida dos metabolitos 3-PBA e padrão interno, o 2-PBA, o procedimento é constituído por 3 fases: condicionamento, passagem da amostra, lavagem e eluição.

Quanto à fase de condicionamento utilizou-se 5 mL de Acetato de Etilo (EtOAc), 5 mL de metanol (MeOH), 5 mL de água desionizada e 5 mL HCl 1N.

Após o condicionamento dos cartuchos fez-se passar a amostra, sem deixar entrar ar. De seguida adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico 0.1N (HCl), 5mL de hidróxido de amónio (NH₄OH), 5mL MeOH e por último 5mL de EtOAc.

Posteriormente deixou-se a bomba de vácuo ligada durante cerca de 1 hora para cada cartucho de modo a garantir a secagem dos cartuchos. Finalmente a extração foi realizada com 5 mL de 5% MeOH em EtOAc [47] (Figura 12).



Figura 12: Sistema de SPE utilizado com cartuchos Strata X-C

3.6.3. Derivatização

A derivatização é uma etapa fundamental para a determinação de metabolitos piretróides na urina, após a adição dos reagentes de derivatização HFIP e DIC, formam-se derivados dos ácidos carboxílicos com boas propriedades cromatográficas o que permite serem facilmente detetados no GC-MS (aumento da sensibilidade), ao mesmo tempo que são eliminadas as substâncias interferentes [51].

É então adicionado 20 e 30 µL de DIC e HFIP, respetivamente, ao eluato obtido do SPE, seguindo-se da agitação no vortéx durante 10 minutos.

3.6.4. Extração Líquido-líquido

Na fase final do procedimento é feita uma extração líquido-líquido (LLE), para obtenção dos metabolitos numa fase, que tem também como função a neutralização do excesso do reagente derivatizante [51].

Foi adicionado 1 mL de Carbonato de potássio à amostra (250 µL de n-hexano e 50 µL de reagente derivatizantes), seguiu-se a agitação manual da amostra durante 10 minutos. Com uma micropipeta retirou-se 50µL do sobrenadante (n-hexano) onde se encontram os metabolitos, transferindo-se esta quantidade para um “insert” colocado dentro de um vial. A etapa é repetida uma segunda vez. Na segunda extração são ainda recuperados mais 36 % dos metabolitos 3-PBA e 2-PBA.

3.6.5. Cromatografia

A Tabela 6 resume os dados mais pertinentes sobre a separação e deteção de metabolitos de piretróides no GC em urinas. Nesta tabela estão especificados o tipo e tamanho da coluna, o gás de arraste e o detetor utilizado, o volume injetado, as temperaturas do forno, injetor e detetor.

Tabela 6: características GC utilizados e programa utilizado

<u>Metabolito piretróide</u>	<u>2-PBA/3-PBA</u>
Tipo de coluna capilar	ZLB-XLB
Detetor	Captura de iões, detetor espectrometria de massa Polaris Q, MS ⁿ (n > 5) detetor.
Programa	Xcalibur obtido de Thermo Finigan
Tamanho da coluna analítica	30m x 0.25 mm (diâmetro interno) obtido Phenomenex
Programa Coluna	40 ⁰ C aumento de 15 ⁰ C durante o seguinte minuto até atingir a temperatura final de 260 ⁰ C
Temperatura Liner	250 ⁰ C
Gás de arraste/ fluxo	Hélio; 1.3mL/min.
Detetor	MS
Volume injetado	1µL

3.7. Validação da metodologia analítica:

Na fase de validação da metodologia analítica proposta, estudou-se a escolha dos iões correspondentes aos metabolitos piretróides selecionados para este trabalho, a linearidade da resposta do detetor para a relação existente entre a concentração de cada analito e a área correspondente (numa gama de concentrações selecionadas), o tempo de retenção de cada analito e testou-se também 4 cartuchos de extração em fase sólida.

A precisão das metodologias desenvolvidas foi avaliada através dos parâmetros de repetibilidade para um número N de injeções sucessivas, nas mesmas condições operatórias, através do coeficiente de variação (CV) expresso em percentagem [72] definido pela seguinte expressão:

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \times 100 \quad (1)$$

onde *s* e *x* representam, respetivamente, o desvio padrão e a média das determinações.

No decorrer deste trabalho utilizou-se sempre a média de pelo menos três injeções para quantificar um metabolito, eliminando-se o valor correspondente a uma injeção quando o CV era superior a 10%.

Os valores de recuperação, expressos em percentagem, foram calculados através de seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}} \times 100 \quad (2)$$

em que A_{amostra} é a área obtida do metabolito do pesticida após a extração por SPE a $A_{\text{padrão}}$ é a área obtida desse pesticida numa solução padrão em n-hexano. A solução padrão é preparada com o mesmo volume de extracto final obtido por SPE e tem a concentração igual à que se obteria se a recuperação do pesticida por SPE, fosse de 100%.

Os limites de deteção (LOD) do método cromatográfico foram calculados a partir dos parâmetros estatísticos das curvas de calibração, pela expressão 3:

$$LOD = \frac{3 \times []_{\text{escolhida}}}{sn} \quad (3)$$

em que o sn é a razão sinal/ruído correspondente à concentração escolhida na reta de calibração.

Os limites de quantificação (LOQ) do método cromatográfico foram calculados a partir da expressão 4:

$$LOQ = \frac{10 \times []_{\text{escolhida}}}{sn} \quad (4)$$

em que o sn é a razão sinal/ruído correspondente à concentração escolhida na reta de calibração.

3.8. Metodologia de análise estatística:

A análise dos dados envolvendo métodos estatísticos, como a comparação de médias e desvios padrão foi realizada com o programa Microsoft Office Excel 2007, e o

programa de análise estatística SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16 para o Windows. Os teste utilizados no programa SPSS foram Shapiro wilk e Kolmog-Smirnov, teste Spearman e por ultimo o teste Kolmogorov-Smirnov.

3.9. Tratamento dos resíduos gerados e medidas preventivas:

As soluções residuais resultantes deste trabalho com metabolitos de pesticidas em n-hexano foram armazenadas num recipiente de acordo com as normas de segurança, colocando o rótulo existente no laboratório do TRELAB (Anexo D) onde podem ser preenchidos as seguintes informações:

- Disciplina
- Componentes
- Observações: (responsável pelo trabalho)

O tratamento de resíduos resultantes de trabalhos experimentais no laboratório tem como objetivo permitir a reutilização de algumas substâncias em trabalhos menos rigorosos e diminuir o impacto ambiental que algumas das substâncias poderiam provocar caso não sofressem nenhum tratamento antes da sua rejeição.

O trabalho realizado foi sempre executado com bata, luvas adequadas para solventes orgânicos e sob condições adequadas de ventilação.

Capítulo IV: Resultados:

4.1. Otimização do Método GC-MS:

Para a análise qualitativa operou-se inicialmente em modo de varrimento total de iões (“Full scan”) de m/z , [50 – 650] e depois em modo de monitorização seletiva de iões (*SIM*) para análise quantitativa com diferentes concentrações dos analitos. Foram obtidos cromatogramas dos compostos estudados no equipamento GC Trace Ultra-MS Polaris Q. Parâmetros técnicos como as condições de injeção, fluxo e gradientes de temperatura foram continuamente monitorizados para a obtenção de uma melhor resolução dos picos cromatográficos. Na figura 13 é apresentado um cromatograma em modo de varrimento total de iões, para identificação dos metabolitos 2-PBA e 3-PBA.

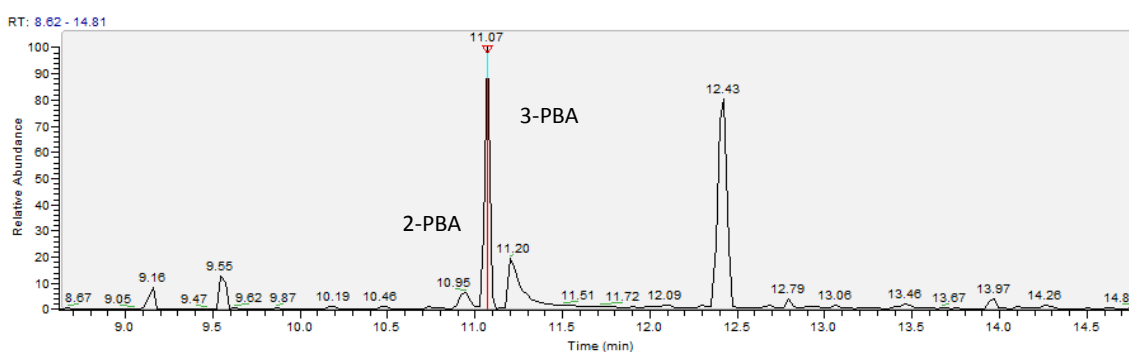


Figura 13 - Cromatograma obtido após a injeção de uma amostra contaminada com o metabolito 2-PBA (10.95min.) e 3-PBA (11.07min.)

Após esta primeira identificação, os programas foram desenvolvidos em modo *SIM*, baseados na deteção de iões selecionados para cada analito e utilizados para a monitorização dos vários analitos simultaneamente. Assim foram traçados cromatogramas em modo *SIM*, como por exemplo o cromatograma apresentado na Figura 14 e cujos respetivos espectros de massas dos picos individuais dos compostos alvo são apresentados nas Figura 14, 15 e 16.

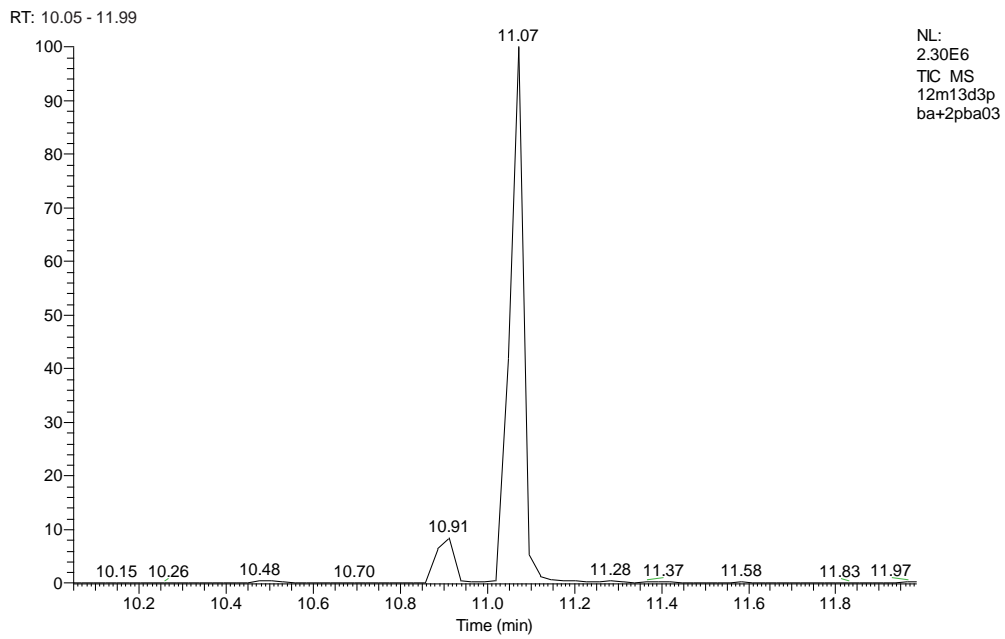


Figura 14: Cromatograma obtido após a injeção da amostra contaminada com o metabólito 2-PBA (tempo de retenção (t_R): 10.91 min) e 3-PBA (t_R : 11.07 min), em modo de monitorização seletiva de iões (*SIM*).

