

Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes

**Avaliação de método enzimático para monitorar a
presença de agrotóxicos organofosforados em leite
bovino**

PPGVS/ INCQS

FIOCRUZ

2009

Avaliação de método enzimático para monitorar a presença de agrotóxicos organofosforados em leite bovino

Christina Maria Queiroz de Jesus Morais

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

Orientadores: Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria

Dra. Silvana do Couto Jacob

Rio de Janeiro
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação de método enzimático para monitorar a presença de agrotóxicos organofosforados em leite bovino

Christina Maria Queiroz de Jesus Morais

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

Aprovada:

Prof. Dr. _____

Leonardo Lucchetti Caetano da Silva – presidente (FIOCRUZ)

Prof. Dr. _____

Orlando Marino Gadas de Moraes (UNIRIO)

Prof. Dr. _____

Jayme da Cunha Bastos Neto (UERJ)

Prof. Dra. _____

Paola Cardarelli Leite – suplente (FIOCRUZ)

Prof. Dr. _____

Armando Meyer – suplente (UFRJ)

Orientador: _____

Silvana do Couto Jacob

Mauro Velho de Castro Faria

Jesus-Morais, Christina Maria Queiroz

Avaliação de método enzimático para monitorar a presença de agrotóxicos organofosforados em leite bovino./ Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xv, 68 p., il., tab.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/INCQS, 2009. Orientadores: Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria e Dra. Silvana do Couto Jacob.

1. Agrotóxicos. 2. Método Enzimático. 3. Leite Bovino. 4. Enzima Acetilcolinesterase.

I. Título.

Evaluation of enzymatic method to monitorate the presence of organophosphates pesticides in cow milk.

À tia Gildete e tia Beata (*in
memorian*), pelo estímulo e amor
presente em todos os seus atos e que
foram para mim de extrema
importância para que eu ingressasse
nessa carreira científica.

Paciência e perseverança foram
os sentimentos que me
nortearam nessa fase da minha
vida.

Christina

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria, por ter me dado essa oportunidade de trabalhar ao seu lado com liberdade, respeito e confiança nesse projeto.

À minha orientadora, Dra. Silvana do Couto Jacob, por sua orientação carinhosa e apoio que foram de grande ajuda para a realização desse trabalho.

Aos parceiros do Depto. de Biologia Celular e Genética da UERJ, do passado e do presente, pela amizade, ajuda, dicas e por terem me propiciado bons momentos no cotidiano.

Aos meus bigamigos de sempre do INCQS e da minha vida que não me deixaram desistir dessa empreitada.

Aos colegas do laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS, em especial, Adherlene e Lúcia, que colaboraram para que esse trabalho fosse bem realizado.

Aos colegas do meu laboratório, do passado (Thiago) e do presente (Robson) por comprarem essa meta junto comigo.

Ao Dr. André Gemal, por sua disposição em me orientar nesse projeto.

Aos meus pais Clementino Kelé e Chica Xavier por me fazerem acreditar que eu chegaria até aqui.

Ao meu amor eterno Ernesto pelo seu carinho, apoio e paciência que tornaram possível a realização desse trabalho.

Aos meus filhos Ernesto e Luana pelo companheirismo e força que me deram para continuar insistindo nessa luta.

Aos meus irmãos Izabela e Clementino Júnior pela força e carinho.

A todos os meus familiares e amigos, pelo carinho e dedicação tornando o meu cotidiano mais agradável.

Resumo

Os testes de triagem por serem sensíveis, específicos, rápidos e de baixo custo, vêm sendo largamente utilizados no monitoramento de contaminantes químicos, como os agrotóxicos, visando à prevenção de riscos para a saúde humana. Estes tipos de testes têm sido aplicados no monitoramento de um grande número de amostras, permitindo que a análise cromatográfica seja realizada apenas em amostras potencialmente não-conformes, o que reduz substancialmente o custo. O leite bovino é um alimento essencial na dieta do ser humano e, especialmente, de crianças e são poucos os trabalhos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos, neste tipo de alimento, realizados no Brasil. O aparecimento de resíduos de agrotóxicos no leite pode ocorrer pelo uso de rações e pastagens contaminadas, ou pelo tratamento, com agrotóxicos, especialmente alguns organofosforados, contra ectoparasitas que atacam os animais.

Desenvolveu-se um método de extração de resíduos de agrotóxicos organofosforados (OFs) em leite bovino para detecção qualitativa desta classe de substâncias através da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e posterior confirmação pela cromatografia gasosa (CG).

Através das pesquisas realizadas estabeleceu-se um protocolo de extração dos agrotóxicos OFs de amostras de leite bovino para posterior detecção utilizando o *kit* enzimático e confirmação pela cromatografia em fase gasosa, bem como as condições ideais de análise usando o *kit* desenvolvido pelo Laboratório de Toxicologia Enzimática (ENZITOX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), próprio para análise de OFs em água, adaptado para a detecção de organofosforados em leite bovino. O leite foi contaminado com parationa metílica e clorpirifós etil de modo que a concentração dessas substâncias variassem na faixa de 5 a 200 ng/ml.

Os resultados obtidos demonstraram que os métodos de extração e de detecção por inibição enzimática propostos, para o leite integral, permitem detectar, com segurança, níveis tão baixos quanto 5 ng/ml de clorpirifós, menor que o LMR não intencional estabelecido pela ANVISA/MS que é de 10 ng/ml de clorpirifós etil na gordura do leite. Desde que somente concentrações de clorpirifós a partir da de 10 ng/ml foram detectadas por cromatografia gasosa, nosso método mostrou-se mais sensível. O *kit* de inibição enzimática demonstrou ser apropriado para monitoramento de contaminação do leite por clorpirifós.

Abstract

Rapid and practical methods, like screening assays having sensibility, specificity, and low cost are widely used in monitoring programs for risk prevention of chemical contaminants. Screening tests are used as strategic tools when a large number of samples are involved. In these cases, chromatographic analysis is carried out only in potentially non-conforming samples, substantially reducing monitoring costs. The bovine milk is an essential food in adult and, specially, children diets. Considering that cows can accumulate such residues in milk from ingested food and also during ectoparasite treatment with insecticides and taking into account that, so far, a few pesticide monitoring programs in bovine milk were carried out in Brazil, we now propose, for this purpose, a practical methodology which could be useful in large scale survey programs.

A method of extraction of organophosphorus pesticides in bovine milk was developed for the qualitative and quantitative detection of these substances. This technique is based on the inhibition of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme by organophosphates that can be subsequently confirmed by gas chromatography. The enzymatic screening method used in this work, was initially developed by the ENZITOX laboratory of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), for the detection organophosphate and carbamate pesticides in the water. Therefore, the main objective of this work was to establish an organophosphate extraction protocol which could efficiently perform on the fat enriched-bovine milk matrix and, thus, be used in the simultaneous detection by enzymatic and chromatographic methods. For this purpose, milk samples were fortified with methyl-parathion and chlorpyrifos-ethyl in the concentration range 5 - 200 ng/ml.

Results demonstrated that the proposed milk extraction and enzyme detection methods were able to efficiently detect 5 ng/ml of chlorpyrifos. The gas chromatographic method used could only detect chlorpyrifos from the initial concentration of 10 ng/ml. The ANVISA establishes a not intentional LMR of 10 ng/ml for chlorpyrifos-ethyl in milk samples. The proposed methodology proved to be appropriated and efficient for use in wide scale milk monitoring programs evaluating the presence of organophosphate pesticides.

Síglas e abreviaturas

ABLV – Associação Brasileira de Leite Longa Vida

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

CCS- Contagem de Células Somáticas

CL₅₀ – Concentração Letal que causará a morte de 50% dos animais em experimentação

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DG SANCO – Directorate General for Health and Consumers Affairs (Direção Geral da Saúde e da Proteção do Consumidor)

DIPOA – Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal

DL₅₀ – Dose Letal que causará a morte de 50% dos animais em experimentação

EIA- “Enzyme ImmunoAssay”

ELISA – “Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)

ENZITOX – Toxicologia Enzimática

FAO- “Food and Agricultural Organization” (Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas)

FDA – “Food and Drug Administration”

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN 51- Instrução Normativa 51

ISO/IEC- International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – “Limit of Detection” (limite de detecção)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento

OC – Organoclorado

OF - Organofosforado

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PCRL – Programas de Controle de Resíduos em Leite

PNCR - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

T_{fn} – Taxa de falso-negativo

T_{fp} – Taxa de falso-positivo

UHT – “Ultra High Temperature” (Ultra Alta Temperatura)

UNEP – “United Nations Environment Programme” (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente)

WHO – “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Classificação de organofosforados segundo a via de absorção e toxicidade aguda, expressa em DL ₅₀	10
Tabela 2: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pela parationa metílica em leite desnatado e leite pasteurizado (primeiro método)	38
Tabela 3: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós em leite desnatado e leite pasteurizado (primeiro método)	40
Tabela 4: Recuperação e coeficiente de variação calculados para leite desnatado e pasteurizado integral para o primeiro método	42
Tabela 5: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós em água e leite orgânico integral (segundo método)	43
Tabela 6: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós e parationa metílica em leite pasteurizado (segundo método)	45
Tabela 7: Recuperação e coeficiente de variação calculados para água, leite orgânico e pasteurizado integral para o segundo método	47
Tabela 8: Percentagem de inibição da enzima AChE pela parationa metílica e clorpirifós em leite orgânico integral (terceiro método)	48

Lista de figuras

	Página
Figura 1 - Estrutura básica dos organofosforados (derivados do ácido fosfórico e tiofosfórico)	11
Figura 2 - Esquema de biotransformação dos OFs derivados do ácido tiofosfórico na forma OXON (potentes inibidores da AChE)	12
Figura 3: Esquema da ação da Acetilcolina (ACh), Acetilcolinesterase (AChE) e os agrotóxicos organofosforados	14
Figura 4: Representação esquemática das possíveis vias de exposição ambiental e humana	20
Figura 5: Sistema de triagem direta	22
Figura 6: Curva de inibição da AChE por parationa metílica em leite pasteurizado e leite desnatado	39
Figura 7: Curva de inibição da AChE por clorpirifós em leite desnatado e pasteurizado (primeiro método)	41
Figura 8: Curva de inibição da enzima AChE por clorpirifós em água e leite orgânico integral (segundo método)	44
Figura 9: Curva de inibição da AChE por clorpirifós e parationa metílica em leite pasteurizado (segundo método)	46
Figura 10: Curva de inibição da AChE por parationa metílica e clorpirifós em leite orgânico (terceiro método)	49
Figura 11: Sobreposição dos cromatogramas da amostra branco de leite e amostra branco de leite fortificada com parationa metílica e clorpirifós a 10 ng/ml	52
Figura 12: Sobreposição dos cromatogramas de branco de água e branco de solvente fortificados com clorpirifós a 10 ng/ml.	52

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
SUMÁRIO	xiv
1 Introdução	1
1.1 Histórico	1
1.1.1 História do leite no mundo	1
1.1.2 História do leite no Brasil	3
1.1.3 História dos agrotóxicos	5
1.2 Agrotóxicos	7
1.2.1 Características gerais	7
1.2.2 Características físico-químicas e metabólicas dos organofosforados	11
1.3 Leite bovino	15
1.3.1 Qualidade do leite bovino	15
1.3.2 Tipos de leite	16
1.3.3 Composição do leite bovino e sua importância para a alimentação	17
1.4 Segurança alimentar	18
1.5 Métodos de triagem	21
1.5.1 Critérios importantes na avaliação de métodos de triagem	24
1.5.1.1 Indicadores de desempenho	24
1.5.1.2 Limite de detecção (LOD)	24
1.5.2 Classificação de métodos qualitativos	25
1.5.2.1 Métodos qualitativos baseados na detecção sensorial	25
1.5.2.2 Métodos qualitativos baseados na detecção instrumental	26
1.5.3 Validação de método na análise qualitativa	26
1.6 Legislação	27

1.6.1 Agrotóxicos	27
1.6. 2 Leite bovino	28
2 Objetivos	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 Materiais e métodos	30
3.1 Amostras	30
3.2 Padrões e reagentes	30
3.3 <i>Kit</i> enzimático	31
3.4 Método cromatográfico	31
3.5 O método	32
3.5.1 Primeiro método	32
3.5.2 Segundo método	34
3.5.3 Terceiro método	35
3.6 Validação do método e avaliação dos critérios de desempenho	35
4 Resultados e discussão	37
5 Conclusões	54
6 Referências bibliográficas	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

1.1.1 História do leite no Mundo

O consumo de leite animal na alimentação humana remonta a civilizações bem antigas. Arqueólogos encontraram evidências de que a ordenha de vacas para obtenção de leite ocorria na Antiguidade (9.000 a. C.). Os sumérios (3.000 a. C.) foram os primeiros a criar gado de corte e a utilizarem o leite para alimentação e fabricação de manteiga. Diz-se que, no antigo Egito, o leite era entornado todas as manhãs sobre os 365 altares sacrificiais que cercavam o túmulo do deus Osíris para ajudá-lo em sua ressurreição (SERRA, 2007). Leite, manteiga e queijos já eram conhecidos pelos egípcios neste mesmo período (ROQUE *et al*, 2003). Hipócrates (400 a. C.), considerado o pai da Medicina, recomendava uma dieta de leite de vaca contra envenenamentos (CTENAS, 2000a). Ele foi um dos primeiros a reconhecer e a escrever sobre os benefícios da amamentação, porque já havia observado uma maior mortalidade entre bebês que não eram amamentados (CRISPIM, 1992).

O leite é citado também diversas vezes no Antigo Testamento: I Pedro Cap. 2: “Desejai afetosamente, como meninos novamente nascidos, o leite racional, não falsificado, para que por ele vades crescendo” (Bíblia Sagrada, 2005). Fora suas conotações religiosas, o leite foi utilizado em algumas civilizações como medicamento ou com finalidades cosméticas. Segundo Hipócrates, misturado com água, vinho, mel e outros ingredientes, era utilizado para curar afecções inflamatórias. Na Ásia Menor, devido às suas propriedades hidratantes, o leite era utilizado em doenças de pele. Pompéia, esposa do imperador romano Nero (37-68 d.C.), costumava tomar longos banhos com leite de jumenta, crendo na sua ação rejuvenescedora. A rainha egípcia Cleópatra, tinha o mesmo hábito. No século XX começou a ser utilizado, por exemplo, nas dietas dos doentes internados e na terapêutica de úlceras de estômago (CTENAS, 2000a).

Na Antiguidade clássica, o consumo de leite estava limitado à imediata utilização em virtude de sua rápida deterioração (LEITE *et al*, 2006). Nessa época, devido a esses problemas sanitários, o leite criou uma imagem negativa entre os romanos, que denominavam “bárbaros” os povos que consumiam carne e leite (CTENAS, 2000a).

Até meados do século XIX, cientistas observaram a ocorrência da fermentação em produtos como o vinho e a cerveja, mas não tinham como explicar o fato do vinho avinagrar e a cerveja azedar. Louis Pasteur descobriu que a acidificação do vinho ocorria devido à presença de microrganismos vivos no ar e que esses não resistiam a um aquecimento de 60 °C (PANEK, 2001). A partir dessas observações, criou o processo conhecido como pasteurização, no qual as bactérias são eliminadas pelo aquecimento, por alguns minutos, entre 50 e 60 °C, seguido por resfriamento brusco, produzindo um choque térmico que leva à destruição dos microrganismos em geral (VANIN, 1996). O processo de pasteurização do leite não foi empregado de imediato, o que só ocorreu após o advento do sistema de refrigeração, no final do século XIX. A pasteurização permitiu assegurar um leite isento de microrganismos prejudiciais à saúde e uma maior conservação do mesmo (LEITE *et al*, 2006).

Enquanto a pasteurização não era conhecida nos Estados Unidos, em 1852, o inventor Gail Borden Jr, durante uma viagem transatlântica em que a vaca leiteira que estava no navio para o consumo de leite pelos viajantes adoeceu e não pode fornecer leite fresco, estudou uma solução para conservar o leite por mais tempo. Dentre várias experiências, Borden acrescentou açúcar ao leite e o desidratou; dessa forma ele inventou, ao mesmo tempo, o leite condensado e o leite em pó. Somente em 1861, quando da Guerra de Secessão nos Estados Unidos (1861-1865), as invenções de Gail Borden (patenteadas em 1856) foram utilizadas pelos combatentes norte-americanos, tornando-o um próspero negociante. Em 1866, o leite condensado desembarcou na Europa, mais precisamente na Suíça, juntamente com Borden e seu sócio Jeremiah Milbank, onde fez sucesso rapidamente. O leite condensado pôde então ser usado pelas mães européias como reforço na alimentação de seus filhos (JANK *et al*, 1999).

Os primeiros carregamentos de leite condensado chegaram ao Brasil ainda no final do século XIX. Importado diretamente da Suíça, era usado, apenas, como bebida (reconstituído com água). Sua grande vantagem era que podia ser armazenado por um longo tempo, condição fundamental em períodos de escassez de leite (CUNHA, 2005).

1.1.2. História do leite no Brasil

Em 1550, Tomé de Souza mandou buscar em Cabo Verde um lote de bovinos para a recém-fundada capital do Brasil colonial, Salvador. A partir daí, o rebanho foi se espalhando pelo Brasil, dando origem às fazendas de gado que se transformaram, posteriormente, em povoados e vilas (LEITE *et al*, 2006).

A pecuária leiteira do Brasil teve início em 1532, quando a expedição de Martim Afonso de Souza trouxe trinta e duas cabeças de bovinos para a Vila de São Vicente, no litoral paulista, a mando de D. João III, rei de Portugal. Os primeiros bovinos não foram utilizados para a produção de leite, serviam para tração e produção de carne. Novas levas de bovinos chegaram ao Brasil por três frentes: São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia. Somente vinte anos depois, em 1552, fez-se referência ao leite no Brasil através de cartas escritas pelo jesuíta Manoel da Nóbrega a seus superiores em Portugal. Nessas correspondências, ele descreve a utilização do leite extraído de doze vacas para criação e sustento das crianças indígenas e filhos de escravos que os jesuítas catequizavam na sesmaria de □Água dos Meninos□ na cidade de Salvador (NÓBREGA, 1956).

O leite levou cerca de trezentos anos para ser incluído na culinária brasileira, lugar ocupado até então pela mandioca, milho e carne de caça. O preconceito só começou a ser quebrado quando D. João VI de Portugal chegou ao Brasil, já que a corte estava acostumada com o consumo de leite, queijo e manteiga nas refeições (DIAS, 2006).

