

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Escola Nacional
de Saúde Pública
Sérgio Arouca

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA E MEIO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS
DE METABÓLITOS DE AGROTÓXICOS PIRETROIDES
NA POPULAÇÃO ADULTA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO:
CONTRIBUIÇÃO PARA A VIGILÂNCIA EM SAÚDE NO PAÍS**

ANA CRISTINA SIMÕES ROSA

RIO DE JANEIRO

2017

ANA CRISTINA SIMÕES ROSA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS
DE METABÓLITOS DE AGROTÓXICOS PIRETROIDES
NA POPULAÇÃO ADULTA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO:
CONTRIBUIÇÃO PARA A VIGILÂNCIA EM SAÚDE NO PAÍS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, área de concentração Toxicologia Ambiental, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Paula de Novaes Sarcinelli

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert

RIO DE JANEIRO
2017

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS
DE METABÓLITOS DE AGROTÓXICOS PIRETROIDES
NA POPULAÇÃO ADULTA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO:
CONTRIBUIÇÃO PARA A VIGILÂNCIA EM SAÚDE NO PAÍS**

ANA CRISTINA SIMÕES ROSA

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Paula de Novaes Sarcinelli - Orientadora
CESTEH – ENSP - FIOCRUZ

Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert – Coorientador
Departamento de Química - INCQS - FIOCRUZ

Prof. Dr^ª. Bernardete Ferraz Spisso
Departamento de Química - INCQS - FIOCRUZ

Prof. Dr. Armando Meyer
IESC - UFRJ

Prof. Dr^ª. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos
CESTEH – ENSP - FIOCRUZ

Prof. Dr. Josino Costa Moreira
CESTEH – ENSP - FIOCRUZ

Aprovada em 07 de abril de 2017.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

R788a Rosa, Ana Cristina Simões.
Avaliação dos níveis basais de metabólitos de
agrotóxicos piretroides na população adulta da cidade do
Rio de Janeiro: contribuição para a vigilância em saúde no
país / Ana Cristina Simões Rosa. -- 2017.
169 f. : il. color. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientadora: Paula de Novaes Sarcinelli.
Coorientador: André Luís Mazzei Albert.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro,
2017.

1. Agroquímicos. 2. Piretrinas. 3. Urina. 4. Vigilância
em Saúde Pública. 5. Níveis Basais. 6. Inseticidas. I. Título.

CDD – 22.ed. – 632.95098153

Dedico este trabalho à minha família de
origem e à minha família constituída,
fontes de toda razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Jamil que, no céu, certamente está vibrando por este momento.

À minha mãe Ana Maria por estar sempre ao meu lado, me apoiando incondicionalmente, em todos os momentos da minha vida. Sei que você está orgulhosa de mim e esse trabalho é pra você, fruto de toda sua dedicação a nós. Aos meus filhos Mariana e Gabriel por terem aturado tanta ausência de corpo presente, e que agora terão a mãe de volta, “normal”, sem assunto de doutorado. Em especial meu obrigada à Mariana que me ajudou na conferência das numerações de páginas e tabelas.

Ao meu marido André por ser um grande companheiro, me apoiando e às crianças, pra que eu pudesse concluir o trabalho, meu eterno muito obrigada. Esse trabalho é pra nossa família.

Ao meu irmão Julio por ser meu amigo, companheiro de trabalho, e padrinho, que livrou meu filho do trauma de ser o último a ser pego na creche todo dia no último ano. À minha cunhada Helen por toda ajuda, carinho e apoio nesses últimos tempos.

À minha madrinha Celia, pelo apoio e carinho incondicionais desde sempre, e não seria diferente nessa fase de sufoco.

Ao meu padrinho João, tia Nelisa, Danielly, Cynthia, minha afilhada Gabriela, pelo apoio e carinho durante todos esses anos, torcendo pra que essa conclusão chegasse.

Aos meus sogros Vera e Américo por toda ajuda, atenção e apoio às crianças e a mim, sempre nas horas em que mais precisei, sem vocês por perto tudo seria muito mais difícil. Obrigada por me tratarem como filha!

Aos meus cunhados Meco e Evelyn pelo carinho e atenção.

À minha amiga e comadre Virgínia que fez toda correção e formatação deste trabalho, separou colunas do questionário, minha imensa gratidão. Sem sua ajuda, a conclusão não seria agora.

Ao Professor Josino que absorveu a demanda deste trabalho e a confiou a mim.

Ao Sérgio que me apoiou para que conseguíssemos recurso pra execução deste trabalho, e juntos o submetemos ao edital de financiamento.

Às Professoras Carla Andrade, Sandra Hacon, Rosalina Koifman, Gina Torres pela ajuda com a amostragem.

Aos Professores Vinícius Sardella e Bernardete por toda valiosa ajuda no desenvolvimento da metodologia.

À minha amiga Juliana por toda ajuda na estatística e apoio, e fazer me lembrar que um pouquinho de SPSS no sangue não faz mal a ninguém.

Ao meu coorientador André Mazzei por toda ajuda com o equipamento, colunas, seringas, obrigada por tudo, por me receber quando eu só levava problemas.

Aos técnicos Julio e Alexandre pelos atendimentos para conserto do equipamento, até via telefônica, pra que não interrompesse o trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia do CESTE, em especial, Lucineide, Fernanda, Thelma, Simone, Leandro, Regina, Eline, Renato, Juliana, Josino, Fátima, Sérgio que nos apoiaram em cada dia de coleta, que cobriram a ausência do Setor de Agrotóxicos por 4 meses, que vibraram e torceram sempre, meu muito obrigada de coração. Ao Mário, meu obrigada mais que especial.

Às minhas amigas Mara, Andrea, Beta, Erika, Anna Thereza e Cris pela força, preocupação e apoio, sempre me estimulando, quando muitas vezes eu desanimei.

À minha terapeuta Joana por me ajudar a abrir mão dos analitos perdidos e seguir a diante.

Ao Cesar por ser nosso companheiro de coleta, além de motorista.

À Ione por ter conseguido o recurso pra consertar o equipamento, e olha que foi muito...

Às pupilas Amanda e Luciana e ao estagiário José Carlos, por toda ajuda no desenvolvimento do método, coleta das amostras, análise das amostras, sem vocês não seria possível. Também à recém chegada Márcia, que nos ajuda e torce muito por mim.

À minha querida amiga e companheira de trabalho Tatyane, minha fiel escudeira, participando de todas as etapas, meu muito obrigada pelo seu apoio, torcida, amizade!

À minha orientadora, Paulinha, minha chefe querida, minha mentora de trabalho há vinte anos, que privilégio ter compartilhado com você minha vida profissional, pessoal, acadêmica! O meu muito obrigada hoje e sempre, do fundo do meu coração.

“A vida é como jogar uma bola na parede.
Se for jogada uma bola verde, ela voltará verde;
Se for jogada uma bola azul, ela voltará azul;
Se a bola for jogada fraca, ela voltará fraca,
Se a bola for jogada com força, ela voltará com força:
Por isso, nunca ‘jogue uma bola na vida’,
De forma que não esteja pronto para recebê-la.
A vida não dá nem empresta;
Não se comove nem se apieda.
Tudo quanto ela faz é
Retribuir e transferir aquilo que nós lhe oferecemos.”
(Albert Einstein)

RESUMO

Os agrotóxicos da classe dos piretroides são substâncias com mediano nível de toxicidade e de uso massivo, tanto no meio urbano, em ações de combate a vetores, quanto no meio rural, onde os agricultores fazem uso destes insumos sem a adoção de boas práticas agrícolas, representando um importante problema para a saúde humana e ambiental. No Brasil, valores de referência para piretroides, bem como para agrotóxicos de outras classes químicas, são definidos para alimentos e água. Entretanto, não existem dados para a população não exposta ocupacionalmente, nem mesmo para trabalhadores expostos a estes agrotóxicos. Assim, torna-se importante e necessário o conhecimento do nível de exposição da população brasileira a estas substâncias, para orientação do setor regulador. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer os níveis basais para metabólitos de agrotóxicos da classe dos piretroides para a população do município do Rio de Janeiro. Foi realizada uma amostragem por conglomerados em dois estágios, e a coleta em cada um dos 474 domicílios consistiu em aplicação de um questionário e fornecimento de amostra de urina de indivíduos pertencentes à população não exposta ocupacionalmente, com idade maior que 18 anos, de ambos os sexos, distribuídos proporcionalmente pelos setores censitários da cidade. Para a realização das análises laboratoriais, o método analítico empregado baseou-se na determinação de 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) e 4-FPBA (ácido 4-fluor 3-fenoxi benzoico), metabólitos de piretroides, por extração em fase sólida e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com triplo quadrupolo. A faixa de trabalho foi determinada entre 0,5 a 15 ng mL⁻¹, com boa precisão e exatidão. Os limites de detecção e quantificação foram 0,05 e 0,25 ng mL⁻¹ para o 4-FPBA, e 0,06 e 0,20 ng mL⁻¹ para o 3-PBA, respectivamente, e demonstraram a boa sensibilidade do método. A viabilidade do método foi verificada através de ensaios de recuperação dos analitos nos pontos de concentração de 0,5, 5 e 15 ng mL⁻¹. Resultados médios de 95% e 84% para 3-PBA e 4-FPBA, respectivamente, indicaram exatidão adequada e aplicabilidade do método desenvolvido para a determinação destes metabólitos na urina. Níveis basais da população adulta carioca exposta ambientalmente, para 3-PBA de 6,85 ng mL⁻¹, e 4-FPBA de 1,41 ng mL⁻¹, foram determinados neste trabalho. A obtenção destes valores constitui relevante contribuição para a realização de estudos de avaliação e gerenciamento do risco químico desta importante classe de substâncias, na população estudada. Os resultados encontrados neste estudo são comparáveis aos realizados em outros países. No que se refere ao aspecto regulatório, este estudo fornece um importante volume de conhecimento para o Ministério da Saúde que regula a matéria, com vistas ao bom estabelecimento de políticas de controle do uso destas substâncias, de relevância toxicológica ambiental e ocupacional.

Palavras-Chave: agrotóxicos, piretroides, urina, níveis basais, vigilância em saúde, Rio de Janeiro

ABSTRACT

Pyrethroids pesticides are substances with medium levels of toxicity and massive use, both in the urban areas, in vector controlling, and in the rural areas, where farmers make use of these substances with any good agricultural practices, representing an important problem for human and environmental health. In Brazil, reference values for pyrethroids, as well as for pesticides at all, are defined for food and water. However, there are no established values for non-occupationally exposed population, even for exposed workers to these pesticides. Thus, it is important and necessary to know the exposure levels of Brazilian population, for assessment of regulatory sector. The main objective of this work was to establish background levels for pyrethroids metabolites for Rio de Janeiro's population. A cluster sampling was performed in two stages, and sampling in 474 households consisted of a questionnaire and urine sample from non-occupationally exposed individuals, aged over 18 years, of both sexes, distributed proportionally by the city census tracts. In order to perform the laboratory analysis, the used analytical method was based on 3-PBA (3-phenoxybenzoic acid) and 4-FPBA (4-fluoro-3-phenoxy benzoic acid) determination, analysed by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. The working range was determined between 0.5 and 15 ng mL⁻¹, with good precision and accuracy. The detection and quantification limits were 0.05 and 0.25 ng mL⁻¹ for 4-FPBA, and 0.06 and 0.02 ng mL⁻¹ for 3-PBA, respectively, demonstrated good sensitivity of method. The viability of the method was verified by recovery assays at 0.5, 5 and 15 ng mL⁻¹ levels. Average results of 95% and 84% for 3-PBA and 4-FPBA, respectively, indicated adequate accuracy and applicability of the developed method for pyrethroids determination in urine. Background levels for 3-PBA of 6.85 ng mL⁻¹ and 4-FPBA of 1.41 ng mL⁻¹ were established in this work. The achievement of these values constitutes a relevant contribution for further risk assessment evaluation for pyrethroids in this study population. These results are in agreement with those found in other countries. Regarding the regulatory aspect, this study provides an important volume of knowledge for Health Ministry, looking for establishing public policies to use control of these substances with environmental and occupational toxicological relevance.

Keywords: pesticides, pyrethroids, urine, background levels, health surveillance, Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química básica dos piretroides e seus radicais.....	6
Figura 2: Ação dos piretroides nos canais celulares de sódio.....	9
Figura 3: Piretróides e metabólitos correspondentes. Fonte:(WU; MIAO; FAN, 2011)	11
Figura 4: Principais atividades dos levantamentos por amostragem.	14
Figura 5: Fluxos de nitrogênio da Fonte de Ionização ESI. Fonte: Termo Fisher Scientific.....	30
Figura 6: Esquema do acoplamento da técnica de CLAE com EM/EM. Fonte: (TORRE <i>et al.</i> , 2015).....	31
Figura 7: Curvas de calibração do equipamento para os metabólitos de piretroides.	65
Figura 8: Cromatograma de íons totais, mistura de piretróides a 250 ng mL ⁻¹ (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL ⁻¹ (DBCA e DCCA) preparada em solvente.	70
Figura 9: Cromatograma com MRM extraídas, mistura de metabólitos a 250 ng mL ⁻¹ (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL ⁻¹ (DBCA e DCCA) preparada em solvente.....	70
Figura 10: Fator de resposta do injetor.	71
Figura 11: Fluxograma do procedimento de extração de metabólitos da urina.....	79
Figura 12: Cromatogramas com MRM extraídos, numa amostra de urina fortificada com uma mistura de metabólitos a 250 ng mL ⁻¹ (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL ⁻¹ (DBCA e DCCA), no extrato final, ou 5 ng mL ⁻¹ (3-PBA e 4-FPBA) e 30 ng mL ⁻¹ (DBCA e DCCA) na urina inicial.....	80
Figura 13: Gráfico de distribuição dos domicílios do estudo.....	94
Figura 14: Mapa demográfico da cidade do Rio de Janeiro. Fonte: (IBGE, 2016).....	96
Figura 15: Mapa físico da cidade do Rio de Janeiro, como imagem de satélite, com os pontos de coleta marcados. Fonte: (IBGE, 2016).....	96
Figura 16: Uso de inseticida nos bairros do município do Rio de Janeiro.....	110
Figura 17: Condição do esgotamento sanitário por bairros do município do Rio de Janeiro.....	110
Figura 18: Comparação entre o n coletado, os que usam inseticidas e que apresentam níveis de 3-PBA e 4-FPBA por bairros do município do Rio de Janeiro.....	111
Figura 19: Somatório dos níveis de 3-PBA por bairros do município do Rio de Janeiro.....	112
Figura 20: Somatório dos níveis de 4-FPBA por bairros do município do Rio de Janeiro.....	112
Figura 21: Análise de clusters considerando apenas variáveis socioeconômicas em bairros do município do Rio de Janeiro.....	113
Figura 22: Análise de clusters considerando variáveis socioeconômicas e dos níveis de exposição em bairros do município do Rio de Janeiro.....	114
Figura 23: Análise de clusters considerando apenas níveis de exposição em bairros do município do Rio de Janeiro.....	115
Figura 24: Componente 1 (boas condições sanitárias e socioeconômicas) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).....	119
Figura 25: Componente 3 (Escolaridade fundamental, condições sanitárias ruins, frequência de uso dentro de casa e dengue) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).....	120
Figura 26: Componente 4 (dengue e última utilização do inseticida) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).....	121