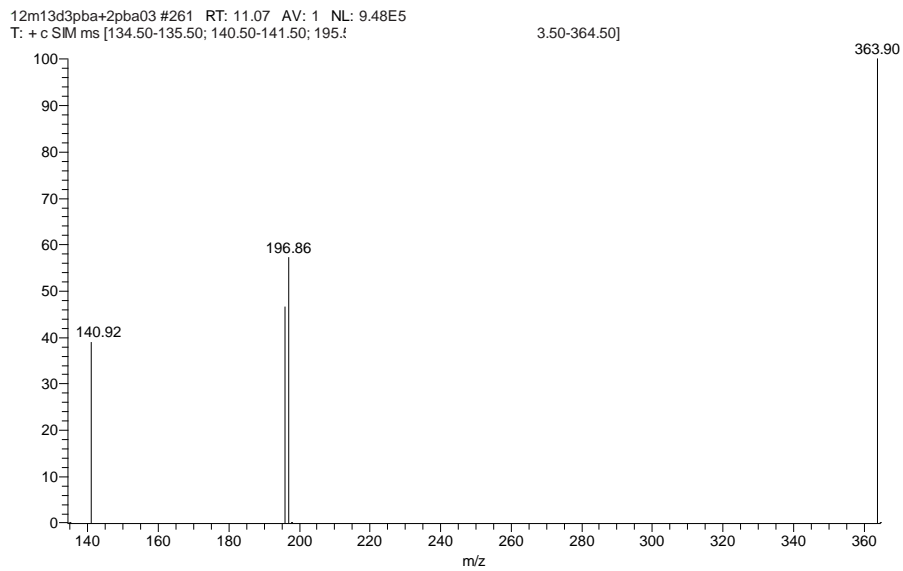


Figura 15: espectro de massa do metabólito 3-PBA obtido no GC Thero Trace GC Ultra acoplado ao MS Thermo Polaris Q

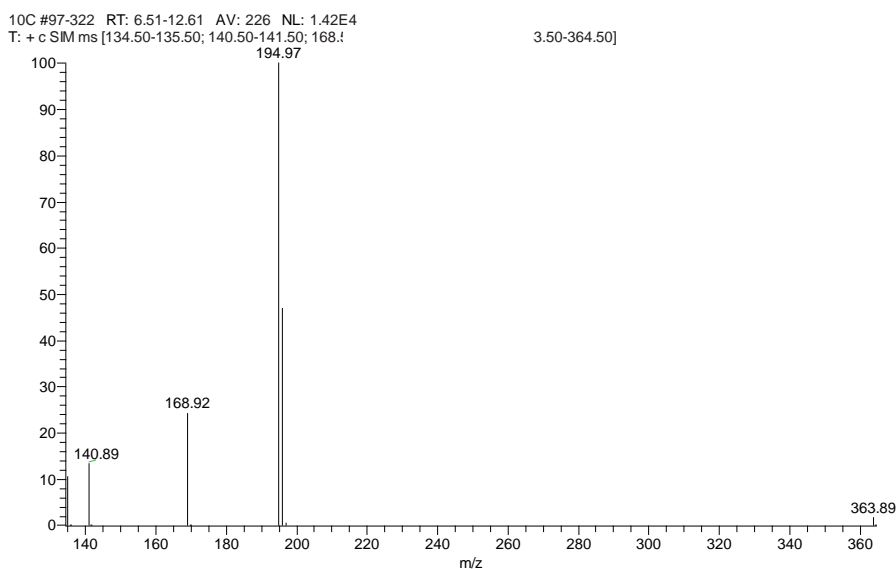


Figura 16: espectro de massa do metabólito 2-PBA obtido no GC Thermo Trace GC Ultra acoplado ao MS Thermo Polaris Q

As moléculas do 2-PBA e 3-PBA são muito semelhantes quimicamente e por isso os iões selecionados para a identificação dos metabólitos 2-PBA e 3-PBA são também semelhantes. O ião molecular 364 é comum a ambos, e é também o ião mais abundante no metabólito 3-PBA. A identificação dos metabólitos torna-se mais precisa com a identificação dos iões de m/z 135; 169; 141; 195; 197, sendo que o ião 195 apresenta uma abundância relativa de 100 % no metabólito 2-PBA.

4.1.1. Otimização de extração em Fase Sólida

Foram realizados estudos de recuperação após extração por SPE dos compostos, partindo de 5mL de amostra adequadamente preparada, sendo de seguida analisada no GC-MS. A otimização da técnica de SPE foi realizada recorrendo a diferentes cartuchos, nomeadamente, Chromabond, Strata C, Strata XC e Techelut. As recuperações para cada cartucho são apresentadas na Figura 17. Estabeleceu-se como limites de aceitação para estes ensaios recuperações entre 70 e 120% [73]. O cartucho Strata C 18 apresentou percentagens de recuperação superiores a 100% para o metabólito 3-PBA. Quanto aos cartuchos Strata X-C e Chromabond HR P apresentaram percentagens de recuperação de 100% para o metabólito em estudo. Quanto ao cartucho Techelut de um modo geral, apresenta baixos valores de recuperação (50%).

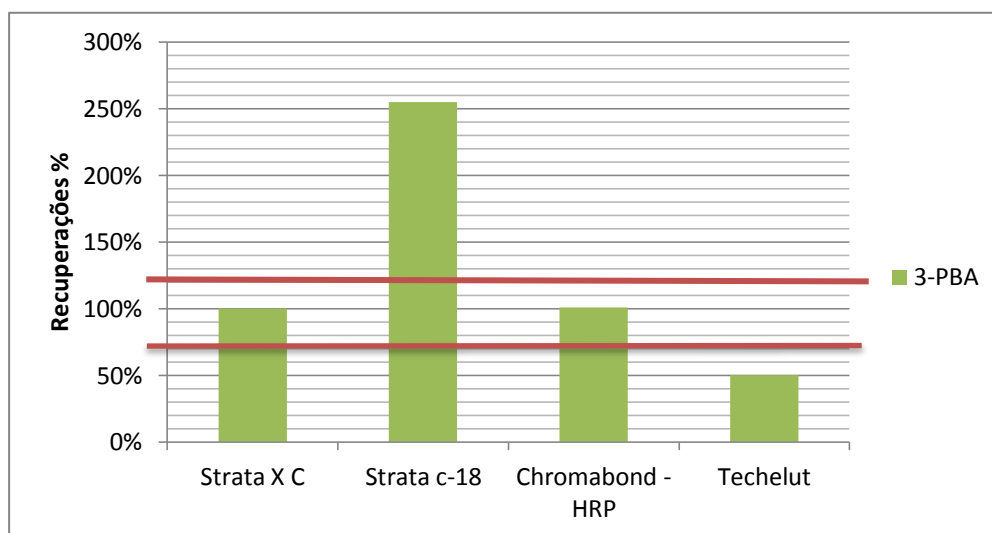


Figura 17: Estudo das percentagens de recuperação do metabolito 3-PBA, utilizando diferentes cartuchos de SPE.

A recuperação foi avaliada calculando a concentração das substâncias em amostras submetidas ao processo de extração, com base na curva analítica preparada a partir da injeção direta das soluções padrão a diferentes concentrações.

Os cartuchos escolhido para o estudo foram os Strata X-C, uma vez que foram considerados os mais eficientes e de menor custo.

4.2. Validação do Método:

A resposta linear obtida pela injeção de 1 μL da solução padrão previamente derivatizada, em triplicado e no modo *SIM*, foi estudado através de 6 níveis de concentração no intervalo $[0.5 \text{ a } 10] \mu\text{g/L}^{-1}$.

Atendendo aos efeitos de matriz observados, os padrões de calibração foram preparados em 6 níveis de concentração para a mesma gama de concentrações e nas mesmas condições requeridas para as amostras.

A validação de um método é um processo contínuo que tem início no planeamento da estratégia analítica e prossegue ao longo de todo o processo. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para a validação de métodos de separação são: especificidade e seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de deteção, limite de quantificação, exatidão e tendência, precisão, robustez e incerteza de medição [74].

4.2.1. Curva de calibração direta/ reta de calibração matriz

Esta etapa tem como principal objetivo ver qual é a eficácia e a fiabilidade do método utilizado.

A reta de calibração direta é feita com os metabolitos 2-PBA e 3-PBA. Para o metabolito 2PBA, como tem função de padrão interno, as quantidades foram constantes: 40 µg/L.

As concentrações escolhidas para a reta de calibração direta com o metabolito 3-PBA: foram: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 µg/ L.

Após a realização da curva de calibração direta, foi efetuada uma curva de calibração matriz que consiste na curva de calibração com a amostra que se pretende analisar, neste caso urina. Foi realizada uma curva de calibração com 6 pontos: 0,5; 1; 3; 5; 8 e 10 µg/ L.

Após a injeção no GC-MS conseguiu-se obter a reta de calibração com R= 0,9963% (Figura 18).

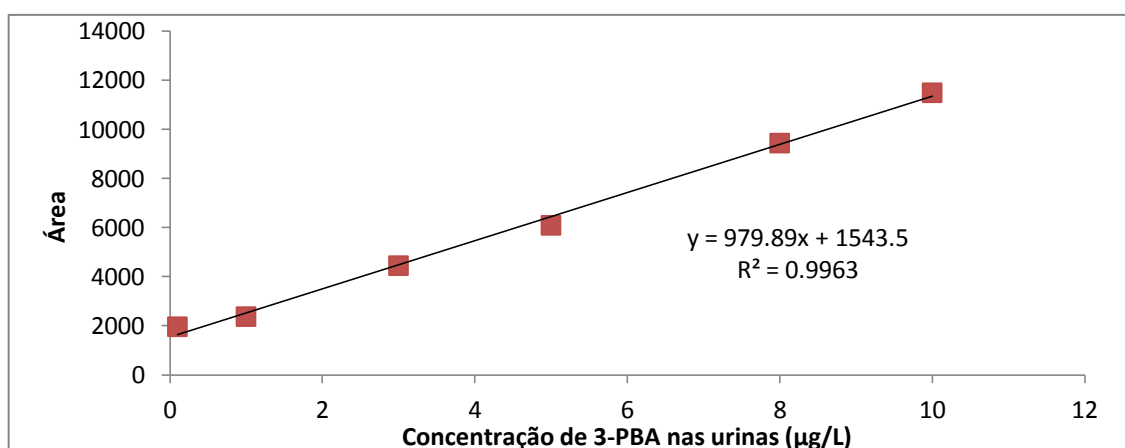


Figura 18: Curva de calibração matriz.

4.2.2. Limite de deteção e quantificação:

Os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram calculados através das equações 3 e 4. Os valores de LD e LQ do 3-PBA, relativos ao método nas condições analíticas utilizadas, foram 0,2 e 0,6 µg/L, respetivamente

4.3. Análise de questionários e correlação com os resultados:

A estatística descritiva consiste no cálculo de frequências, das variáveis apresentadas sendo nominais, ordinais ou cardinais, obtidas de discretas e limitadas a escalas, com distribuições não normais e normais.

Foi considerada uma diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para a verificar se a amostra tinha uma distribuição normal. Para a comparação de médias de variáveis ordinais e cardinais sem uma distribuição normal de dois grupos independentes, o teste utilizado foi o Mann-Whitney (variável concentrações), tal como é possível verificar na Tabela 7.

Quando o resultado do teste Kolmogorov-Smirnov origina uma distribuição normal o teste de hipótese utilizado é o de Spearman (variável idade), Tabela 7.

Tabela 7: Teste Kolmogorov - Smirnov para as variáveis idade e concentrações.

	Idade (n=87)	Concentrações de 3-PBA (µg/L)
Média	21,14	5,23
Normal Parâmetros Desvio Padrão	7,859	14,6
Kolmogorov-Smirnov Z	1,275	3,362
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,078	0,000
a. Teste distribuição é Normal.		