A primeira fábrica de laticínios do Brasil e da América Latina foi fundada em 1888, em Santos Dumont, na Serra da Mantiqueira mineira, pelo Dr. Carlos Pereira de Sá que importou maquinário e mão-de-obra especializada da Holanda. Foi nesta mesma cidade que, em 1923, foi criada a primeira indústria de coalho. Nesta época o leite era coalhado com enzimas retiradas do estômago de animais como tatu, anta ou veado, dependendo da região, usando métodos do início do século XIX, quando os primeiros queijos começaram a ser fabricados no Brasil, em Minas Gerais (DIAS, 2006).

Entre 1894 e 1930, a maioria dos presidentes eram políticos de Minas Gerais ou de São Paulo, os estados mais ricos do país. Saídos das elites desses estados, eles acabavam favorecendo sempre o setor agrícola, principalmente do café (paulista) e do leite (mineiro) (historia do brasil.net).

No início do século XX, o abastecimento de leite das cidades era feito pelos próprios produtores, que distribuíaam o leite através de carrocinhas movidas por tração animal. A partir dos anos 20, foram criados usinas e entrepostos, surgindo o setor industrial do leite no Brasil. Em julho de 1939, o Governo do Estado de São Paulo determinou que todo o leite a ser distribuído à população deveria ser pasteurizado, ou seja, submetido a operações de filtração, aquecimento, refrigeração e outras técnicas para promover a sua sanidade e homogeneização, definindo, ainda, três tipos de leite pasteurizado (A, B e C), de acordo com as condições e características de cada um deles. Em 1952, essa determinação foi estendida a todo país com a publicação do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (ALVES, 2001).

Até o início da década de 60, o leite pasteurizado era comercializado em garrafas de vidro retornáveis com tampa de alumínio laminado, para evitar adulteração. A Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) decidiu que essa forma de acondicionamento seria obrigatória para todo leite vendido no Rio de Janeiro (1958). Nessa mesma época, foi decidida a inclusão no consumo do carioca de um novo tipo, denominado leite magro, contendo menos gordura do que o tipo C (Jornal O Globo, 1958). Em 1961, lançou-se no mercado os leites tipos B e C em embalagens Tetra Pak[®] (papel cartão revestido de polietileno). Devido ao alto custo dessas embalagens, no final dos anos 60, o leite tipo C passou a ser comercializado em embalagens plásticas de polietileno (saquinhos). A produção de leite pasteurizado (tipos B e C) ficou nas mãos das indústrias nacionais e cooperativas. Durante cerca de vinte anos, comercializou-se basicamente leite pasteurizado embalado em saquinhos plásticos de polietileno, os quais ficaram conhecidos no mercado como “barriga mole”.

No início da década de 90, o Governo Federal promoveu a abertura do mercado para produtos internacionais, iniciando o processo de desregulamentação dos preços do leite no mercado interno. Essa fase marca o crescimento da importância do leite tipo “longa vida” no mercado brasileiro (JANK *et al*, 1999). As indústrias que investiram neste tipo de leite eram, principalmente de capital estrangeiro, empresas que se firmaram no mercado com produtos lácteos de valor agregado mais alto, como queijos, iogurtes, sobremesas e outros. As indústrias

nacionais e cooperativas, com pouca capacidade de investimento, foram perdendo mercado. A década de 90 é marcada por toda uma mudança do estilo de vida da população. A maioria das mulheres entrou no mercado de trabalho, a população passou a se alimentar em restaurantes durante a semana e, cada vez mais, nos grandes centros, as pessoas ficavam menos tempo em casa. Essa mudança alterou os hábitos de compra dos consumidores. Com esses novos costumes, era esperado que o consumidor gradualmente passasse a dar preferência a alimentos que pudessem ser guardados por mais tempo. O leite pasteurizado embalado em polietileno já não atendia às novas exigências do mercado, abrindo espaço para o leite “longa vida” ou UHT (*Ultra High Temperature*). O leite longa vida ultrapasteurizado é o leite líquido homogeneizado submetido, por 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150 °C mediante um processo térmico de fluxo contínuo, sendo imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado assepticamente em embalagem Tetra Brik® ou Tetra Pak® com multicamadas protetoras, para impedir o contato com o oxigênio e raios solares, sem a adição de conservantes. Atualmente, segundo a Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV, 2008), 75,8% do leite fluido vendido no Brasil é do tipo “longa vida”.

Segundo o IBGE, no primeiro semestre de 2009, a produção de leite direcionada ao mercado interno apresentou queda significativa nos três estados do sul, devido à forte estiagem. Em contrapartida, houve um pequeno crescimento no consumo de agrotóxicos, principalmente do grupo dos inseticidas e herbicidas de uso agropecuário, por conta do aumento da produção de soja, cana-de-açúcar e milho (IBGE, 2009).

1.1.3 História dos agrotóxicos

A pesquisa científica voltada para a utilização de substâncias químicas orgânicas genericamente definidas como agrotóxicos teve seu início na década de 20 do século passado. O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) foi sintetizado em 1874 por

Othmar Zeidler, porém suas propriedades inseticidas foram descobertas por Paul Muller em 1939. Em 1948, ele recebeu o Prêmio Nobel de Medicina por ter introduzido, durante a II Guerra Mundial, o uso do DDT no combate a pragas que transmitiam doenças como a malária (CARSON, 1969). Somente no pós-guerra essas substâncias passaram a desempenhar um papel de crescente relevância no controle de pragas agrícolas e em saúde pública, no controle de espécies vetores de doenças (MILANO, 1997).

É nesse contexto que se insere o uso generalizado dos agrotóxicos que desencadeou a chamada Revolução Verde na década de 50, focada em um significativo aumento na produção de cereais básicos à alimentação como arroz, milho e trigo. Nesta mesma época, os organofosforados, devido à sua alta toxicidade, foram utilizados (e ainda o são) para fins bélicos como os chamados “gases dos nervos” (sarin, somam e tabun).

Dentro da Organização das Nações Unidas (ONU), a Organização para Agricultura e Alimentação (FAO), criada para erradicar a fome planetária através do aumento da produção agrícola mundial, iniciou-se em 1945, uma operação denominada Campanha Livre da Fome, que incluía um detalhado programa sobre o uso de fertilizantes. Vale dizer que, concomitantemente a este bem intencionado projeto, outra autarquia da organização, a OMS (Organização Mundial da Saúde), divulgava um programa para erradicar doenças veiculadas por insetos com a ajuda de agrotóxicos, com destaque para o programa anti-malária que envolvia um verdadeiro arsenal dessas substâncias (PAES, 1998).

Como os agrotóxicos se mostravam uma eficiente arma contra as pragas da agricultura e doenças veiculadas por insetos, os indivíduos e as organizações responsáveis pela regulamentação desses produtos acharam difícil pressionar a indústria a gastar tempo e dinheiro com testes de toxicidade. Desta forma, as leis que regulamentaram o licenciamento e a avaliação da relação risco/benefício destas substâncias foram baseadas praticamente no entusiasmo pelos benefícios imediatos oferecidos.

Apesar do registro de alguns casos de intoxicação e de pequenos desastres de impacto ambiental, providências não foram imediatamente tomadas. Somente a partir do lançamento, em 1962, do livro Primavera Silenciosa (*Silent Spring*) escrito pela

zoóloga Rachel Carson, foi demonstrado como o DDT penetrava na cadeia alimentar e acumulava-se nos tecidos gordurosos dos animais, inclusive do homem. Esta pesquisadora demonstrou que o DDT, além de outros biocidas, era persistente no ambiente (CARSON, 1969). Seu livro contribuiu para que o uso de agrotóxicos fosse questionado pelo público. Pela primeira vez, levantou-se a necessidade de regulamentar a produção industrial e o uso destes inseticidas, de modo a proteger o meio ambiente e a população em geral.

1.2 Agrotóxicos

1.2.1 Características gerais

O termo “pesticida” foi definido pela Organização Para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO/WHO) como uma substância ou mistura de substâncias capazes de evitar, destruir ou controlar qualquer praga, inclusive vetores de doenças humanas ou animais, espécies indesejáveis de plantas ou animais que causem danos ou interfiram com a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, de produtos relacionados à agricultura, de madeiras e seus derivados e de rações animais. Arrolam-se entre as pragas: insetos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, vírus, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida animal ou vegetal danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e seus produtos, e a outras matérias-primas alimentares. Por extensão, incluem-se, nesta categoria, os agentes desfolhantes, os dessecantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Excluem-se as vacinas, os medicamentos, os antibióticos de uso humano e veterinário e os agentes utilizados para o controle biológico das pragas (WHO/UNEP, 1990).

No Brasil, há diversas denominações, tais como: defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, produtos fitossanitários e agrotóxicos. A legislação brasileira adotou e definiu o termo agrotóxico através do Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a LEI Nº 7.802/89 da Presidência da República, como:

Agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e

industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Resíduo de agrotóxico - substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes.

Os critérios que podem ser utilizados para a classificação dos agrotóxicos variam muito. Entretanto, alguns dos mais comuns são: finalidade, modo de ação, toxicidade e grupo químico.

➤ **Quanto à finalidade**

Destacam-se:

- inseticidas: de combate aos insetos;
- herbicidas: de combate às ervas daninhas;
- fungicidas: de combate aos fungos;
- rodenticidas: de combate aos roedores, dentre outros.

➤ **Quanto ao modo de ação**

- contato: resultante da absorção pelo tegumento do organismo-alvo em
- borrifações residuais ou espaciais;
- ingestão: o pesticida age e penetra no organismo-alvo através da via oral;
- fumigante: alcança o organismo-alvo na forma de vapor, através de suas vias respiratórias.

Convém salientar que alguns agrotóxicos possuem múltiplos mecanismos de ação.

➤ **Quanto à toxicidade**

A classificação toxicológica é baseada na identificação do componente de risco referente a uma substância química e diferencia a toxicidade dos agrotóxicos com base no ingrediente ativo e sua formulação. A classificação toxicológica dos agrotóxicos é obtida a partir da DL_{50} (dose necessária para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos ao protocolo experimental). As toxicidades aguda oral, dérmica (DL_{50}) e inalatória (CL_{50}) para ratos em relação aos agrotóxicos foram o princípio fundamental da classificação, sendo que valores de DL_{50} dérmica tiveram uma forma de classificação mais rígida do que os valores da DL_{50} oral. Os agrotóxicos são classificados em 4 classes distintas, conforme a DL_{50} por via oral ou dérmica: classe I (extremamente tóxicos), classe II (altamente tóxicos), classe III (moderadamente tóxicos) e classe IV (pouco tóxicos).

Em 1992, a portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Portaria SVS/MS Nº 3 de 16/01/92) alterou as regras de classificação toxicológica, buscando se adequar aos padrões internacionais. Este último, recomendado pela Organização Mundial de Saúde, classifica os agrotóxicos segundo o grau de periculosidade, baseando-se na determinação da dose letal aguda a 50% (DL_{50}), por via oral ou dérmica, para ratos. A tabela 1 apresenta o grau de toxicidade e os valores de DL_{50} dos principais agrotóxicos organofosforados, que são as substâncias envolvidas nas pesquisas relatadas nesse trabalho.

Tabela 1: Classificação de organofosforados segundo a via de absorção e toxicidade aguda, expressa em DL₅₀ (recomendado pela WHO)

Grau de Toxicidade/ Classe Toxicológica	Exemplos de Agrotóxicos	DL ₅₀ mg/kg (ratos)	
		Oral	Dérmica
Extremamente Tóxico/ CT I Faixa vermelha	Organofosforados		
	Metamidofós	< 5 (S) *	< 10 (S)
	Parationa metílica	< 20 (L)	< 40 (L)
Altamente Tóxico/ CT II Faixa amarela	Clorpirifós	5-50 (S)	10-100 (S)
	Fenitrotiona	20-200 (L)	40-400 (L)
Medianamente Tóxico/ CT III Faixa azul	Malationa	50-500 (S)	100-1000 (L)
	Temefós	200-2000 (L)	400-4000 (L)
Pouco tóxico/ CT IV Faixa verde	-	> 500 (S)	> 1000 (L)
	-	> 2000 (S)	> 4000 (L)

Fonte: ANVISA, 2009a

(S) sólido e (L) líquido se referem ao estado físico do ingrediente ativo ou da formulação.

➤ Quanto ao grupo químico

Organofosforados: são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico ou do ácido ditiosfosfórico. Ex.: Folidol, Azodrin, Malationa, Diazinon, Nuvacron, Tamaron, Rhodiatox.

Carbamatos: são derivados do ácido carbâmico. Ex.: Carbaril, Temik, Zectram, Furadan.

Organoclorados: são compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Ex.: Aldrin, Endrin, BHC, DDT, Endossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex.

Piretróides: são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Pyrethrum* (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina e fenpropanato. Ex.: Decis, Protector, K-Otrine, SBP.

1.2.2 Características físico-químicas e metabólicas dos organofosforados

O grupo de inseticidas genericamente conhecido como anticolinesterásicos inclui os organofosforados e os carbamatos. Ambos possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica: a inibição da enzima acetilcolinesterase, presente em sinapses do sistema nervoso central e periférico (BURONFOSSE & BURONFOSSE, 1995).

Quanto à estrutura química, os organofosforados são ésteres, amidas ou tióis derivados do ácido orto- e tiofosfórico, cuja fórmula geral é apresentada na figura 1:

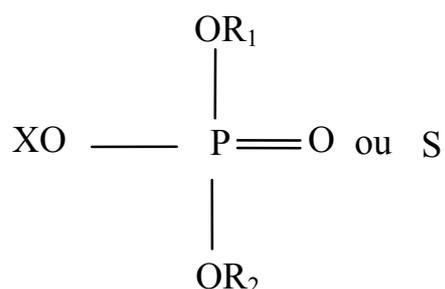


Figura 1: Estrutura básica dos organofosforados (derivados do ácido fosfórico e tiofosfórico)

Os substituintes R_1 , R_2 e X são preferencialmente ésteres de grupos alifáticos ou aromáticos e a ligação dupla do grupo fosfato com o oxigênio ou enxofre representa a diferença entre os oriundos do ácido fosfórico ou do ácido tiofosfórico, respectivamente.

São rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente como nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo/água.

Os organofosforados são largamente utilizados no controle e no combate a pragas, principalmente como inseticidas (agrícola, saúde pública: doméstico e veterinário) e como acaricidas, nematicidas, fungicidas e herbicidas, no controle de parasitas em fruticultura, horticultura, cultura do algodão, cereais, sementes e plantas ornamentais.

➤ **Toxicodinâmica**

Nem todos os pesticidas organofosforados são inibidores diretos da acetilcolinesterase. Os que possuem um grupamento tiofosfato (a maioria dos usados na agricultura: parationa metílica, fenitrotiona e malationa) são, freqüentemente, inibidores muito fracos. No entanto, são biotransformados ("ativados") em seus correspondentes oxo-

análogos como é, por exemplo, o caso da parationa que dá origem ao paraoxon, através da dessulfuração que constitui uma das principais vias de biotransformação dos organofosforados. Os oxo-análogos são potentes inibidores da acetilcolinesterase, através das enzimas oxidases de função mista dependentes de citocromo P-450, encontradas no fígado e em outros órgãos (Figura 2). As formas "oxon" são mais tóxicas, porém menos lipofílicas; sendo assim, têm menos probabilidade de se depositarem nos tecidos adiposos do organismo e, por serem facilmente hidrolisadas, são facilmente excretadas (LARINI, 1993). As interações da enzima com os pesticidas organofosforados são bem conhecidas e podem ser consideradas similares às interações enzima-substrato (SULTATOS, 1994). As outras vias de biotransformação são a redução e a clivagem hidrolítica.

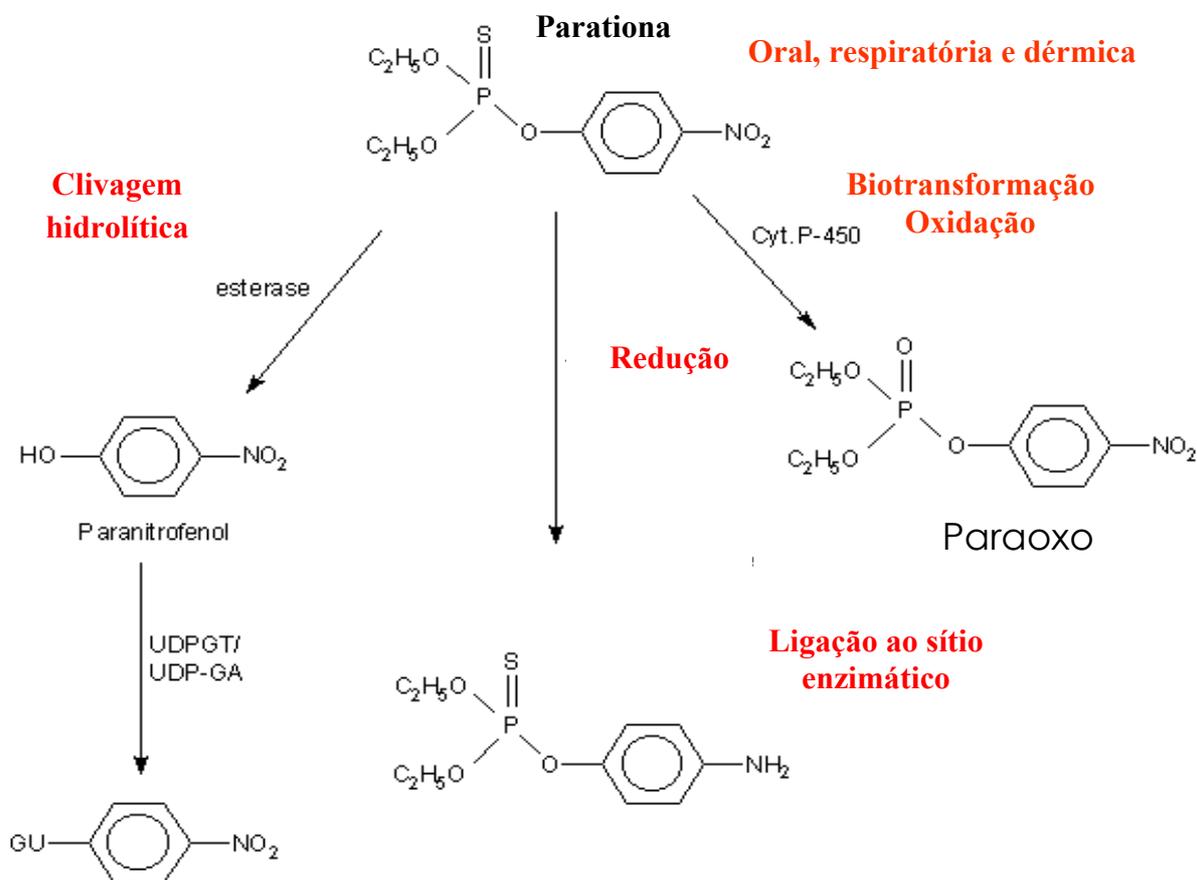


Figura 2: Esquema de biotransformação dos OFs derivados do ácido tiofosfórico na forma OXON (potentes inibidores da AChE). Fonte: Disponível em: <<http://virtual.unipar.br/courses/TOXICOLOGIA/document/Praguicidas.ppt?cidReq=TOXICOLOGIA>>. Acesso em: 20 jun. 2008

O complexo organofosforado-acetilcolinesterase é relativamente estável, impedindo a regeneração da enzima livre e ativa, a menos que seja administrado um antídoto. O papel fisiológico da acetilcolinesterase é o de hidrolisar a acetilcolina, que é o mediador químico

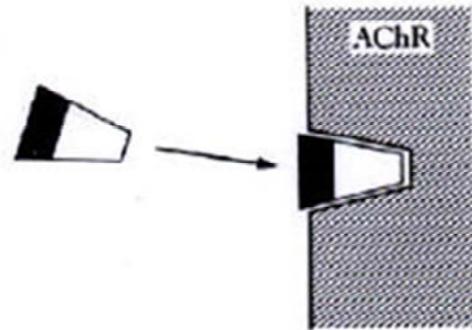
responsável pela transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, como representado na reação abaixo:



Na presença de agrotóxicos como os organofosforados, a acetilcolinesterase se fosforila e deixa de ser capaz de degradar a acetilcolina em colina e ácido acético. A acumulação de acetilcolina nas sinapses nervosas (efeitos muscarínicos), na placa motora (efeitos nicotínicos) e no sistema nervoso central (SNC) é responsável por alterações do estado mental, fraqueza muscular e atividade secretória excessiva (PEDRO & COBOS, 2000), todos sintomas típicos que podem ocorrer numa intoxicação por organofosforado (Figura 3). Os mecanismos envolvidos na transmissão de impulsos nervosos em insetos são muito semelhantes àqueles operantes em mamíferos, aves e peixes. Por isso, muitos inseticidas neurotóxicos são tóxicos também para esses organismos não-alvos, incluindo os seres humanos.