Figura 27: Estruturas etárias da população adulta do Rio de Janeiro segundo o IBGE e da amostra deste estudo.....	126
Figura 28: Dispersão dos valores médios da 3-PBA por faixa etária, com valores de ± 1 desvio-padrão.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos agrotóxicos segundo a via de absorção e toxicidade aguda pela DL ₅₀	3
Tabela 2: Valores da DL ₅₀ para piretroides em função do isômero.....	7
Tabela 3: Piretroides e seus respectivos metabólitos.....	10
Tabela 4: Resumo do NHANES, EUA.....	15
Tabela 5: Resumo do GerES IV, Alemanha.....	17
Tabela 6: Resultados do percentil 95 do estudo de Quebec, Canadá.....	18
Tabela 7: Métodos analíticos descritos para avaliação de metabólitos de piretroides e outras classes, em urina.....	28
Tabela 8: Concentrações dos metabólitos nas soluções-estoque de piretroides.....	39
Tabela 9: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração.....	41
Tabela 10: Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.....	43
Tabela 11: Experimentos de ELL e EFS.....	46
Tabela 12: Etapas dos procedimentos de ELL e EFS.....	47
Tabela 13: Etapas dos procedimentos de EFS adaptando o método de Tao (2015) e Olsson (2004).....	48
Tabela 14: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração.....	52
Tabela 15: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração para urina.....	53
Tabela 16: Grupos de variáveis do estudo.....	62
Tabela 17: Condições otimizadas no espectrômetro de massas com triploquadropolo.....	67
Tabela 18: Condições de infusão e MRM.....	68
Tabela 19: Transições do monitoramento de reações múltiplas.....	69
Tabela 20: Áreas e coeficientes de variação para injeções nos diferentes modos de injeção do equipamento, a partir de mistura de metabólitos a 500 ng mL ⁻¹	71
Tabela 21: Condições otimizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	72
Tabela 22: Resultados de recuperação (em %) dos experimentos de otimização.....	74
Tabela 23: Influência do pH na recuperação do método.....	74
Tabela 24: Resultados de recuperação (%) obtidos em diferentes tempos de hidrólise.....	75
Tabela 25: Resultados de recuperação considerando a influência da filtração do extrato final.....	75
Tabela 26: Média da recuperação com diferentes soluções de lavagem.....	76
Tabela 27: Média da recuperação com diferentes solventes de eluição.....	77
Tabela 28: Critérios para aceitabilidade das razões de íons.....	81
Tabela 29: Razões de íons e recuperações nos "pools" de urina e água.....	82
Tabela 30: Recuperações nos "pools" de urina e água.....	83
Tabela 31: Equação da reta em metanol.....	84
Tabela 32: Intensidade do íon de maior abundância dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração na urina, expresso pelo valor médio das 3 replicatas.....	85
Tabela 33: Resultados da homocedasticidade.....	86
Tabela 34: Equação da reta em urina.....	86
Tabela 35: Sensibilidade expressa pelo coeficiente angular da equação da reta em urina.....	86
Tabela 36: Faixa linear e seus limites superior e inferior.....	87
Tabela 37: Limites de detecção do equipamento.....	88
Tabela 38: Limites de detecção e quantificação do método.....	89
Tabela 39: Recuperações nos pontos 1, 3 e 5.....	90
Tabela 40: Coeficientes de variação para os testes de repetibilidade interdia e intradia.....	91
Tabela 41: Resultados da precisão intermediária.....	91

Tabela 42: Variáveis sócio-econômicas (n = 473).	98
Tabela 43: Variáveis sobre estado de saúde (n = 473).	99
Tabela 44: Acompanhamento dos controles de qualidade diários durante a análise das amostras.	101
Tabela 45: Concentrações dos metabólitos de piretroides em amostras de urina da população adulta do município do Rio de Janeiro coletadas em 2015.	102
Tabela 46: Descrição dos estudos de avaliação de 3-PBA e 4-FPBA em população geral, em ng mL ⁻¹ , expressa nos percentis 50 e 95.	103
Tabela 47: Características da exposição a piretroides em setores censitários da população do Rio de Janeiro, em 2015.	105
Tabela 48: Correlações entre as variáveis socioeconômicas, de exposição e dos níveis de metabólitos de piretroides.	109
Tabela 49: Comunalidades com a matriz de extração.	116
Tabela 50: Matriz da análise de componentes principais.	118
Tabela 51: Perda por bairro com n = 22 esperado.	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CGVAM	Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CV	Coefficiente de Variação
DL ₅₀	Dose letal em 50% dos animais
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de Massas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GerES	<i>German Environmental Survey</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEA	Instituto de Economia Agrícola
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
OMS	Organização Mundial da Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	USO DE AGROTÓXICOS NO MUNDO E NO BRASIL	1
1.2	AGROTÓXICOS – DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	3
1.3	AGROTÓXICOS USADOS COMO SANEANTES E CONTROLE DE VETORES E EXPOSIÇÃO AMBIENTAL	4
1.4	TOXICOLOGIA DOS AGROTÓXICOS PIRETROIDES	6
1.5	INQUÉRITOS POPULACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DE PIRETROIDES EM OUTROS PAÍSES	13
1.6	ESTUDOS BRASILEIROS SOBRE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS SANEANTES	19
1.7	CONTROLES ESPECIALIZADOS DE VETORES E PRAGAS – PÚBLICO E PRIVADO – NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO	21
1.8	CONSEQUÊNCIAS DA VENDA LIVRE DE AGROTÓXICOS COMO SANEANTES DESINFESTANTES	23
1.9	AGROTÓXICOS USADOS COMO SANEANTES NO BRASIL	25
1.10	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS DE PIRETROIDES	26
1.10.1	Efeito Matriz e Supressão Iônica	32
1.10.2	Parâmetros para quantificação em CLAE-EM/EM	33
1.10.3	Validação de Métodos Analíticos	34
2	OBJETIVO GERAL	38
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MÉTODOS	39
3.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS E DE PADRÃO INTERNO	39
3.2	PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO	41
3.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS	41
3.4	FORTIFICAÇÃO DA URINA	44
3.4.1	Correção pela creatinina	45
3.4.2	Concentrações de fortificação	45
3.5	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	46
3.6	PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA	49
3.7	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	51
3.8	AMOSTRAGEM	57
3.8.1	Caracterização do inquérito populacional	57
3.8.2	Cálculo do n amostral representativo da população	58
3.9	APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E TCLE	61
3.10	ASPECTOS ÉTICOS PARA COLETA DE URINA	62
3.11	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DOS METABÓLITOS E VARIÁVEIS QUALITATIVAS	63

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	PREPARO DAS MISTURAS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO.....	65
4.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS.....	66
4.2.1	Condições espectrométricas	66
4.2.2	Condições cromatográficas	69
4.2.3	Otimização do método de extração.....	73
4.2.4	Condições de EFS otimizadas.....	78
4.3	PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	80
4.3.1	Parâmetros de validação.....	80
4.3.2	Amostragem.....	92
4.3.3	Variáveis socioeconômicas e de saúde.....	96
4.3.4	Avaliação dos níveis dos metabólitos	100
4.3.5	Variáveis de exposição.....	104
4.3.6	Determinação dos níveis basais na população	122
4.3.7	Possibilidades de ações de prevenção e educação	127
5	CONCLUSÃO	130
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
7	ANEXOS	
	Anexo 1 Materiais, reagentes, soluções e equipamentos.....	144
	Anexo 2 Bairros e densidade populacional por sexo.....	147
	Anexo 3 Setores censitários sorteados.....	148
	Anexo 4 Endereços Sorteados.....	149
	Anexo 5 TCLE.....	150
	Anexo 6 Carta enviada aos moradores sorteados.....	151
	Anexo 7 Mapa de coleta.....	152
	Anexo 8 Questionário.....	153
	Anexo 9 Carta enviada com resultados aos participantes do estudo.....	158
	Anexo 10 Folheto explicativo.....	159
	Anexo 11 Níveis de metabólitos determinados nos participantes.....	161

1 INTRODUÇÃO

1.1 USO DE AGROTÓXICOS NO MUNDO E NO BRASIL

Os agrotóxicos representam um importante problema para a saúde humana e ambiental porque são substâncias, na maioria das vezes, com elevado nível de toxicidade e de uso massivo tanto no meio urbano, onde são usados em campanhas de saúde pública, por empresas de desinsetização, ou no próprio ambiente doméstico para o combate a insetos, quanto no meio rural, onde os agricultores os utilizam sem muitos cuidados com as misturas e quantidades aplicadas, que são fatores essenciais durante sua manipulação (WHO, 2016).

O grande apelo para sua utilização maciça se dá principalmente pela necessidade de produção de alimentos para a crescente população mundial, a preservação de alimentos e materiais e também a prevenção de doenças. Entretanto, são substâncias produzidas para matar ou repelir insetos e outras espécies, ou ainda outros organismos, atuando nos sistemas enzimáticos desses seres de forma muito semelhante ao que atuam nos seres humanos e outras espécies não alvo presentes no ambiente (WHO, 2016).

O aumento do uso de agrotóxicos vem ocorrendo em quase todo mundo, sendo possível fazer sua estimativa através da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, pela avaliação para cada país (FAO, 2013). O consumo mundial teve sua distribuição de 45% para toda a Europa, 25% para os EUA e 25% para o restante do mundo, sendo o dado anterior ao ano da publicação (DE et al., 2014).

Outro aspecto importante é o econômico. No Brasil, de 2010 a 2014 houve um aumento de 58,3% no valor de comercialização de agrotóxicos, correspondendo neste último ano a um montante de 12,249 bilhões de dólares, atingindo em 2014 o volume de 914.220 toneladas de agrotóxicos em produtos formulados e 352.336 toneladas de princípio ativo. A importação em 2014 correspondeu a cerca de 418.000 toneladas, entre produtos formulados e ingredientes ativos, perfazendo dessa forma um montante de 1.310.408 toneladas de agrotóxicos utilizados no país, entre nacionais e importados. A perspectiva para o ano de 2015 era de um aumento de 2% no valor de comercialização e esses números vêm aumentando ao longo do tempo (IEA, 2015).

A utilização de agrotóxicos no Brasil tem sido foco de preocupação em diversos segmentos da nossa sociedade. O cidadão comum, o meio científico e as instituições governamentais vêm sendo alertados ou têm alertado sobre os impactos à saúde humana

e ambiental que essas substâncias podem causar. Ano a ano o Brasil supera seus recordes de comercialização e uso de agrotóxicos. Desde 2008 o Brasil tem sido o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, ficando à frente de países como os Estados Unidos e China (CARNEIRO; ABRASCO, 2015).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) registra também que em 2013 o setor de produção de inseticidas, herbicidas e outros agrotóxicos no Brasil para uso agropecuário apresentou pequenas variações ao longo do ano, mas teve expansão de 18,8% no último trimestre do referido ano (IBGE, 2013).

Apesar de todas essas cifras, o Brasil não é o maior produtor de alimentos no mundo, sem uma colheita proporcional a esse montante (CARNEIRO; ABRASCO, 2015).

Atualmente existem 511 monografias autorizadas de produtos registrados no Brasil usados como ingredientes ativos destinados ao uso agrícola, saneantes desinfestantes, não agrícola, ambientes aquáticos e preservante de madeira. Destes, 350 contribuem com 98% das formulações de agrotóxicos mais utilizados, sendo que 80% deles são rotineiramente usados na agricultura do Brasil (ANVISA, 2016a).

Todos estes agrotóxicos compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação.

Os três inseticidas mais utilizados no país no ano de 2014, e suas respectivas classes toxicológicas, foram acefato (classe III), clorpirifós (classe II), metomil (classe I), sendo acefato e clorpirifós da classe química dos organofosforados, correspondendo a 42.000 toneladas de princípio ativo (IBAMA, 2016). Considerando outros ainda que extrapolam esta lista, são usados carbamatos, triazinas, organofosforados, piretróides, derivados de uréia, biperidílicos e nitrocompostos, e a maioria deles podem causar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

1.2 AGROTÓXICOS – DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

O termo *agrotóxico* é definido na legislação brasileira como:

[...] produto e agente de processos físicos, químicos ou biológicos, destinado 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 substância e produto empregado como desfolhante, dessecante, estimulador e inibidor de crescimento Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 D.O. de 8/1/2002 (BRASIL, 2002).

A Organização Mundial da Saúde classifica os agrotóxicos segundo sua periculosidade e essa classificação é comumente empregada pela indústria de agrotóxicos, constando nos rótulos desses produtos. Essa classificação representaria a capacidade do agrotóxico produzir algum dano agudo para a saúde após uma ou várias exposições num curto espaço de tempo, pela dose letal média (DL₅₀), por via oral, dérmica ou respiratória, em estudos realizados com ratos. O valor da DL₅₀, por definição, é a quantidade em miligramas por kg de peso corpóreo requerida para matar 50% do grupo de animais em experimentação (IPCS; WHO, 2010). A tabela 1 demonstra resumidamente as classes e respectivas doses, nas diferentes vias de absorção.

Tabela 1: Classificação dos agrotóxicos segundo a via de absorção e toxicidade aguda pela DL₅₀.

CLASSE	DL ₅₀ para ratos (mg kg ⁻¹ de peso corpóreo)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia – Extremamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib – Altamente tóxicos	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
II – Moderadamente tóxicos	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000
III – Pouco tóxicos	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Fonte: INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010

1.3 AGROTÓXICOS USADOS COMO SANEANTES E CONTROLE DE VETORES E EXPOSIÇÃO AMBIENTAL

Por regulamentação da ANVISA, produtos desinfestantes estão contidos na categoria de produtos saneantes, sendo destinados à aplicação em domicílios e suas áreas comuns, no interior de instalações, em edifícios públicos ou coletivos e ambientes afins, para controle de insetos, roedores e de outras pragas incômodas ou nocivas à saúde. São incluídos nessa categoria de produtos os inseticidas domésticos, os inseticidas para empresas especializadas, os produtos para jardinagem amadora, os moluscicidas, os raticidas domésticos, os raticidas para empresas especializadas e os repelentes (ANVISA, 2010b; ANVISA, 2010a).

Além do uso agrícola, vários agrotóxicos aplicados como saneantes e para o controle de vetores contêm absolutamente os mesmos princípios ativos, das mesmas classes toxicológicas das formulações usadas na agricultura, o que muitas pessoas desconhecem (LONDRES, 2012).

Esses produtos podem ser de venda livre ao consumidor nos supermercados, ou de venda restrita às instituições ou empresas especializadas, prestadoras de serviços de controle de vetores e pragas urbanas. No caso da venda livre ao consumidor, esses produtos costumam ser comercializados em embalagens de pronto uso, com concentrações que asseguram ação eficaz segundo sua indicação, instrução de uso e monografia autorizada pela ANVISA (ANVISA, 2010a).

Os agrotóxicos saneantes não são submetidos à aprovação dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e do Meio Ambiente, como ocorre com os agrotóxicos de uso agrícola (LONDRES, 2012); estes são registrados apenas pelo Ministério da Saúde, através da ANVISA e, por esta razão, sofrem fiscalização diferente dos agrotóxicos agrícolas, o que pode ser considerado um contrassenso da legislação, já que na Lei dos Agrotóxicos (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002) a definição é bastante clara quanto ao uso destas substâncias em ambiente urbano e industrial.

Por esta razão, as indústrias se beneficiam desta distorção criando a ideia de que esses produtos saneantes contendo agrotóxicos são inócuos, e não oferecem risco à saúde, associando a ideia do uso de água como solvente com a ideia de segurança, estimulando o uso de produtos que propiciam o borrifamento contínuo em ambientes com crianças, idosos e outros grupos vulneráveis, entre outras discrepâncias. Além disso, há grande

utilização dos agrotóxicos como saneantes pelo Estado nas campanhas de controle de mosquitos e larvas (CARNEIRO; ABRASCO, 2015).

As classes químicas de agrotóxicos mais utilizadas em inseticidas desinfestantes são os piretroides, organofosforados e carbamatos. A própria OMS recomenda o uso dos piretroides deltametrina, lambda-cialotrina, permetrina e trans-cifenoctrina, bem como do organofosforado malation, para o controle de mosquitos, sob a forma de spray (OMS, 2006).

Os piretroides também são amplamente utilizados em produtos veterinários. Estes são regulados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através do Decreto Lei nº 467 (BRASIL, 1969), e geralmente possuem os mesmos princípios ativos das formulações de inseticidas domésticos, em doses maiores, que são tóxicas para o homem e outras espécies. Vários princípios ativos são ainda usados em loções e shampoos para o controle de piolhos e lêndeas. Além da exposição direta, outra forma de exposição aos piretroides é através da ingestão de alimentos contaminados (JARDIM; CALDAS, 2012).

Para uso como saneantes existem, autorizados pela ANVISA, 27 agrotóxicos da classe química dos piretroides e 8 princípios ativos da classe dos organofosforados. Para os piretroides, as concentrações permitidas para venda livre estão compreendidas na faixa de 0,01% a 4,0% p/p. Já para os organofosforados, as concentrações variam na faixa de 1% a 5% p/p. Empresas especializadas têm permissão para comercialização em concentrações mais altas, como no caso do diclorovós, que é permitido para venda livre na concentração de 1% e para empresas especializadas pode ser utilizado na concentração de 2% p/p (ANVISA, 2016a).