Com o objetivo de uma melhor a apresentação dos resultados e posterior discussão dos mesmos, dividiu-se os resultados dos questionários em 8 grupos principais:

- 1- Classificação das amostras;
- 2- Amostras outono/ inverno; primavera/verão
- 3- Localização;
- 4- Profissão;
- 5- Alimentação, água e vestuário;
- 6- Tratamento para piolhos;
- 7- Uso inseticidas, produtos antitraças e difusores automáticos;

- 8- Animais de estimação e tratamento contra pulgas e carraças.

4.3.1. Caracterização de amostras:

Neste estudo foram analisadas 87 amostras, provenientes de diferentes localizações no Norte de Portugal e de uma população com idades até aos 35 anos.

Na Figura 19 é possível visualizar que foram analisadas 48 amostras durante as estações de primavera e verão e 39 amostras durante o outono e inverno. Das estações primavera e verão, 28 amostras foram do sexo feminino e 20 do sexo masculino. Nas estações de outono inverno foram analisadas 22 amostras do sexo feminino e 17 amostras do sexo masculino (Figura 19).

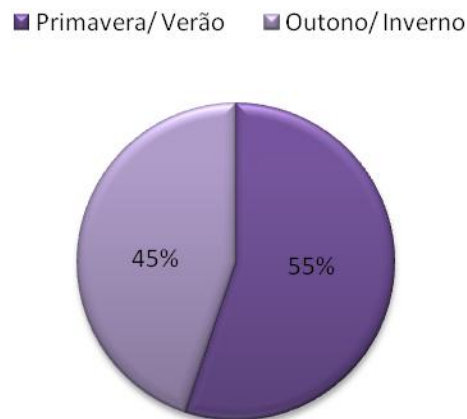


Figura 19: Número de amostras nas diferentes estações do ano

A Tabela 8 caracteriza o grupo estudado, de acordo com a idade e com o sexo, onde podemos verificar que o intervalo de idades com mais amostras (26) é entre 25 e 30 anos.

Tabela 8: caracterização da população estudada.

		Sexo		Total	
		Feminino	Masculino		
Idade em categorias	até 12 anos	Nº de amostras % de idade na categoria sexo	8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%
	13 a 18 anos	Nº de amostras % de idade na categoria sexo	10 90,9%	1 9,1%	11 100,0%
	19 a 24 anos	Nº de amostras % de idade na categoria sexo	16 53,3%	14 46,7%	30 100,0%
	25 a 30 anos	Nº de amostras % de idade na categoria sexo	12 46,2%	14 53,8%	26 100,0%
	mais de 31 anos	Nº de amostras % de idade na categoria sexo	5 62,5%	3 37,5%	8 100,0%
Total		Nº de amostras % de idade na categoria sexo	51 58,6%	36 41,4%	87 100,0%

De acordo com o teste Spearman, em que é avaliado o nível de correlação entre duas variáveis, sendo, uma variável com distribuição normal (concentração do metabolito 3-PBA) e uma variável cardinal sem distribuição normal (idade) obteve-se um ρ Value de 0,744 o que significa que é $\geq 0,05$ e que de acordo com a referência [75], significa que existe uma correlação moderada entre as variáveis (idade e concentração de metabolitos).

4.3.1. Resultados das amostras outono/inverno

No total das 39 amostras colhidas durante as estações de outono/ inverno, provenientes da população do Norte de Portugal, em 24 amostras não foi detetado o metabolito 3-PBA, em 3 amostras a concentração deste metabolito encontrava-se abaixo

do LOQ, 8 amostras apresentaram concentrações abaixo de 2 µg/L (valor de referência do metabolito 3-PBA na urina) [37], 1 amostra apresentava o valor compreendido entre 10 e 15 µg/L e 3 amostras tiveram valores superiores a 15 µg/L (Figura 20).

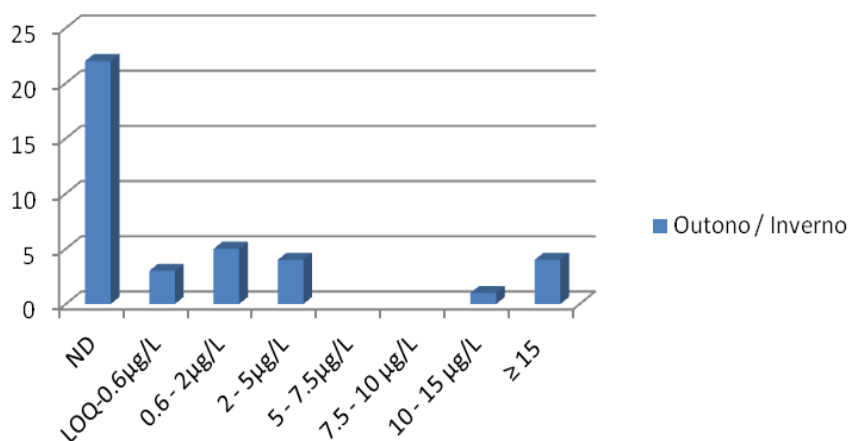


Figura 20: Concentrações encontradas nas amostras do outono e inverno

4.3.2. Resultados das amostras primavera / verão

No total das 48 amostras colhidas durante as estações do ano primavera/verão, em 18 amostras não foi detetado o metabolito (ND) 3-PBA, em 6 amostras as concentrações estavam abaixo do LOQ (< LOQ), e 12 amostras tinham uma concentração < 2 µg/L (valor de referência)

Em 18 amostras foram encontradas concentrações > 2 µg/L. Este resultado pode-se dever ao facto de 54% dos voluntários viver no meio rural (Figura 21).

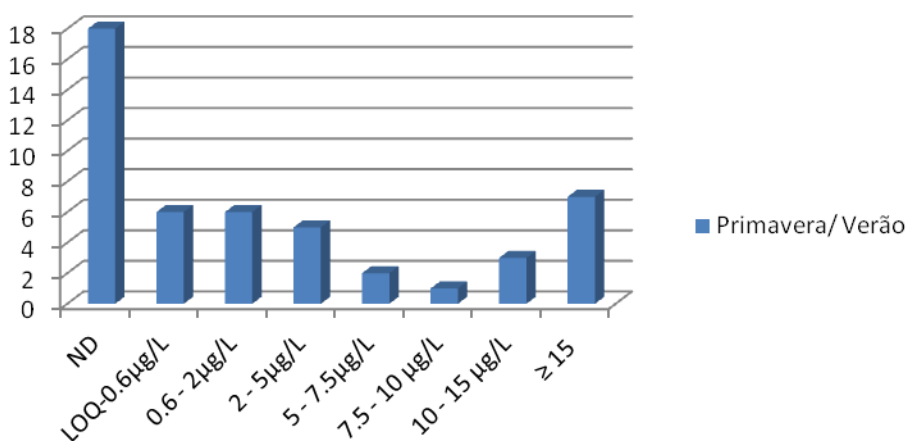


Figura 21: Concentrações das amostras estudadas durante a primavera e verão

Na Tabela 9, são apresentados os valores máximos, mínimos e média encontrados nas diferentes estações do ano. São também apresentados os valores, mas excluindo o grupo que fez tratamento para piolhos.

Tabela 9: Valores máximos, mínimos e médias obtidas nas diferentes estações do ano.

	Primavera/ Verão	Outono/ Inverno
Valor máximo total	20,087 µg/L	114,49 µg/L
Valor mínimo total	<LOD	< LOD
Média nas diferentes estações do ano	3.7 µg/L	6.7 µg/L
Média total	5,2 µg/L	
Valor máximo (sem tratamento piolhos)	20,087 µg/L	18,165 µg/L
Valor mínimo (sem tratamento piolhos)	<LOD	<LOD
Média nas diferentes estações do ano sem tratamento para piolhos	3.7 µg/L	1.04 µg/L
Média total (sem tratamento piolhos)	2,63 µg/L	

4.3.3. Correlação dos resultados com a localização

As amostras estudadas foram divididas em 2 grupos mediante a localização de residência: meio rural e urbano. Na Figura 22 é possível visualizar que foram estudadas 57 amostras do meio rural e 30 amostras do meio urbano (Figura 22).

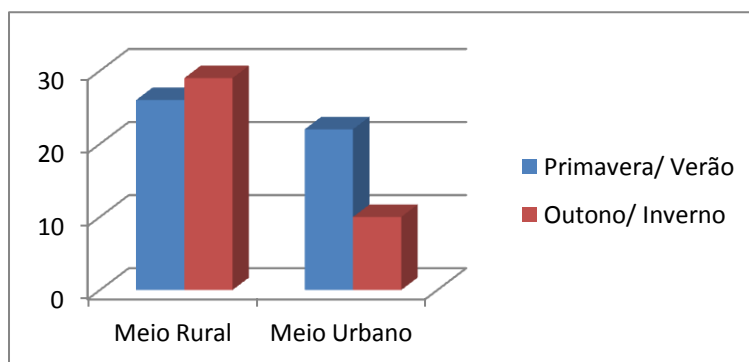


Figura 22: Número de amostras estudadas provenientes do meio rural e urbano nas diferentes estações do ano.

Com o teste Mann-Whitney U, utilizado para variáveis não paramétricas, e sendo condição fundamental que uma das variáveis seja nominal (Residência), com o objetivo de verificar se existe relação entre as duas variáveis em questão obteve-se um ρ Value de 0,050 para $p < 0.05$, o que significa que há relação entre o local de residência e a exposição aos pesticidas piretróides. Sendo a população mais exposta a que vive no meio rural.

4.3.4. Correlação dos resultados com a profissão

Após a análise dos questionários, decidiu-se agrupar a população de acordo com o risco profissional (profissões com possível exposição aos pesticidas piretróides e profissões sem exposição aos pesticidas).

Assim das 87 amostras do grupo de estudo, 23 apresentam profissões que podem ter alguma exposição (como por exemplo; agricultores, técnicos de investigação, arquiteto paisagista e estudantes de química) aos pesticidas, e 64 com profissões em que provavelmente não estão sujeitos à exposição pesticidas (estudantes do ensino básico, crianças, professores, contabilistas).

Após a análise das variáveis profissão e as concentrações, o ρ Value obtido com o teste Mann-Whitney U foi de 0,002 o que significa que profissões com risco de exposição aos pesticidas piretróides, têm influência nas concentrações do metabólito 3-PBA encontradas na urina.

4.3.5. Correlação dos resultados com a alimentação:

Em relação ao tipo de alimentação do grupo estudado, apenas 3 pessoas não faziam uma alimentação variada.

Com o Teste U de Mann-Whitney pretendemos verificar se existe relação entre o tipo de alimentação efetuada pelo grupo em estudo e as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina dos voluntários, na Tabela 8 verifica-se que o p Value encontrado foi de 0,037, ou seja, a alimentação parece ser uma importante fonte de exposição aos pesticidas piretróides.

Em relação ao tipo de água ingerida, (Figura 23) 46,4% dos inqueridos responderam que consumiam água engarrafada, 28,6% consumiam água do poço, 16,6% consumia todo o tipo de água e por último 8,3 % consumia água da companhia.

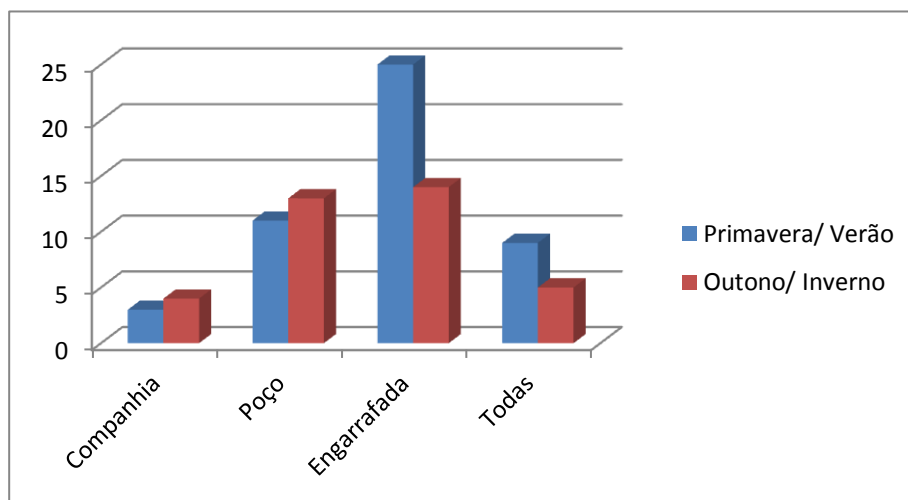


Figura 23: Tipo de água ingerida pelo grupo em estudo

À questão que tipo de roupa costuma usar, sendo as possibilidades algodão, lã e sintética, podemos verificar na Figura 24 que 43 pessoas (51% das amostras) usam preferencialmente roupa de algodão, 19 pessoas (22,6%) usam todo o tipo de roupa, 13 pessoas (15,5%) usam roupa sintética e 9 pessoas (10,71%) usam diversos tipos de roupa. (Figura 24).