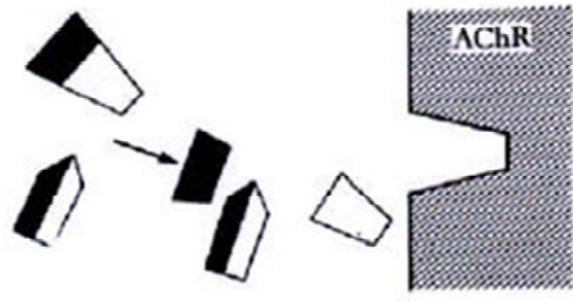
1- Ação fisiológica da acetilcolina

A ACh () sintetizada e liberada nas sinapses nervosas vai interagir com os seus receptores produzindo suas respostas características: estímulo e tonus dos músculos esqueléticos, aumento do peristaltismo intestinal, estímulo geral das secreções, esvaziamento da bexiga, broncoespasmo, etc.



2- Função fisiológica da acetilcolinesterase

As regiões ativas existentes na superfície da AChE () permitem uma interação enzima- substrato, resultando da ação hidrolítica do centro esterásico, a transformação da ACh em colina () e ácido acético ().



3- Mecanismos da ação tóxica dos agrotóxicos organofosforados

Os agrotóxicos organofosforados () inibem o centro esterásico da AChE incapacitando a mesma de exercer sua função, ou seja, desdobrar a ACh em colina e ácido acético ().

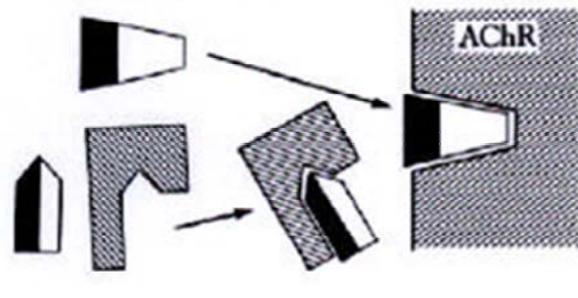


Figura 3: Esquema da ação da Acetilcolina (ACh), Acetilcolinesterase (AChE) e os agrotóxicos organofosforados. Fonte: Disponível em: <http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/impulso%20nervoso.PDF>. Acesso em 26 jun. 2008.

➤ Toxicocinética

Os organofosforados são absorvidos através da pele, pelo trato respiratório e pelo trato gastrointestinal e geralmente sua absorção é favorecida pelos solventes presentes na formulação. A absorção cutânea é maior em temperaturas elevadas ou quando existem lesões na pele. Após absorvidos, os organofosforados e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos. Não existem evidências de bioacumulação. Os compostos sofrem biotransformação, principalmente no fígado,

formando produtos menos tóxicos e mais polares, que são eliminados facilmente do organismo através da urina e das fezes, sendo que 80 a 90% da dose absorvida é eliminada em 48 horas.

1.3 Leite bovino

1.3.1 Qualidade do leite bovino

A sanidade dos rebanhos é de fundamental importância para a obtenção de um leite saudável. Porém, quando se fala em qualidade do leite e dos seus derivados, a preocupação predominante é aquela do ponto-de-vista higiênico-sanitário, onde a contaminação microbiológica é a principal responsável pela perda de qualidade e pelas perdas econômicas no processamento industrial (CARVALHO Fº, 2001).

Outra questão a ser discutida quanto à qualidade do leite é a contaminação do mesmo por agrotóxicos os quais estão intensivamente presentes na pecuária leiteira, indiretamente, através de rações e pastagens contaminadas e, diretamente, devido ao tratamento dos animais contra ectoparasitas (carrapatos), uma vez que o uso de carrapaticidas ainda se constitui no principal instrumento de controle do carrapato dos bovinos (BRITO, 2007), destacando o carrapato *Boophilus microplus*, que causa queda na produção de leite e carne e danos ao couro, sendo o transmissor dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (SOUSA, NOGUEIRA, BRONDI, 2007). Ao longo de décadas, foram usados carrapaticidas baseados em compostos arsenicais, organofosforados, carbamatos, formamidina e piretróides (BRITO, 2007). Embora a troca de princípios ativos seja uma necessidade constante devido ao surgimento de populações resistentes (MENDES *et al*, 2001; ROCHA *et al*, 2006; BRITO, 2007), ainda são de uso corrente os piretróides e organofosforados ou sua associação, devido ao baixo custo relativo destas substâncias e também por promoverem um eficiente controle do carrapato de bovinos (SILVA, NEVES-SOBRINHO, LINHARES, 2000; FAUSTINO, 2008).

Pouco tem sido feito para se conhecer, de forma profunda e substanciada, a questão toxicológica, por depender de laboratórios sofisticados, equipamentos caros que necessitam constante manutenção e pessoal especializado dificultando o monitoramento em larga escala (CARVALHO Fº, 2001).

1.3.2 Tipos de leite

O leite é classificado de acordo com a forma através da qual é produzido, bem como pelo tipo de beneficiamento e tratamento recebido.

Tipo A: leite *in natura*, retirado pela ordenha mecânica e diretamente transferido para um tanque, onde é aquecido até 70-75 °C e depois resfriado, no processo denominado pasteurização e em seguida embalada. Todo o processo é feito na origem de produção, com o mínimo de contato humano. Devido à qualidade do processo, o leite tipo A tem menos contaminantes, com padrão microbiológico de até 10 000 bactérias/ml.

Tipo B: a ordenha é mecânica e o local de armazenamento deve ser sempre refrigerado (a aproximadamente 4 °C). O processo industrial de pasteurização, bem como o envasamento, devem ser feitos na usina de beneficiamento fora da fazenda. A mecanização contribui para a excelência na extração do leite tipo B, e devido a isto possui menos contaminantes do que o leite tipo C. Como há transporte até a usina, sofre maior exposição ao ambiente do que o leite tipo A, apresentando, portanto, maior concentração de contaminantes e durabilidade intermediária entre os tipos A e C, com padrão microbiológico de até 50 000 bactérias/ml.

Tipo C: a ordenha pode ser manual ou mecânica e o leite pode ser armazenado em tanques não refrigerados antes de seguir para a usina onde será pasteurizado e envasado. Pode apresentar padrão microbiológico de até 350.000 bactérias/ml (IN 51, 2002).

O leite longa vida, ultrapasteurizado é o leite líquido homogeneizado, que foi submetido durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130 a 150 °C, mediante a um processo térmico de fluxo contínuo e imediatamente resfriado a uma temperatura abaixo de 32 °C e envasado assepticamente (ABLV, 2008).

O nível de gordura é indicado por outra classificação: integral (gordura original); padronizado (teor de gordura de 3 g/100 g); semi-desnatado (teor de gordura entre 0,6 e 2,9 g/100 g) ou desnatado (teor de gordura de até 0,5 g/100 g) (ABLV, 2008).

1.3.3 Composição do leite bovino e sua importância para a alimentação

A participação do leite na alimentação do ser humano nas diferentes fases da vida tem papel fundamental, constituindo-se assim em um dos alimentos mais completos. É uma importante fonte de carboidratos (lactose principalmente), gorduras, proteínas (caseína), sais minerais (cálcio) e vitaminas em diferentes estados de dispersão na água. Deve-se enfatizar sua importância também no setor leiteiro como gerador de renda (3º lugar na formação da renda bruta agropecuária) e como fixador de mão-de-obra no campo (2,5 milhões de produtores, em sua grande maioria familiares) (SILVA & GROOTENBOER, 2008).

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952), o leite é um produto integral resultante da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea saudável e bem alimentada, devendo ser recolhido em condições adequadas bem como isento de colostro. É considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas, caseína (corresponde a 80% das proteínas do leite) e albumina, necessárias à constituição dos tecidos e sangue, sais minerais (fosfatos, principalmente fosfato de cálcio, citratos, carbonato de sódio, cálcio, potássio e magnésio) imprescindíveis à formação do esqueleto e ainda, vitaminas (A, D, E e K, além das hidrossolúveis B1, B2, B6, B12, ácido pantotênico e niacina), certas diástases e fermentos lácticos - estes últimos muito favoráveis à digestão e que defendem o intestino da ação nociva de muitas bactérias patogênicas (C Quali Leite, 2008).

A gordura do leite é composta em sua quase totalidade por triglicerídeos (98% da gordura total) (FONSECA & SANTOS, 2000), os 2% restantes são constituídos por diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. O leite de vaca contém em média 35 g de gordura/litro. Os ácidos graxos predominantes no leite são os saturados, e englobam de 60% a 70% dos triglicerídeos. Já os insaturados correspondem de 25% a 30% (C Quali Leite, 2008).

A lactose é o carboidrato do leite, sendo responsável pelo seu sabor adocicado (C Quali Leite, 2008).

1.4 Segurança alimentar

Muito se tem dito e proposto a respeito da melhor maneira de se proteger o trabalhador do campo, diretamente exposto à intoxicação aguda pelos agrotóxicos, quase sempre, inadequadamente manuseados (MOREIRA *et al*, 2002; FARIA *et al*, 2007; RIBEIRO & MELLA, 2007). O mesmo não ocorre, no entanto, quanto à proteção das populações humanas e de organismos vivos em geral, indiretamente expostas através da contaminação do ar, da água e de alimentos contendo níveis perigosos de resíduos de agrotóxicos ou por usos domésticos (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005; VEIGA *et al*, 2006). Tais populações estão potencialmente sujeitas a efeitos crônicos de exposição continuada a múltiplos agrotóxicos.

Em vista do exposto, é de grande importância o desenvolvimento de métodos rápidos, de execução simples, de baixo custo e validados, para monitorar a presença de agrotóxicos em alimentos destinados ao consumo humano, permitindo verificar se os eventuais resíduos encontrados e se os níveis dos mesmos presentes nos alimentos constituem um risco à saúde pública, através da comparação dos resultados obtidos com os níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos pelas regulamentações vigentes (GALLI *et al*, 2006).

A importância de executar-se uma avaliação continuada (monitoramento) da presença e dos níveis de resíduos dos contaminantes químicos em alimentos é crescente, uma vez que nenhum teste isoladamente preenche todos os requisitos analíticos requeridos (HILL & REYNOLDS, 1999; VACÁRCEL *et al*, 1999). O uso de um sistema integrado empregando ensaios de triagem e confirmação é necessário para assegurar que os alimentos contendo resíduos de contaminantes químicos em níveis superiores aos LMRs não sejam introduzidos na cadeia alimentar, pondo em risco a saúde humana.

Quanto à produção convencional de alimentos, é inquestionável que os procedimentos utilizados têm deixado resíduos em níveis preocupantes para a saúde pública. Daí a necessidade imperiosa da certificação de um método de triagem para atender a missão da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que é “proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso.” (ANVISA, 2008b).

Atualmente, a filosofia dos países desenvolvidos em relação à vigilância da qualidade dos alimentos expostos ao consumo da população é monitorá-los usando a conjugação dos métodos de triagem com métodos de confirmação físico-químicos multirresíduos, visto que os primeiros são de baixo custo, sensíveis, práticos e rápidos. No Brasil, esses *kits* podem ser utilizados pelos laboratórios da Rede de Laboratórios de Saúde Pública que tenham um mínimo de infra-estrutura para análise de triagem como primeira etapa da avaliação de risco, que é a identificação do dano e a avaliação da exposição.

O Brasil é um país de clima favorável ao desenvolvimento de pragas agrícolas devido às altas temperatura e umidade. Dessa forma, o uso de agrotóxicos é ainda a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas, como carrapatos (*Boophilus microplus*) que acometem preferencialmente o rebanho bovino. Isto tornou o Brasil o líder mundial em consumo de agrotóxicos (ANVISA, 2009b). A figura 4 mostra as possíveis vias de contaminação ambiental e humana por agrotóxicos.

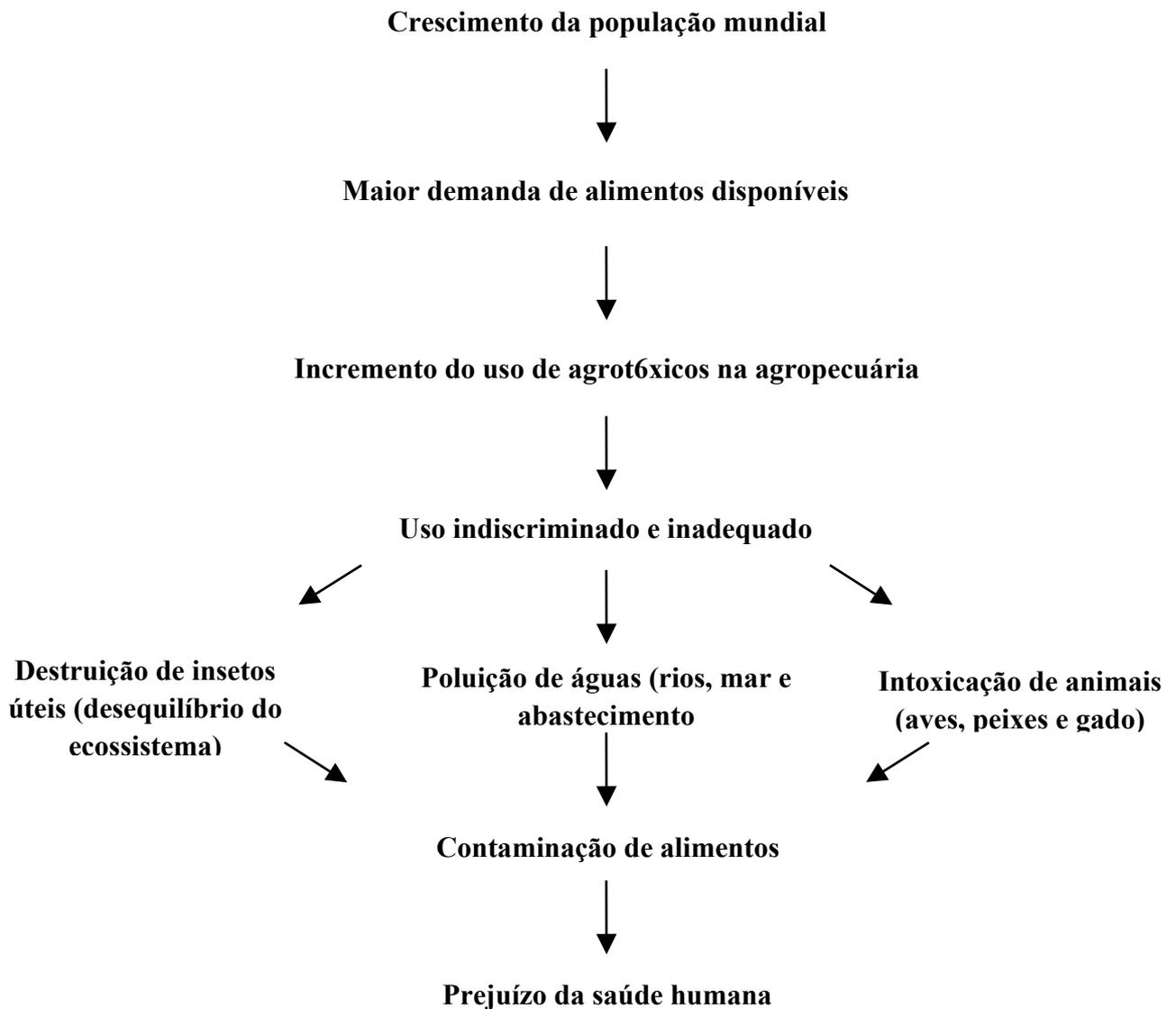


Figura 4: Representação esquemática das possíveis vias de exposição ambiental e humana

O aparecimento de resíduos de agrotóxicos no leite pode ocorrer mediante rações e pastagens contaminadas, ou no tratamento dos animais com agrotóxicos contra ectoparasitas, porém poucos trabalhos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite bovino têm sido realizados no Brasil (HECK *et al*, 2007; NERO *et al*, 2007). Rangel (2006), ao analisar, resíduos de organoclorados em vinte amostras de leite “longa vida”, detectou resíduos do organofosforado clorpirifós etil em 75% das amostras. A quantidade encontrada variou entre 0,182 e 2,846 mg/kg, valores acima do LMR, que é 0,01 mg/kg na gordura do leite.