Os produtos comercializados como multi-inseticidas para mosquitos, moscas e baratas utilizam na maioria das vezes mais de um princípio ativo, em concentrações que variam de 0,02% a 0,35% p/p. Nestes casos, a avaliação de riscos fica ainda mais difícil devido à possibilidade de interação entre as substâncias, o que pode aumentar ou diminuir seus efeitos tóxicos.

A recomendação da OMS é muito semelhante à da ANVISA (ANVISA, 2016a) para os piretroides, com os percentuais permitidos variando de 0,05% a 0,75%, excetuando a deltametrina que é de 0,025%, e a lambda-cialotrina que é de 0,03% p/p (OMS, 2006).

Existem muitas formulações disponíveis nos supermercados para que a população escolha pelo inseto ou praga que deseja controlar, com diferentes custos e apresentações.

Pela consulta de produtos saneantes no site da ANVISA, pode-se observar que dentre os processos com situação de deferimento, ou publicação de deferimento, existem cerca de 175 produtos disponíveis, dos quais 137 são produzidos por apenas 4 fabricantes, e pode-se verificar ainda que, algumas vezes, a mesma marca pode ser produzida por dois diferentes fabricantes, dadas suas relações de propriedade. De uma mesma marca A, por exemplo, existem 21 produtos diferentes, para diferentes alvos.

1.4 TOXICOLOGIA DOS AGROTÓXICOS PIRETROIDES

Os piretroides são produtos sintéticos similares às piretrinas, compostos naturais com atividade inseticida encontrados em crisântemos, utilizados com o intuito de aumentar sua fotoestabilidade e atividade inseticida, bem como reduzir efeitos tóxicos em organismos não alvos. Basicamente têm dois núcleos, um de ácido ciclopropanoico e outro de radical 3-fenoxi-benzil (SODERLUND et al., 2002).

Existem outras variações na estrutura, substituindo a ligação éster, o radical 3-fenoxi-benzil, dentre outras. Na figura 1 está ilustrada a fórmula estrutural geral dos piretroides e os substituintes de cada radical, na tabela 2.

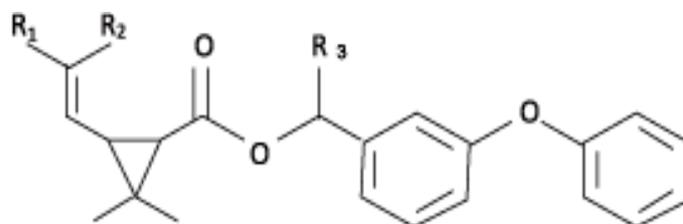


Figura 1: Estrutura química básica dos piretroides e seus radicais.
Fonte: Adaptado de SODERLUND, 2012.

A estrutura molecular está diretamente relacionada à atividade inseticida dos piretroides. A presença de dois centros quirais no ácido ciclopropanoico produzem dois diastereoisômeros trans e cis baseados na orientação dos substituintes nos carbonos 1 e 3, em relação ao plano do ciclopropano (SODERLUND, 2012).

A toxicidade da mistura racêmica varia com a razão cis/trans bem como pela polaridade do solvente utilizado. Usualmente os isômeros cis apresentam toxicidade 10 vezes mais elevada que o isômero trans, e o uso de um solvente apolar implica no aumento

do efeito inseticida de ambos (SODERLUND et al., 2002), (DOS SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Em mamíferos, a DL_{50} varia de 50 a 500 $mg\ kg^{-1}$, e são em sua maioria considerados moderadamente tóxicos (classe II) (DOS SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Na tabela 2 são apresentados os valores de DL_{50} em ratos machos, por pesos corporal e cerebral, em função da forma isomérica.

Tabela 2: Valores da DL_{50} para piretroides em função do isômero.

PIRETROIDES	ISÔMERO	R₁	R₂	R₃	LD₅₀ *	LD₅₀ **
λ-Cialotrina	-	Cl	CF ₃	CN	79	-
Cipermetrina	Cis	Cl	Cl	CN	297	0,6
Cipermetrina	Trans	Cl	Cl	CN	297	1,6
Deltametrina	Cis	Br	Br	CN	95	0,5
Permetrina	Cis	Cl	Cl	H	1200	11
Permetrina	Trans	Cl	Cl	H	1200	> 860
Fenotrina	Cis	CH ₃	CH ₃	H	-	> 4300
Fenotrina	Trans	CH ₃	CH ₃	H	-	> 8600
β-Ciflutrina	-	Cl	Cl	CN	155***	-
Cifenotrina	Cis	CH ₃	CH ₃	CN	-	3,9
Cifenotrina	Trans	CH ₃	CH ₃	CN	-	12

* $mg\ kg^{-1}$ de peso corpóreo, administrado em óleo de milho, em ratos machos

** $\mu g\ g^{-1}$ de peso de cérebro

*** administrado em acetona + óleo de amendoim

Fonte: Adaptado de (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) e (SODERLUND, 2012)

A deltametrina e a cipermetrina são os piretroides consideravelmente mais neurotóxicos que os demais, pela presença do radical ciano na configuração cis. Devido às singularidades estruturais e isoméricas é difícil fazer extrapolações sobre a toxicidade aguda de piretroides, sendo necessário observar os dados disponíveis na literatura que apontam com os achados individualizados para cada molécula, com seus respectivos isômeros (SODERLUND, 2012).

Existem duas ligações de ésteres na estrutura dos piretroides, um éster terminal (piretrina) e um central adjacente ao ciclopropano (aletrina, tetrametrina, fenotrina, deltametrina) ou o substituinte ciano (deltametrina, cipermetrina, fenvalerato e cifenotrina). Essas ligações são rompidas por hidrólise enzimática, por carboxilesterases inespecíficas encontradas nos sistemas microssomais em vários tecidos de quase todas as espécies mamíferas.

A toxicidade pode ser classificada também em função da presença ou ausência do grupamento ciano ligado ao radical fenoxibenzil. No Tipo I, ou Síndrome T, a ação se dá preferencialmente no sistema nervoso periférico, e os sintomas relatados em ratos são cansaço, descordenação, prostração, movimentos repetidos com as mãos, agressividade, tremor corporal, sobressalto, ataxia e convulsões. No tipo II, ou Síndrome CS (coreoatetose com salivação), a ação se dá no sistema nervoso central, e os sintomas relatados, também em ratos, são hiperatividade, salivação excessiva, tremores periódicos, contorção mais severa – coreoatetose (CASARETT; DOULL; KLAASSEN, 2001).

Efeitos em humanos resultantes da exposição ambiental a baixas doses de piretroides ainda não são totalmente conhecidos, mas estudos apontam que os sintomas mais comuns em humanos são irritação no aparelho respiratório após inalação, dor de cabeça, cansaço, náusea, vômito, irritação ocular e dérmica (parestesia) (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015a).

Em estudos desenvolvidos em ratos, de forma semelhante à atuação nos insetos, que são os organismos alvo, os piretroides interferem na abertura e fechamento dos canais de sódio das células neurais (Figura 2), prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula, resultado do estado de hiperexcitação pelo potencial negativo que é elevado ao potencial da membrana, produzindo descargas repetitivas anormais.

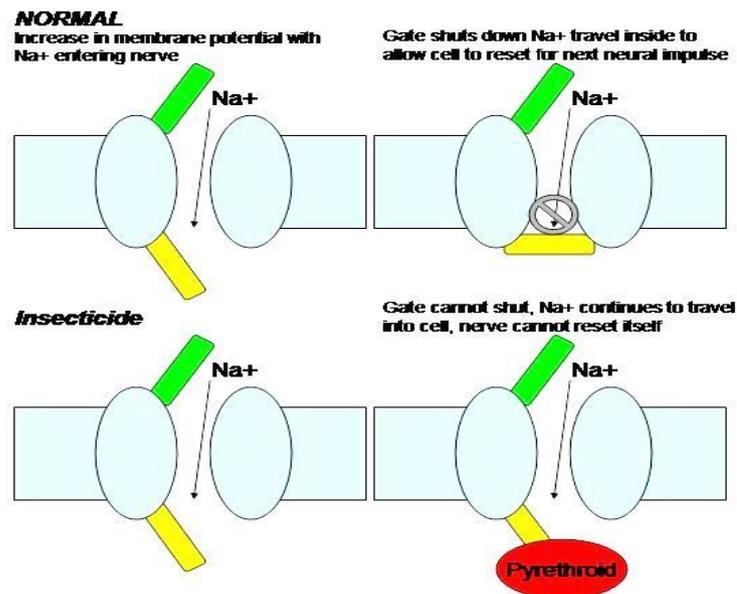


Figura 2: Ação dos piretroides nos canais celulares de sódio.
Fonte:(UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2013)

Apesar das descargas poderem ocorrer em qualquer região da célula nervosa, essas nas terminações pré-sinápticas causam maiores consequências na transmissão sináptica, evidenciando os sintomas descritos anteriormente. Além disso, os piretroides agem no complexo receptor do GABA (ácido γ -aminobutírico), ligando-se a eles e bloqueando os canais de cloro e sua ativação. Sendo o GABA um dos principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso central, a ausência de seu bloqueio causa hiperexcitação desse sistema (CASARETT; DOULL; KLAASSEN, 2001), (SODERLUND, 2012).

Estudos toxicocinéticos conduzidos em ratos com compostos marcados com radioisótopos demonstram que os piretroides são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral, alcançando níveis plasmáticos máximos em 4 horas. Para a deltametrina e permetrina, os tempos de meia-vida foram de 38,5 h e 12,4 h, respectivamente. Para os dois compostos foram identificadas doses maiores em elementos do sistema nervoso central e periférico que no plasma (ANADÓN et al., 1996).

Após esta etapa, reações de conjugação produzem metabólitos não tóxicos e mais solúveis para serem excretados pela urina e bile, na forma de glicuronídeos ou conjugados com glicina, taurina e ácido glutâmico. Dependendo da molécula de piretroide, predominará o mecanismo de oxidação ou hidrólise. A presença do grupo ciano parece diminuir a rota de clivagem hidrolítica da ligação de éster (CASARETT; DOULL; KLAASSEN, 2001).

Os metabólitos de piretroides usualmente identificados são o ácido 3 fenoxibenzóico (3-PBA), indicador de dose interna para permetrina, cipermetrina, esfenvalerato, cialotrina e deltametrina; cis e trans 2,2 diclorovinil – 2,2 dimetilciclopropano 1-ácido carboxílico (cis e trans DCCA), indicador para permetrina, cipermetrina e ciflutrina; cis 2,2 dibromovinil – 2,2 dimetilciclopropano 1-ácido carboxílico (DBCA), indicador específico para deltametrina e 4 – flúor - ácido 3 fenoxibenzóico (4F-3PBA), indicador específico para ciflutrina (ASTDR, 2003).

Esses principais metabólitos são utilizados para monitorar as exposições aguda e crônica em adultos e crianças na população geral, não exposta ocupacionalmente, como também em população ocupacionalmente exposta (ASTDR, 2003).

Na tabela 3 e na figura 3 estão relacionados alguns piretroides autorizados pela ANVISA e seus metabólitos correspondentes.

Tabela 3: Piretroides e seus respectivos metabólitos.

PIRETROIDE	METABÓLITO
Cipermetrina	DCCA, 3 – PBA
Deltametrina	3 – PBA, DBCA
Permetrina	3 – PBA, DCCA
Esbiotrina	3 – PBA
Fenotrina	3 – PBA
Cialotrina	3 – PBA
Fenpropatrina	3 – PBA
Esfenvalerato	3 – PBA
Ciflutrina	4 – FPBA, DCCA

Fonte: (MORGAN, 2012a)

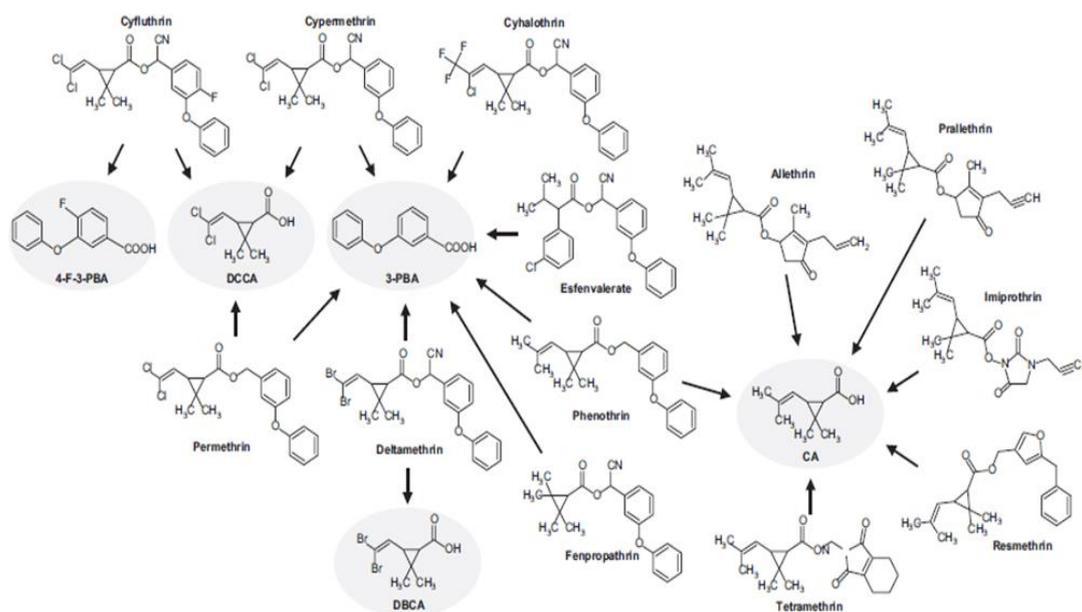


Figura 3: Piretroides e metabólitos correspondentes. Fonte: (WU; MIAO; FAN, 2011)

Apesar da vasta literatura sobre a toxicocinética dos piretroides, todo material é proveniente de experimentação animal, não havendo grande disponibilidade de estudos em humanos. Devido à ampla utilização dos agrotóxicos piretroides tanto no meio rural quanto no urbano, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de caracterização dos efeitos adversos provocados pelo uso crônico em baixas doses dessas substâncias. Em 2015, Saillenfait realizou uma ampla revisão sobre esse tema, trazendo algumas evidências sobre o atual conhecimento dos efeitos crônicos a baixas doses em humanos (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015).

De forma geral, os piretroides têm baixa volatilidade, se ligam ao solo, e são degradados rapidamente no ambiente. Possuem baixa toxicidade para aves e mamíferos, mas alta toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos e abelhas. Pela vantagem de apresentarem baixas persistência no ambiente e toxicidade em mamíferos, os piretroides tiveram seu uso ampliado e, por conseguinte, maior exposição e efeitos para organismos não alvo. Não apresentam evidências de se biomagnificarem na cadeia alimentar, apesar de serem moléculas pouco polares (DOS SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Essencialmente a exposição ambiental de uma população aos agrotóxicos piretroides se dá pela ingestão de alimentos ou água que contenham resíduos dessas substâncias e através da inalação ou contato dérmico com inseticidas domésticos usados nas residências e áreas comuns para o controle de vetores, na maior parte insetos. Crianças pequenas ainda podem se expor pela ingestão de poeira do chão contendo resíduos, já que

costumam levar a mão à boca, brincar ou se locomoverem no chão. Elas constituem um grupo mais vulnerável, pois estão em fase de desenvolvimento e a influência destes xenobióticos poderia ser mais expressiva (MORGAN, 2012b).

Estudos sobre reprodução humana têm sido conduzidos na China, Polônia, Japão e Estados Unidos, em sua maioria com grupos de pacientes de clínicas de infertilidade e grupos de trabalhadores expostos a essas substâncias. Dos 16 artigos analisados nesta revisão, 12 apontaram algum tipo de correlação entre alterações morfológicas ou de mobilidade do sêmen ou hormônios relacionados à reprodução com os níveis de metabólitos de piretroides, indicando haver influência dessas substâncias no sistema reprodutor masculino (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015), (JAENSSON et al., 2007), (MCCARTHY et al., 2006).