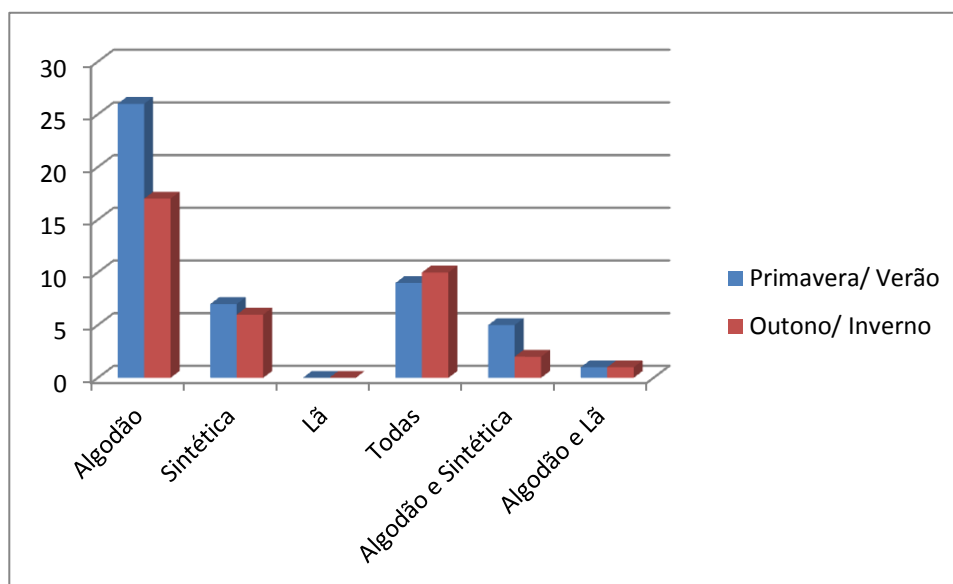


Figura 24: Tipo de roupa usada pelo grupo em estudo

4.3.6. Correlação dos resultados com o uso de tratamento para piolhos:

Das 87 amostras estudadas, 5 realizaram tratamento para piolhos.

Após a realização do teste Mann-Whitney U, o p Value obtido foi 0,015, o que permite concluir que o uso de algum tratamento para piolhos influencia a exposição aos pesticidas PYRs e conseqüentemente as concentrações do metabólito 3-PBA encontradas na urina.

É de salientar que os voluntários que possuíam concentrações superiores a 10 na urina; tinham realizado o tratamento contra piolhos num período inferior a 1 mês antes da colheita.

4.3.7. Correlação dos resultados com as respostas às questões sobre o uso de pesticidas em casa:

Neste grupo de questões tentou-se compreender o uso direto destes pesticidas na população estudada e a sua relação com as concentrações encontradas.

Foram colocadas as seguintes questões:

- Tem por hábito o uso de inseticidas em casa;

- Tem por hábito o uso de produtos antitraças;
- Tem por hábito o uso de difusores automáticos.

À questão “tem por hábito o uso de inseticidas em casa” 46 pessoas (54,8%) responderam que não usam pesticidas e 37 responderam que sim.

Na Figura 25 é possível verificar que no meio rural o uso de pesticidas é mais frequente do que no meio urbano.

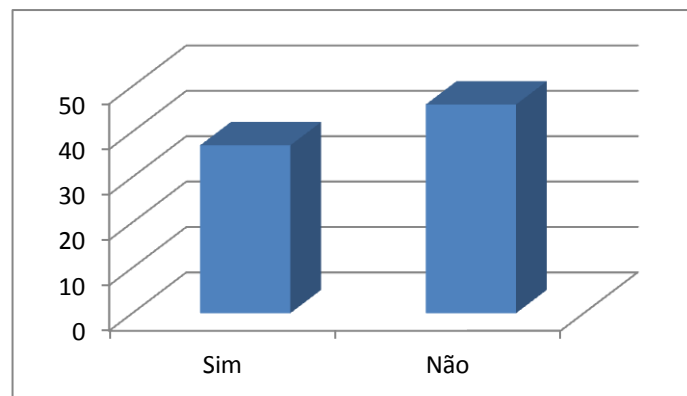


Figura 25: Respostas à pergunta uso de inseticidas

Após a análise da variável uso de inseticidas e as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina o p Value foi 0,1 (Figura 26), ou seja o uso de inseticidas domésticos parece não influenciar as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina.

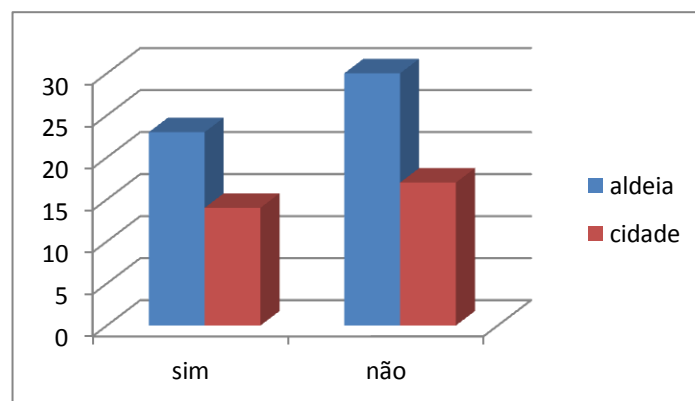


Figura 26: Comparação do uso de inseticidas em casa no meio rural e urbano.

O teste de correlação Spearman e Pearson foram efetuados para as variáveis “uso de inseticida” e “local de residência”, o ρ Value obtido foi 0,9 o que significa que existe uma correlação elevada entre as 2 variáveis estudadas.

Das 38 pessoas que responderam que usavam inseticidas em casa, 13 pessoas apresentaram concentrações superiores a 0,6 $\mu\text{g/L}$ (Figura 27).

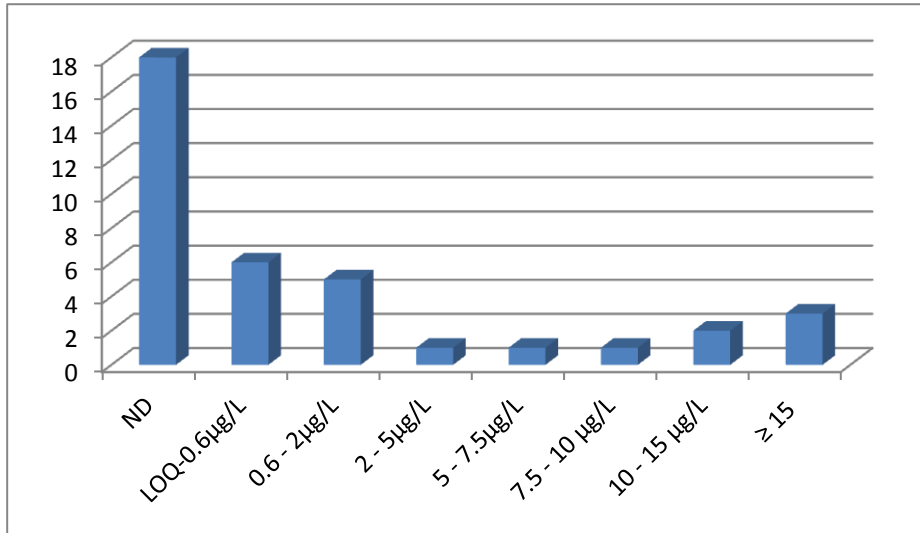


Figura 27: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmavam usarem inseticidas.

À pergunta se “tem por hábito o uso de produtos contra traças” 82,1% do grupo estudado não tem por hábito o uso de produtos antitraças e 17,9% utilizam produtos antitraças (Figura 28).

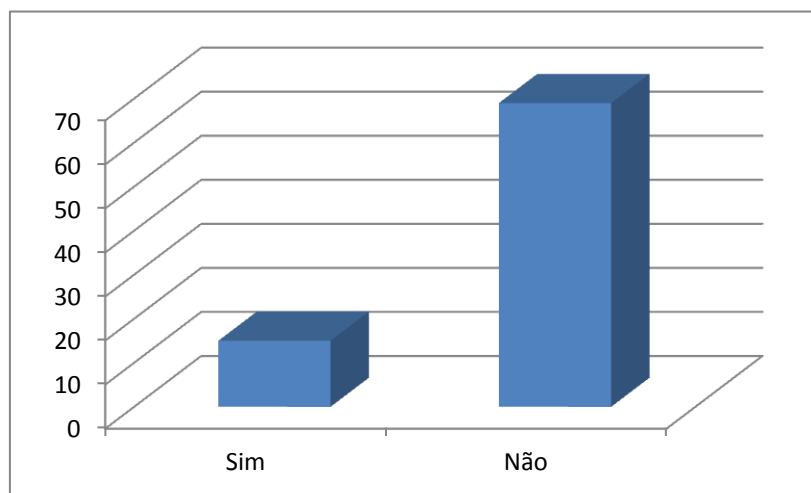


Figura 28: Respostas ao uso de produtos antitraças.

Após a realização do teste Mann-Whitney U para a variável “uso de produtos antitraças” e “concentrações”, o ρ Value obtido foi 0,01, o que significa que o uso de produtos antitraças está relacionado com as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina.

Das 15 pessoas que afirmaram usar produtos antitraças apenas 4 amostras apresentaram resultados positivos (concentração do metabolito 3-PBA acima do LOD).

À pergunta se “tem por hábito o uso de difusores automáticos” 23 pessoas (27,4%) responderam que sim.

Das 23 pessoas que afirmaram usar difusores automáticos em casa (Figura 29), em 9 amostras não foi detetado o metabolito 3-PBA, 5 amostras apresentavam concentrações abaixo do LOQ, e 9 amostras apresentavam concentrações superiores a 0.6 $\mu\text{g/L}$.

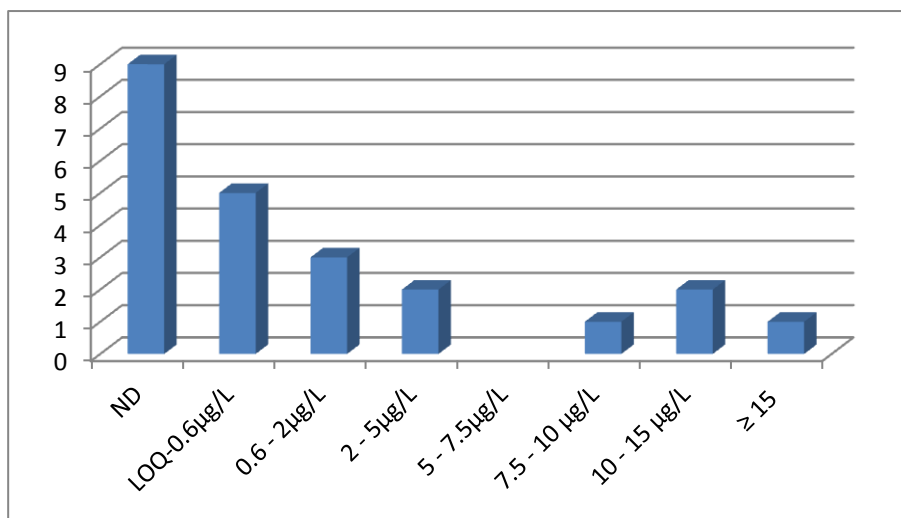


Figura 29: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmaram usarem difusores automáticos

O ρ Value obtido foi de 0,09 o que significa que de acordo com os dados obtidos o uso de difusores automáticos de inseticidas influencia a exposição aos pesticidas piretróides.