Em função do acima exposto e também devido ao difundido uso de agrotóxicos e ao potencial risco à saúde apresentados pelos mesmos, é importante monitorar de modo

rápido, simples e com exatidão a presença destes compostos, mesmo em baixíssimos níveis (ng/mL) no ambiente e nos alimentos (RAZAK *et al*, 1998). Existe, hoje, uma grande necessidade de se aumentar a capacidade analítica, devido ao crescimento da demanda, especialmente de métodos que sejam simples, de baixo custo, com nível de detecção bem determinado e capazes de produzir uma resposta rápida de exatidão conhecida (CHO *et al*, 2004). Tais métodos poderiam, no mínimo, ser usados como métodos de triagem, detectando amostras positivas e facilitando grandemente o trabalho de análise instrumental. Por este motivo, a otimização de um método de extração de resíduos de agrotóxicos organofosforados (OF) do leite bovino juntamente com a validação de um método qualitativo como o *kit* de inibição enzimática com a capacidade de contribuir para a realização de um programa nacional de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é imprescindível para que ações de vigilância sanitária, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de alimentos contaminados, sejam desenvolvidas (ABAD *et al*, 1999; ABAD & MONTOYA, 1994; HENNION & BARCELO, 1998; MANCLUS & MONTOYA, 1995).

1.5 Métodos de triagem

A necessidade de respostas analíticas rápidas e confiáveis é inquestionável. Os métodos de laboratório convencionais que analisam detalhadamente amostras quali e quantitativamente estão sendo substituídos por ferramentas analíticas que proporcionam respostas binárias (RIOS & TELLEZ, 2005), que é claramente uma informação analítica qualitativa. É comum os termos “método de triagem” ou “método rápido” serem usados como sinônimos de “método qualitativo” (VALCÁRCEL, CÁRDENAS, GALLEGO, 1999). Os métodos de triagem são um tipo de análise qualitativa e estão se tornando importantes na rotina analítica dos laboratórios (ABAD *et al*, 1999), uma vez que eles proporcionam soluções baseadas simplesmente em respostas binárias do tipo sim/não, positiva/negativa ou presente/ausente que indicam se o analito-alvo está presente acima ou abaixo de uma concentração limite pré-estabelecida (RIOS & TELLEZ, 2005).

Há mais de uma década tem-se intensificado a pesquisa e desenvolvimento de métodos de triagem rápidos, descomplicados e de baixo custo para monitoramento e controle dos níveis de contaminantes químicos em alimentos, como resíduos de agrotóxicos e de drogas veterinárias e geralmente, se apresentam na forma de ferramentas bioanalíticas como imunoenaios, biossensores e métodos biológicos baseados em inibição enzimática ou

microbiana (ABAD *et al*, 1999, BASTOS *et al*, 1991, CALODW *et al*, 2005, CHO *et al*, 2004, HENNION & BARCELO, 1998, KAUFMAN & CLOWER JR, 1995, LEHOTAY & MILLER, 1994, MANCLÚS & MONTOYA, 1995, SCHULZE *et al*, 2002, SCORTICHINI *et al*, 2005, WANG *et al*, 2005). A maioria dos sistemas de triagem é planejada para minimizar ou eliminar o tratamento da amostra ou uso de equipamentos custosos, ou ambos. Tais métodos têm como características:

- a) serem métodos rápidos;
- b) a resposta é usada para tomada de decisão imediata (ABAD *et al*, 1999);
- c) não é necessário o processamento de um grande número de amostras para obtenção de medidas gerais para substâncias tóxicas ou poluentes;
- d) diminuição das operações preliminares de um processo analítico convencional, o qual usualmente é longo e fonte de erros sistemáticos;
- e) diminuição do uso permanente de instrumentos dispendiosos e de alto custo de manutenção. Somente amostras com resposta positivas serão usadas para quantificação nesses instrumentos (MUÑOZ-OLIVAS, 2004).

Em processos de monitoramento, nos quais freqüentemente se mostra necessária a verificação de que a contaminação da amostra se apresenta abaixo ou acima de um valor limite, como ocorre no monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, o sistema de triagem principalmente usado é o da triagem direta (Figura 5).

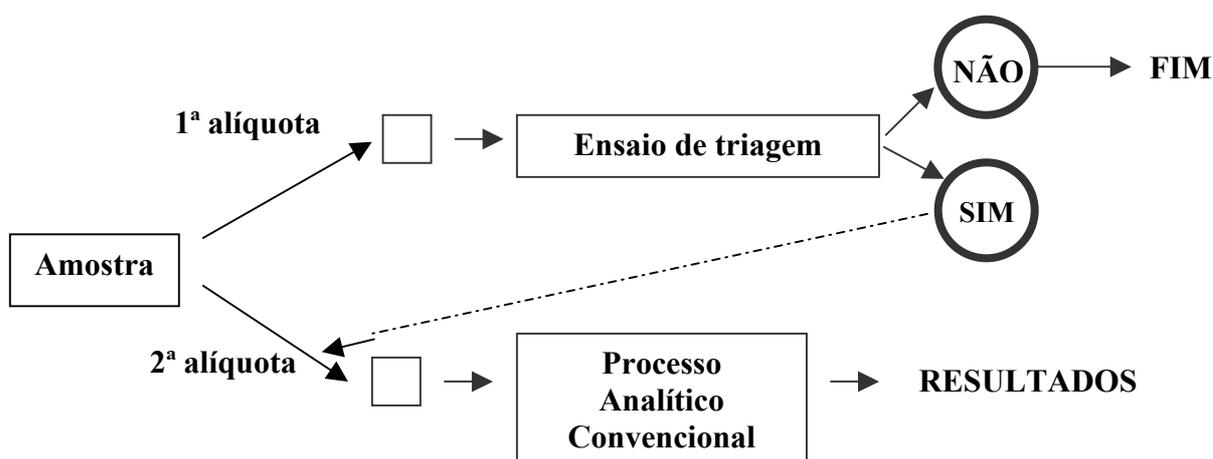


Figura 5: Sistema de triagem direta Fonte: Vacarcél *et al*, 1999

A avaliação da qualidade dos dados analíticos quantitativos tem sido alvo de numerosos estudos, gerando uma gama de guias internacionais e padrões fundamentais.

Conseqüentemente, existem protocolos bem estabelecidos para validação de método e para estudos de proficiência dos métodos quantitativos (ELLISON & FEARN, 2005). No entanto, inicialmente, os métodos analíticos qualitativos vinham recebendo pouca atenção. Com a publicação da norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025: 2005, o interesse no gerenciamento da qualidade e a caracterização objetiva do desempenho dos testes qualitativos têm crescido muito. Alguns dos métodos desenvolvidos para validação das técnicas quantitativas são também usados nas abordagens qualitativas e semiquantitativas. Por exemplo, conceitos gerais como capacidade de detecção (limite de detecção) e o conceito de estudo colaborativo são importantes (ELLISON & FEARN, 2005). A análise estatística e a comunicação de resultados são, no entanto, diferentes. Conceitos fundamentais para os métodos quantitativos, tais como precisão, inclinação da curva e cálculo de incerteza, não podem ser aplicados aos métodos de triagem (ELLISON & FEARN, 2005; TAVERNIERS *et al*, 2004). O objetivo geral de validação de um método é demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido (“Fitness for purpose”) (EURACHEM, 1998). No caso de uma análise de triagem qualitativa para uso na rotina do laboratório, parâmetros diferentes de validação precisam ser verificados. Deve-se proceder, primeiro, à avaliação de desempenho do método e, em seguida, à avaliação de sua confiabilidade (ANKLAN *et al*, 2002).

Para o desenvolvimento desses testes, é necessário o conhecimento do mecanismo de ação dos contaminantes químicos como, por exemplo, os agrotóxicos. O melhor exemplo é a medição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), presente nas sinapses do sistema nervoso central e periférico, para monitoramento da exposição aos agrotóxicos organofosforados e carbamatos, que são inibidores da AChE. O método de Ellman (1961) foi o precursor na medição das atividades colinesterásicas de forma cinética, todos os outros trabalhos foram baseados neste método ou modificações dele. A atividade da AChE foi estudada para medição do impacto à saúde humana, causado por três vias de contaminação:

- alimentar: (CUNHA BASTOS *et al*, 1991; HE, 1999; LEE *et al*, 2002; SCHULZE *et al*, 2002; ANDREESCU & MARTY, 2006; NAGATANI *et al*, 2006; MORAIS *et al*, 2009);
- ocupacional: MOREIRA *et al*, 2002; FARIA, FASSA, FACCHINI, 2007;
- ambiental: ANDREESCU & MARTY, 2006.

Avanços nas técnicas imunoquímicas, como o desenvolvimento de anticorpos seletivos, levaram à geração de métodos sensíveis como os EIAs, usados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes (MORENO, ABAD, MONTOYA, 2001; KIM, LEE, CHUNG *et al*, 2003; CHO, SEOK, LEE *et al*, 2004).

1.5.1 Critérios importantes na avaliação de métodos de triagem

1.5.1.1 Indicadores de desempenho

A AOAC (2006) propõe e define quatro indicadores de desempenho para métodos qualitativos na forma de *kits*: sensibilidade, especificidade, T_{fp} (taxa de falso-positivo) e T_{fn} (taxa de falso-negativo). Dentre os parâmetros requeridos pela AOAC para submissão de *kits*, a precisão deve ser expressa pelas T_{fp} e T_{fn} e a exatidão é determinada através da comparação dos resultados obtidos pelo método em estudo com um método padrão já existente (recuperação) (AOAC, 2006). A taxa de falso-positivo é definida como a probabilidade de se obter um resultado positivo pelo método mesmo quando o analito não está presente e pode ser estimada pela proporção de resultados incorretos apresentados por amostras que não contenham o analito (ELLISON & FEARN, 2005). Esse critério está ligado ao conceito de especificidade: quanto maior a taxa de falso-positivo, menor a especificidade do método, que é definida como sendo a capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias numa determinada matriz (EURACHEM, 1998), bem como a probabilidade de se obter um resultado positivo mesmo quando o analito não está presente. A taxa de falso-negativo é a probabilidade de se obter um resultado negativo pelo emprego do método, mesmo quando o analito está presente (ELLISON & FEARN, 2005). Esse critério é relativo ao conceito de sensibilidade, que é a capacidade de um método detectar como positivas amostras verdadeiramente positivas (EURACHEM, 1998).

1.5.1.2 Limite de detecção (LOD)

A capacidade de detecção é estimada para um método de respostas qualitativas através da experimentação direta. O limite de detecção é encontrado pela aplicação do método em amostras contendo, progressivamente, quantidades menores do analito até que não se consiga mais detectar, de modo confiável, a presença do mesmo. A concentração do

analito neste ponto é tomada como sendo o limite de detecção (LOD) do método para este analito em particular (ELLISON & FEARN, 2005).

Segundo RIOS & TELLEZ (2005) para assegurar que o método de triagem seja considerado um método binário de classificação de amostras o LOD deve ser menor que o limiar, ou seja menor que o limite máximo de resíduo (LMR) definido pelo guia EURACHEM (1998) e outros órgãos oficiais como sendo a menor quantidade de um analito na amostra à qual pode ser detectada mas não necessariamente quantificada com um valor exato. Entretanto, o LOD é dependente da matriz. Para medidas qualitativas, o LOD deve variar se o experimento é repetido em outro tempo com diferentes reagentes, fortificação ou matrizes fortificadas (EURACHEM, 1998).

1.5.2 Classificação de métodos qualitativos

Os métodos de triagem podem ser classificados em químicos e biológicos, onde “químico” aplica-se à determinação de compostos inorgânicos e orgânicos e elementos através de titulometria, fotometria, testes colorimétricos e visuais (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ, RIUS, 2004). Os métodos biológicos envolvem técnicas analíticas que incorporam um componente biológico como uma parte integrante do sistema de detecção, como os biossensores e bioensaios, e o desenvolvimento destes métodos é uma área em expansão da bioquímica. Muitos métodos biológicos são baseados nas interações enzima/inibidor/ativador, antígeno/anticorpo, receptor/ligante, etc, e representam ferramentas-chave para avaliação dos sistemas ambiental e biológico (NISTOR & EMNÉUS, 1999). Os métodos biológicos denominados biotestes, são usados somente para informação sobre a toxicidade das amostras, tais como reações enzimáticas e imunoensaios e são altamente específicos e sensíveis. Também podem ser classificados de acordo com o tipo de sistema de detecção em métodos de detecção sensorial e de detecção instrumental (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ, RIUS, 2004).

1.5.2.1 Métodos qualitativos baseados na detecção sensorial

A principal característica desses métodos qualitativos é que os sentidos humanos são usados para obtenção e interpretação das respostas. A visão é o sentido mais usado quando o sistema de detecção envolve uma solução colorida, uma tira de teste ou turbidez. A resposta é obtida através da reação entre o analito de interesse e reagentes específicos constantes no procedimento (*kit*). A magnitude da resposta pode ser direta ou indiretamente relacionada à

concentração do analito. As reações seguem diferentes princípios, principalmente, químicos e imunológicos. A complexação e a precipitação são as reações químicas mais utilizados. Nos métodos imunológicos, principalmente do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), o surgimento de *spot* colorido requer a adição de uma enzima que reconheça a ligação analito-anticorpo e a intensidade da cor formada é diretamente proporcional a concentração do analito (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ, RIUS, 2004).

1.5.2.2 Métodos qualitativos baseados na detecção instrumental

Esses métodos se baseiam geralmente na medida da absorvância. O resultado final é dado por comparação da resposta obtida para a amostra analisada com aquela de uma amostra contendo o analito-alvo num nível determinado (amostra referência). Esses métodos podem ser usados para quantificar o analito na amostra e decidir se a sua concentração está acima ou abaixo de um nível específico. A resposta da amostra é comparada à resposta obtida pela amostra referência (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ, RIUS, 2004). Alguns métodos baseados em ELISA utilizam a detecção instrumental. Também fazem uso deste tipo de detecção alguns *kits* de inibição enzimática nos quais os produtos da ação enzimáticas são medidos por espectrofotometria. Se a absorvância do analito na amostra desconhecida for maior que àquela da amostra referência, pode se concluir que a amostra contém o analito em um nível de concentração maior que da amostra referência. O inverso também ocorre quando a amostra contém menos analito que a amostra referência. Dessa forma, a resposta instrumental torna-se uma resposta binária do tipo sim/não.

1.5.3 Validação de método na análise qualitativa

Dados analíticos válidos são essenciais para um monitoramento satisfatório, principalmente no que se refere ao controle de resíduos de contaminantes químicos. Todas as etapas de análise, desde a preparação da amostra à produção de resultados, devem ser avaliadas com o foco na simplicidade e eficiência dos requisitos (HILL & REYNOLDS, 1999).

Um método analítico, antes de ser aplicado na rotina do laboratório, deve ser validado, ou seja, suas características de desempenho devem ser definidas (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ, RIUS, 2004). A norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025: 2005 define validação de um método analítico como “a confirmação, mediante exame e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida.”. A validação dos métodos de triagem deve seguir a mesma filosofia que norteia a validação de métodos quantitativos, embora haja algumas diferenças na metodologia. A AOAC Internacional tem um programa desenvolvido especialmente, para *kits* denominado: *Performance Tested Methods Program*, que engloba os parâmetros já definidos no item 1.5.1.1. A recomendação geral é que a validação de métodos seja

feita, preferencialmente através de estudos colaborativos ou por comparação com um método já existente e preferencialmente validado.

A EURACHEM especifica que para os métodos qualitativos deve-se avaliar os seguintes parâmetros de desempenho: confirmação da identificação, sensibilidade, seletividade/especificidade e precisão. A precisão pode ser expressa como taxas de verdadeiro e falso positivo/negativo e deve ser levado em conta que essas taxas estão relacionadas à sensibilidade e especificidade como descrito no item 1.5.1.1.

Similarmente, a União Européia (UE) através do seu Boletim Oficial (2002), define e propõe a avaliação dos seguintes parâmetros qualitativos: limite de detecção (CC β), seletividade/especificidade, estabilidade, aplicabilidade e robustez. A UE também estabelece que métodos de triagem podem ser usados quando forem apropriadamente validados e a percentagem de falso negativo seja menor que 5% ao nível de concentração de interesse.

1.6 Legislação

1.6.1 Agrotóxicos

A Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989, resultado de portarias e resoluções emitidas pelo Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura e de estudos com a participação de pesquisadores, indústrias e entidades de classe, dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos de embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

As características principais desta lei dizem respeito, principalmente à proibição de agrotóxicos para os quais não haja: (1) método de desativação, no Brasil, de seus componentes, impedindo danos ao meio ambiente e ao homem; (2) antídoto ou tratamento eficaz no Brasil; (3) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas; (4) que provoquem distúrbios hormonais e danos ao aparelho reprodutor, entre outros itens.

No mesmo ano, foi regulamentada a lei 7802 através do Decreto nº 98062 (Brasil, 1989), em 17 de agosto, que formou a Comissão Interministerial composta por representantes dos Ministérios da Agricultura, Saúde e Interior e da Secretaria de Assessoramento da Defesa Nacional, que ficou responsável pela apresentação de um anteprojeto para o bom desempenho dos trabalhos propostos na lei. O Decreto nº 98816, de 11 de janeiro de 1990, definiu as competências desses três

ministérios. O Ministério da Agricultura ficou responsável pelas avaliações, concessões de registro, fiscalização e inspeção da produção de agrotóxicos; ao Ministério da Saúde coube a avaliação toxicológica e concessão de registro quanto ao aspecto da saúde humana; ao Ministério do Interior coube as mesmas ações, sendo que destinadas ao uso e proteção de florestas, de ambientes hídricos e outros ecossistemas, atendidas as diretrizes e exigências do Ministério da Saúde.

O Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, regulamentou a lei 7802, estabelecendo as competências dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde e do Meio Ambiente. Neste Decreto ocorreram modificações importantes, tais como a responsabilidade, por parte do Ministério da Saúde, do monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem animal e avaliação e classificação toxicológica dos agrotóxicos, seus componentes, e afins. As responsabilidades do extinto Ministério do Interior foram repassadas ao Ministério do Meio Ambiente.

1.6.2 Leite bovino

A Lei nº 1283, de 18 de dezembro de 1950, dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal, estabelecendo a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, de todos dos produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, sejam ou não adicionados de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito. A responsabilidade dessa fiscalização cabia exclusivamente, ao Ministério da Agricultura e às Secretarias de Agricultura Estaduais. O Decreto nº 30 691 de 29/03/1952 regulamentou a Lei 1283, através da aprovação do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. No Título VIII (Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados), descreve as características do leite bovino e condições higiênico-sanitárias para seu consumo.