Outros estudos sobre exposição materna e infantil a piretroides e neurodesenvolvimento foram realizados nos Estados Unidos, China e Filipinas também correlacionando os níveis de metabólitos com características neonatais e desenvolvimento cognitivo e neuromotor, acompanhados em coortes de 24 meses e 36 meses, tais como equilíbrio, coordenação motora, desenvolvimento social, fala, inteligência, não tendo sido estabelecidas correlações positivas na maior parte dos estudos (SHAFER; MEYER; CROFTON, 2004), (SODERLUND et al., 2002), (EGEGHY et al., 2011), (KOLACZINSKI; CURTIS, 2004), (DEWAILLY et al., 2014), (BURNS et al., 2013).

Estudos que investigaram o sistema imunológico e a dose interna de metabólitos através de avaliação de crianças expostas intra-útero a piretroides mostraram que a imunoglobulina E foi alterada nas crianças com idade de 5 a 6 anos. Também foi associado o aparecimento de tosse na idade de 5 anos (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015).

São pontuais os trabalhos que relacionam a exposição a piretroides e efeitos adversos na saúde humana, principalmente em população exposta ambientalmente e muitos pesquisadores sugerem que estudos epidemiológicos de base populacional sejam bem feitos, que definam bem a exposição e o aparecimento de sintomas, na sua temporalidade, além do uso de testes neuropsicológicos validados, para que possam elucidar melhor o quão susceptível está a população exposta a piretroides (KOLACZINSKI; CURTIS, 2004).

1.5 INQUÉRITOS POPULACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DE PIRETROIDES EM OUTROS PAÍSES

Os inquéritos são estudos observacionais do tipo seccional, que sendo feitos por base populacional, continuamente, se tornam instrumentos bastante utilizados para a formulação e avaliação de políticas públicas, orientando a construção de indicadores sobre fatores de risco, contaminantes químicos, doenças, dentre outros (KISH, 1995).

Uma das limitações mais importantes dos inquéritos populacionais está relacionada aos níveis de agregação possíveis para manter a representatividade da população em estudo, sendo a alternativa para a viabilização do estudo o direcionamento para unidades geográficas menores. Outra limitação se dá pelo nível de não resposta ao estudo, oriundas de recusa ou problemas operacionais na coleta, e quando respondentes e não respondentes se diferenciam muito, as análises apresentarão erros sistemáticos. Para corrigir os casos ignorados pode-se ordenar os registros e substituir pelos valores próximos (SNEDECOR; COCHRAN, 1996), (VIACAVA, 2002).

Outro aspecto importante é sobre a confidencialidade das informações prestadas pelos participantes do inquérito, sendo necessária a adoção de formatos agregados que impeçam a identificação das pessoas. O tratamento de dados também é primordial para garantir a coerência do inquérito, visto que as análises estatísticas levarão em conta o desenho de amostragem e os erros oriundos desse processo (WALDMAN et al., 2008), (VIACAVA; OTHERS, 2002).

As técnicas para amostragem também são absolutamente importantes para que o inquérito tenha a representatividade pretendida. O levantamento por amostragem produz “fotografias” da população de estudo e os dados coletados e as estimativas atribuídas a partir destes dados passam a ser uma aproximação disponível deste grupo (KISH, 1995).

A amostragem está inserida na etapa de planejamento e muitos fatores devem ser considerados e previstos para que a execução da pesquisa não seja comprometida. A figura 4 ilustra bem as etapas de construção conceitual, planejamento e amostra e operação.

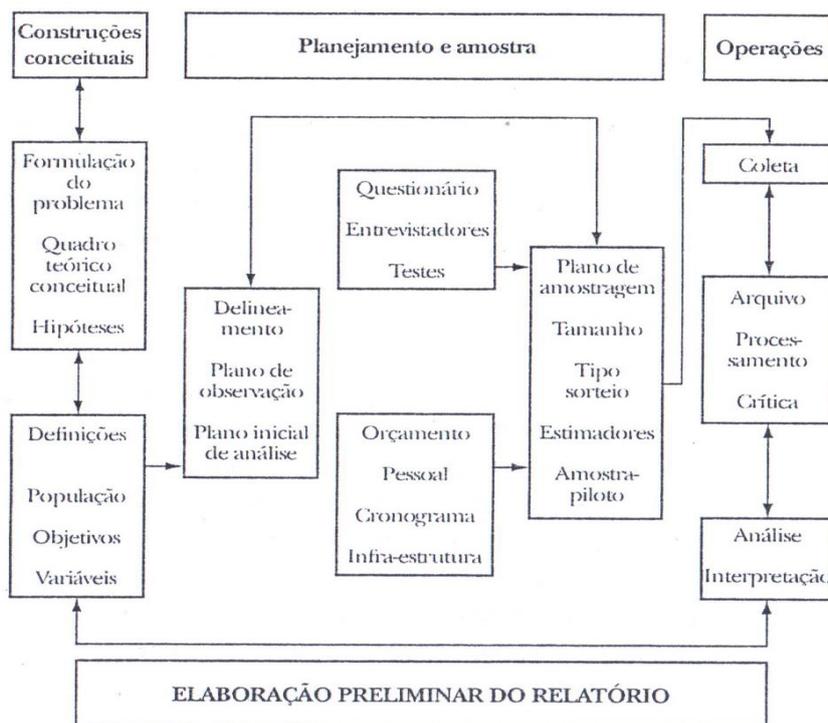


Figura 4: Principais atividades dos levantamentos por amostragem. Fonte: (SILVA, 2004).

Uma unidade amostral é a menor parte da população, que se pode identificar individualmente para fins de classificação e sorteio. Caso a unidade sorteada seja a considerada para a análise, a unidade amostral será o elemento ou indivíduo, mas se a população for identificada por grupos de indivíduos, a unidade amostral será o conglomerado, mesmo que a unidade de análise seja o indivíduo (SILVA, 2004).

As amostragens probabilísticas podem ser dos tipos: casual simples, realizada por sorteio do indivíduo, onde qualquer um da população tem a mesma probabilidade de ser sorteado; aleatória estratificada, quando os indivíduos ou unidades amostrais são divididos em estratos e dentro deles são sorteadas amostras casuais simples; ou por conglomerados, quando os indivíduos da população são reunidos em grupos e alguns desses são sorteados para comporem a amostra (KISH, 1995).

Basicamente, inquéritos de monitoramento da exposição da população a agrotóxicos são realizados nos Estados Unidos e Alemanha. Outros poucos países relatam inquéritos dessa natureza, mas não de forma permanente, e sim pontual.

Nos EUA, o National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES, realizado entre 1999 e 2010, constatou que os níveis encontrados na população geral americana, não exposta ocupacionalmente, de idade entre 6 e 59 anos, tem o metabólito 3-PBA como o mais frequentemente encontrado (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo do NHANES, EUA (National Health and Nutrition Examination Survey).

	Média geométrica $\mu\text{g L}^{-1}$	Percentil 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	Percentil 75 $\mu\text{g L}^{-1}$	Percentil 90 $\mu\text{g L}^{-1}$	Percentil 95 $\mu\text{g L}^{-1}$
3PBA					
1999-2000	0,292	0,25	0,73	1,75	4,33
2001-2002	0,318	0,27	0,70	1,73	3,54
2007-2008	0,401	0,39	1,10	3,22	6,63
2009-2010	0,418	0,40	1,06	3,12	6,50
trans DCCA					
1999-2000	-	-	0,56	1,40	3,42
2001-2002	-	-	0,42	1,20	2,54
2007-2008	-	-	-	2,23	5,23
2009-2010	-	-	-	1,29	5,42

Fonte: (CDC, 2017)

O metabólito 3-PBA apresentou níveis médios que variam de 0,292 a 0,418 $\mu\text{g L}^{-1}$ e níveis de 3,54 a 6,63 $\mu\text{g L}^{-1}$ no percentil 95; já o metabólito trans-DCCA, aumentou de 2,54 para 5,42 $\mu\text{g L}^{-1}$ no percentil 95, ambos não corrigidos pela creatinina. Há uma tendência de aumento, em uma década, de cerca de 50% dos níveis médios inicialmente identificados, e cerca de 100%, nos percentis 95. Não foram encontrados níveis do 4-FPBA, DBCA e o metabólito cis-DCCA deixou de ser monitorado em 2002 (CDC, 2017).

Ainda nos Estados Unidos, foram avaliadas em Ohio, 127 crianças selecionadas aleatoriamente, em 16 clínicas da cidade. O acompanhamento nas residências ocorreu durante 48 horas sendo recolhidas amostras ambientais e de urina. O piretroide avaliado foi a permetrina, nas amostras ambientais, apresentando níveis mais elevados do isômero cis (470 a 1010 ng g^{-1}) do que do trans (344 a 544 ng g^{-1}). Na urina foi avaliado o 3PBA, tendo sido encontrado em 67% das amostras, na concentração média de 0,3 ng mL^{-1} , e

valor máximo de 33,8 ng mL⁻¹. O trabalho comprovou a rota múltipla de exposição de crianças a baixos níveis de piretroides (MORGAN et al., 2007).

Já num estudo conduzido na Califórnia, 105 mulheres e 103 crianças de famílias de agricultores foram avaliadas quanto à exposição a piretroides. Foram encontrados níveis de 3-PBA em cerca de 80% dos participantes dos dois grupos, e valores médios do metabólito de 2,40 ng mL⁻¹ em crianças e 2,62 ng mL⁻¹ em mulheres. Os níveis foram correlacionados com as condições de pobreza das residências, falta de manutenção e uso frequente de inseticidas domésticos incrementando a exposição relacionada à atividade agrícola. A exposição dessas famílias está acima da média dos estudos realizados com amostras de todo país, como citado anteriormente (TRUNNELLE et al., 2014b).

Em uma população não exposta ocupacionalmente, habitantes da cidade de Nova Iorque nos Estados Unidos, 1452 adultos foram avaliados no ano de 2004 quanto à exposição aos agrotóxicos das classes de piretroides e organofosforados. Os níveis determinados no percentil 95 foram, para os metabólitos 3-PBA e trans-DCCA, de 5,23 e 5,94 µg L⁻¹, respectivamente. Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas com preditores coletados em questionário que explicassem o aumento da exposição em relação ao restante da população americana (MCKELVEY et al., 2013).

Na Alemanha, é realizado o German Environmental Survey - GerES, em moldes semelhantes ao NHANES, nos Estados Unidos. Entretanto, na Alemanha, maior direcionamento é dado a crianças e adolescentes, com o intuito de avaliar, regular e criar políticas públicas para proteção da saúde dessa e de futuras gerações quanto a exposição às substâncias químicas de forma geral. Em relação aos piretroides, até o GerES IV, seus metabólitos eram monitorados. Já no último inquérito, o GerES V, que ainda está em curso, essa classe de contaminantes foi excluída.

Um estudo piloto para o GerES IV foi realizado com 396 crianças entre 2 e 17 anos e os níveis encontrados no percentil 95 foram 0,74 µg L⁻¹ para o cis-DCCA, 1,7 µg L⁻¹ para o trans-DCCA, 0,52 µg L⁻¹ para o DBCA, 0,1 µg L⁻¹ para o 4-FPBA e 2,4 µg L⁻¹ para o 3-PBA, esse último encontrado em 90% das amostras analisadas. Os níveis de permetrina encontrados na poeira doméstica foram correlacionados significativamente aos níveis de metabólitos, indicando que o contato por ingestão ou inalação da poeira contaminada aumenta a exposição das crianças. A exposição também foi relacionada à idade, localização da amostragem, consumo de vegetais cozidos e o uso de inseticidas domésticos (BECKER et al., 2006).

Os resultados completos do GerES IV, realizado com 598 crianças entre 3 e 14 anos, demonstram valores médios próximos aos encontrados na população americana. A tabela 5 ilustra resumidamente os resultados. As edições anteriores do GerES não apresentam resultados para metabólitos de piretroides.

Tabela 5: Resumo do GerES IV, Alemanha (German Environmental Survey).

	% de amostras detectadas	Média geométrica µg L⁻¹	Percentil 10 µg L⁻¹	Percentil 50 µg L⁻¹	Percentil 90 µg L⁻¹	Percentil 95 µg L⁻¹
3-PBA	98	0,486	0,16	0,43	1,67	3,80
4-FPBA	19	ND	<0,10	<0,10	0,21	0,43
DBCA	45	0,110	<0,10	<0,10	0,52	0,91
trans DCCA	86	0,280	<0,10	0,25	1,18	2,46
cis DCCA	60	0,136	<0,10	0,12	0,52	1,00

Fonte: (BECKER; CONRAD; MUSSIG ZUFIKA, 2008).

Outro estudo conduzido na Alemanha identificou metabólitos de piretroides em até 65% da população estudada, para pelo menos um deles, detectando níveis de 0,66 µg L⁻¹, sem corrigir pela creatinina, e 0,69 µg g⁻¹, corrigindo pela creatinina (HEUDORF; ANGERER, 2001).

Ainda na Alemanha, outro trabalho conduzido com 673 crianças e jovens com idade entre 0 e 18 anos, moradores de um conjunto habitacional de militares americanos aposentados, foram avaliados os metabólitos 4-FPBA, cis e trans DCCA e DBCA, sendo encontrada, para o somatório de todos eles, a média de 0,61 (± 1,1) µg L⁻¹, tendo o percentil 95 o valor de 2,15 µg L⁻¹. Nesse estudo não foi avaliado o 3-PBA. Houve o relato dos pais, de que nunca havia sido usado inseticida doméstico nestas residências, nem para fins médicos, levando à conclusão de que estes níveis são oriundos da dieta (HEUDORF; ANGERER; DREXLER, 2004).

Neste país, são determinados valores de referência para exposição ambiental a piretroides para 3 metabólitos, construídos pela avaliação de 2100 pessoas, entre adultos e crianças, sendo 1 µg L⁻¹ para cis-DCCA e 2 µg L⁻¹ para trans-DCCA e 3-PBA (HEUDORF et al., 2006).

Outros trabalhos foram desenvolvidos em diversos países, não apresentando o histórico de monitoramento da população, mas de um estudo pontual que poderá servir de base para futuras investigações.

No Canadá, na região metropolitana de Quebec, foram avaliados 81 adultos, entre 18 e 64 anos, e 89 crianças, entre 6 e 12 anos. Metabólitos de piretrinas e piretroides foram medidos em urina coletada em 12 horas para as crianças e de 2 períodos de 12 horas para os adultos, com o intuito de verificar se a ingestão de alimentos, uso de drogas, cigarro, álcool, tratamento de saúde e controle de piolho, e desinsetização em casa, poderiam estar correlacionadas aos níveis de metabólitos encontrados. Os resultados demonstraram não haver grandes diferenças entre adultos e crianças, e para os adultos, o fumo e uso de medicamentos estariam correlacionados ao incremento dos níveis de cis e trans DCCA e 3-PBA, diferindo entre homens e mulheres. Para as crianças, o uso de medicamento para o controle de lêndeas está associado ao aumento dos níveis, pois esse medicamento é formulado com piretroide. Os resultados encontrados se assemelham aos da população americana e são maiores que os alemães.

A tabela 6 expressa os resultados encontrados neste estudo (FORTIN et al., 2008).

Tabela 6: Resultados do percentil 95 do estudo de Quebec, Canadá.

METABÓLITO		% amostras detectadas	Percentil 95 $\mu\text{g L}^{-1}$		% amostras detectadas	Percentil 95 $\mu\text{g L}^{-1}$
trans-DCCA	ADULTOS	100	3,48	CRIANÇAS	97,6	4,10
cis-DCCA		96	1,51		96,5	0,76
3-PBA		98,7	4,23		94,1	1,54
CDCA*		4,27	0,15		75,3	0,39
DBCA		13,3	0,14		12,9	0,03
4FPBA		12	0,02		16,4	0,14

*CDCA – chrysanthemum dicarboxylic acid, metabólito da piretrina. Fonte: (FORTIN et al., 2008).

Em 2005, Ueyama e colaboradores conduziram no Japão um estudo com 448 adultos entre 39 a 85 anos, que realizavam exames de checagem rotineira de saúde. O nível médio encontrado para o metabólito 3-PBA foi de $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo $1,96 \mu\text{g L}^{-1}$ para o percentil 95 (UEYAMA et al., 2009).