4.3.8. Questões indiretamente relacionadas com a exposição aos pesticidas piretróides

Neste grupo de questões estão englobadas:

- Tem tapetes em casa

- Tem animais de estimação
- Costuma fazer o tratamento contra pulgas e carraças nos seus animais de estimação.

Estas questões são também fundamentais na compreensão da exposição da população a este tipo de pesticidas. Os piretróides são frequentemente utilizados com a finalidade da preservação de têxteis tanto de algodão como lã, como é o caso dos tapetes de Arraiolos; a presença de animais de estimação e conseqüentemente o uso de produtos anti-pulgas e carraças, como é o caso de algumas coleiras anti-pulgas/carraças, pós ou pipetas, que têm muitas vezes na sua constituição permetrina [76].

Em relação à questão “tem tapetes em casa”, 79 pessoas responderam que sim e 5 que não têm tapetes.

Em relação à questão “tem algum animal de estimação”, 55 pessoas (63.2%) responderam que sim e 32 que não tinham (36.8%).

Do grupo que respondeu que tinha animais de estimação, 38 pessoas (69,09%) afirmaram fazer tratamento contra pulgas e carraças nos seus animais e 17 (31.01%) não fazem qualquer tipo de prevenção contra pulgas e carraças.

Em relação às concentrações do metabolitos piretróides encontradas nas amostras das pessoas que afirmaram fazer tratamento anti-pulgas e carraças nos seus animais de estimação (Figura 30), em 20 amostras o metabolito 3-PBA não foi detetado, em 6 amostras as concentrações encontravam-se abaixo do LOQ e 10 amostras apresentaram concentrações acima de 0.6.

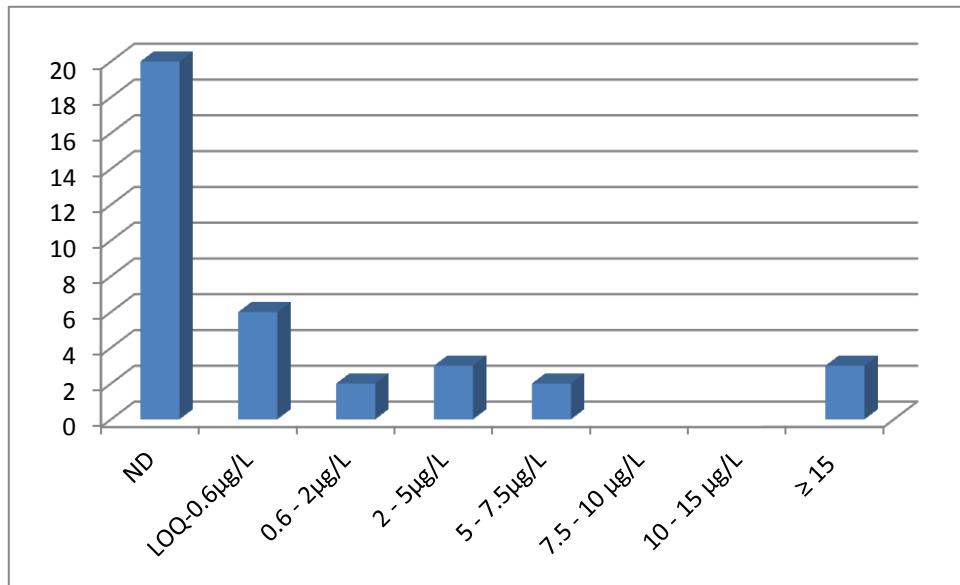


Figura 30: Concentrações encontradas nas amostras das pessoas que afirmaram usarem tratamentos anti-pulgas e carrapatos nos seus animais.

A realização do teste Mann-Whitney U para a variável “uso de tratamento antipulgas nos animais de estimação” e as concentrações do metabolito 3-PBA na urina, permitiu concluir que existe uma relação entre estas variáveis, uma vez que o pValue obtido foi de 0,2 pelo que o uso de produtos anti pulgas e carrapatos nos animais de estimação parece não influenciar a exposição aos pesticidas piretróides nesta população.

Capítulo V: Discussão

5.1. Discussão

Ao comparar os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método proposto, 0.2 e 0.6 µg/L respectivamente, com outros da bibliografia (Tabela 5), verifica-se que os limites obtidos com o método proposto estão muito próximos dos obtidos por outros autores, considerando-se assim satisfatórios para a quantificação e detecção do composto alvo.

O LOD obtido por Olsson, 2004 [41], Baker, 2004 [64] e Hu, 2004 [43], foi de 0.1 no entanto a metodologia utilizada neste trabalho não foi a mesma (Tabela 5). Os LOD obtidos por Khun, 1996 [55] e Angerer, 1997 [29] (utilizando a mesma metodologia deste trabalho) foram 0.3 µg/ L e 0.5µg/ L respetivamente. No entanto, Schettgen, 2002 [46] e Leng, 2005 [50] obtiveram LOD de 0.05 e 0.01 utilizando também a mesma metodologia.

Após a análise de todos os inquéritos e sua relação com as concentrações de metabolitos piretróides encontrados na urina verificamos que 54% do grupo estudado apresentou concentrações acima do limite de detecção 0,2 µg/L. Estes valores podem-se dever-se a diversos factores que induzem a exposição da população de forma voluntária (aplicação de inseticidas domésticos, produtos anti-traças, utilização de tratamento para piolhos, tratamento anti-pulgas e carraças nos animais de estimação) mas também de forma involuntária (alimentação, água, roupa,).

No estudo apresentado, 87 pessoas responderam que faziam uma alimentação variada e apenas 4 que faziam outro tipo específico de alimentação. Tendo em conta a homogeneidade das respostas dadas não foi possível saber se há algum tipo de alimentação que incremente a exposição aos pesticidas. No entanto os resultados estatísticos mostram que a alimentação pode ser uma fonte de exposição a estes pesticidas. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com um trabalho realizado na Alemanha acerca da exposição da sua população aos inseticidas piretróides onde é afirmado que provavelmente a principal fonte de exposição a estes pesticidas é a presença de resíduos na alimentação [37].

No estudo supra mencionado, [37], a outra provável fonte de exposição é o uso de inseticidas domésticos. Na Alemanha não existem muitos estudos de pesticidas piretróides encontrados em casas devido à baixa volatibilidade destes pesticidas e às baixas concentrações encontradas no ar, sendo difícil assim encontrar relações com outras variáveis naquele país. No entanto em 1998 foi realizado um estudo em que a

permetrina foi encontrada em 91% de amostras de lixo doméstico. O que permite concluir o elevado uso destes pesticidas nas casas, assim como a sua permanência nas casas.

No estudo apresentado, 46 (54,8%) pessoas têm por hábito o uso de inseticidas em casa. Estes inseticidas têm normalmente na sua constituição 1-2% de tetrametrina, e 99% de substâncias inertes e outros compostos. Embora tenha apenas 1% de piretróides na sua constituição, do grupo de pessoas que afirmaram ter por hábito o uso destes inseticidas, 13 apresentaram concentrações do metabolito 3-PBA superiores a 0,6µg/L. No entanto estas concentrações podem estar associadas também a outras fontes de exposição, uma vez que o teste Mann-Whitney não permitiu confirmar que o uso destas substâncias seja uma fonte de exposição aos pesticidas, conclusão que vai ao encontro do artigo mencionado.

O tratamento para piolhos com shampoo é uma clara fonte de exposição aos pesticidas piretróides, uma vez que a base ativa da constituição deste tratamento é a permetrina (os outros componentes são: Álcool isopropílico, cloreto de estearalcónio, álcool cetílico, Ceteth-10, hidroxietilcelulose, gelatina, metilparabeno, bálsamo de Tolú, perfume, propilparabeno, propilenoglicol, Amarelo Sunset (E110), ácido cítrico anidro, água purificada) [77].

Do grupo em estudo, 5 pessoas fizeram este tratamento num período inferior a um mês antes da realização da colheita.

As concentrações obtidas nestas 5 pessoas variaram entre 14,6 µg/L e 114,5 µg/L, e o teste estatístico confirmou a relação entre a presença de tratamento e as concentrações encontradas na urina.

O local de residência é também um fator importante neste estudo, uma vez que uma pessoa que resida no meio rural está mais exposta aos pesticidas do que uma pessoa que vive no meio urbano. Das 87 pessoas que fizeram parte do estudo, 57 pessoas residem no meio rural e 30 no meio urbano. As concentrações encontradas na população proveniente do meio rural foram superiores às encontradas na população proveniente do meio urbano, em qualquer altura do ano. O teste Mann-Whitney revelou uma associação entre o meio em que vive o indivíduo e a exposição aos pesticidas piretróides. Este resultado veio comprovar estatisticamente o que já era esperado, tal como aconteceu no tratamento para piolhos. Uma pessoa que resida na aldeia tem um maior contacto com animais (vacas, cães, gatos, galinhas, moscas, mosquitos, entre outros), assim como com o campo (muitas vezes mesmo que a profissão não seja a

agricultura têm sempre algum terreno onde cultivam e necessariamente aplicam pesticidas), nestas circunstâncias há uma maior aplicação dos pesticidas piretróides, quer em casa, nos animais ou mesmo na agricultura.

Na mesma sequência de ideias, há determinadas profissões em que o sujeito está mais vulnerável à exposição aos pesticidas (agricultores, investigadores, professores e estudantes da área de Biologia e Química, arquitectos paisagista, entre outros), do que outras (bancário, contabilista, o professor e estudantes do ensino básico/secundário, doméstico, militar, entre outros). Mais uma vez o teste estatístico utilizado revelou que existe relação entre a profissão e os níveis de metabolitos encontrados na urina.

A presença de animais de estimação em casa pode também ser uma fonte de exposição, devido aos tratamentos anti-pulgas e carraças, que são frequentemente usados nos animais e que têm na sua constituição pesticidas piretróides, como é o caso do Pulvex® e o Defendog®, que têm na sua constituição permetrina, e o Advantix® que é constituído por uma combinação imidaclopride e permetrina entre outros [76].

Do grupo em estudo, 55 pessoas têm animais de estimação das quais 32 fazem tratamento nos seus animais para a prevenção de pulgas e carraças. O teste Mann-Whitney revelou não haver relação entre as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina e o uso de tratamento para pulgas e carraças nos animais de estimação. Este facto pode ser devido à grande diversidade de produtos para pulgas e carraças, existentes no mercado, assim como, à diversidade de constituintes destas coleiras, pipetas, pós e comprimidos. Muitos deles não têm na sua constituição pesticidas piretróides, mas sim outras substâncias que podem ser menos/mais prejudiciais e também menos/mais eficazes na sua constituição.

Por último este estudo foi realizado entre o outono/ inverno (Fevereiro, Setembro e Outubro) e primavera/ verão (Março, Maio, Julho). No total de 39 amostras colhidas durante as estações do ano outono/ inverno, provenientes da população do Norte de Portugal, não foi detectado o metabolito 3-PBA em 61.5% das amostras, em 7.7% das amostras a concentração deste metabolito encontrava-se abaixo do LOQ, 20.5% amostras apresentaram concentrações abaixo de 2 µg/L (valor de referência do metabolito 3-PBA na urina estabelecido na Alemanha) [37], 2.6% das amostras apresentava o valor compreendido entre 10 e 15 µg/L e 7.7% das amostras com valores superiores a 15 µg/L (Figura 20).