A Lei nº 7889, de 23 de novembro de 1989, alterou a Lei 1283 no que tange a responsabilidade da fiscalização, acrescentando os órgãos de saúde pública dos Estados, do Distrito Federal e dos Territórios aos órgãos da agricultura.

Em 1998, é aprovado o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos", com vistas a minimizar os riscos à saúde humana. Os limites máximos de contaminantes químicos foram estabelecidos baseando-se em normas, diretrizes ou recomendações da Comissão do Codex Alimentarius, da União Européia, do FDA (Food and Drug Administration) ou de outros organismos reconhecidos internacionalmente,

além de dados existentes na literatura científica, informações toxicológicas e boas práticas agrícolas, pecuárias, industriais e analíticas.

A Instrução Normativa nº42, de 1999 (MAPA) alterou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Leite – PCRL, além de outras matrizes. Os agrotóxicos considerados quanto aos limites de resíduos máximo (LMR) nessa instrução foram apenas do grupo dos organoclorados na gordura do leite. Segundo as monografias de produtos agrotóxicos da ANVISA, os agrotóxicos organofosforados com LMR para gordura do leite, como resíduo não intencional, são: clorpirifós (0,01 mg/kg) e fenitrotona (0,05 mg/kg) (ANVISA, 2008).

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o uso do *kit* de inibição enzimática para detecção de organofosforados em leite bovino, que foi originalmente usado na detecção de organofosforados e carbamatos em água e alguns alimentos.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar os limites de detecção para os agrotóxicos parationa metílica e clorpirifós, na matriz leite bovino, pelo emprego do *kit* de inibição enzimática.
2. Estabelecer o protocolo de extração dos agrotóxicos organofosforados presentes no leite bovino para detecção simultânea pelo *kit* enzimático e por cromatografia gasosa.
3. Avaliar o desempenho do método de extração quanto à aplicação pretendida.
4. Avaliar o desempenho do método de inibição enzimática através da estimativa do LOD, da especificidade e da sensibilidade do mesmo em relação à matriz leite bovino.

3 Materiais e métodos

3.1 Amostras

As análises foram realizadas em: (1) 2 lotes diferentes de uma única marca de leite UHT integral orgânico adquirida no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro e de

São Paulo; (2) 5 amostras de leite pasteurizado dos tipos B e C, de marcas diferentes, coletadas durante o programa com a Vigilância Sanitária Municipal em 2006 e mantidas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essas amostras foram testadas no *kit* enzimático para verificação da presença ou não de algum agrotóxico OF e (3) 1 lote do leite desnatado em pó (Skim Milk da DIFCOTM) para ser usado em meio de cultura microbiológico, isento de contaminantes químicos. Todas as amostras de leite foram fortificadas com soluções dos padrões de clorpirifós e parationa metílica nas concentrações que variaram de 5 a 200 ng/ml. A utilização de leite orgânico e do leite desnatado em pó, usado em meio de cultura, foi devida a inexistência de material de referência certificado (MRC), na época das análises.

3.2 Padrões e reagentes

Foram utilizados padrões de agrotóxicos com grau de pureza acima de 95% (Dr. Ehrenstorfer – Augsburg, Alemanha). Solventes acetato de etila grau HPLC/SPECTRO (Tedia), n-hexano e acetonitrila grau HPLC. Sulfato de sódio anidro (para análise, MERCK[®]), ácido fosfórico (para análise, MERCK[®]) e papel de filtro (qualitativo, WHATMAN[®]). TritonX-100[®] é um detergente que facilita a suspensão do extrato e estabiliza a enzima.

Soluções-estoque foram preparadas na concentração nominal de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e soluções intermediárias de trabalho para parationa metílica e para clorpirifós, foram preparadas em acetato de etila a partir das soluções-estoque. As soluções de trabalho foram empregadas na confecção das curvas analíticas em solvente e na matriz leite bem como para fortificação das amostras.

3.3 *Kit* enzimático

- Frasco com preparação de acetilcolinesterase (liofilizado), obtida a partir de cérebro de rato, com a propriedade de ativação de agrotóxicos tiofosforados, preparada conforme Cunha Bastos *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 1996 e Castro Faria, 2003. Suspender no volume de água indicado no rótulo (concentração final de proteína da preparação 20 mg/mL);
- Frasco com o reagente ditionitrobenzoato tamponado (solução 1.0 mM de DTNB em tampão de fosfato de sódio 0,5 M);

- Frasco com substrato acetilcolina (dessecado, sob vácuo ou atmosfera de nitrogênio). Suspender no volume de água indicado no rótulo (solução 1,25 mM de acetilcolina).

3.4 Método cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas para confirmação do desempenho dos métodos de extração e detecção propostos nesse trabalho. As condições cromatográficas foram estabelecidas pelo laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS e que constam do POP nº 65.3120.081. Para isso foi utilizado o cromatógrafo a gás 14A (SHIMADZU), equipado com o detector fotométrico de chama (FPD- *Flame Photometric Detector*) modelo 14B- SHIMADZU, seletivo para análises de compostos com enxofre (S) e/ou fósforo (P), com sistema de injeção automático. Temperatura do detector e injetor: 290 °C e 230 °C, respectivamente. Coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm \varnothing x 0,25 μ m espessura do filme), vazão constante: 1 mL/min, gás de arraste: Hélio. Programação de temperatura do forno: 170 °C (1min) (25 °C/min); 180 °C (1min) (1 °C/min); 230 °C (0min) (1 °C/min); 260 °C (5min) (5 °C/min); 280 °C (5 min) (20 °C/min). O extrato seco proveniente da evaporação do combinado de acetonitrila foi dissolvido em 0,25 mL de acetato de etila. Desse volume final foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e transferida para “vial” de vidro com “insert” e 2,5 μ L analisado em GC/FPD.

3.5 O método

O método de detecção enzimática foi desenvolvido, primeiramente, para análise de água (BASTOS *et al*, 1991) ou frutas e hortaliças (CASTRO FARIA, 2003). Devido aos motivos expostos acima, foi pesquisado e desenvolvido um novo método de extração que fosse capaz de extrair os organofosforados lipossolúveis do leite bovino que, ao mesmo tempo, permitisse a análise pelo método qualitativo (enzimático) e pelo método quantitativo (cromatografia em fase gasosa) para confirmação da presença da substância. Primeiramente foi feita uma revisão bibliográfica à procura de métodos de extração de organofosforados de leite bovino, que tivesse como características:

- Uso de solventes menos tóxicos;
- Pequeno número de etapas de extração para redução da possibilidade de erros sistemáticos;

- Uso de pequenas quantidades de amostras.

Os métodos encontrados, na sua maioria, eram para análise por cromatografia em fase gasosa ou líquida (BEAM & HANKINSON, 1964; TOYODA *et al*, 1990; MUCCIO *et al*, 1996; BOLLES *et al*, 1999; AHMED, 2000; SALAS *et al*, 2003; PAGLIUCA *et al*, 2005; CARDEAL & PAES, 2006; PAGLIUCA *et al*, 2006).

O primeiro método de extração foi baseado nos métodos de Bolles e colaboradores (1999) e Salas e colaboradores (2003) com modificações nas proporções dos reagentes utilizados, está descrito abaixo:

3.5.1 Primeiro método:

Etapa de extração

1. Aquecer as alíquotas de leite em banho-maria a 45 °C antes de proceder à extração;
2. Tomar 10 ml de leite, adicionar 10 ml de acetato de etila, agitar fortemente por pelo menos 1 min, centrifugar a cerca de 3.000 rpm por 15 min, para a perfeita separação das fases;
3. Coletar 4 ml da fase acetato de etila (superior), adicionar 48 µL de ácido fosfórico 1% e 5 ml de n-hexano, agitar por 1 min;
4. Coletar 5 ml da fase n-hexano (superior) em pequenos tubos de ensaio e evaporar o solvente em banho-maria entre 35- 40 °C, com corrente de nitrogênio, até a secura;
5. Extrair o resíduo 3 vezes com 2 ml de acetonitrila e evaporar os extratos até a secura;

Dosagem enzimática:

1. Aos tubos contendo os resíduos de evaporação do solvente, adicionar 0,25 ml de solução aquosa de Triton X-100[®] a 4% e agitar bem. Filtrar em seringa de 1 a 3 ml de capacidade através de camada de lã de vidro. Tomar 0,125 ml do filtrado e adicionar 0,125 ml da preparação enzimática suspensa em água.

2. Agitar fortemente, incubar durante 120 min a 37 °C. Esta incubação permite a ativação completa de quaisquer tionofosforados, transformando-os em potentes inibidores da acetilcolinesterase;
3. Transferir para cubeta do espectrofotômetro 25 µl da preparação incubada, adicionar 0,25 ml da solução do reagente de cor ditionitrobenzoato (DTNB);
4. Adicionar, em seguida, 0,25 ml da solução do substrato da enzima (acetiltiocolina), homogeneizar rapidamente e proceder à leitura do acréscimo de absorvância em 412 nm, durante 3 min em espectrofotômetro Shimadzu mod 150 no módulo cinético. Calcular o acréscimo de absorvância por min (que representa a medida da atividade enzimática). A percentagem de inibição enzimática foi obtida por comparação com controles apropriados.

O método de extração foi testado em leite desnatado (Skim milk da DIFCO®) e em amostras de leite pasteurizado tipos B e C (3% de gordura) do programa de monitoramento de drogas veterinárias em leite que foi realizado com a Vigilância Sanitária (VISA) municipal. As amostras foram inicialmente testadas quanto à presença de inibidores da AChE, por comparação com o leite desnatado e, caso negativo, as amostras foram fortificadas com parationa metílica (agrotóxico referência para água no kit enzimático) e clorpirifós que segundo as monografias da ANVISA, é permitido na gordura do leite como resíduo não intencional na concentração de 10 ng/ml.

Na extração do primeiro método o resíduo apresentou-se ainda com gordura, impossibilitando a análise cromatográfica, por isso o mesmo foi modificado resultando no segundo método de extração, que está baseado no método de Salas e colaboradores (2003) com adaptações e descrito abaixo:

3.5.2 Segundo método:

Etapa de extração:

1. Tomar 10 ml de leite, adicionar 20 ml de acetato de etila e 8 g de sulfato de sódio anidro para separação da fase aquosa, agitar fortemente por pelo menos 1 min e centrifugar a cerca de 3.000 rpm por 15 min, para a perfeita separação das fases;

2. Coletar 10 ml da fase acetato de etila (superior) e evaporar até a secura (35 °C);
3. Dissolver o resíduo em n-hexano (5 ml) e extrair com 2 x 10 ml de acetonitrila saturada com n-hexano para remover a gordura e os fosfolipídios (SALAS *et al*, 2003);
4. Evaporar o filtrado das fases acetonitrila em banho-maria entre 35-40 °C, com corrente de nitrogênio, até a secura.

Na tentativa de uma recuperação do analito no extrato final para que a dosagem enzimática seja eficiente, a recuperação do extrato seco foi feita diretamente com a enzima AChE como descrito abaixo:

Dosagem enzimática:

1. Dissolver os resíduos de evaporação do solvente com 0,25 ml de preparação enzimática convenientemente diluída conforme instruções do frasco que a contém;
2. Agitar fortemente, incubar durante 120 min a 37 °C. À preparação incubada, adicionar 0,5 ml da solução do reagente de cor ditionitrobenzoato (DTNB) e em seguida 0,5 ml da solução do substrato da enzima (acetiltiocolina). Imediatamente misturar e transferir para cubeta do espectrofotômetro;
3. Proceder à leitura da absorvância em 412 nm, conforme descrito no primeiro método.

3.5.3 Terceiro método:

Para a proteína acrescentou-se ao método uma nova etapa de extração o que produziu um aumento na sensibilidade do método enzimático e das análises cromatográficas, como descrito abaixo.

Etapa de extração:

1. Tomar 10 ml de leite, adicionar 10 ml de acetonitrila HPLC, agitar fortemente por 30 s, centrifugar a 3.000 rpm por 10 min para precipitação da proteína do leite (BEAM & HANKINSON, 1964);

2. Transferir o sobrenadante para tubo limpo e acrescentar 10 ml de acetato de etila HPLC e 8 g de sulfato de sódio anidro, agitar fortemente por pelo menos 1 min, centrifugar a cerca de 3.000 rpm por 15 min, para a perfeita separação das fases;
3. Coletar 10 ml da fase acetato de etila (superior), e evaporar até a secura (35 °C);
4. Dissolver o resíduo em n-hexano (5 ml) e extrair com 2 porções de 10 ml de acetonitrila saturada com n-hexano (SALAS *et al*, 2003);
5. Adicionar 8g de sulfato de sódio anidro à acetonitrila proveniente da extração e filtrar (papel de filtro qualitativo) (PAGLIUCA *et al*, 2005);
6. Evaporar o filtrado das fases acetonitrila e evaporar em banho-maria entre 35-40 °C, com corrente de nitrogênio, até a secura.
7. A dosagem enzimática é a mesma descrita nos métodos anteriores.

3.6 Validação do método e avaliação dos critérios de desempenho

A validação do método de extração e detecção foi baseada em vários documentos encontrados na literatura científica (EURACHEM, 1998; VALCÁRCEL, CÁRDENAS, GALLEGRO, 1999; ANKLAN *et al*, 2002; COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002; ABNT-NBR ISO/IEC 17025, 2005; ELLISON & FEARN, 2005; RIOS & TELLEZ, 2005; AOAC, 2006; DG SANCO, 2007). A norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025 (2005) define validação de método como “a confirmação, mediante exame e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida”.

Segundo a EURACHEM (1998), os parâmetros de desempenho para métodos qualitativos que devem ser avaliados são a confirmação da identificação, a sensibilidade, a seletividade/especificidade e a precisão.

O limite de detecção do método qualitativo, foi determinado pela aplicação do método de inibição enzimática em amostras de leite orgânico contendo, progressivamente, quantidades menores do agrotóxico (parationa metílica e clorpirifós) até que não se conseguisse mais detectar, de modo confiável, a presença do mesmo. Os valores de atividade enzimática obtidos (crescimento da absorvância/min a 412nm) foram avaliados

quanto à presença de valores aberrantes “outliers”, através da aplicação do teste de Grubbs ($G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$).

Através dos estudos da recuperação dos agrotóxicos nas amostras de leite orgânico, leite desnatado (DIFCO™) e leite pasteurizado fortificados em diferentes níveis de concentração dos dois agrotóxicos em estudo, foi determinada a exatidão do método, comparando-se a concentração real adicionada antes do procedimento de extração e detecção, com aquela encontrada após esta etapa. A recuperação foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\overline{x}_{\text{experimental}}}{\overline{x}_{\text{teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A precisão foi medida sob condições de repetitividade e expressa pelo coeficiente de variação (CV %) calculado através da equação:

$$CV\% = (s / \overline{x}) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, s = Desvio padrão das absorvâncias medidas ao longo de 3 min em cada nível de concentração estudada; \overline{x} = média das absorvâncias obtidas.

4 Resultados e Discussão

Dentre os trabalhos publicados sobre a avaliação da presença de organofosforados em leite bovino (BEAM & HANKINSON, 1964, TOYODA *et al*, 1990, MUCCIO *et al*, 1996, BOLLES *et al*, 1999, AHMED, 2000, SALAS *et al*, 2003, PAGLIUCA *et al*, 2005, CARDEAL & PAES, 2006, PAGLIUCA *et al*, 2006, NERO *et al*, 2007), alguns trabalhos envolvem o monitoramento do leite consumido (BOLLES *et al*, 1999, AHMED, 2000, SALAS *et al*, 2003, PAGLIUCA *et al*, 2006, NERO *et al*, 2007), o restante são estudos de métodos de extração e quantificação de OFs, que não utilizam solventes tóxicos (CARDEAL & PAES, 2006), ou envolvem análises rápidas e simples (BEAM & HANKINSON, 1964, TOYODA *et al*, 1990, MUCCIO *et al*, 1996, PAGLIUCA *et al*, 2005). No entanto, todos esses trabalhos citados utilizaram análises quantitativas feitas através da cromatografia em fase gasosa ou líquida que envolvem longo tempo nas etapas iniciais de preparação das amostras, maior quantidade de reagentes e instrumentação mais dispendiosa, o que eleva o custo final das análises. Por essa razão, procuramos modificar e adaptar as técnicas existentes para torná-las mais rápidas, mais baratas e tão sensíveis quanto às técnicas cromatográficas.

O ensaio enzimático proposto aqui, que foi primeiramente desenvolvido para análise de água, frutas e hortaliças, foi adaptado para análise de organofosforados em leite, matriz que contém proporção de gorduras bem maior do que aquelas já testadas. Para isso foram feitas adaptações e modificações que resultaram em três diferentes métodos de extração dos OFs da gordura do leite. O primeiro método de extração e detecção proposto apresentou LOD de 5 ng/ml para parationa metílica em leite desnatado e pasteurizado, como demonstrado na tabela 2 e representado nas figuras 6 A e 6 B.