Ainda no Japão, residentes de áreas rurais, suburbanas e trabalhadores de controle de vetores foram avaliados, nos períodos de 2005 e 2007. Não foram encontradas

diferenças significativas entre residentes de áreas rurais e urbanas, mas os trabalhadores de controle de vetores apresentaram valores elevados do metabólito 3-PBA, comparados aos outros grupos (KIMATA et al., 2009).

Babina e colaboradores realizaram um estudo para avaliação de agrotóxicos organofosforados e piretroides em crianças de 2,5 a 6 anos da pré-escola, em regiões rural, urbana e peri-urbana de Adelaide, no sul da Austrália. Os resultados descritos foram corrigidos pela creatinina, mas não foram apresentados os valores sem correção. Para os metabólitos cis e trans-DCCA os níveis médios variaram de 5,6 a 9,0 $\mu\text{g g}^{-1}\text{cn}$, para o DBCA, de 3,0 a 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}\text{cn}$ e para o 3-PBA, variaram de 1,2 a 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}\text{cn}$ (BABINA et al., 2012).

No Reino Unido, os valores de referência para metabólitos de piretroides foram estabelecidos numa população de 436 voluntários, maiores de 18 anos, selecionados aleatoriamente pelo registro eleitoral. Os valores de referência foram 6,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 3-PBA, 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cis-DCCA, 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para trans-DCCA e 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DBCA (BEVAN et al., 2013).

1.6 ESTUDOS BRASILEIROS SOBRE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS SANEANTES

No Brasil, valores de referência para piretroides, bem como para agrotóxicos de outras classes químicas são definidos para alimentos (ANVISA, 2016a),(ANVISA, 2016b) e alguns estão incluídos na Portaria 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b), que regulamenta sobre a potabilidade da água, a exemplo da permetrina cujo valor é de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Entretanto, não existem valores de referência para a população não exposta ocupacionalmente, nem mesmo para trabalhadores expostos a esses agrotóxicos, com exceção dos valores de acetilcolinesterase preconizados para a população exposta a organofosforados e carbamatos, sendo importante e necessário o conhecimento do perfil de exposição da população brasileira para orientação do setor regulador, para auxiliar na tomada de decisões e criação de políticas públicas, no que se refere ao controle de vetores e liberação de novos produtos.

A reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil trouxe consigo a reaparição de uma série de doenças virais que têm se tornado epidêmicas com a proliferação de insetos em todas as regiões brasileiras. De fato no Brasil, de janeiro a setembro de 2016, foram

notificados quase 1,5 milhão de casos de dengue, com 563 óbitos. Para a zika, foram registrados 200.465 casos suspeitos, com 3 óbitos. Em relação às gestantes, por associação do vírus ao aumento de casos de microcefalia, foram registrados 16.473 casos prováveis, sendo 9.507 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. Para a febre chikungunya, foram registrados 236.287 casos prováveis no país, destes, 116.523 casos foram confirmados (49,3%), e com 120 óbitos também confirmados (“Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde”, 2016).

Estima-se que o Brasil tenha gasto cerca de US\$ 310 milhões com a zika (ARAÚJO, 2016) e 2,7 bilhões de reais na prevenção e no tratamento dos doentes de dengue (CONSTENLA et al., 2015).

As medidas de proteção mais comuns são o uso de repelentes de insetos e o de inseticidas domésticos. Este uso está se tornando cada vez mais comum devido à facilidade de aquisição destes produtos, ao desconhecimento de eventuais efeitos sobre a saúde e às propagandas veiculadas pela mídia.

Além do uso doméstico, o combate aos mosquitos utiliza simultaneamente larvicidas que são adicionados aos reservatórios de água e ocasionalmente o uso de fumacês. Os larvicidas mais usados são o piriproxifeno, difluobenzuron, benzoiluréias, espinosade, uma vez que o uso do temefós decaiu muito a partir de 2013. Para aplicação espacial são utilizados a deltametrina, lambdacialotrina, transcifenotrina e a mistura malation e lambdacialotrina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Ou seja, a exposição humana no ambiente doméstico recebe contribuição do uso domiciliar, da aplicação na água e da contaminação aérea resultante da aplicação espacial.

De fato, a popularidade deste uso no Brasil é confirmada por vários estudos. Em um estudo conduzido em Goiânia, os autores avaliaram a frequência de uso de inseticidas domésticos entre alunos de um curso de técnico e, de acordo com os resultados obtidos, 80% dos alunos consultados reportaram o uso de inseticidas em suas casas, dos quais 70% era sob a forma de aerossol, e 10% aerossol combinado com pastilha, sendo que 70% dos consultados nunca haviam lido os rótulos dos produtos utilizados (GUINATI; GONÇALVES; REED, 2014).

No município de Pelotas, RS, foi feito um inquérito populacional sobre o uso de inseticidas domésticos em 2.039 domicílios da área urbana. Este estudo constatou que em 89% dos domicílios visitados se utilizavam inseticidas domésticos, pelo menos uma vez, nos 12 meses anteriores à entrevista e em 79% dos domicílios havia um ou mais produtos nas residências no momento da entrevista. Os sprays e as pastilhas para aparelhos

elétricos contendo piretroides foram os inseticidas mais utilizados, sendo que os sprays foram mais frequentes nas famílias de maior renda, enquanto que as soluções pulverizadoras compostas por organofosforados estiveram mais presentes em domicílios de menor renda. Este estudo foi conduzido em 1999/2000 e, nessa época, ainda se utilizavam organofosforados como inseticidas de venda livre (DIEL; FACCHINI; DALL'AGNOL, 2003).

Em Recife, um estudo revelou que em 67% dos domicílios estudados utilizavam-se saneantes para combater insetos e roedores e dos produtos utilizados, 51% eram inseticidas (CÂMARA NETO; AUGUSTO, 2000).

Em Niterói, RJ, foi estudado o impacto da propaganda sobre a utilização de inseticidas domésticos em dois grupos com rendas distintas; foi constatado que 92% do grupo de maior renda e 77% do de menor renda usavam inseticidas. Foi também verificada a grande influência da propaganda para o estímulo ao uso de inseticidas e o quanto os consumidores não são informados sobre os riscos (MELLO; ROZEMBERG; CASTRO, 2015) (CASTRO; ROZEMBERG, 2011).

No Piauí, o padrão de uso de inseticidas e percepção de risco também demonstra que a população não utiliza práticas preventivas além do uso indiscriminado destes produtos (OLIVEIRA et al., 2015).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Afins - ABIPLA na 10ª edição de seu anuário, as vendas destes produtos em 2014 resultou num faturamento de cerca de 900 milhões de reais, 40,4% maior que o de 2013. Estes gastos foram efetuados na compra de quase 148 milhões de unidades de produtos dentre aerossóis, refis elétricos, armadilhas, líquidos, espirais e gás fumigante (ABIPLA, 2015).

1.7 CONTROLES ESPECIALIZADOS DE VETORES E PRAGAS – PÚBLICO E PRIVADO – MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

Para o controle de vetores podem ser contratadas empresas especializadas, que têm seu funcionamento regulado pela Anvisa através da Resolução RDC nº 52/2009 (ANVISA, 2009). No Estado do Rio de Janeiro elas são licenciadas pelo Instituto Estadual do Ambiente - INEA e devem remeter ao órgão licenciador um relatório mensal das suas atividades.

De acordo com dados levantados junto ao INEA, existem hoje 171 empresas privadas licenciadas pelo órgão, instaladas no município do Rio de Janeiro, para o controle de pragas e vetores. Apesar de sediadas no município do Rio de Janeiro, sua área

de atuação pode extrapolar os limites geográficos municipais e realizarem, portanto, serviços em outros municípios do Grande Rio. Para se ter uma ideia dos problemas associados à exposição humana neste segmento, foram avaliadas 10 empresas: 5 consideradas de maior porte pelo volume de serviços realizados e 5 de menor porte. Essa avaliação foi realizada tendo-se como base as informações submetidas ao INEA quanto aos princípios ativos utilizados e suas respectivas quantidades no período compreendido entre junho de 2014 a junho de 2015.

Nestas 10 empresas foram utilizadas 58 formulações diferentes contendo 22 princípios ativos, sendo 8 da classe dos piretroides, 2 organofosforados, 5 cumarínicos, 2 neonicotinóides e 7 de outras classes químicas. Os 5 princípios ativos mais utilizados foram diclorvós (organofosforado), cipermetrina, permetrina, lambda-cialotrina (piretróides) e fipronil (pirazol).

O volume total gasto neste ano, de acordo com os dados notificados por estas 10 empresas, em kilogramas ou litros, dependendo da forma de apresentação, foi de 1.388 kg e, se extrapolarmos para as demais 161 empresas, esse volume utilizado chegaria a 22 toneladas utilizadas.

Apesar desta grande quantidade de agrotóxicos utilizados por empresas de desinsetização estar bem regulado, e das empresas prestarem informações ao órgão fiscalizador, pouco se sabe sobre o impacto destes serviços sobre a saúde das pessoas, tanto de seus profissionais quanto dos moradores, visto que são feitos em locais públicos, condomínios, casas, dentre outros.

Como mencionado, no ano de 2015 ocorreram no Brasil epidemias de zika e chikungunya, ambas transmitidas pelo mesmo vetor da dengue *Aedes aegypti*, e foi intensificado pelo Ministério da Saúde o envio de larvicidas para os estados brasileiros, sendo utilizados em 2015, 114 toneladas destes insumos. Em 2016, já foram adquiridas 100 toneladas, que são distribuídas para os estados necessitados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

No Brasil, os larvicidas mais utilizados são o difluorbenzuron, o novaluron e o piriproxifeno. Já os inseticidas para UBV são a lambda-cialotrina e o malation (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Outros inseticidas podem ser utilizados pelos estados, desde que autorizados.

Segundo a Sub-gerência de Operações da dengue, da Secretaria Municipal de Saúde do município do Rio de Janeiro, o controle de vetores utilizou o fenitroton, da classe química dos organofosforados, no combate aos vetores. No período de 2011 a

2014, o volume de princípios ativos utilizados foi da ordem de 20.000L sob a forma de ultra baixo volume (fumacê), restrito às áreas foco de maior número de casos de dengue, perfazendo uma média de 5.000L por ano, atendendo em média 1.063.000 imóveis ao ano. Já no pulverizador costal, também usado em residências, o volume utilizado chegou a ordem de 1.500L, com uso médio anual de 350L de fenitroton, atendendo em média 65.400 imóveis ao ano.

Assim como para as empresas desinsetizadoras, não se tem avaliado o impacto à saúde humana, visto que a necessidade de controle da dengue, zika e chikungunya prevalece sobre o risco.

1.8 CONSEQUÊNCIAS DA VENDA LIVRE DE AGROTÓXICOS COMO SANEANTES DESINFESTANTES

Apesar das quantidades de princípios ativos de agrotóxicos usadas nas formulações de saneantes desinfestantes serem menores que as utilizadas na agricultura, e o montante em volume também ser bem menos expressivo, ou seja, cerca de 370.000 toneladas na agricultura contra 40 toneladas em formulações, estes princípios estão contidos em cerca de 78 milhões de unidades de produtos (ABIPLA, 2015).

Estes produtos incluem diversas formas de apresentação como sprays, pastilhas de tomadas, inseticida líquido, gás fumigante, inseticida espiral e armadilha e cada unidade contém cerca de 0,5 g de princípio ativo, devendo-se observar que a exposição da população como um todo se dá de forma contínua.

Não é possível estimar a real contaminação humana da população não exposta ocupacionalmente por agrotóxicos de uso agrícola, a não ser através de estudos de avaliação de risco que consideram os resíduos de agrotóxicos determinados em matrizes de alimentos, água e ar (JARDIM; CALDAS, 2012), (CALDAS; DE SOUZA; JARDIM, 2011).

A opção pelo controle de vetores com a utilização de inseticidas traz consequências que vão muito além do real motivo de eliminá-los (LONDRES, 2012). Quando são utilizados inseticidas dentro das residências são introduzidos nos ambientes domésticos substâncias que apresentam efeitos nocivos à nossa saúde, tais como alterações nos sistemas nervoso, imunológico e endócrino (BALTAZAR et al., 2014), (CASIDA; DURKIN, 2013), (KOUREAS et al., 2012).

Grupos mais vulneráveis como crianças, idosos, gestantes, pessoas com alguma enfermidade, imunodeprimidos podem ficar ainda mais fragilizados com o uso constante destas substâncias (SCHULTE-OEHLMANN; OEHLMANN; KEIL, 2011), (COSTA et al., 2013).

Obviamente deve-se ponderar a relação custo-benefício uma vez que o simples abandono do uso também expõe a família a estes vetores. Isto significa que há necessidade de se adotar estratégias múltiplas de combate aos insetos indesejáveis.

Insetos e outras pragas vão adquirindo resistência aos inseticidas, levando ao aumento cada vez maior das doses utilizadas ou à necessidade periódica de mudança dos princípios ativos. Assim, um novo ciclo se inicia e cada vez fica mais difícil interromper ou diminuir o uso de inseticidas.

Isso pode ser constatado num estudo realizado em Pernambuco (ARAÚJO, 2013), que conduziu testes de resistência de populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos como o temefós (larvicida), diflubenzuron (regulador de crescimento) e cipermetrina (adulticida). Foram feitos testes bioquímicos para quantificar atividades enzimáticas e mutações no gene do canal de sódio. Os resultados demonstraram que todas as populações estavam resistentes ao temefós, exceto a de Fernando de Noronha. A razão de resistência foi moderada apenas na população de Recife. Para o diflubenzuron foi construída uma linha de base dose resposta e as razões de resistência foram correlacionadas com as do temefós. A análise para a cipermetrina também apontou que todas as populações apresentaram resistência a este composto. De forma geral, o estudo comprovou que o controle do *Aedes aegypti* com temefós e cipermetrina não é eficaz em Pernambuco, dada a resistência do mesmo e estes inseticidas comumente utilizados.

Um outro estudo conduzido no Estado de São Paulo pela Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN constatou, através da percepção dos profissionais da Saúde das esferas estadual e municipal que atuaram no controle do *Aedes aegypti*, que havia uso excessivo de substâncias químicas para o controle de vetores, ao invés de melhorar as condições de saneamento e ações educativas e que, se fosse optado por manter esse modelo de controle por muito mais tempo, as ações de controle perderiam sua eficácia (LEFEVRE et al., 2003).

Outra questão é a inespecificidade destas substâncias, pois elas acabam matando outros animais que muitas vezes são predadores naturais destes vetores, promovendo um grande desequilíbrio ambiental (CHASKOPOULOU et al., 2014).

Seria mais razoável e com resultados permanentes para o controle de focos de vetores, se fossem feitos investimentos em saneamento básico, fiscalização efetiva, e educação da população.

1.9 AGROTÓXICOS USADOS COMO SANEANTES NO BRASIL

Existe no Brasil o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX, que disponibiliza dados compilados sobre os acidentes toxicológicos registrados por 38 Centros de Informação Toxicológica distribuídos pelo País. Esse Sistema Nacional é coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e atua na coleta, compilação, análise e divulgação dos casos registrados no país pela Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica - RENACIAT. Ainda que seja considerada uma subnotificação dos dados de intoxicação no país, o SINITOX informa que desde 1986 os saneantes constituem a terceira causa de intoxicações em seres humanos no Brasil, ficando atrás apenas de medicamentos e animais peçonhentos/venenosos (FOOK et al., 2013).

Em um estudo realizado na Paraíba, esse padrão também é mantido, sendo as notificações de intoxicações por saneantes a terceira causa de todos os casos atendidos no Ceatox-CG. Igual constatação foi identificada em um estudo realizado em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, no qual os saneantes foram responsáveis por 19% dos casos de intoxicação (FOOK et al., 2013).

Outro estudo realizado em Pernambuco sugeriu que os inseticidas induzem dano auditivo periférico e que o ruído é um fator que interage com os mesmos, potencializando seus efeitos ototóxicos (TEIXEIRA; DA SILVA AUGUSTO; MORATA, 2003).