No total de 48 amostras colhidas durante as estações do ano primavera/verão, em 37.5% das amostras não foi detectado o metabolito 3-PBA, em 12.5% das amostras as

concentrações estavam abaixo do LOQ, 25% das amostras apresentaram concentrações inferiores a 2 µg/L (valor de referência)

Em 37.5% das amostras as concentrações encontradas neste estudo estavam acima dos de 2 µg/L, este resultado pode-se dever ao facto de 54% dos voluntários viver em meio rural (Figura 21).

Os resultados são claramente mais elevados na primavera/verão. Este resultado pode dever-se às temperaturas mais elevadas e consequentemente um aumento das moscas e mosquitos levando à uma maior necessidade do uso de insecticidas em casa.

Os resultados do mesmo estudo permitem verificar que algumas variáveis têm influência direta na exposição aos pesticidas piretróides e consequentemente aos níveis de excreção dos metabolitos destes pesticidas na urina.

As variáveis que influenciam as concentrações do metabolito 3-PBA encontradas na urina são, o local de residência, alimentação, profissão, tratamentos contra piolhos e o tratamento antitraças. Todas as restantes variáveis (uso de insecticidas, difusores automáticos e tratamento antipulgas) parecem não ser relevantes na exposição aos pesticidas piretróides.

Num estudo realizado no Japão [78], onde foram estudados operários expostos aos insecticidas piretróides de 14 companhias, dos quais 78 operários foram estudados durante o inverno e 68 durante o verão, os operários que utilizaram spray com piretróides dois dias antes da colheita (grupo 1) apresentaram: Valores entre < LOD e 76,1 µg/L no inverno e entre < LOD e 226,0 µg/L no verão. Os operários que utilizaram spray com piretróides num intervalo superior a dois dias antes da colheita (grupo 2) apresentaram: Valores entre <LOD e 28,6µg /L no inverno e entre < LOD e 86,8 µg /L no verão.

Na população do presente estudo português os resultados obtidos foram: Valores entre <LOD e 114,49 µg /l no inverno e entre <LOD e 20,087 µg /L no verão. Os resultados obtidos no estudo Japonês no grupo 2 foram inferiores aos obtidos na população portuguesa no inverno, no entanto no verão acontece o inverso.

Este estudo concluiu que em qualquer um dos grupos encontraram níveis do metabolito 3-PBA mais elevados no verão, devido ao maior número de aplicações de spray de insecticidas nesta estação do ano. Também é apontada a hipótese do uso de insecticidas 3 a 4 dias antes da colheita da amostra poder atenuar as concentrações do metabolito encontrado na urina. Contudo este estudo não consegue esclarecer uma possível relação do grupo com as concentrações obtidas no verão.

Noutro estudo de determinação de metabolitos na urina em estudantes do Norte da Tailândia [79], estiveram envolvidos 250 estudantes, dos quais 207 providenciaram amostras de urina. Nos metabolitos de pesticidas estudados esteve também envolvido o metabolito 3-PBA. A primeira urina do dia foi solicitada a todos os participantes no estudo. Concluiu-se que os filhos de agricultores apresentavam níveis mais altos de pesticidas do que filhos de governantes ou outro tipo de empregos com baixa exposição aos pesticidas. O 3-PBA foi detetado em 47% dos estudantes, o valor mínimo encontrado foi 0,05 µg/g e o valor máximo foi 39,7 µg/g de creatinina.

Num estudo de exposição a piretróides pela população Alemã [37], foram considerados os piretróides no plasma e os metabolitos encontrados na urina. A determinação de compostos inalterados no plasma tem a vantagem de se obter a concentração efetiva no organismo, por outro lado os métodos para determinar metabolitos piretróides na urina apresentam maior sensibilidade.

O maior estudo realizado na Alemanha sobre o assunto em questão ocorreu em 1998 [80], em que estiveram envolvidas 1177 residentes da região de Frankfurt, dos quais 331 eram crianças com idades inferiores aos 6 anos e 247 entre os 6 e 12 anos de idade. O metabolito F-PBA (metabolito da ciflutrina) foi detetado em 16% e 19% das amostras respetivamente. A média do metabolito assim como o valor máximo foi inferior ao LOD.

Schettgen [81] realizou um estudo também na Alemanha com 46 adultos, e 70% das amostras apresentaram resultados inferiores ao LOQ (0,05 µg/L), e 0,16 µg/L foi a média obtida das concentrações encontradas, e o valor máximo encontrado foi 1,7 µg/L.

Os valores obtidos neste estudo da população Portuguesa variaram entre < LOD e o máximo 114,49 µg/L, valores que estão bastante acima dos referidos por Schettgen.

Em todos os estudos apresentados realizados na Alemanha os valores máximos encontrados (15,6 µg/L; 5,11 µg/L; 1,7 µg/L) foram sempre inferiores ao valor máximo encontrado no grupo de voluntários portugueses (114,493 µg/L); a média obtida das 87 amostras estudadas em Portugal foi de 5,25 µg/L.

Num trabalho de monitorização de metabolitos piretróides na urina usando SPE e GC-MS [60] realizado em Espanha e Canadá foram estudadas 6 urinas provenientes de operários expostos aos piretróides e 2 urinas provenientes de sujeitos não expostos. A média da concentração do metabolito 3-PBA nos operários expostos foi de 1,00 µg/L, o que torna um valor inferior à média encontrada em Portugal. Nos operários não

expostos a média obtida foi 294,5 µg/L, um valor bastante inferior ao encontrado nos operários expostos.

Num outro estudo em que é avaliada a exposição às piretrinas e piretróides de uma população da província de Quebec, Canadá [82], em que foram estudados 120 crianças (6 a 12 anos) e 120 adultos (18 a 64 anos), foram sempre solicitadas amostras de urina (a primeira e a última do dia, no entanto todas as restantes urinas também eram consideradas para o estudo). Todos os participantes estiveram sujeitos a 2 questionários, o primeiro foi realizado pelo telefone e o segundo presencialmente e as questões colocadas são as mesmas que foram questionadas no nosso trabalho.

Foram obtidos os seguintes resultados

- 73% das amostras apresentaram valores inferiores ao LOD (0.013 mg/L) nas amostras colhidas durante 24 horas;
- 69% das amostras apresentaram valores inferiores ao LOD na segunda urina do dia depois;
- 72% das amostras apresentara valores inferiores ao LOD na primeira urina do dia.

Os valores obtidos de interesse para a comparação com o estudo português são os valores referentes à primeira amostra do dia, devido a ser este o critério escolhido para a colheita de amostras no estudo do grupo de voluntários portugueses.

O valor mínimo obtido foi 0,01µg/L, o valor máximo foi 24 µg/L e a média obtida foi 0,19 µg/L.

Em comparação com o nosso estudo o valor mínimo obtido está abaixo do LOD, e o valor máximo foi 114,493µg/ L ^a.

^a Este sujeito teve uma exposição directa aos pesticidas piretróides através do uso de tratamento para piolhos, excluindo este valor para estar de acordo com o grupo Japonês, o valor máximo obtido é 18,165 µg / L.

Capítulo VI: Conclusão

6.1. **Conclusão:**

O uso de insecticidas é indispensável para o aumento da produtividade na agricultura, sendo também utilizados na pecuária e em programas de saúde pública. Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados por apresentarem baixa toxicidade aguda nos mamíferos e ser pouco persistentes no ambiente. No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, são necessário ter algumas precauções em relação à sua utilização.

O método proposto usando o GC-MS mostrou, através dos parâmetros de validação seguidos, ser eficiente e confiável para a determinação do metabolito 3-PBA.

Os cartuchos SPE Strata XC foram selecionados no processamento das amostras por apresentarem as percentagens de recuperação e preços mais satisfatórios.

No estudo realizado os valores de metabolitos encontrados na urina variaram significativamente entre as estações do ano outono/inverno (média 1,04µg/L) e primavera/verão (média 4,15µg/L). As fontes de exposição que influenciaram estatisticamente os resultados obtidos foram: local de residência; alimentação; profissão; tratamento contra piolhos e tratamento antitraças.

O grupo em estudo apresenta valores bastante superiores aos encontrados em outros estudos de outros países.

Embora o tratamento da amostra seja pequeno e só fizeram parte do grupo representantes da região norte de Portugal é possível afirmar que do grupo em estudo, os residentes do meio rural apresentam concentrações mais elevadas em relação aos residentes do meio urbano.

No âmbito de estudos académicos o resultado deste trabalho deverá ser comunicado à população, de forma a contribuir para alterar a percepção dos factores que contribuem na exposição a estes compostos.

Capítulo VII: Referências bibliográficas

Referências bibliográficas:

- [1] De Caíres S. M. CJGD. Desenvolvimento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta-Mato Grosso. Revista de Biologia e Ciência da Terra. 2º semestre 2002;2.
- [2] What are Pesticides? 2009
http://www.pesticides.gov.uk/about_pesticides.asp?id=219].
- [3] Ware GW. The pesticide book Thomson Publications 1994.
- [4] Ferreira MC. Pragas de viveiros florestais identificação e control.: Editora plátano edições técnicas 1999.
- [5] Ministério da Agricultura dDRedP, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Direcção de Serviços de Produtos Fitofarmacêuticos. Vendas de produtos fitofarmacêuticos, em Portugal em 2001. 2005 [cited; Available from: <http://www.dgpc.min-agricultura.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006291.pdf>
- [6] Barroso MdFdS. Métodos Analíticos em Processos de Biodegradação de Pesticidas-O Molinato. Porto: Universidade do Porto; 2002.
- [7] EPA EPA-. Learn the Issues: Pesticides, Chemicals and Toxics. [cited; Available from: www.epa.gov
- [8] Ware GW. Pesticides- Theory and application. New York: Freeman & Company 1983.
- [9] Carson R. Silence Spring: Houghton Mifflin 1962.
- [10] FLORES AV, RIBEIRO JN, NEVES AA, QUEIROZ ELRD. Organoclorados: um problema de saúde pública. Ambiente e Sociedade. 2004;7.
- [11] Formosinho S. Saúde pública. [cited; Available from: <http://paginas.fe.up.pt/~jotace/saudepublica/principioprecaucao.htm>
- [12] WHO. Pesticides, Children's Health and the Environment; WHO Training Package for the Health Sector. 2008.
- [13] Tomlin C. The pesticide manual. 11 ed 1997.
- [14] Paludismo: a verdade sobre a proibição do DDT. 2010 [cited; Available from: <http://octopedia.blogspot.com/2010/05/paludismo-verdade-sobre-proibicao-do.html>
- [15] Katsuda Y. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. Pestic Sci. 1999 Aug;55(8):775-82.
- [16] Leng G, Lewalter J, Rohrig B, Idel H. The influence of individual susceptibility in pyrethroid exposure. Toxicol Lett. 1999 Jun;107(1-3):123-30.
- [17] Leng G, Leng A, Kuhn KH, Lewalter J, Pauluhn J. Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. Xenobiotica. 1997 Dec;27(12):1273-83.