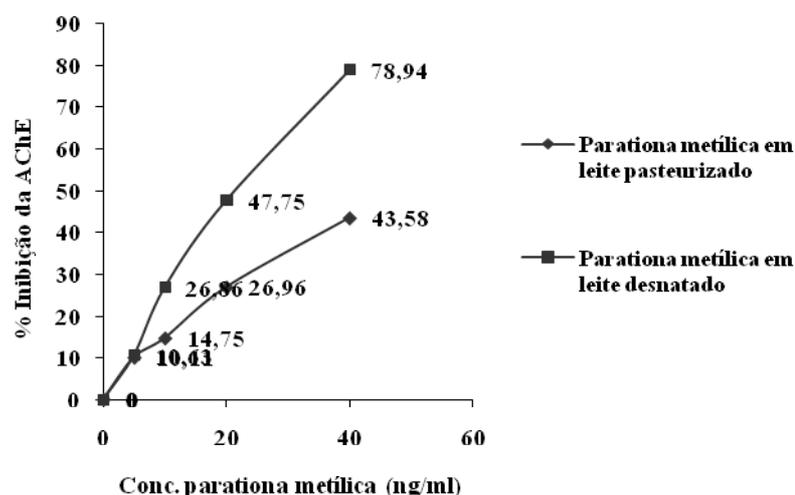
Tabela 2: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pela parationa metílica em leite desnatado e leite pasteurizado (primeiro método)

<i>Conc. parationa metílica (ng/ml)</i>	<i>% inibição da AChE em leite pasteurizado</i>	<i>% inibição da AChE em leite desnatado</i>	<i>log conc.</i>	<i>log conc. (calculado) pasteurizado</i>	<i>log conc. (calculado) desnatado</i>	<i>Conc. calculada (Pasteurizado) (ng/ml)</i>	<i>Conc. calculada (Desnatado) (ng/ml)</i>
0	0	0					
5	10,11	10,63	0,7	0,74	0,70	5,5	5,0
10	14,75	26,86	1,0	0,93	0,99	8,5	9,9
20	26,96	47,75	1,3	1,32	1,30	20,7	19,8
40	43,58	78,94	1,6	1,55	1,58	35,8	38,3
		50			1,32		21,0

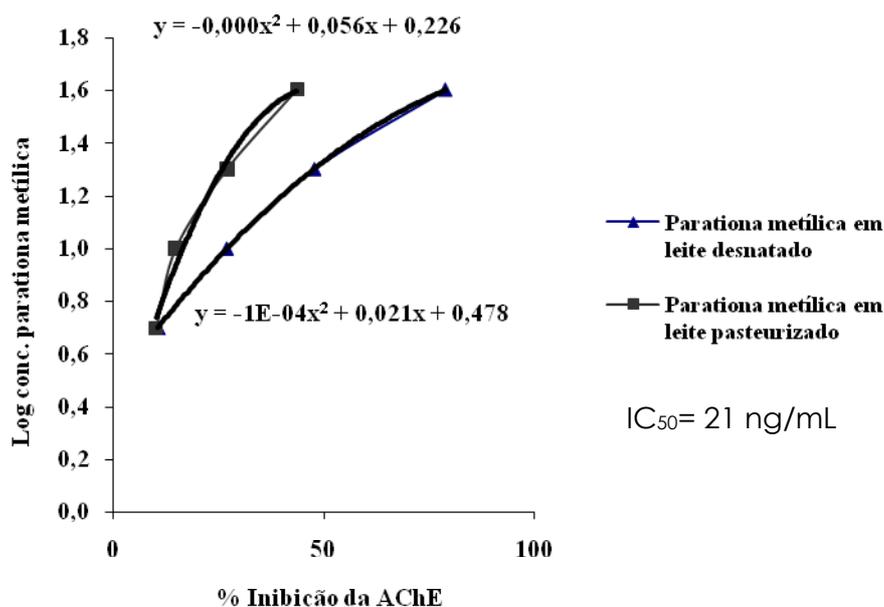
Primeiro método → acetato de etila/ n-hexano/ acetonitrila

A análise enzimática resulta numa curva cinética que para verificarmos o desempenho da análise e do método é necessário plotar os dados num gráfico semi-log para obtermos a equação da curva de tendência (figuras 6B e 7B) e a partir desses dados calcular a concentração real das amostras brancas fortificadas (tabelas 2 e 3), a recuperação (tabela 4) e a IC₅₀ (figuras 6B e 7B).

Comparando as tabelas 2 e 3 podemos verificar que na extração pelo primeiro método, a parationa metílica mostrou-se um inibidor mais potente da AChE que o clorpirifós, alcançando patamares mais altos de inibição. Dessa forma, procedemos a modificações deste método para que melhorássemos o desempenho do clorpirifós. O OF clorpirifós é o agrotóxico de interesse desse trabalho por apresentar LMR permitido para o leite e quando analisado por esse método o LOD foi igual ao LMR, impossibilitando a utilização desse procedimento.



A



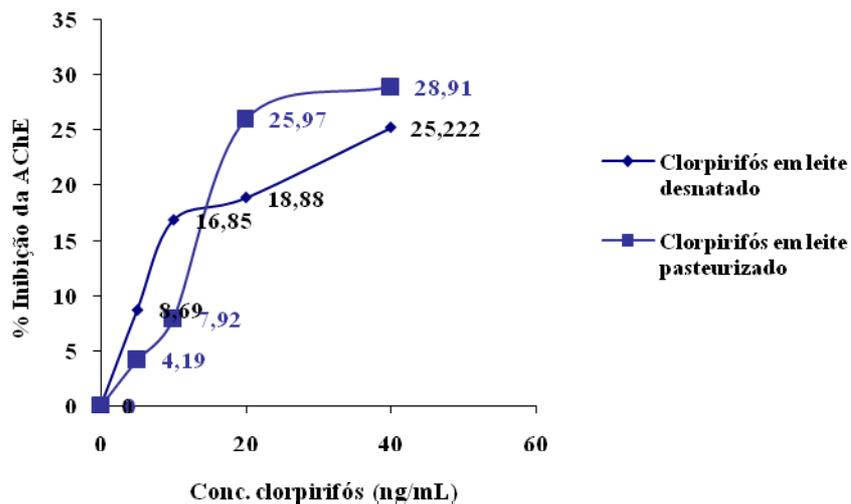
B

Figura 6: Curva de inibição da AChE por parationa metílica em leite pasteurizado e leite desnatado (primeiro método)- Amostras de leite desnatado (SKIM MILK®) e leite pasteurizado fortificadas com parationa metílica submetidas a etapa de extração (primeiro método→ acetato de etila/ n-hexano/ acetonitrila) avaliadas quanto a inibição da atividade da AChE pelo método espectrofotométrico. As concentrações do pesticida indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações no início da fortificação. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos. O gráfico B representa a determinação do IC₅₀ calculado a partir dos dados experimentais e que para parationa metílica no leite desnatado foi de 21 ng/ml. Quanto ao leite pasteurizado, não foi calculado o IC₅₀, porque não foi alcançada 50% de inibição nessa faixa de concentração.

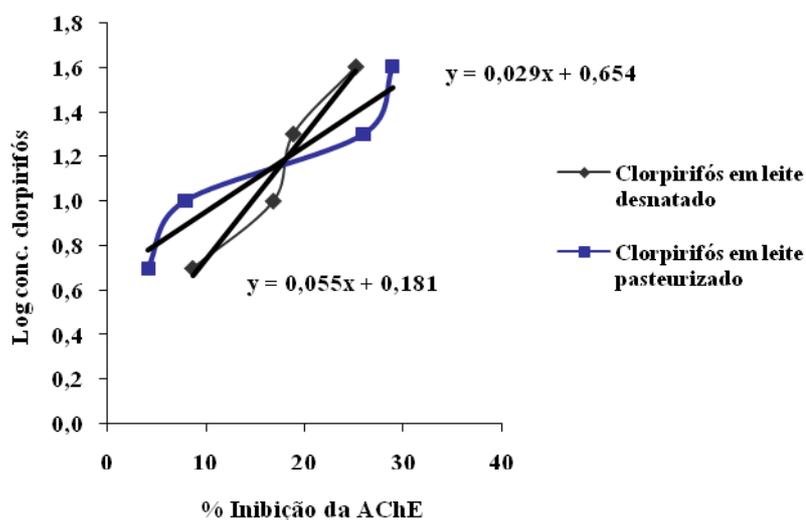
Tabela 3: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós em leite desnatado e leite pasteurizado (primeiro método)

<i>Conc. clorpirifós (ng/ml)</i>	<i>% inibição da AChE em leite desnatado</i>	<i>% inibição da AChE em leite pasteurizado</i>	<i>log conc.</i>	<i>log conc. (calculada) leite desnatado</i>	<i>log conc. (calculada) leite pasteurizado</i>	<i>Conc. calculada leite desnatado (ng/ml)</i>	<i>Conc. calculada leite pasteurizado (ng/ml)</i>
0	0	0					
5	8,69	4,19	0,7	0,7	0,8	4,6	6,0
10	16,85	7,92	1,0	1,1	0,9	13,2	7,7
20	18,88	25,97	1,3	1,2	1,4	17,1	26,5
40	25,22	28,91	1,6	1,6	1,5	38,5	32,4

Primeiro método→ acetato de etila/ n-hexano/ acetonitrila



A



B

Figura 7: Curva de inibição da AChE por clorpirifós em leite desnatado e pasteurizado (primeiro método) - Amostras de leite desnatado (SKIM MILK®) e leite pasteurizado fortificadas com clorpirifós submetidas à etapa de extração (primeiro método→ acetato de etila/ n-hexano/ acetonitrila) e foram avaliadas quanto a inibição da atividade da AChE pelo método colorimétrico. As concentrações do pesticida indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações no início da fortificação. Cada ponto representa a média de 3 a 5 experimentos. O gráfico B representa a determinação do IC₅₀ a partir desses dados experimentais, que não foi realizada porque não foi alcançada 50% de inibição nessa faixa de concentração.

Na tabela 4 são apresentados os parâmetros estatísticos de recuperação e coeficiente de variação calculados para leite desnatado e pasteurizado integral para o emprego do primeiro método.

Tabela 4: Recuperação e coeficiente de variação calculados para leite desnatado e pasteurizado integral para o primeiro método

<i>Agrotóxico</i>	<i>Concentração de fortificação (ng/ml)</i>	<i>Recuperação (%) em leite desnatado</i>	<i>Recuperação (%) em leite pasteurizado</i>	<i>CV (%) em leite pasteurizado</i>
Parationa metílica (n=5)	5	100	110	3,76
	10	99	85	4,4
	20	99	103,5	3,32
	40	95,75	89,5	11,48
Clorpirifós	5 (n=5)	92	120	4,55
	10 (n=5)	132	77	5,07
	20 (n=4)	85,5	132,5	16,76
	40 (n=4)	96,25	81	16,69

Primeiro método → acetato de etila/ n-hexano/ acetonitrila

O estudo da exatidão determinada através da comparação dos resultados experimentais com o valor já conhecido (recuperação), deve segundo o documento do DG SANCO (2007), na validação, demonstrar que o método é capaz de recuperar de 70 a 120% do valor esperado com desvio padrão relativo ou coeficiente de variação $\leq 20\%$. Na tabela 4 estão apresentados os valores de recuperação e os respectivos desvios padrão para quatro níveis de concentração para os dois agrotóxicos analisados nesse trabalho. Para as recuperações calculadas através da curva no leite desnatado e na matriz (leite integral) pode-se observar que para a substância clorpirifós obteve-se valores superiores aos 120% recomendados pelo documento do DG SANCO (2007), principalmente nas concentrações próximas ao LMR, o que indica que esse primeiro método de extração não apresentou exatidão e nem sensibilidade suficientes para a análise desejada.

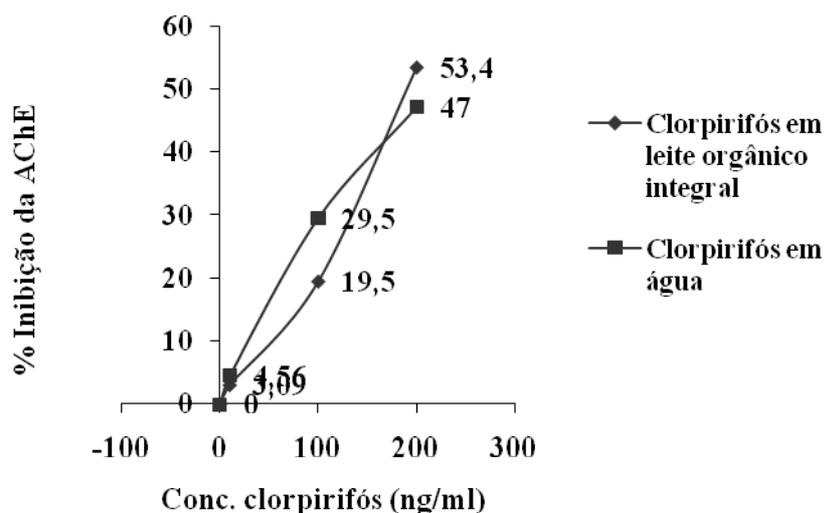
Utilizando o segundo método de extração comparou-se os resultados obtidos para água, leite pasteurizado e orgânico quando fortificadas com clorpirifós, Neste caso, a

inibição da enzima AChE no nível de 10 ng/ml não foi eficiente para quantificar o teor de clorpirifós nem no leite orgânico e nem na água, que apresentaram valores de 3,1 e 4,6% (Tabela 5 e figuras 8A e 8B), respectivamente. A determinação de parationa metílica também não foi eficiente, com uma inibição de 3,34% (Figura 9A e 9B).

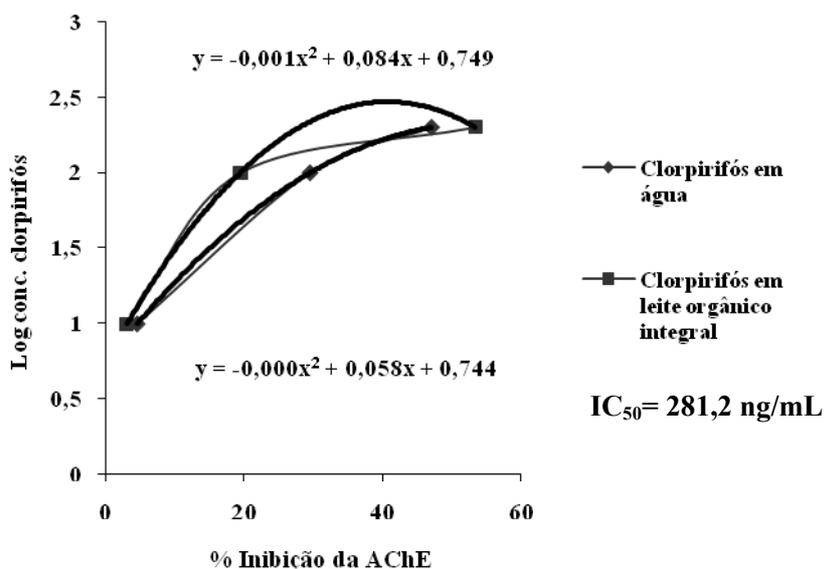
Tabela 5: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós em água e leite orgânico integral (segundo método)

<i>Conc. clorpirifós (ng/ml)</i>	<i>% Inibição da AChE em água</i>	<i>% Inibição da AChE em leite orgânico integral</i>	<i>log conc.</i>	<i>log conc. calculada água</i>	<i>log conc. Calculada leite orgânico</i>	<i>Conc. calculada água (ng/ml)</i>	<i>Conc. calculada leite orgânico (ng/ml)</i>
0	0	0					
10	4,56	3,09	1	1,1	1,0	11,5	10,0
100	29,5	19,5	2	1,8	2,0	68,5	101,6
200	47	53,4	2,3	2,4	2,4	238,8	241,6
		50			2,4		281,2

Segundo método → acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetonitrila



A



B

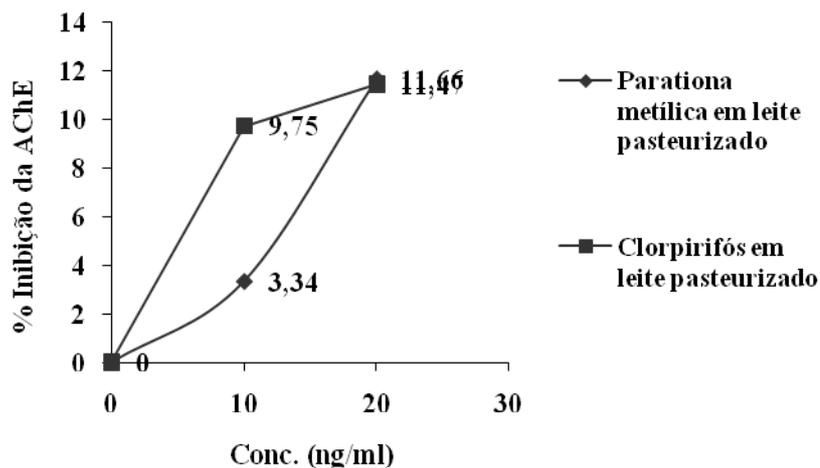
Figura 8: Curva de inibição da enzima AChE por clorpirifós em água e leite orgânico integral (segundo método) - Amostras de leite orgânico e água fortificadas com clorpirifós submetidas a etapa de extração pelo segundo método (acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetonitrila), foram avaliadas quanto a inibição da atividade da AChE pelo método espectrofotométrico. As concentrações do pesticida indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações no início da fortificação. Cada ponto representa a média de 3 a 5 experimentos. O gráfico B representa a determinação do IC_{50} calculado a partir desses dados experimentais e que para clorpirifós no leite orgânico integral foi de 281,2 ng/ml. Quanto à água, não foi calculado o IC_{50} , porque não foi alcançada 50% de inibição nessa faixa de concentração.

O segundo método de extração do clorpirifós para o leite pasteurizado apresentou uma inibição da enzima AChE, no nível de 10 ng/ml, de 9,75%, cujo resultado é apresentado na tabela 6 e figuras 9A e 9B. Por outro lado a parationa metílica na mesma matriz apresentou valores muito baixos de inibição da AChE nas concentrações analisadas, próximas ao LMR do clorpirifós.

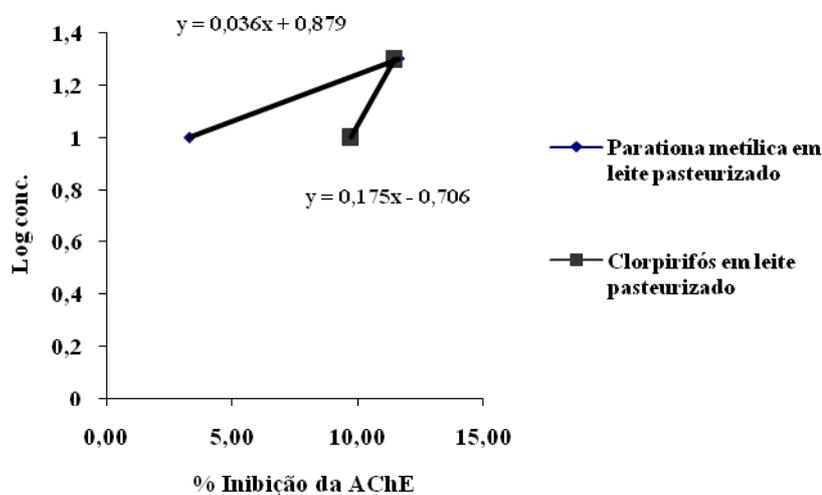
Tabela 6: Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por clorpirifós e parationa metílica em leite pasteurizado (segundo método)

	<i>Conc. (ng/ml) em leite pasteurizado</i>	<i>% Inibição da AChE em leite pasteurizado</i>	<i>Log conc.</i>	<i>Log conc. calculada leite pasteurizado</i>	<i>Conc. calculada leite pasteurizado (ng/ml)</i>
Clorpirifós	0	0			
	10	9,75	1	1	10
	20	11,47	1,3	1,3	20
Parationa metílica	0	0			
	10	3,34	1	1	10
	20	11,66	1,3	1,3	20

Segundo método→ acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetonitrila



A



B

Figura 9: Curva de inibição da AChE por clorpirifós e parationa metílica em leite pasteurizado (segundo método) - Amostras de leite pasteurizado fortificadas com clorpirifós e parationa metílica submetidas a etapa de extração pelo segundo método (acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetonitrila), foram avaliadas quanto a inibição da atividade da AChE pelo método colorimétrico. As concentrações do pesticida indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações no início da fortificação. Cada ponto representa a média de 3 experimentos. O gráfico B representa a determinação do IC₅₀ a partir desses dados experimentais, que não foi realizada porque não foi alcançada 50% de inibição nessa faixa de concentração.