Apesar de ser constatada a presença maciça de inseticidas na nossa vida cotidiana, esse assunto parece começar a preocupar nossa sociedade (DIEL; FACCHINI; DALL'AGNOL, 2003). Há grande escassez de estudos sobre o uso de inseticidas domésticos. Os estudos que são encontrados mais frequentemente referem-se ao uso ocupacional dos inseticidas, principalmente em trabalhadores rurais. Considerando a similaridade entre vários inseticidas agrícolas e domésticos, é razoável esperar que o uso indiscriminado nos domicílios urbanos também gere agravos à saúde humana e ambiental.

A carência na legislação brasileira de valores de referência para agrotóxicos de várias classes é um problema que precisa ser enfrentado. Estudos em países desenvolvidos sugerem a necessidade de monitoramento da população,

objetivando entender o perfil da exposição ambiental, se aumenta ou diminui ao longo do tempo e quais os riscos associados a esta exposição (CDC, 2017), (BECKER et al., 2006), (UEYAMA et al., 2009), (BABINA et al., 2012), (BARR et al., 2010), (HEUDORF et al., 2006), (SCHULZ et al., 2009).

Realizar estudos que delineiem o perfil de exposição da população brasileira para agrotóxicos, num momento em que as atividades agrícolas têm batido recordes de exportação sustentando o superávit da balança comercial do nosso país há algum tempo, pode evidenciar um excesso de exposição da população, comparativamente a outros países. O conhecimento dos níveis aos quais a população do município do Rio de Janeiro está exposta permitirá inferir valores de referência adequados à nossa realidade, sem tomar como verdade os encontrados em estudos realizados em países que muitas vezes pouco se parecem com o nosso.

1.10 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS DE PIRETROIDES

A identificação de metabólitos de piretroides tem sido reportada na literatura desde a década de 80. Como essas substâncias sofrem rápida metabolização por reações de hidrólise e oxidação e têm curto tempo de meia-vida, são excretados através da urina sob a forma de conjugados glicuronídeos ou sulfatos, cujos metabólitos são usados como indicadores de dose interna para intoxicações agudas e exposições recentes. Vários métodos analíticos têm sido relatados na literatura para determinação de um ou múltiplos metabólitos (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015).

Geralmente, os métodos descritos apresentam um escopo que vai sendo modificado de acordo com a aplicação e conveniência do laboratório. Cabe ressaltar que além da questão técnica, o laboratório deve considerar a disponibilidade de equipamento adequado, a sua capacidade operacional para responder às demandas e os insumos necessários para a execução das análises.

A sequência de procedimentos analíticos usualmente compreende uma etapa de preparo da amostra, cujo objetivo é disponibilizar o analito para a sua separação cromatográfica. Com este intuito, podem ser aplicadas técnicas de hidrólise enzimática, ácida ou básica para desconjugar os analitos, e posteriormente técnicas de extração, podendo lançar mão da extração em fase sólida (EFS) mediante a utilização de diferentes fases sólidas, com distintas polaridades ou extração líquido-líquido (ELL).

Posteriormente, o extrato deve ser concentrado e, às vezes, derivatizado para tornar os analitos de interesse mais termoestáveis para serem analisados por cromatografia gasosa.

A segunda etapa compreende a análise cromatográfica, cujas técnicas podem se diferenciar em líquida ou gasosa e seus respectivos analisadores e tipos de detectores. E a terceira etapa consiste em interpretar os resultados gerados, compará-los com padrões de qualidade analisados junto com as amostras desconhecidas, e inferir conclusões sobre as amostras (MARGARITI; TSAKALOF; TSATSAKIS, 2007).

Apesar do desenvolvimento de métodos multianalitos em matrizes biológicas ser o objetivo dos laboratórios de análises toxicológicas, a detecção de agrotóxicos e seus metabólitos é um desafio, principalmente pelas diferenças de polaridade, solubilidade, volatilidade e acidez entre eles.

Os métodos de extração baseados na ELL foram utilizados por muito tempo, contudo vêm sendo substituídos por métodos de EFS por serem longos, utilizarem volumes grandes de solventes orgânicos, aumentando a exposição dos analistas. Além disso, a etapa de evaporação é mais demorada, podendo ocasionar a degradação de alguns analitos (SCHETTGEN et al., 2002).

Os métodos de extração por fase sólida podem variar na fase escolhida em função das características físico-químicas dos analitos de interesse, usualmente fase C₁₈ para compostos menos polares e fase de polaridade mista, tipo HLB (balanço hidrofílico-lipofílico). Eles costumam ser mais simples, com grande possibilidade de automatização, utilizam menores volumes de solventes orgânicos e, por conseguinte, menor tempo na etapa de evaporação de solventes para concentração das amostras. Os extratos obtidos por EFS costumam ser mais limpos, dispensando a etapa de limpeza (ou *clean up*) usualmente requerida nos procedimentos onde é utilizada a extração líquido-líquido (CAZORLA-REYES et al., 2011).

As técnicas cromatográficas gasosas acopladas à espectrometria de massas antecedem as líquidas. O acoplamento de quadrupolos melhora a sensibilidade e especificidade da técnica, diminuindo a influência dos interferentes na resposta do analito, o que normalmente ocorre em matrizes biológicas. Entretanto, para análise de substâncias com baixa volatilidade, alta polaridade e termolabilidade a cromatografia gasosa torna-se mais elaborada, sendo necessária a derivatização antes da injeção, com o objetivo de adicionar grupamentos acila e/ou halogenados para que a molécula adquira maior estabilidade térmica e menor polaridade. Assim, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, em especial, à espectrometria de massas com triplo

quadrupolo, confere a esta técnica uma vasta aplicação para substâncias polares e termolábeis, com alta sensibilidade e seletividade, sendo bastante adequada à análise de resíduos de metabólitos em matrizes biológicas, como a urina (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A tabela 7 relaciona alguns métodos descritos na literatura que vêm sendo empregados para avaliação de metabólitos de piretroides e outras classes, na matriz urina.

Tabela 7: Métodos analíticos descritos para avaliação de metabólitos de piretroides e outras classes, em urina.

Analitos	Preparo da Amostra	Método Analítico	LD	REC	Autor
3-PBA, 4-F-3-PBA, DBCA, cis/trans-DCCA, 2,4-D, AM, MDA, IMPY	Hidrólise enzimática, extração com solvente orgânico	CL-IQPA-EM/EM	0,02 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	>13%	(BAKER et al., 2000)
3-PBA, 4-F-3-PBA, DBCA, cis/trans-DCCA	Hidrólise ácida, ELL, Clean-up com NaOH, Derivatização	CG-IE-EM	0,05 ng mL^{-1}	79,3 a 93,4%	(SCHETTGEN et al., 2002)
TCPY, ISA, COU, PYR, AZI, MDA, PNP, IMPY	Hidrólise enzimática, EFS, Concentração	CL-IES(+/-)-EM/EM CL- IQPA-EM/EM	0,1 a 1,5 ng mL^{-1}	68 a 114%	Olsson (OLSSON et al., 2004)
cis,trans-DCCA, DBCA, 4FPBA, 3-PBA, CDCA	Hidrólise ácida, ELL, Concentração, Derivatização	CG-IE-EM/EM	0,005 a 0,1 ng mL^{-1}	90 a 108%	(LENG; GRIES, 2005)
cis,trans-DCCA, DBCA, 3-PBA, 4-FPBA	Hidrólise ácida, ELL, Concentração, Derivatização	CG-IQ-EM/EM	0,03 a 4,27 ng mL^{-1}	8 a 99%	(BARR et al., 2007)
cis,trans-DCCA, DBCA, 3-PBA, 4-FPBA	Hidrólise enzimática, ELL, Concentração	CLAE-IES-EM/EM	0,015 ng mL^{-1}	71 a 81%	(LE GRAND et al., 2012)
3-PBA, DBCA, cis,trans-DCCA	Hidrólise ácida, ELL, Concentração, Derivatização	CG-IE-EM	0,1 ng mL^{-1}	NI	(WIELGOMAS, 2013)
PNP, TCPY, MDA, IMPY,	Hidrólise enzimática,	CLAE-IES-EM/EM	0,03 a 0,4 ng mL^{-1}	50,5 a 97,5%	(DAVIS et al., 2013)

DEAMPY, 2,4D, 2,4,5T, 3- PBA, 4FPBA, cis,trans-DCCA, DBCA	EFS, Concentração				
cis,trans-DCCA, DBCA, 3-PBA, 4-FPBA	Hidrólise enzimática, EFS, Concentração, Derivatização	CG-IE-EM	0,02 a 0,08 ng mL ⁻¹	88 a 100%	(TAO et al., 2013)
3-PBA, cis,trans- DCCA, DBCA, 4-FPBA	Hidrólise enzimática, ELL, Concentração, Derivatização	CG-IE-EM			(DEWAILLY et al., 2014)
cis,trans-DCCA, DBCA, 3-PBA, 4-FPBA	Hidrólise ácida, ELL, Concentração, Derivatização	CG-IE-EM	0,006 a 0,01 ng mL ⁻¹	NI	(DEWAILLY et al., 2014)
3-PBA	ELISA	UV-VIS	5 ng mL ⁻¹	86%	(THIPHOM et al., 2014)

REC - Recuperação; LD - Limite de detecção. TCPY – 3,5,6-tricloro-2-piridinol (metabólito do clorpirifós); IMPY – 2-isopropil-4metil-pirimidinol; DEAMPY - 2-dietilamino-6-metil pirimidin-4-ol; 2,4D – 2,4 ácido dicloroacético; 2,4,5 T – 2,4,5 ácido tricloroacético; IE – impacto de elétrons; IQ – ionização química; IQPA – ionização química a pressão atmosférica; IES – ionização por eletrospray; NI – Não informado

A espectrometria de massas está baseada na distinção que o analisador faz para separar e calcular a relação entre a massa e a carga (m/z) dos íons presentes na amostra inserida gerando um espectro de massas, cuja informação é peculiar para cada substância e fornece informações sobre a estrutura química da mesma (AQUINO NETO; NUNES, 2003), (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

No acoplamento da CLAE com EM/EM, a fonte de ionização mais utilizada para matrizes biológicas e análise de compostos polares e de maiores massas moleculares é a *electrospray ionization* (ESI) (YAMASHITA; FENN, 1984), que por possuir um mecanismo brando para ionização produz íons monocarregados, sem fragmentação, sendo possível a obtenção do íon-molecular ou íons pseudo-moleculares do metabólito que se deseja avaliar.

É muito comum a utilização de modificadores que facilitem a protonação ou desprotonação de sítios básicos ou ácidos, gerando os íons $[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$, respectivamente. Ainda na fonte, é utilizado o nitrogênio como gás de nebulização (*auxiliary gas*) e “secagem” da fase móvel (*sheath gas*), que através do mecanismo de

repulsão coulombiana promove a transferência dos íons da fase móvel pra fase gasosa, sendo os mesmos atraídos para o analisador por um gradiente de potenciais.

Uma contra corrente de nitrogênio (*sweep gas*) evita a formação clusters (agregados iônicos) e entrada de moléculas neutras para o espectrômetro de massas. Esses fluxos, bem como a voltagem e temperatura, são parâmetros a serem otimizados durante o desenvolvimento do método e interferem diretamente na ionização das moléculas de metabólitos, na formação de interferentes e possível supressão de sinal do espectrômetro (AQUINO NETO; NUNES, 2003), (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007), (PANUWET et al., 2016), (ANTIGNAC et al., 2005).

A figura 5 ilustra o posicionamento dos fluxos de nitrogênio na sonda de entrada da amostra (*probe*).

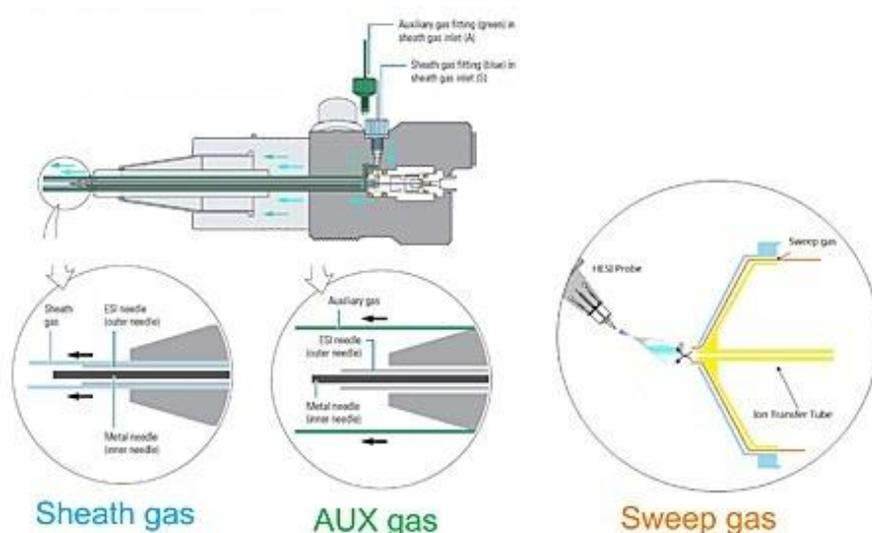


Figura 5: Fluxos de nitrogênio da Fonte de Ionização ESI. Fonte: Termo Fisher Scientific

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo é constituído de quatro barras cilíndricas de aço inox. As barras opostas e paralelas são conectadas eletricamente e às barras opostas são aplicadas voltagem (DC) e radio frequência (RF) capazes de manter apenas um íon de massa/carga específica oscilando dentro do quadrupolo. Esta relação de massa/carga pode ser fixa (monitoramento seletivo de íon) ou pode variar permitindo a varredura (*scan*) e detecção de todos os íons no quadrupolo. Quando ao quadrupolo é determinada uma voltagem RF fixa, eles agem como focalizadores de íons ou como câmaras de colisão, para dissociação induzida por colisão (CID), fazendo com que os íons dentro de uma faixa de m/z definida ali atravessem. Nesse caso eles são chamados de segundo quadrupolo. A resolução dos quadrupolos é unitária, portanto são menos

sensíveis que outros analisadores. Normalmente alcançam m/z até 2000 Da, no máximo (DAWSON et al., 1982).

Na figura 6 está ilustrado o acoplamento da técnica de CLAE com o triplo quadrupolo.

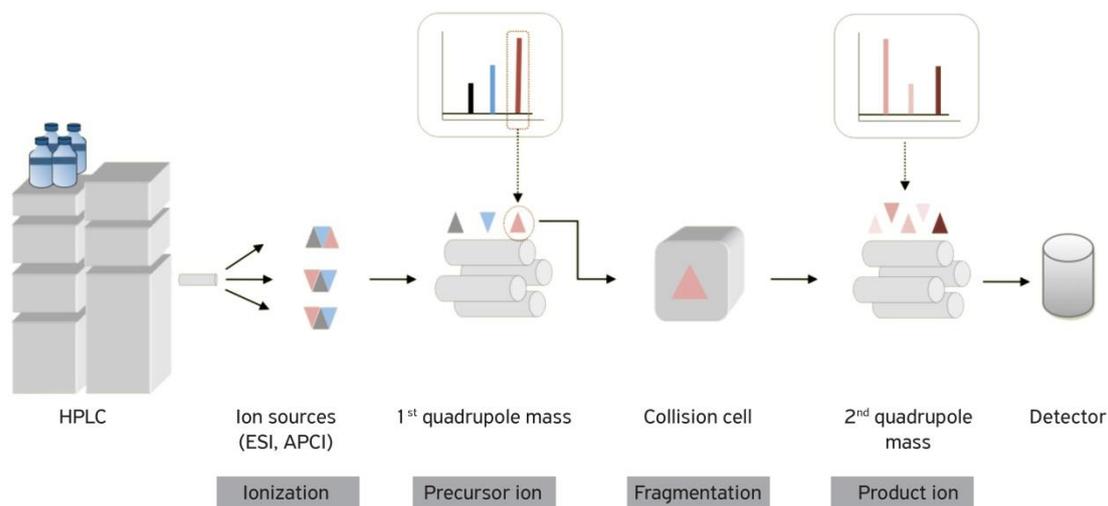


Figura 6: Esquema do acoplamento da técnica de CLAE com EM/EM. Fonte: (TORRE et al., 2015)

Em menor escala, métodos de imunodiagnóstico também são utilizados para avaliação de metabólitos de piretroides, mas podem sofrer maior influência de conjugados proteína-analito que não sejam de interesse. A grande vantagem desse método é o menor custo em relação às análises cromatográficas e a possibilidade de resposta de cerca de 100 amostras por dia, o que também não é possível para as outras técnicas com apenas um analista (CHUANG et al., 2011), (THIPHOM et al., 2014).