- [18] Classe 6-Substâncias Tóxicas e Substâncias Infectantes.
- [19] Henriques ABOM. Guia de produtos fitofarmacêuticos com venda autorizada em Portugal. Lisboa 2011.
- [20] Draper WM. Biological monitoring: Exquisite research probes, risk assessment, and routine exposure measurement. *Anal Chem.* 2001 Jun;73(12):2745-60.
- [21] Koziol AS, Pudykiewicz JA. Global-scale environmental transport of persistent organic pollutants. *Chemosphere.* 2001 Dec;45(8):1181-200.
- [22] Indústria Fitofarmacêutica em Portugal. ANIPLA. 2011.
- [23] ANIPLA CdCdDeEd. Indústria Fitofarmacêutica em Portugal. ANIPLA. 2011.
- [24] WHO. The WHO Recommended Classification of Pesticides of Pesticides by Hazards and Guidelines to Classification 2004. Geneva, Switzerland 2004.
- [25] Fred Whitford CRE, Johnathan J. Neal, Andrew G. Martin, John Osumn, Robert Hollingworth. PESTICIDES AND PERSONAL SAFETY. Purdue Pesticide Program.
- [26] Brasileiro MdS. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde Brasil 1997.
- [27] Dale WE. Toxicología Insecticidas. Insecticidas Modernos y Antiguos: Familias Formulaciones Y Usos. [cited; Available from: http://www.lamolina.edu.pe/profesores/wdale/tox_insect/TOXICOLOGIA%20INSECTICIDAS.%20INSECTICIDAS%20MODERNOS%20Y%20ANTIGUOS.%20FAMILIAS,%20FORMULACIONES%20Y%20USOS.%20VERSI.pdf
- [28] Chen ZM, Wang YH. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *J Chromatogr A.* 1996 Nov;754(1-2):367-95.
- [29] Angerer J, Ritter A. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 1997;695(2):217-26.
- [30] Veja ELS. High-Performance liquid Chromatography: New York: Academic press 1980.
- [31] Tsumura Y, Wada I, Fujiwara Y, Nakamura Y, Tonogai Y, Ito Y. Simultaneous Determination of 13 Synthetic Pyrethroids and Their Metabolite, 3-Phenoxybenzoic Acid, in Tea by Gas-Chromatography. *J Agric Food Chem.* 1994;42(12):2922-5.
- [32] Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8 ed: David Harris 2004.
- [33] PAN Pesticides Database - Chemicals. [cited; Available from: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC32863
- [34] Henriques ABOM. Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos

Lista dos Produtos com venda autorizada. In: Ministério da Agricultura ddRedP, ed. Lisboa 2010.

[35] Tipos de intoxicações: comportamento a adoptar [cited; Available from: <http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=867>

[36] WHO. Environmental Health Criteria 94. Permethrin. 1990.

[37] Agency GFE. Internal exposure among general population in Germany and reference values for pyrethroid metabolites in urine. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. 2005;48(10):1187-93.

[38] Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Di Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. Toxicology. 2007;229(3):194-205.

[39] Jun UYAMA ISaMK. Analysis and evaluation of pyrethroid exposure in human population based on biological monitoring of urinary pyrethroid metabolites. J Pestic Sci. 2010;2(35):87-98.

[40] Ueyama J, Kimata A, Kamijima M, Hamajima N, Ito Y, Suzuki K, et al. Urinary excretion of 3-phenoxybenzoic acid in middle-aged and elderly general population of Japan. Environ Res. 2009 Feb;109(2):175-80.

[41] A. O. Olsson SEB, J. V. Nguyen, L. C. Romanoff, S. O. Udunka, R. D. Walker, K. L. Flemmen and D. B. Barr:. Anal Chem. 2004:453-61.

[42] Verschoy.Rd, Barnes JM. TOXICITY OF NATURAL AND SYNTHETIC PYRETHRINS TO RATS. Pest Biochem Physiol. 1972;2(3):308-&.

[43] Hu Y BJ, Raymer J, Gardner M. Disposable diaper to collect urine samples from young children for pyrethroid pesticide studies. Journal of Exposure Analysis Environmental Epidemiology. 2004;14:378-84.

[44] Lopez T, Gil-Garcia MD, Martinez-Vidal JL, Martinez-Galera M. Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. Anal Chim Acta. 2001 Nov;447(1-2):101-11.

[45] Kolaczinski JH, Curtis CF. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. Food Chem Toxicol. 2004 May;42(5):697-706.

[46] Ahmada M. AMI, Attiquea M. R. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. Bulletin of Entomological Research. 1997;87:343-7.

[47] Barr D, Leng G, Berger-Preiß E, Hoppe H-W, Weerasekera G, Gries W, et al. Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007;389(3):811-8.

[48] Leng G, Gries W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. J Chromatogr B. 2005 Jan;814(2):285-94.

- [49] Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J. New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *J Chromatogr B*. 2002 Oct;778(1-2):121-30.
- [50] Leng G, Kuhn KH, Idel H. Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: Applications and limitations. *Sci Total Environ*. 1997 Jun;199(1-2):173-81.
- [51] Arrebola FJ, Martinez-Vidal JL, Fernandez-Gutierrez A, Akhtar MH. Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 1999 Nov;401(1-2):45-54.
- [52] Colume AC, S; Gallego, M ; Valcarcel, M A solid phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY. 2001;15(21):2007-13.
- [53] Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Crouch SR. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8 ed: THOMSON Brooks/Cole.
- [54] Feo ML, Eljarrat E, Barcelo D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trac-Trend Anal Chem*. 2010 Jul-Aug;29(7):692-705.
- [55] Kuhn KH, Leng G, Bucholski KA, Dunemann L, Idel H. Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Chromatographia*. 1996 Sep;43(5-6):285-92.
- [56] Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA, Donoghue DJ. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2001 Oct;49(10):4589-96.
- [57] Fernandes VC, Domingues VF, Mateus N, Delerue-Matos C. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. *J Chromatogr Sci*. 2011 Oct;49(9):715-30.
- [58] Colume A, Cardenas S, Gallego M, Valcarcel M. Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system. *J Agric Food Chem*. 2001 Mar;49(3):1109-16.
- [59] Vaz BG. Equipamentos híbridos. [cited; Available from: <http://www.espectrometriademassas.com.br/img/assuntos/imagens/25/30.jpg>
- [60] Silverstein R. M. WFJ, Kiemle D. J. *Spectrometric Identification of organic Compounds*. 7 ed: John Wiley e Sons 2005.
- [61] Susan R. Mikkelsen ECn. *BIOANALYTICAL CHEMISTRY*. New Jersey: A JOHN WILEY & SONS, 2004.
- [62] *Jornal dCE*. Decisão da comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (2002/657/CE, L221, 16. 2002.
- [63] S. E. Baker DBB, W. J. Driskell, M. D. Beeson and L. L. Needham Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid

chromatography/tandem mass spectrometry. *J Exposure analytical environmental epidemiology*. 2000;10:789-98.

[64] Baker SE, Olsson AO, Barr DB. Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Quantifying Urinary Metabolites of Synthetic Pyrethroid Insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004;46(3):281-8.

[65] Kim HJ AK, González-Techera A, González-Sapienza GG, Gee SJ, Hammock BD. Magnetic bead-based phage anti-immunocomplex assay (PHAIA) for the detection of the urinary biomarker 3-phenoxybenzoic acid to assess human exposure to pyrethroid insecticides. *Analytical Biochemistry*. 2009;1:42-52.

[66] Manual MERCK. *Acidentes e lesões*.

[67] Heudorf U, Butte W, Schulz C, Angerer J. Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2006;209(3):293-9.

[68] Chromabond HR-P. [cited; Available from: <http://www.mnnet.com/tabid/4529/default.aspx>

[69] Shahana Huq AD, James teuscher, Stanley Lok, Krishna Kallury. Efficient extraction of basic drugs from biological matrices using polymeric cationic mixed-mode sorbent strata™ X-C. *Applications SPE*. Torrence, CA, uSA: Phenomenex Inc.

[70] SPE strata [cited; Available from: <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata>

[71] Cientific T. GC ultra MS polaris Q. [cited; Available from: <http://www.thermoscientific.com/ecomm/servlet/productsdetail?productId=11962236&groupType=PRODUCT&searchType=0&storeId=11152&from=search>

[72] Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry*. West Sussex: Ellis Horwood 1993.

[73] Domingues V, Cabral M, Alves A, Delerue-Matos C. Use and Reuse of SPE Disks for the Determination of Pyrethroids in Water by GC-ECD. *Analytical Letters*. 2009;42(4):706-26.

[74] VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE; 2005; European Union, Japan and USA; 2005.

[75] Finney DJ. *Statistics for biologists*. London, New York: Chapman and Hall 1980.

[76] APAFF. Controlar pulgas. 2011 [cited; Available from: <http://www.apaff.net/ver.php?id=2373>

[77] Infarmed. FOLHETO INFORMATIVO: INFORMAÇÃO PARA O UTILIZADOR NIXCreme Permetrina a 1% p/p. 2006.

- [78] Dong W, Michihiro K, Ryota I, Takayoshi S, Yohei K, Kazumi A, et al. Biological Monitoring of Pyrethroid Exposure of Pest Control Workers in Japan. *J Occup Health*. 2007;49:509-14.
- [79] Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Barr DB. Urinary pesticide metabolites in school students from northern Thailand. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2009 May;212(3):288-97.
- [80] Heudorf U, Angerer J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany. *Environ Health Perspect*. 2001 Mar;109(3):213-7.
- [81] Schettgen T, Heudorf U, Drexler H, Angerer E. Pyrethroid exposure of the general population - is this due to diet? *Toxicol Lett*. 2002 Aug;134(1-3):141-5.
- [82] Fortin MC, Bouchard M, Carrier G, Dumas P. Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ Res*. 2008 Jul;107(3):343-50.

Capítulo VIII: Anexos

Anexo A: Informações sobre os piretróides autorizados em Portugal em 2011

Tipo de form	Teor em subst. activa	Nº de autor. venda	Marca comercial	Classif.	Empresa
--------------	-----------------------	--------------------	-----------------	----------	---------

ACRINATRINA

Piretróide. Insecticida e acaricida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

EW	75g/l	3587	RUFAS AVANCE	N	CHEMINOVA
----	-------	------	--------------	---	-----------

FRASES DE RISCO: R50/53.

IS: 3 dias em alho, cebola, feijoeiro, meloeiro, pepino, pimenteiro e tomateiro, não efectuando mais de uma aplicação em todas estas culturas; 14 dias em ameixeira, cerejeira e pessegueiro; 21 dias em macieira, pereira e videira, não efectuando em videira mais de uma aplicação.

ALFA-CIPERMETRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

EC	100g/l	3263	FASTAC	T; N	BASF
----	--------	------	--------	------	------

FRASES DE RISCO: R10; R25+R65+R43+R37+R48/22+R66+R67; R50/53.

IS: 4 dias em beringela, couve, pimenteiro e tomateiro; 7 dias em macieira, pereira e pessegueiro; 14 dias em batateira e videira, não efectuando em videira mais de uma aplicação.

BETA-CIFLUTRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio

SC	25g/l	0108	BULLDOCK	Xn; N	MAKHTESHIM
----	-------	------	----------	-------	------------

FRASES DE RISCO: R22; R50/53.

IS: 3 dias em tomateiro; 7 dias em couves (excepto couve-rábano) aplicando nestas apenas ao ar livre e em macieira e pereira; 14 dias em batateira, beterraba sacarina, milho e videira.

BIFENTRINA

Piretróide. Insecticida e acaricida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

A formulação de AL está homologada apenas para ornamentais.

AL	0,02g/l	(5) 3645	KIROS PRONTO	Is	SCOTTS
----	---------	----------	--------------	----	--------

Produto autorizado para uso não profissional.

FRASES DE RISCO: R52/53.

IS: Não se aplica.

EC	100g/l	(5) 3458	TALSTAR	Xn; N	FMC
----	--------	----------	---------	-------	-----

FRASES DE RISCO: R10; R22+R36/37+R65+R66+R67; R51/53.

IS: 3 dias em alface, feijoeiro, meloeiro, morangueiro, pepino, pimenteiro e tomateiro; 7 dias em batateira; cerejeira e pessegueiro; 21 dias em alho, macieira e pereira.

ME	2g/l	(5) 3663	KIROS	N	SCOTTS
----	------	----------	-------	---	--------

A formulação de ME está homologada apenas para ornamentais.

Produto autorizado para uso não profissional.

FRASES DE RISCO: R50/53.

IS: Não se aplica.

CIFLUTRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio

EC	50g/l	0115	CIFLUMAX	Xn; N	MAKHTESHIM
----	-------	------	----------	-------	------------

FRASES DE RISCO: R22+R65; R50/53.