Na tabela 7 são apresentados os parâmetros estatísticos de recuperação e coeficiente de variação calculados para água, leite orgânico e pasteurizado integral para o segundo método de extração.

Tabela 7: Recuperação e coeficiente de variação calculados para água, leite orgânico e pasteurizado integral para o segundo método

<i>Agrotóxico</i>	<i>Concentração de fortificação (ng/ml)</i>	<i>Recuperação (%) em água</i>	<i>Recuperação (%) em leite orgânico integral</i>	<i>Recuperação (%) em leite pasteurizado</i>	<i>CV(%) em leite pasteurizado</i>	<i>CV(%) em leite orgânico integral</i>
Clorpirifós	10	115,4	99,8	100,1	4,7	20
	20	x	x	100,1	2,8	x
	100	68,5	101,6	x	x	26,2
	200	119,4	120,8	x	x	13,9
Parationa metílica	10			100	7,9	
	20			100,1	1,5	

Segundo método→ acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetonitrila

Observando-se as recuperações calculadas para os dois agrotóxicos analisados em leite orgânico usando o segundo método de extração, verifica-se que este método apresentou valores de recuperação superiores a 120% para clorpirifós num nível de concentração bem maior que o LMR, o que demonstra que o método não atende também ao indicador de desempenho: sensibilidade.

Acrescentou-se então uma etapa de limpeza ao segundo método de extração que garantiu maior inibição da enzima como pode ser verificado na tabela 8 e nas figuras 10A e 10B. Esta etapa consiste na precipitação da proteína do leite através da adição de acetonitrila ao mesmo na primeira etapa e da adição de 8g de sulfato de sódio anidro à solução final de acetonitrila seguida de agitação, filtração em papel de filtro qualitativo e evaporação do filtrado até a secura, resultantes da mescla de três métodos de extração (BEAM & HANKINSON, 1964; SALAS *et al*, 2003; PAGLIUCA *et al*, 2005) com adaptações das quantidades de reagentes e amostras.

Tabela 8: Percentagem de inibição da enzima AChE pela parationa metílica e clorpirifós em leite orgânico integral (terceiro método)

<i>Conc. (ng/ml)</i>	<i>% inibição da AChE por parationa metílica em leite orgânico</i>	<i>% inibição da AChE por clorpirifós em leite orgânico</i>	<i>log conc.</i>	<i>log conc. (calculado) parationa metílica</i>	<i>log conc. (calculado) clorpirifós</i>	<i>Conc. Calculada (Parationa metílica)</i>	<i>Conc. calculada (clorpirifós)</i>
0	0	0					
5	30,4	24,5	0,7	0,8	1,0	5,6	9,0
10	56,2	27,7	1,0	1,1	1,0	13,9	10,2
25	x	59,2	1,4	x	1,4	x	26,5
50	x	75,6	1,7	x	1,6	x	36,5
100	97,1	88	2,0	2,6	1,6	385,8	42,7
200	98,7		2,3	2,7		460,5	

Terceiro método → acetona (desproteinização)/ acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetona.

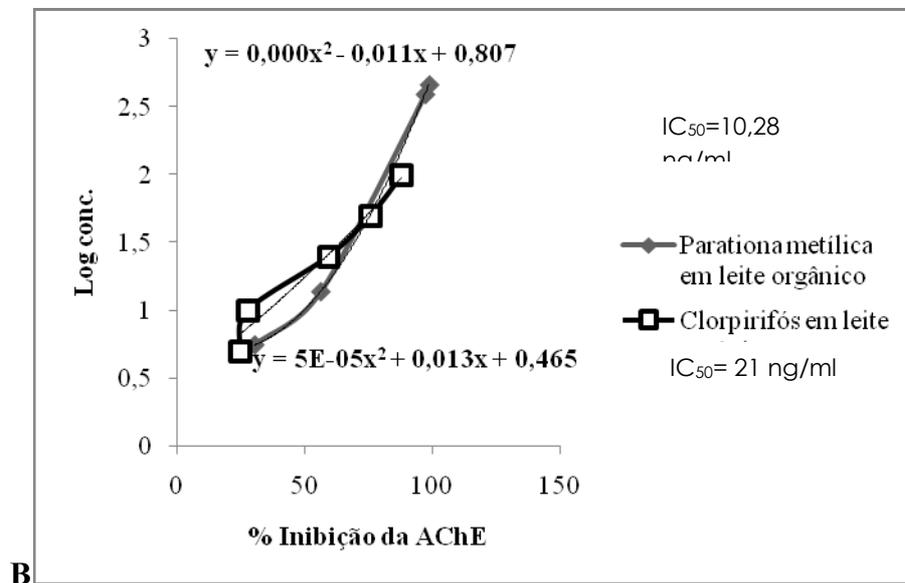
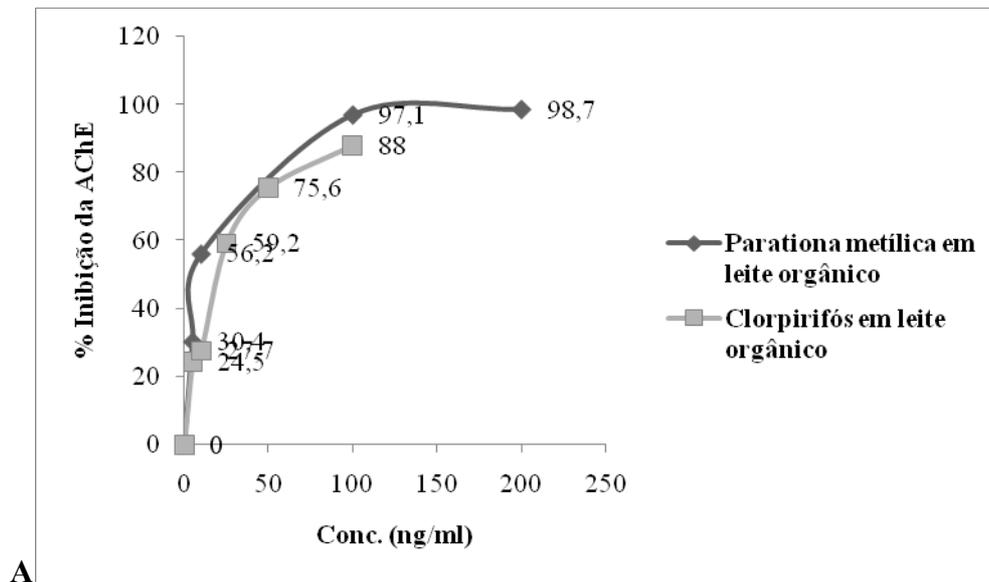


Figura 10: Curva de inibição da AChE por parationa metílica e clorpirifós em leite orgânico (terceiro método) - Amostras de leite orgânico fortificadas com parationa metílica e clorpirifós submetidas a etapa de extração pelo terceiro método (acetoneitrila (desproteínização)/ acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetoneitrila), foram avaliadas quanto a inibição da atividade da AChE pelo método colorimétrico. As concentrações dos pesticidas indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações no início da fortificação. Cada ponto representa a média de 3 experimentos. O gráfico B representa a determinação do IC₅₀ a partir destes dados, que foi 10,3 ng/ml para parationa metílica e 21 ng/ml para clorpirifós.

A tabela 9 apresenta a recuperação e o coeficiente de variação para o teor de clorpirifós determinado em leite orgânico integral utilizando o método de extração com a etapa de desproteínização do leite (acetoneitrila) e adição de sulfato de sódio anidro para retirada da água.

Tabela 9: Recuperação e coeficiente de variação calculados para leite orgânico integral para o terceiro método

<i>Agrotóxico</i>	<i>Concentração de Fortificação (ng/ml)</i>	<i>Recuperação (%) em leite orgânico</i>	<i>CV (%) em leite orgânico</i>
Parationa metílica (n=3)	5	112,2	8,1
	10	261,7	29,7
	100	384,5	25
	200	230,7	95,6
Clorpirifós (n=3)	5	127,7	4,5
	10	73,1	2,8
	25	109,4	5,1
	50	108,5	8,2
	100	91,4	19,3

Terceiro método → acetoneitrila (desproteínização)/ acetato de etila/ sulfato de sódio anidro/ n-hexano/ acetoneitrila

Observando-se as recuperações calculadas para parationa metílica e clorpirifós analisados pelo terceiro método de extração em leite orgânico, verifica-se que para o clorpirifós obteve-se valores de recuperação superiores aos 120% recomendado pelo documento do DG SANCO (2007) apenas para uma faixa de concentração (5 ng/ml), mas como a concentração 5 ng/ml está abaixo do LMR, o método demonstrou ser preciso, exato e adequado ao uso (Tabela 9). Diferentemente da parationa metílica, onde obteve-se valores de recuperação superiores aos 120% recomendado pelo documento do DG SANCO (2007) nas três faixas de concentração, bem como o CV > 20 %, o que demonstra que para a parationa metílica, o método foi pouco preciso e exato, embora tenha apresentado o indicador de desempenho, sensibilidade, apropriado.

Através da cromatografia gasosa, somente foi detectado clorpirifós no leite na concentração inicial de 10 ng/ml, o que corresponde a uma concentração na solução final entre 300 a 1100 ng/ml, ou seja, dentro da faixa de calibração utilizada no método cromatográfico desenvolvido e validado pelo Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Departamento de Química do INCQS (Figuras 11 e 12).

Durante o processo de extração, o analito adicionado antes da extração é concentrado 40 vezes, propiciando uma dosagem enzimática e análise cromatográfica eficientes.

Nesta técnica, seja qual for o agrotóxico inibidor presente na amostra de leite, o resultado será expresso em “equivalentes” (ng/ml) de clorpirifós, que foi escolhido como organofosforado de referência devido ao seu desempenho nessa matriz, o que atende à legislação brasileira, que definiu LMR para esse OF no leite bovino. Para análise de amostras de leite será necessário construir uma curva padrão de inibição por clorpirifós, plotando os valores de inibição da AChE das amostras desconhecidas nesta curva e comparando-os, as amostras que apresentarem resultados positivos (concentração igual ou maior que o LMR) serão encaminhadas para confirmação por análise cromatográfica.

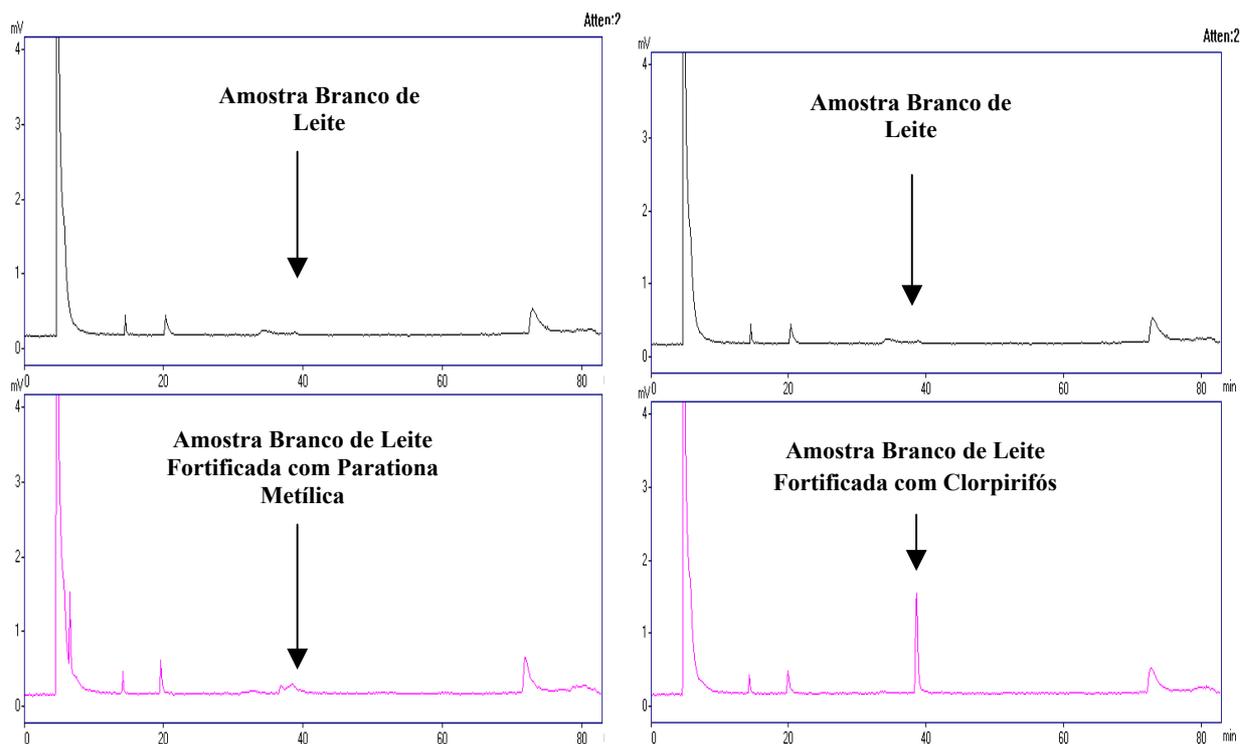


Figura 11: Sobreposição dos cromatogramas da amostra branco de leite e amostra branco de leite fortificada com parationa metilica e clorpirifós a 10 ng/ml.

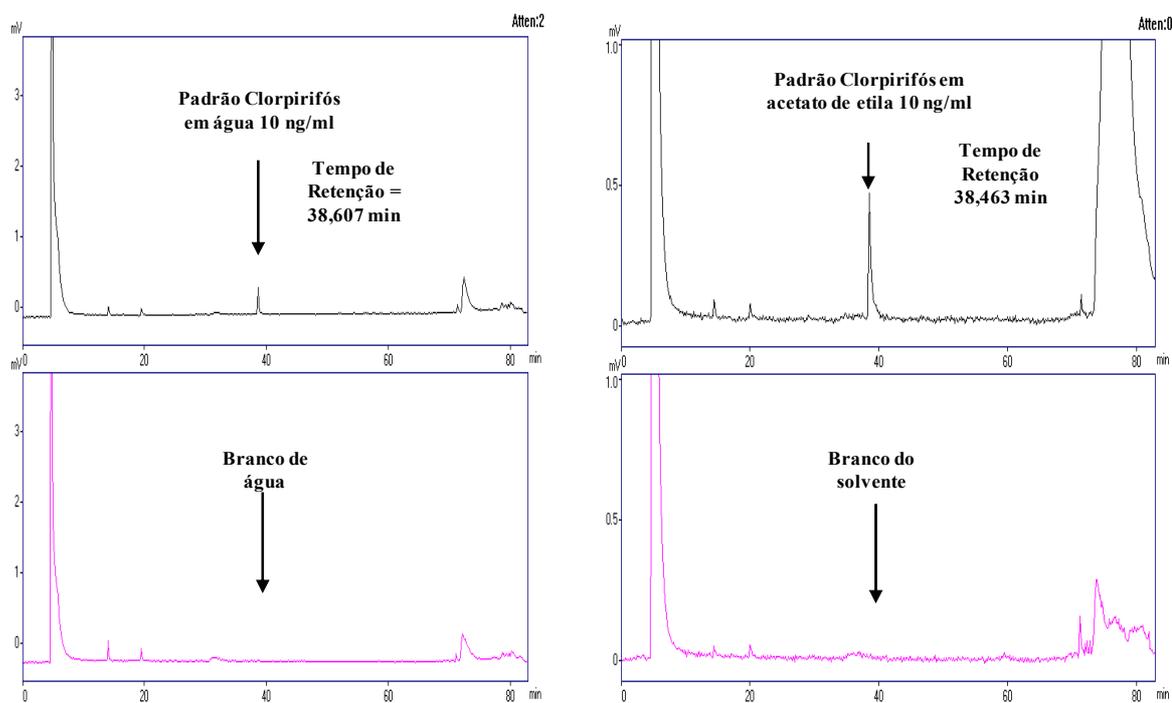


Figura 12: Sobreposição dos cromatogramas de branco de água e branco de solvente fortificados com clorpirifós a 10 ng/ml.

Na busca de biomarcadores para serem usados como indicadores de contaminação ambiental, além das contaminações ocupacional e alimentar, a atividade da enzima AChE é considerada como um dos mais antigos biomarcadores de contaminação aquática em peixes (KLENZ & ASSIS, 2005). Os agrotóxicos OFs e carbamatos são compostos conhecidamente anticolinesterásicos. Outras classes de agrotóxicos como o organoclorado endossulfano (KLENZ & ASSIS, 2005; SALVO *et al*, 2008) e o piretróide deltametrina (NICARETA, 2004). também foram avaliados quanto a essa característica. Mas, nesses trabalhos não foram encontradas diferenças significativas de inibição da AChE por tais agrotóxicos, corroborando a especificidade da enzima AChE em relação aos OFs e carbamatos.

A vantagem do uso de métodos de triagem em programas de monitoramento de contaminantes químicos no leite já foi demonstrado no trabalho realizado pelo INCQS e a VISA municipal do Rio de Janeiro, em que foi avaliada a presença de resíduos de antibióticos (betalactâmicos, tetraciclinas e estreptomicina) em 57 amostras de leite pasteurizado e em 37 foram detectadas a presença de antibióticos diversos. Os resultados deste trabalho demonstram a necessidade da implementação de um programa de monitoramento, pelo menos no âmbito estadual, de controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal nas diferentes formas de apresentação do leite bovino (pasteurizado, UHT e em pó) Este trabalho foi relatado por Jesus- Morais *et al* em 2009.

Nesse trabalho, o principal objetivo foi verificar a viabilidade da utilização da atividade da AChE como biomarcador em programas de monitoramento da qualidade do leite bovino, já que essa técnica enzimática foi desenvolvida somente para alimentos não gordurosos. Para isso foi fundamental padronizar métodos de análise para extração e detecção de OFs dessa matriz.