1.10.1 Efeito matriz e supressão iônica

Matrizes biológicas, especialmente a urina, são complexas e os interferentes podem causar o enriquecimento do sinal, comum nos procedimentos de preparo de amostras utilizando a EFS ou ELL, ou supressão do sinal, comum nos procedimentos de diluição e precipitação de proteínas. Ambos são considerados efeito matriz e muitas vezes não podem ser evitados, mas devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método analítico e fim de se criar mecanismo de controle de qualidade para que as etapas de qualificação e quantificação dos analitos de interesse não sejam comprometidas (FIORI et al., 2005), (FUREY et al., 2013), (MEI et al., 2003), (PANUWET et al., 2016).

O efeito matriz altera diretamente a sensibilidade e a robustez do método, podendo inviabilizar a sua aplicação. A realização do procedimento em diferentes urinas ou “pool” de urinas fortificadas em comparação com água ultra-pura fortificada e a avaliação destes resultados é uma das formas de se conhecer a influência que a variação interindividual dos interferentes presentes na urina pode causar (SCHLITTENBAUER; SEIWERT; REEMTSMA, 2015).

A supressão iônica reduz a resposta do detector pela perda da eficiência da ionização dos analitos de interesse em decorrência da competição com os interferentes que ainda estiverem presentes no extrato final da amostra, mesmo após todas as etapas de extração e limpeza que tiverem sido aplicadas. Muitas vezes os interferentes que causam a supressão iônica coeluem com os analitos, afetando enormemente a precisão e os limites de detecção e quantificação do método analítico. Os mecanismos da supressão consistem na modificação da composição da gota formada no spray da ESI pela presença dos interferentes menos voláteis, dificultando sua evaporação e formação do íon de interesse carregado que migrará pra fase gasosa até atingir o analisador. Para controlar e corrigir os efeitos da supressão iônica, deve-se realizar o melhor procedimento de cleanup possível, realizar modificações cromatográficas para que os interferentes não coeluem com os analitos de interesse, fazer a substituição de reagentes utilizados para pareamento iônico e a utilização de padronização interna para avaliação do efeito da supressão e a correção do mesmo na etapa de quantificação (ANNESLEY, 2003).

1.10.2 Parâmetros para quantificação em CLAE-EM/EM

Para a quantificação de resíduos de agrotóxicos ou seus metabólitos em matrizes biológicas existem normativas da União Europeia e dos Estados Unidos que tratam com critérios bem estabelecidos a forma que se deve realizar a aquisição dos dados no espectrômetro de massas e como proceder a avaliação dos resultados que estiverem acima do limite de quantificação do método. No guia SANTE 11945/2015, a quantificação por CLAE-EM/EM, com triplo quadrupolo, deve ser feita no modo de monitoramento de reações múltiplas, com resolução de massa do íon precursor menor ou igual a uma unidade de massa, duas transições com dois íons-produto diferentes, relação sinal-ruído maior ou igual a 3, e a razão entre os íons de quantificação e de confirmação não deve variar mais que 30% em comparação com as razões obtidas nos padrões de calibração. O tempo de retenção dos íons nas amostras extraídas deve ser similar, com mesmo formato,

e razão de resposta, de padrões injetados numa mesma sequência. (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

No método do CDC, a razão dos íons de quantificação e de confirmação deve estar compreendida dentro da faixa estabelecida pelos padrões dos analitos de interesse. Caso a razão caia fora da faixa, a integração dos picos deve ser checada e caso ainda permaneça fora, o extrato deve ser reinjetado com um gradiente de fase móvel diferenciado para a verificação da coeluição de interferentes. Para compostos não halogenados, a razão de íons depende da calibração do equipamento, e o critério de 30% de variação deve ser utilizado. A variação do tempo de retenção deve ser observada e não deve exceder 5% o tempo de retenção do padrão. A relação sinal-ruído deve ser no mínimo 3:1, a área mínima para quantificação não deve ter contagem menor que 800, e os resultados encontrados para cis e trans DCCA devem ser relacionados ao 3-PBA. A avaliação do padrão interno deve direcionar para a aceitação ou necessidade de reinjeção ou reanálise da amostra (CDC, 2013).

Berendsen e colaboradores sugerem, a partir das conclusões de seu estudo multicêntrico, que os tempos de retenção dos compostos que eluem mais rápido variam em função do gradiente de eluição e que a variação de $\pm 0,2$ min é aplicável. Além disso, a razão de íons costuma variar em função da intensidade do íon produto e, por essa razão, a tolerância pode ser de 50% e não de 30% como é normalmente aplicado nos guias (BERENDSEN et al., 2016).

1.10.3 Validação de métodos analíticos

A orientação do Inmetro para a validação de métodos analíticos pretende assegurar que o método utilizado pelo laboratório seja adequado ao uso pretendido. Para tanto, devem ser validados aqueles que não são normalizados, os que são desenvolvidos pelo laboratório, os normalizados que são utilizados para outro escopo e os normalizados que foram modificados ou ampliados. Os parâmetros de validação, bem como os critérios de aceitação, devem ser estabelecidos previamente à validação, sendo eles a seletividade, linearidade, faixas de trabalho e linear, limites de detecção e quantificação, recuperação, precisão, robustez e comparações interlaboratoriais (INMETRO, 2011).

1.10.3.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico consiste na sua capacidade de diferenciar a medida do analito de interesse dos interferentes que podem estar presentes na matriz. Estes interferentes usualmente modificam o sinal do analito e devem ser controlados através de ensaios com padrões, fortificações da matriz, e identificação do analito na presença dos mesmos (INMETRO, 2011; INMETRO, 2012).

1.10.3.2 Linearidade

A linearidade é a habilidade do método analítico para produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de trabalho. Uma vez realizada a identificação do metabólito, a sua qualificação depende da relação entre a resposta do detector para cada um dos analitos pesquisados e a sua concentração.

Durante a avaliação da linearidade usualmente também é determinada a sensibilidade, expressa pelo coeficiente angular ou inclinação da curva analítica, sendo o método considerado mais sensível quando pequenas variações de concentração causam maiores variações de resposta do equipamento.

São recomendados no mínimo cinco pontos para a curva de calibração, com um número de replicatas semelhante ao utilizado na rotina de análises. Para a construção da curva analítica através de regressão linear, os valores aberrantes devem ser desconsiderados através da aplicação de testes, como o teste de Grubbs, por exemplo, e a homocedasticidade – que é a homogeneidade da variância dos resíduos – deve ser verificada através do teste de Cochran ou de Levene (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016), (INMETRO, 2011).

1.10.3.3 Faixa de trabalho e faixa linear

A faixa de trabalho deve conter a faixa de aplicação para a qual o método analítico será usado e a concentração mais esperada para a população estudada deve ser especificada no centro da faixa de trabalho.

A faixa de resposta linear está contida na faixa de trabalho e a resposta do detector deve ter relação com a concentração do analito. A extensão desta faixa deve ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

1.10.3.4 Limite de detecção

O limite de detecção do método analítico (LD) é definido como a menor concentração do analito que produz um sinal que pode ser distinguido do sinal do branco/ruído. Ele é determinado através da análise completa de uma matriz contendo o analito, num nível baixo de concentração. Com estes resultados, multiplica-se o valor de t unilateral, com 99% de confiança da distribuição de Student pelo desvio padrão das replicatas deste nível baixo de concentração (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016; INMETRO, 2011).

1.10.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser medida e quantificada com um nível aceitável de tendência e precisão por um método analítico, correspondendo na prática ao ponto da curva analítica de menor valor de concentração, ou ainda podendo ser calculado pelo valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão (INMETRO, 2011; EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

1.10.3.6 Recuperação

A tendência de um método analítico pode ser verificada pelo uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência.

Pelo uso de materiais de referência certificados, a performance do método pode ser avaliada através do cálculo do seu erro relativo, consistindo na comparação dos resultados obtidos com aqueles declarados pelos MRC, também pelo score-z, quando se

participa de ensaios interlaboratoriais e, por último, através do erro normalizado, quando é expressa a incerteza da medida realizada.

A recuperação pode ser expressa pela razão entre o valor observado na análise, subtraindo o valor do branco e o valor esperado, multiplicado por 100. Ela pode ser estimada através da análise de matrizes fortificadas com quantidades conhecidas do analito de interesse, pelo menos em três níveis de concentração (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

1.10.3.7 Precisão

A precisão do método analítico é expressa em termos de condições específicas quando ele é aplicado e as formas mais utilizadas para expressá-la são a *repetibilidade*, a *precisão intermediária* e a *reprodutibilidade*, sendo o desvio padrão e o coeficiente de variação as medidas mais atribuídas a esse parâmetro (INMETRO, 2011), (BRITO et al., 2003).

1.10.3.7.1 Repetibilidade

Por definição do VIM, a repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sobre as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade, que são procedimentos de medição, o analista, equipamento usado sob as mesmas condições, local e repetições em curto espaço de tempo (VIM, 2012);(INMETRO, 2011).

O limite de repetibilidade serve para que se possa decidir se a diferença entre análises realizadas é significativa.

1.10.3.7.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária avalia a precisão de um método analítico sobre uma mesma amostra utilizando o mesmo método, mesmo laboratório e variando os analistas, os equipamentos e tempos. Pode ser modificada apenas uma ou mais de uma condição.

Existem algumas formas diferentes para se determiná-la sendo comum a repetição de no mínimo 15 vezes de um mesmo método analítico sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões. Neste caso, a precisão é expressa pelo desvio padrão destas

medidas (INMETRO, 2011), (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016), (BRITO et al., 2003).

1.10.3.7.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é um parâmetro de validação que precisa ser executado por mais de um laboratório, visto que as condições analíticas que devem ser alteradas são os analistas, equipamentos, laboratórios e extensão do período de comparação. Ela demonstra ser importante quando um laboratório busca utilizar as comparações interlaboratoriais para verificar seu desempenho (INMETRO, 2011), (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

1.10.3.8 Robustez

A robustez do método permite assegurar quais variáveis podem interferir na performance dele e a ordem de influência destas variáveis. Normalmente, utiliza-se o teste de Youden para esta finalidade (INMETRO, 2011), (BRITO et al., 2003).

Ainda podem ser feitas comparações interlaboratoriais para estabelecer o quanto o método é eficaz para o propósito ao que foi criado.

2 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de níveis basais de agrotóxicos utilizados como inseticidas domésticos da classe química dos piretroides, a partir da investigação dos níveis de metabólitos destes agrotóxicos em urina humana, na população adulta do município do Rio de Janeiro, RJ, exposta ambientalmente.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização e validação de método analítico multiresidual para metabólitos de agrotóxicos piretroides, utilizando como técnica analítica instrumental a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo;
- Estabelecimento de amostra representativa da população geral do município do Rio de Janeiro, RJ e realização de coleta de amostras de urina;
- Avaliação das variáveis qualitativas estudadas através de questionário aplicado durante a coleta das amostras de urina;
- Estabelecimento de relações entre os níveis de metabólitos encontrados e as variáveis qualitativas;
- Estabelecimento dos níveis basais, utilizando parâmetros estatísticos apropriados.

3 MÉTODOS

Os materiais para análise laboratorial, reagentes e soluções, padrões, gases e equipamentos foram listados no ANEXO 1.

De acordo com trabalhos publicados em outros países, os níveis de metabólitos esperados na população estudada foram da ordem de ng mL^{-1} , e pela descrição na literatura e disponibilidade do equipamento CLAE-EM/EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas com triplo quadrupolo) adequado para detecção de analitos nestes níveis, sendo eficiente e sensível para a análise de piretróides e seus metabólitos em urina, esta foi a técnica analítica escolhida para este fim (OLSSON et al., 2004), (DAVIS et al., 2013), (LE GRAND et al., 2012).

3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS E DE PADRÃO INTERNO

Com exceção do 3-PBA, todos os padrões de metabólitos estavam disponíveis comercialmente na forma de soluções, em solventes orgânicos, com concentrações que variaram de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme tabela 8.

Tabela 8: Concentrações dos metabólitos nas soluções-estoque de piretróides

Metabólitos	Pureza (%)	[] padrão ou estoque individual ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] solução para infusão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] na solução-estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
DCCA (cis + trans)	99,0	10,00	0,5	1,00
DBCA	99,3	10,00	0,5	1,00
4-FPBA	95,5	100,00	0,5	0,50
3-PBA	99,0	1030,00	0,5	0,50
3-PBA-C13 - PI	98,8	1000,00	0,5	0,50

O padrão de 3-PBA foi preparado pesando-se 10,30 mg do padrão em balão volumétrico e em seguida foi adicionado metanol até completar o volume de 10,00 mL.

A maioria dos padrões apresentava pureza maior que 99% e, por esta razão, não foi feita correção da concentração considerando a pureza. Entretanto, para o 4-FPBA, que

apresentava pureza de 95,5%, foi feito o acerto do volume levando em conta a pureza deste padrão, para que ficasse na mesma concentração dos demais.

Foram feitas diluições individuais de todos os padrões na concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as otimizações cromatográfica e espectrométrica. Para o estabelecimento das melhores condições no espectrômetro de massas com triplo quadrupolo estas soluções foram infundidas individualmente.

Para estabelecer a melhor separação cromatográfica os padrões foram preparados numa única solução-estoque, numa concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, foram avaliados vários gradientes de fases móveis, com diferentes solventes, volumes de injeção, temperatura do forno, coluna cromatográfica e fluxo de fase móvel.

Para o preparo da solução-estoque de metabólitos de piretroides (PYR) foram utilizados volumes dos padrões que variaram de 2,50 a 500,00 μL , adicionados em balão volumétrico de 5,00 mL e avolumados com metanol grau LC-MS.

A razão para que os padrões tenham sido preparados em concentrações diferentes deveu-se ao fato de que os analitos DBCA e DCCA têm respostas muito inferiores que os demais.

Todas as soluções-estoque foram estocadas em frascos de vidro âmbar, com tampa de plástico com batoque de teflon, e armazenadas em freezer ($-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todas as soluções de padrões foram aliqüotadas em *vials* para que sofressem menos ciclos de congelamento-descongelamento, conforme sua utilização. As soluções de padrões foram testadas quanto a sua estabilidade por um período de 6 meses.

Outra solução-estoque do padrão interno 3-PBA-C13 foi preparada numa concentração de 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ser adicionado em todas as amostras e curvas de calibração.

O padrão interno foi adicionado para o acompanhamento e controle da cromatografia e espectrometria de massas, sendo marcado com C_{13} para os piretroides.

3.2 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO

A curva de calibração do equipamento foi preparada a partir de diluições das soluções-estoque de metabólitos. A concentração de cada metabólito em cada ponto da curva de calibração pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração.

Metabólitos	Solução estoque $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ponto 1 ng mL^{-1}	Ponto 2 ng mL^{-1}	Ponto 3 ng mL^{-1}	Ponto 4 ng mL^{-1}	Ponto 5 ng mL^{-1}
DCCA (cis + trans)	10	250	500	750	1000	1250
DBCA	10	250	500	750	1000	1250
4-FPBA	100	25	125	250	500	750
3-PBA	1030	25	125	250	500	750

A enzima β -glicuronidase, utilizada para desconjugar as analitos do ácido glicurônico foi preparada no mesmo dia dos experimentos para ser utilizada até um ou dois dias depois, esperando-se dessa forma que a sua atividade fosse mantida. A solução foi preparada de forma a se obter 1000 U de enzima em cada tubo de ensaio, sendo feita a estequiometria para a obtenção dessa quantidade em aproximadamente 400 μL em volume da solução de enzima adicionada.