IS: 3 dias em tomateiro; 7 dias em couves (excepto couve-rábano) aplicando nestas apenas ao ar livre; 7 dias em macieira e pereira; 14 dias em batateira, milho e videira.

CIPERMETRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

EC	100g/l	3210	CYTHRIN 10 EC	Xn; N	AGRIPHAR
----	--------	------	---------------	-------	----------

FRASES DE RISCO: R10; R22+R65+R37+R67+R66; R50/53.

IS: 2 dias em couves de cabeça e de inflorescência, meloeiro, pepino, pimenteiro e tomateiro; 7 dias em couves de folha e pereira; 14 dias em batateira e videira.

DELTAMETRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

EC	25g/l	0101	DECIS	Xn; N	BAYER
----	-------	------	-------	-------	-------

FRASES DE RISCO: R10; R20/22+R37/38+R41+R65; R50/53.

IS: 3 dias em alface ao ar livre (não aplicar em alface em estufa), morangueiro e tomateiro; 7 dias em batateira, cerejeira, couves, ervilheira, faveira, feijoeiro, macieira, oliveira, pereira, pessegueiro e videira; 30 dias nos cereais (excepto milho).

EC	100g/l	0107	DECIS EXPERT	Xn; N	BAYER
----	--------	------	--------------	-------	-------

FRASES DE RISCO: R10; R20/22+R37+R41+R65+R66+R67; R50/53.

IS: 7 dias em batateira, ervilheira, faveira, feijoeiro, grão-de-bico, lentilhas, oliveira e tremçoço; 30 dias em beterraba sacarina, milho e outros cereais; 60 dias em girassol.

EC	25g/l	0136	DELTAPLAN	Xn; N	BAYER
----	-------	------	-----------	-------	-------

FRASES DE RISCO: R10; R20/22+R37/38+R41+ R65; R50/53.

IS: 3 dias em alface ao ar livre (não aplicar em alface de estufa), morangueiro e tomateiro; 7 dias em batateira, cerejeira, couves, ervilheira, faveira, feijoeiro, macieira, oliveira, pereira, pessegueiro e videira; 30 dias nos cereais (excepto milho).

ESFENVALERATO

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso dos insectos, nos canais de sódio.

EW	50g/l	0190	SUMIFIVE PLUS	Xn; N	KENOGARD
----	-------	------	---------------	-------	----------

FRASES DE RISCO: R20/22 + R100; R50/53

IS: 3 dias em tomateiro; 7 dias em batateira; 14 dias em macieira, pereira e videira; 28 dias em algodão, centeio, cevada, trigo e tritcale; 42 dias em colza. Não se aplica a outras finalidades.

LAMBDA-CIALOTRINA

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

CS	100g/l	0020	KARATE with ZEON technology	Xn, N	SYNGENTA
----	--------	------	-----------------------------	-------	----------

FRASES DE RISCO: R22+R43; R50/53.

IS: 3 dias em morangueiro, pimenteiro e tomateiro; 7 dias em alface, ameixeira, beterraba sacarina, citrinos, couves, damasqueiro, feijoeiro, macieira, nectarinas, oliveira, pereira, pessegueiro e videira; 14 dias em batateira; 28 dias em trigo, aveia e cevada; 56 dias em arroz; 60 dias em milho.

WG	2,5%	0042	KARATE +	Xn, N	SYNGENTA
----	------	------	----------	-------	----------

FRASES DE RISCO: R20/22+R36/38+R43; R50/53.

IS: 3 dias em pimenteiro e tomateiro; 7 dias em alface, couves, feijoeiro; macieira, pereira e videira; 14 dias em batateira; 28 dias em aveia, cevada e trigo; 60 dias em milho.

CS	100g/l	0090	NINJA with ZEON technology	Xn, N	SYNGENTA
----	--------	------	----------------------------	-------	----------

FRASES DE RISCO: R22+R43; R50/53.

IS: 3 dias em tomateiro e pimenteiro; 7 dias em alface, ameixeira, beterraba sacarina, citrinos, couves, damasqueiro, feijoeiro, macieira, nectarinas, pereira, pessegueiro e videira; 14 dias em batateira; 28 dias em trigo, aveia e cevada; 60 dias em milho.

TAU-FLUVALINATO

Piretróide. Insecticida de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modulador dos canais de sódio.

EW	240g/l	3282	KLARTAN	N	MAKHTESHIM
----	--------	------	---------	---	------------

FRASES DE RISCO: R50/53.

IS: 7 dias em pessegueiro; 21 dias em videira; 90 dias em macieira e pereira.

EW	240g/l	3693	MAVRIK	N	MAKHTESHIM
----	--------	------	--------	---	------------

FRASES DE RISCO: R50/53.

IS: 7 dias em pessegueiro; 21 dias em videira; 90 dias em macieira e pereira.

EW	240g/l	3792	MAVRIK	N	AAKO B.V
----	--------	------	--------	---	----------

FRASES DE RISCO: R50/53.

IS: 7 dias em pessegueiro; 21 dias em videira; 90 dias em macieira e pereira.

TEFLUTRINA

Piretróide. Insecticida para tratamentos dirigidos ao solo, de contacto e ingestão. Actua no sistema nervoso, como modelador dos canais de sódio.

FG	0,5%	3578	FORCE	Xn	SYNGENTA
----	------	------	-------	----	----------

FRASES DE RISCO: R22; R52/53.

IS: Não é necessário em milho, devido à época de aplicação.

Anexo B: Inquérito colocado aos voluntários do grupo em estudo

Com este inquérito pretende-se compreender os resultados obtidos na análise de urinas, com o intuito de, determinar a presença de metabolitos de pesticidas presentes na mesma.

Este inquérito enquadra-se numa Investigação no âmbito do Mestrado em Ciências Forenses, do Instituto Politécnico de Saúde do Norte e Instituto Superior de Engenharia do Porto, a fim de que seja possível produzir a respectiva dissertação.

Todas as informações recolhidas são estritamente confidenciais. Os dados de identificação solicitados servem apenas para o efeito de interpretação de resultados.

Grupo 1

1.1. Idade _____

1.2. Sexo F M

1.3. Local de residência _____

1.4. Profissão _____

Grupo 2 (Pessoais)

2.1. Que tipo de alimentação costuma fazer diariamente?

- Variada (cumpre a roda dos alimentos)
- Ovolactovegetariana
- Vegetariana
- Outra

2.2. Que tipo de água costuma ingerir?

- Companhia
- Poço
- Água engarrafada

2.3. Que tipo de roupa costuma usar?

- Algodão
- Sintética
- Lã

2.4. Aplicou recentemente (1 mês) algum tratamento para *Pediculus humanus capitis* (piolho da cabeça)

- Sim
- Não

Se sim qual? _____

Grupo 3 (casa)

3.1. Em casa tem tapetes?

- Sim
- Não

3.2. Tem por hábito o uso de insecticidas na sua casa?

- Sim
- Não

Se sim qual?_____

3.3. Costuma utilizar produtos contra traças na sua casa (guarda-roupa, gavetas)?

- Sim
- Não

3.3.1. De que tipo?

3.3.2 Com que frequência?

3.4. Costuma utilizar difusores automáticos de insecticidas contra moscas e mosquitos na sua casa (Ezalo)?

- Sim
- Não

3.5. Tem animais em sua casa?

- Sim
- Não

3.5.1. Costuma aplicar produtos contra pulgas e carraças?

- Sim
- Não

Anexo C: Declaração de consentimento informado

Eu,.....
portador do bilhete de identidade/ cartão de cidadão nº.....
declaro que dou o meu consentimento para a recolha de urina e posterior análise de
metabolitos de pesticidas

.....,.....de.....de.....

Assinatura

Anexo D: Concentrações em µg/L obtidas nas 87 amostras estudadas ,local de residência (1- urbano; 2-rural).

Fevereiro	Abril	Maió	Julho	Setembro	Outubro
ND (2)	ND (1)	0.9 (1)	1,4 (2)	4.9 (2)	ND (1)
ND (1)	ND (1)	0.2 (1)	ND (1)	18.1 (1)	0.6 (1)
ND (1)	ND (1)	ND (1)	0.6 (2)	0.1 (1)	ND (2)
45.3(2)	ND (1)	7.8 (1)	ND (2)	0.2 (2)	ND (2)
ND (2)	0.4 (1)	6.2(1)	1.2 (2)	3.9 (2)	ND (2)
48.7 (1)	ND (2)	15.9 (2)	3.7 (2)	1.0 (2)	3.7 (2)
ND (2)	ND (1)	15.9 (1)	ND (2)		0.8 (2)
ND (2)	ND (2)	ND (2)	0.1 (2)		0.4 (2)
ND (2)	ND (2)	ND (2)	ND (1)		1.8 (2)
ND (1)		ND (1)	5.1 (2)		3.1 (2)
ND (1)		ND (1)	2.4 (2)		ND (2)
ND (2)			4.1 (2)		1.9 (2)
14.6 (2)			0.5 (1)		
ND (2)			ND (1)		
114.5 (2)			3.1 (2)		
ND (2)			0.7 (1)		
ND (2)			0.5 (1)		

ND (2)			0.23 (1)		
ND (2)			17.04 (2)		
ND (2)			17.3 (2)		
			18.7 (2)		
			20.1 (2)		
			18.0 (2)		
			10,6 (2)		
			1.03 (2)		
			10.4 (2)		
			4.04 (2)		
			10.8 (2)		

Anexo E: Procedimento

1. Colocar num tubo de 12 mL 40µL 2PBA (solução 200× diluído em n-hexano) + 597,4 µL da solução 3PBA (solução 5)
2. Evaporar em N₂
3. Colocar 5mL de H₂O desionizada a escorrer pela parede dos tubos
4. Adicionar 5mL de urina
5. Agitar no Vortéx
6. Adicionar 1mL de KOH (hidróxido de potássio) a 10M (molaes), aquecer durante 15' a 70°C
7. Adicionar 1mL a 12M de HCl (passar para um tubo maior)
8. Adicionar 13mL de água desionizada
9. Condicionamento com:
 - 6mL de acetato de etilo
 - 6mL de MeOH (metanol)
 - 6mL de H₂O
 - 6mL de HCl 1M
10. Passar a amostra
11. Lavar com:
 - 6mL a 0.1M HCl
 - 6mL NH₄ (pH 10)
 - 6mL MeOH
 - 6mL Acetato de etilo
12. Secar muito bem, passar 6 × 1mL e em cada intervalo deixar secar
13. Secar
14. Eluir com 6mL de MeOH (metanol) em ETOAC (acetonitrilo) – não esquecer de colocar o suporte com os tubos por baixo de cada cartucho
15. Secar em corrente de N₂
16. Dissolver o resíduo em 5mL de n-hexano
17. Adicionar 30µL de HFIP (hexafluorisopropanol)
18. Adicionar 20 µL de DIIC
19. Agitar 10' no vortéx
20. Adicionar 1 mL de K₂CO₃ (pH12)
21. Agitar 10 minutos (manualmete)
22. Retirar sobrenadante
23. Redissolver com 250 µL de N-hexano
24. Agitar 10 min
25. Retirar sobrenadante

Nunca deixar secar o cartucho

Anexo F: Formulário de resíduo Trelab

The image shows a form for 'Resíduo Trelab' (Laboratory Waste). At the top left is the logo for 'isep' (Instituto Superior de Engenharia do Porto) with the text 'Instituto Superior de Engenharia do Porto' below it. The form contains several fields for data entry, each with a horizontal line for writing. The text 'Resíduo' is printed in large bold letters, and 'N.º de controlo' is printed to its right. A large, semi-transparent watermark in the background reads 'trelab tratamento de resíduos laboratoriais'.

Data: _____ **Resíduo** **N.º de controlo** _____

Disciplina: _____

Componentes: _____

Observações: _____