O *kit* de inibição enzimática demonstrou ser apropriado para utilização em programas de monitoramento de leite quanto à presença de agrotóxicos OFs, permitindo a avaliação de grande número de amostras. Esse *kit* também pode ser utilizado como ferramenta para normatização dos limites de tolerância dos resíduos de agrotóxicos desse grupo químico para o leite bovino pelo fato que a Instrução Normativa 51 (IN 51) não regulamenta essa classe de substâncias, referindo-se apenas à análises físico-químicas,

microbiológicas, CCS e de resíduos de antibióticos com enfoque nas perdas industriais (CARVALHO FILHO, 2007).

O terceiro método de extração melhorou as condições de dosagem do clorpirifós, mas não da parationa metílica. Considerando que o clorpirifós tem LMR estabelecido para leite definido na legislação brasileira (ANVISA, 2008) e que, em monitoramento anterior Rangel (2006), ao analisar vinte amostras de leite “longa vida”, detectou resíduos do OF clorpirifós etil em 75% das amostras, propomos esse tipo de extração para análise de leite pelo método enzimático, podendo o resultado ser expresso em equivalentes de clorpirifós.

5 Conclusões

- O método para extração e detecção proposto apresentou eficiência e sensibilidade adequadas para o monitoramento de resíduos do organofosforado clorpirifós no leite bovino;
- A utilização da atividade da AChE como biomarcador de organofosforados em alimentos, é apropriada quanto à seletividade, já que outras classes de agrotóxicos, como organoclorados e piretróides, não são capazes de inibir, significativamente, a atividade da enzima AChE;
- O limite de detecção (LOD) do método enzimático foi de 5 ng/ml de clorpirifós etil, demonstrando que esse *kit* é sensível por ter LOD abaixo do LMR de 10 ng/ml da legislação brasileira;
- Os valores de recuperação e do CV calculados para o clorpirifós estão de acordo com o estabelecido pelo documento DG SANCO, demonstrando a adequação do método a sua finalidade;
- O método de análise desenvolvido e validado neste trabalho se mostrou em concordância com o estabelecido pela organização internacional AOAC, o guia EURACHEM e a norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025, para as análises qualitativas do agrotóxico organofosforado clorpirifós nos diferentes tipos de leite.
- Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram a eficácia do método desenvolvido e são satisfatórios para as atividades do laboratório, já que é um método rápido, sensível e eficiente.

6 Referências bibliográficas

ABAD, A. & MONTOYA, A. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1818-1823, 1994.

ABAD, A., MORENO, M. J., PELEGRÍ, R., MARTÍNEZ, M. I., SÁEZ, A., GAMÓN, M., MONTOYA, A. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: an analytical comparison. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 3-12, 1999.

ABLV- Associação Brasileira de Leite Longa Vida. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/index>>. Acesso em: 26 jun. 2008.

ABNT-NBR ISO/IEC 17025: 2005(E). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Genebra, second edition 2005-05-15.

AHMED, H. F. Monitoring methyl parathion residues in milk and yogurt, and fate of [¹⁴C] methyl parathion during milk processing. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, p. 207-214, 2000.

ALVES, D. R. Industrialização e comercialização do leite de consumo no Brasil- A formação do setor industrial de leite. In: MEIRELES, A. J. & ALVES, D. R. **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 262p, 2001. Disponível em: www.terra.com.br/estudos/estudo_8.html. Acesso em: 28 jul. 2008.

ANDREESCU, S., MARTY, J. L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomol. Engineering**, v.23, p. 1-15, 2006.

ANKLAM, E., HEINZE, P., KAY, S., VAN DEN EEDE, G. Validation studies and proficiency testing. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 85, n. 3, p. 809-815, 2002.

ANVISA a- Critérios para a classificação toxicológica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/manual/anexo_03.htm>. Acesso em 23 jun. 2008.

ANVISA b- Missão da ANVISA. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/Institucional/anvisa/apresentacao.htm>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

ANVISA a- Monografias de produtos agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>> Acesso em: 09 jul. 2009.

ANVISA b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm>. Acesso em: 27 mar. 2009.

AOAC. Performance TestedSM Methods. Disponível em <<http://www.aoac.org/testkits/perftestedmtd.html>>. Acesso em: 12 jul. 2007.

BEAM, J. E. e HANKINSON, D. J. Application of the acetylcholinesterase inhibition method for detecting organophosphate residues and related compounds in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 12, p. 1297-1305, 1964.

BÍBLIA SAGRADA- Edição Pastoral© Paulus, 2005, 1360 p.

BOLLES, H. G. *et al.* U.S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. **Journal of Agriculture of Food Chemistry**, v. 47, p. 1817-1822, 1999.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 1283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 19 de dezembro de 1950. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 12 de julho de 1989. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/php/home.php>>. Acesso em: 16 jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 20 de setembro de 2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 22 de dezembro de 1999. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde - Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 09/12/1991", publicadas no D.O.U. em 13/12/91. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 30 691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 07 de jul. 1952. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 11 jul. 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 08 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 07 jul. 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 98062, de 17 de agosto de 1989. Dispõe sobre a regulamentação da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que trata de agrotóxicos e afins, e dá outras providências. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 18 de agosto de 1989. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 07 jul. 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 98816, de 11 de janeiro de 1990. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 12 de janeiro de 1990. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 07 jul. 2008.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 7889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal e dá outras providências. Publicado D.O.U. - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 24 de novembro de 1989. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

BRITO, L. G. Carrapatograma: um aliado do produtor na exploração leiteira. In: **Portal do Agronegócio**, 2007, EMBRAPA Rondônia. Disponível em: <

<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23487>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

BURONFOSSE, T., BURONFOSSE, F.. Intoxications des carnivores domestiques par les inhibiteurs des Cholinestérasés. **Recueil de Médecine Vétérinaire Spécial Toxicologie des carnivores domestiques**, p. 135-141, 1995.

C QUALI LEITE. **Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade do Leite**. Disponível em: <<http://www.leite.cquali.gov.br/data/Pages/MJ387A323DPTBRIE.htm>>. Acesso em: 19 jun. 2008.

CALODW, M., STEAD, S. L., DAY, J., SHARMAN, M., SITU, C., ELLIOT, C. Development and validation of an optical SPR biosensor assay for Tylosin residues in honey. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7367-7370, 2005.

CARDEAL, Z. L. & PAES. C. M. D. Analysis of organophosphorus pesticides in whole milk by solid phase microextraction gas chromatography method. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 41, p. 369-375, 2006.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**, 1ªed., Edições Melhoramentos, São Paulo, 305p, 1969.

CARVALHO Fº, O. M. de. Algumas razões para produzir e consumir (ou não) orgânicos: leite e derivados. Disponível em: < http://www.milkpoint.com.br/algumas-razoes-para-produzir-e-consumir-ou-nao-organicos-leite-e-derivados_noticia_33792_50_128_.aspx>. Acesso em: 09 ago. 2009.

CARVALHO Fº, O. M. de. Qualidade do leite: uma questão de quantidade. **Rumos e Debates**, Petrolina 2001. Disponível em: <<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/a4384d023606f59c03256c25006826e3?OpenDocument>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

CASARRET, L. J., DOULL, J. Toxicology. In: M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klaassen (Eds), **The Basic Science of Poisons**, 4ª ed., Pergamon Press Inc., New York, 1992.

CASTRO-FARIA, M. V. Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos. In PERES, F. & MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio?** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.

CHO, Y. A. *et al.* Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of immunoassays for fenitrothion. **Analytica Chimica Acta**, v. 62, p. 215-222, 2004.

COMUNIDADE EUROPÉIA. *Council Directive 96/23/EC*, de 12 de agosto de 2002. Dispõe sobre o desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados. **Official Journal of the European Communities**, L221/23, 2002.

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

CTENAS, M. L. B. A Medicina Antiga e o Leite. In: **A vitória do leite, da fragilidade à permanência**. C2 Editora, 2000, 175p. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/medicinaleite.htm>> e <<http://www.pratiquedoleite.com.br/content.php?recid=2976&type=A>>. Acesso em: 29 mai. 2008.

_____. Leite e Religião. In: **A vitória do leite, da fragilidade à permanência**. C2 Editora, 2000, 175p. Disponível em: <<http://www.pratiquedoleite.com.br/content.php?recid=2943&type=A>>. Acesso em: 29 mai.2008.

CUNHA BASTOS, V. L. F., BASTOS, J. C., LIMA, J. S., CASTRO FARIA, M. V. Brain acetylcholinesterase as an *in vitro* detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. **Water Research**, v. 25, n. 7, p. 835-840, 1991.

CUNHA, P. Gastronomia: história do leite condensado. **Revista Onde Comer**, 2005. Disponível em: <<http://www.outravisao.com.br/leite.html>>. Acesso em: 24 Jun. 2008.

DDT. WIKIPÉDIA- a enciclopedia livre. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/DDT>>. Acesso em: 11 jun. 2008.

DETERMINAÇÃO de resíduos de agrotóxicos em alimentos por CG/DCE. Rev. 05. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Seção 10. 19p. (65.3120.081).

DG-SANCO, European Commission. **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Doc. SANCO/2007/3131.** Supersedes doc. SANCO/10232/2006. 31 outubro 2007. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/publications_en.htm>. Acesso em: 18 jun. 2009.

DIAS, J. C. **500 anos de leite no Brasil.** São Paulo: Calandra Editorial, 2006, 147 p.

ELLISON, S. L. R., FEARN, T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 468-476, 2005.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. JR., FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics.** LGC, Teddington, Middlesex, UK: 1998. 46 p.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 25-38, 2007.

FAUSTINO, M. A. G. Controle do carrapato na Bovinocultura de leite. In: XII Seminário Nordeste de Pecuária, 2008, Fortaleza. Disponível em: <<http://www.pecnordeste.com.br/pec2008/pdf/bov/MariaAparecidaGloriaFaustino.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

FONSECA, L. F. L. & SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite.** Lemos Editorial, São Paulo, 175 p., 2000.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

Há 50 anos. **Jornal O Globo**, Rio de Janeiro, 7 jun. 2008, , Segundo Caderno, p. 11.

HE, F. Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. **Toxicol. Lett.**, v. 108, p. 277-283, 1999.

HECK, M. C., SANTOS, J. S., BOGUSZ JR, S., COSTABEBER, I., EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v. 102, p. 288-294, 2007.

HENAO, S. H., COREY, G. O. **Serie Vigilancia 2- Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos-** Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud; Organization Mundial de la Salud; Organización Panamericana de la Salud- México- 1986, 194p.

HENNION, M. C., BARCELÓ, D. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 12, p. 3-34, 1998.

HILL, A. R. C. & REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

HISTÓRIA DO BRASIL REPÚBLICA. Disponível em: <<http://www.historiadorbrasil.net/republica>>. Acesso em: 23 jun. 2008.

HISTÓRIA DOS AGROTÓXICOS. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/agrothist1.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2008.

IBGE – **Produção animal no primeiro trimestre de 2009**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/a-bate-leite-couro-ovos_200901comentarios.pdf. Acesso em: 07 jul. 2009.

_____ - **País evolui mais nos indicadores econômicos e sociais do que nos ambientais**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1156>. Acesso em: 07 jul. 2009.

JANK, M. S.; FARINA, E. M. Q.; GALAN, V. B. **O agribusiness do leite no Brasil**. São Paulo: Editora Milkbizz, 1999, 108p.

JESUS-MORAIS, C. M. Q. *et al.* Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no prelo, 2009.

KAUFMAN, B. M.; CLOWER JR, M. Immunoassays of pesticide: an update. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 78, n. 4, p. 1079-1090, 1995.

KIM, M. J. *et al.* Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of enzyme-linked immunosorbent assays for parathion-methyl. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, p. 47-62, 2003.

KLENZ, C.; ASSIS, H. C. S. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de Cascudo (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). **Revista Acadêmica**, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.

LARINI, L. **Toxicologia**, Ed. Manole, 2^a ed., 1993.

LEE, H. S. *et al.* Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. **Chemosphere**, v. 46, n. 4, p. 571-576, 2002.

LEHOTAY, S. J.; MILLER, R. W. Evaluation of Commercial Immunoassays for the Detection of Alachlor in Milk, Eggs and Liver. **Journal of Environmental Science and Health B**, v.29, n.3, p. 395-414, 1994.

LEITE, Z. T. C. *et al.* Leite e alguns de seus derivados- Da Antiguidade à Atualidade. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 876-880, 2006.

LOURENÇO, E. L. B. Q

MANCLÚS, J. J.; MONTOYA, A. Development of immunoassays for the analysis of chlorpyrifos and its major metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the aquatic environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, p. 341-348, 1995.

MENDES, M. C.; SILVA, M. X.; BRACCO, J. E. Teste bioquímico para determinar a resistência de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 61-65, 2001.

MILANO, S. Aprendendo com a Primavera Silenciosa. **Revista Secretários de Saúde**, jan./fev. 1997. Disponível em: <http://www.ppv.com.br/?FuseAction=textos.texto2>. Acesso em: 31 jul. 2008.

MORAIS, C. M. Q. J. *et al.* Determinação de agrotóxicos organofosforados em leite bovino através de dosagem enzimática. In: ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 16, 2009, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte. 1 CD.

MOREIRA, J.C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p. 299-311, 2002.

MORENO, M. J.; ABAD, A.; MONTOYA, A. Production of monoclonal antibodies to the *N*-methylcarbamate pesticide propoxur. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 72-79, 2001.

MUCCIO, A. *et al.* Selective, solid-matrix dispersión extraction of organophosphate pesticide residues from milk. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 497-506, 1996.

MUÑOZ-OLIVAS, R. Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 203-216, 2004.

NAGATANI, N. *et al.* Rapid and sensitive visual detection of residual pesticides in food using acetylcholinesterase-based disposable membrane chips. **Food Control** (article in press), 2006.

NERO, L. A. *et al.* Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salminella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 201-204, 2007.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multipinnis***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004, 74p. il. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

NISTOR, C.; EMNÉUS, J. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. **Waste Management**, v. 19, p. 147-170, 1999.

NÓBREGA, Manuel, S. J. Cartas de fins de agosto de 1552. In: LEITE, Serafim, S. J. **Cartas dos primeiros jesuítas do Brasil: 1538- 1553**. Coimbra: Tipografia Atlântida, v. 1, p. 403 (Comissão do IV Centenário da Cidade de São Paulo), 1956.

PAES, T. A peste dos pesticidas. **Jornal eletrônico Cult Link Club**. Disponível em: <www.poemashow.com.br/eZines/LITERATUR%20Pesticidas.htm>. Acesso em 28 jul. 2008.

PAGLIUCA, G. *et al.* Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 340-344. 2006.

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

PANEK, A. D. Química para Poetas: Pão e Vinho: A arte e a ciência da fermentação. **Casa da Ciência/IQ- UFRJ**: Rio de Janeiro, 2001.

PASTEURIZAÇÃO. Disponível em: <<http://www.meusestudos.com/biografias/louis-pasteur.html>> e <<http://www.dec.ufcg.edu.br/biografias/LouPaste.html>>. Acesso em: 01 jun. 2008.

PEDRO, A. I. H.; COBOS, D. Plaguicidas: Neurotoxicidad y Vigilancia de la salud. **Revista del INSHT**, v. 8, p. 4-14, 2000. Disponível em: <http://www.mtas.es/insht/revista/A_08_ST.htm>. Acesso em: 26 jun. 2008.

RANGEL, T. B. A. **Avaliação para a viabilidade de implantação de um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite longa vida**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. 81 p. il. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) –

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

RAZAK, C. N. A. *et al.* Development of an ELISA for detection of parathion, carbofuran, and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in water, soil, vegetables, and fruits. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864, p. 479-484, 1998.

RIBEIRO, A. C. C.; MELLA, E. A. C. Intoxicação ocupacional por organofosforados- a importância da dosagem de colinesterase. **CESUMAR**, v. 9, n. 2, p. 125-134, 2007.

RÍOS, A.; TELLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 509-515, 2005.

ROCHA, C. M. B. M. *et al.* Percepção dos produtores de leite do município de Passos-M.G., sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p. 1235- 1242, 2006.

ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAVIA, P. C.: Quantificação dos microorganismos psicotróficos em leites pasteurizados tipo B e C, comercializados na cidade de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p. 59-68, 2003.

SALAS, J. H. *et al.* Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.15, p. 4468-4471, 2003.

SALVO, L. M. *et al.* Effects of endosulfan sublethal concentrations on carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758): Morphometric, histologic, ultrastructural analyses and cholinesterase activity evaluation. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, n. 2, p. 87- 94, 2008.

SCHULZE, H. *et al.* Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1095- 1105, 2002.

SCORTICHINI, G. *et al.* ELISA qualitative screening of Chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 43-48, 2005.

SERRA, L. M. Sobre o leite. **Revista Nespresso** n.03, 2007. Disponível em: <www.marforum.org/viewtopic.php?p=3012>. Acesso em: 16 jun. 2008.

SILVA, M. C. L.; NEVES- SOBRINHO, R.; LINHARES, G. F. C. Avaliação *in vitro* da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia- Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n.2, p. 143-148, 2000.

SILVA, N. O.; GROOTENBOER, C. S. Avaliação das práticas adotadas na produção de leite para uma fábrica de laicínios situada no Rio de Janeiro. **PUBVET**, v.2, n.9, 2008. <Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=164>>. Acesso em: 15 mai. 2009.

SOUSA, J. P. de; NOGUEIRA, A. R. A.; BRONDI, S. H. G. Desenvolvimento de métodos para análise de resíduos de carrapaticidas em carne bovina. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007, Águas de Lindóia. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1328-1.pdf>>.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10 (sup.), p. 91-100, 2005.

SULTATOS, L. G. Mammalian Toxicology of Organophosphorus Pesticides. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 43, p. 271-289, 1994.

TAVERNIERS, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 480-490, 2004.

TEORIA MALTHUSIANA. Disponível em: <<http://www.frigoletto.com.br/GeoPop/Malthusianismo%20e%20Neomalthusianismo.doc>> . Acesso em: 11 jun.2008.

TOYODA, M. *et al.* Simple analytical method for organophosphorus pesticide residues in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 73, n. 5, p. 770-772, 1990.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**; v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.

VACÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**; v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.

VANIN, J. A. Alquimistas e Químicos. 9^a ed., Editora Moderna: São Paulo, cap. 4, 1996.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

WANG, S. *et al.* Development of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Endosulfan residues in agricultural products. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7377-7384, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (WHO/UNEP). **Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture**, 1990.