3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS

As condições espectrométricas foram otimizadas a partir de infusão direta dos metabólitos a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, individualmente, ora sem a utilização da fase móvel, ora com a utilização da fase móvel de composição acetonitrila:ácido fórmico 0,1% na proporção de 1:1. Além das otimizações manuais, como a regulagem da posição da probe, modo de ionização positivo ou negativo, fluxo de solução injetado durante a otimização, avaliação do sinal-ruído, também foram consideradas as otimizações do software Xcalibur®, de acordo com os parâmetros selecionados, através da varredura em ampla faixa de funcionamento do espectrômetro para cada um desses parâmetros. Foram selecionados voltagem do spray (*spray voltage*), gás de bainha (*sheath gas*), gás de contracorrente (*ion*

sweep gas), gás auxiliar (*auxiliary gas*), temperatura do capilar (*capillary temperature*), voltagem da lente do tubo de transferência (*tube lens offset*), voltagem do skimmer (*skimmer offset*), pressão de colisão (*collision pressure*) e energia de colisão (*colision energy*).

Depois de serem especificadas individualmente as melhores condições para cada analito, foi feita a infusão com todos os analitos e selecionadas as condições mais adequadas que promovessem as maiores contagens de íons, simultaneamente, para todos os analitos.

As condições cromatográficas foram inicialmente testadas com as colunas que já existiam no laboratório, sendo todas de fase reversa, a saber:

Hypersil 150 x 4,6 x 3 μm

Hypersil 150 x 4,6 x 5 μm

Agilent C₈ 250 x 4,6 x 5 μm

Phenyl Hypersil 150 x 4,6 x 5 μm

ACE 3 100 x 2,1 x 3 μm

ACE 50 x 2,1 x 3 μm

ACE Excel 2 100 x 2,1 x 2 μm

Também com o intuito de promover a melhor separação possível dos metabólitos, foram testados vários gradientes de fase móvel, variando desde uma isocrática com os solventes água, metanol, acetonitrila, ácido fórmico em diferentes proporções, até um gradiente de grande mudança de polaridade durante a corrida cromatográfica, a fim de promover a separação e deslocá-los do tempo de retenção onde se observava saírem vários interferentes presentes na urina. Também foram testados fluxos de eluição pela coluna

Para ilustrar os testes isocráticos e com gradientes de fase móvel, seguem na tabela 10 as combinações de solventes e alguns dos gradientes testados. Os testes foram realizados a partir da experiência dos técnicos e suporte de especialistas.

Tabela 10: Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.

Teste	Tempo (min)	H ₂ O %	MeOH %	ACN %	FOA %	Fluxo mL min ⁻¹
1	0-10	10	90			0,2
2	0-10	90	10			0,2
3	0-10	30	70			0,2
4	0-10	70	30			0,2
5	0-10	50	50			0,2
6	0-10	20	70		10	0,2
7	0-10	10		90		0,2
8	0-10	90		10		0,2
9	0-3	95		5		0,3
	3-7	95		5		
	7-11	70		30		
	11-12	95		5		
	11-15	95		5		
10	0-3	95	5			0,3
	3-7	95	5			
	7-11	70	30			
	11-12	95	5			
	11-15	95	5			
11	0-3			5	95	0,3
	3-7			5	95	
	7-11			30	70	
	11-12			5	95	
	11-15			5	95	
12	0-1	65	35			0,3
	1-4	50	50			
	4-12	5	95			
	12-12,5	65	35			
	12,5-21	65	35			
13	0-1	65		35		0,3
	1-4	50		50		
	4-12	5		95		
	12-12,5	65		35		
	12,5-21	65		35		

*MeOH – metanol; ACN – acetonitrila; FOA – ácido fórmico

**ACN com 0,05% de ácido acético

Para verificar o fator de resposta do injetor, foi injetada uma solução padrão a 200 ng mL⁻¹ nos volumes de 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 25 µL.

Os tipos de injeção permitidos no software Xcalibur®, loop total, loop parcial ou *no waste* também foram testados para verificação da injeção que garantisse maior repetibilidade, com o menor volume de amostra utilizado.

3.4 FORTIFICAÇÃO DA URINA

As urinas utilizadas para o desenvolvimento do método, para a validação e para controle de qualidade durante a análise das amostras foram fornecidas pelos funcionários do laboratório, tendo como único critério de exclusão o fato de ter utilizado inseticida doméstico na residência nos últimos dois dias, o que era perguntado antes do fornecimento da urina. As urinas eram misturadas para serem formados “pools” para que fosse possível obter um volume maior de matriz, e também considerar no experimento as variações interindividuais da urina, o que está mais próximo da realidade.

Foram avaliados o pH e o aspecto (cor e turbidez) dos “pools” utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

As urinas foram fortificadas de um a sete dias antes do experimento, homogeneizadas por 1 hora com agitador magnético, não tendo sido otimizado este tempo de homogeneização, em temperatura ambiente, e aliqüotadas nos tubos de ensaio. Eram submetidas ao congelamento em freezer a $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e no dia do experimento eram descongeladas. Este procedimento pretendeu retirar a influência do congelamento sobre a performance do método numa amostra descongelada, já que esta foi a realidade das amostras verdadeiras. As amostras coletadas na população não foram analisadas frescas, todas ficaram congeladas por 18 meses.

O teste de estabilidade feito pelo laboratório compreendeu o período de 6 meses, pois não houve tempo de manter as urinas de teste pelo período de 18 meses até a conclusão deste estudo. Leng realizou um estudo de estabilidade de 3-PBA, cis e trans DCCA em urina por 1 ano, a -20°C , obtendo uma perda de $11 \pm 3\%$ (LENG; KÜHN; IDEL, 1997).

3.4.1 Correção pela creatinina

Em todas as amostras de urina foi feita a dosagem de creatinina pelo método espectrofotométrico de Jaffé, com medida direta, pela reação com ácido pícrico em meio alcalino, com desproteinização (FERLAND et al., 2015), (BABINA et al., 2012).

A expressão da concentração de metabólitos em ng mL^{-1} pode variar bastante em função da grande variação de excreção interindividual. Assim, a correção pelo nível de creatinina foi feita dividindo-se o valor da concentração de analito em ng mL^{-1} pelo valor da concentração de creatinina em mg dL^{-1} , multiplicando por 100, para corrigir as unidades de massa e volume e a expressão final ser feita em ng mg^{-1} ou $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina, como é mais usual (BABINA et al., 2012).

3.4.2 Concentrações de fortificação

Durante o desenvolvimento do método analítico as urinas foram fortificadas em dois níveis de concentração, sempre em um nível mais baixo, que normalmente variava entre 0,5 e 1 ng mL^{-1} , e em um nível mais alto, que variava entre 2 e 5 ng mL^{-1} . Eram sempre escolhidos os mais baixos possíveis, dependendo da sensibilidade alcançada pelo espectrômetro, pois os níveis baixos são os esperados para serem encontrados na população não exposta e também para economia de padrões, que apresentaram um custo muito elevado. Para cada teste realizado foram feitos brancos, em duplicata ou triplicata, os quais também foram avaliados quanto à presença de resíduos. É muito difícil obter uma urina completamente isenta de resíduos de metabólitos, já que os agrotóxicos podem ser ingeridos através de alimentos contaminados. Para que a quantificação pudesse ser realizada, foi feita uma curva em urina em cada dia de análise de amostras, além de um branco. A área deste branco foi descontada tanto das curvas quanto das amostras. Para avaliar a recuperação, também foi feita uma fortificação depois da execução do método, o que corresponderia ao 100 %. A recuperação era rotineiramente calculada a partir de regra de três simples. Durante a descrição das etapas de desenvolvimento do método serão citadas as concentrações utilizadas em cada teste de otimização.

3.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Os primeiros testes de otimização foram repetições de dois métodos baseados na técnica de ELL, com a aplicação de duas formas de hidrólise, e outros dois métodos de EFS, também com a aplicação de duas formas de hidrólise.

Neste trabalho não foram aplicados procedimentos de planejamento experimental. Para direcionar se continuaria a ser feita a otimização da ELL ou da EFS, foram feitos os experimentos conforme descrito nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Experimentos de ELL e EFS.

	EFS	Hidrólise
1	EFS1 (BARR et al., 2007)	Hidrólise Ácida (LENG; GRIES, 2005)
2	EFS2 (OLSSON et al., 2004)	Hidrólise Ácida (LENG; GRIES, 2005)
3	EFS1 (BARR et al., 2007)	Hidrólise Enzimática (OLSSON et al., 2004)
4	EFS2 (OLSSON et al., 2004)	Hidrólise Enzimática (OLSSON et al., 2004)
	ELL	Hidrólise
5	ELL1 (SCHETTGEN et al., 2002)	Hidrólise Ácida (LENG; GRIES, 2005)
6	ELL2 (LENG; GRIES, 2005)	Hidrólise Ácida (LENG; GRIES, 2005)
7	ELL1 (SCHETTGEN et al., 2002)	Hidrólise Enzimática (OLSSON et al., 2004)
8	ELL2 (LENG; GRIES, 2005)	Hidrólise Enzimática (OLSSON et al., 2004)

ELL – extração líquido-líquido; EFS – extração em fase sólida

Tabela 12: Etapas dos procedimentos de ELL e EFS

ELL1	ELL2	EFS1	EFS2	HA	HE
5 mL urina hexano Centrifugaçã o 2x hidróxido de sódio Descarte fase orgânica Fase aquosa Ácido clorídrico concentrado, hexano	5 mL urina éter etílico agitação Centrifugaçã o 2x hidróxido de sódio Fase orgânica Evaporação Ressuspensão com 50 µL de fase móvel	5 mL urina Condicionament o Cartucho Oasis HLB acetato de etila, metanol, água, ácido clorídrico 0,1N Lavagem ácido clorídrico 0,1N, hidróxido de amônio 0,1N, metanol, acetato de etila Secagem Eluição acetato de etila, metanol Evaporação Ressuspensão com 50 µL de fase móvel	5 mL urina Condicionament o Cartucho Oasis HLB Metanol, ácido acético 1% Lavagem ácido acético 1%, metanol 5% em água Secagem Eluição Metanol, acetonitrila Evaporação Ressuspensão com 50 µL de fase móvel	5 mL urina + Ácido clorídrico concentrad o 100°C/2h	5 mL urina + 800 U de β- glicuronidase , tampão acetato 37°C/17h

ELL – extração líquido-líquido; EFS – extração em fase sólida; HA – hidrólise ácida; HE – hidrólise enzimática.

Todos os procedimentos foram feitos com urinas fortificadas em 0,5 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹ da mistura de metabólitos, antes e depois do método para que fosse verificada a recuperação, e brancos em duplicata.

Após a definição pela hidrólise enzimática, os procedimentos EFS3 (TAO et al., 2013), EFS4 (modificação de TAO, 2013), EFS5 (OLSSON et al., 2004), EFS6 (modificação de TAO, 2013) e EFS7 (CDC, 2013) foram testados, nas concentrações de 1 ng mL⁻¹ e 4 ng mL⁻¹, observando-se variações nos cartuchos, solventes do condicionamento, lavagem e eluição (tabela 13).

Tabela 13: Etapas dos procedimentos de EFS adaptando o método de Tao (2015) e Olsson (2004).

EFS3	EFS4	EFS5	EFS6	EFS7
5 mL urina	5 mL urina	5 mL urina	5 mL urina	5 mL urina
Condicionamento	Condicionamento	Condicionamento	Condicionamento	Condicionamento
Cartucho Oasis	Cartucho	Cartucho Oasis	Cartucho C ₁₈	Cartucho Oasis
HLB	Bondelut SAX	HLB	Metanol,	HLB
Metanol,	Metanol,	Metanol, ácido	acetoneitrila, ácido	acetona, ácido
acetoneitrila, ácido	acetoneitrila, ácido	acético 1%	fórmico 2%	acético 1%
fórmico 2%	fórmico 2%	Lavagem	Lavagem	Lavagem
Lavagem	Lavagem	ácido acético 1%,	ácido fórmico 2%	ácido acético 1%,
ácido fórmico 2%,	ácido fórmico 2%,	metanol 5% em	Secagem	metanol 25% em
metanol 20% em	Secagem	água	Eluição	água
água	Eluição	Secagem	acetoneitrila	Secagem
Secagem	metanol	Eluição	Evaporação	Eluição
Eluição	Evaporação	metanol	Ressuspensão	acetona
acetoneitrila	Ressuspensão	Evaporação	com 100 µL de	Evaporação
Evaporação	com 100 µL de	Ressuspensão	fase móvel	Ressuspensão
Ressuspensão	fase móvel	com 100 µL de		com 100 µL de
com 100 µL de		fase móvel		fase móvel
fase móvel				

Nesta etapa do desenvolvimento, o volume de urina utilizado foi de 15 mL, por causa da sensibilidade do equipamento que não alcançava na matriz os níveis de 0,5 ng mL⁻¹, sendo este o nível esperado para ser encontrado nas amostras reais.

Foi verificada a influência do pH da matriz nas recuperações dos analitos, sendo testados os valores 3, 5, 7, sendo 5 o pH normal da urina, e 7, já um valor elevado, encontrado em pessoas com quadro de infecção urinária.

Também foi avaliada a influência do tempo de hidrólise, e foram testados dois procedimentos: o primeiro submetendo ao período de 17 horas (overnight) a 37°C (OLSSON et al., 2004), e o segundo ao período de 2 horas a 55°C (GOMES et al., 2009).

Ainda foi avaliada a influência da limpeza do extrato final utilizando filtro de seringa de 0,22 µm, insumo este que aumenta ainda mais o custo da análise, e é mais uma etapa introduzida ao método, possibilitando perda dos analitos.

Por causa do volume de urina de 15 mL, considerado muito elevado para a técnica de EFS nessa matriz, mesmo com todas as tentativas de melhorar a eficiência da limpeza através de etapas de centrifugação, filtração, concentração do eluato com fluxo baixo de nitrogênio, o extrato final ainda apresentava coloração marrom escuro, causando excessiva quantidade de interferentes no sistema CL-EM/EM, supressão de sinal, e perda da eficiência do método.

Foram feitos novos experimentos com a utilização de 5 mL de urina com o intuito de melhorar a recuperação dos analitos, diminuir os interferentes no extrato final e, conseqüentemente a supressão de sinal. Testes com diferentes proporções de solventes nas etapas de lavagem e eluição do cartucho de EFS, bem como a tentativa de precipitação de proteínas após a etapa de hidrólise foram realizados.

Para avaliar se as proteínas da urina poderiam ser removidas na etapa após a hidrólise, foram feitos dois procedimentos, utilizando sulfato de amônio para provocar o efeito *salting out* e acetonitrila.

Para tentar melhorar o aspecto do extrato e diminuir a inserção de interferentes no equipamento, foram testadas proporções distintas de solvente de lavagem da EFS. Sabidamente, quanto maior a proporção do solvente orgânico na solução de lavagem, maior remoção de interferentes será feita. O que se deseja, entretanto, é manter uma proporção que não comprometa a recuperação dos analitos, que não os remova do cartucho antes do solvente utilizado para eluição. O procedimento consistiu em utilizar diferentes quantidades de metanol, variando a mesma de 0% a 40% de metanol na solução aquosa acidificada com 2% de ácido fórmico, nas quantidades de 0%, 5%, 10%, 20%, 30% e 40%, em duplicata apenas no nível de 1 ng mL^{-1} de concentração.

A partir da escolha do melhor procedimento de lavagem foi definido o segundo procedimento, o qual consistiu em testar o melhor solvente de eluição, partindo de acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetona (AC), em duplicata no nível de 1 ng mL^{-1} de concentração, com o intuito de melhorar a limpeza do extrato, e diminuir a supressão de sinal.

3.6 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Para a avaliação tanto dos resultados dos experimentos durante a otimização do método analítico e a validação, quanto das análises das amostras reais, foram utilizados critérios da União Europeia e Centers for Disease Control - CDC para avaliação dos resultados obtidos. A qualificação foi feita mediante a identificação das transições selecionadas em MRM no espectrômetro e a razão entre os íons quantificador (a transição de maior abundância) e qualificador (uma transição de menor abundância) (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016; CDC, 2013).

De maneira prática, foi construída uma planilha em Excel®, onde ao serem introduzidas as áreas de cada transição, já era calculada a razão dos íons e o critério de aceitação desta razão que variava em $\pm 30\%$ do valor médio obtido na curva de calibração injetada no mesmo dia do experimento. Nos experimentos de validação, a média utilizada foi das razões dos experimentos fortificados depois do método. Na análise das amostras reais, quando foi injetada diariamente uma curva na matriz, foram comparadas as áreas, mas para efeito de qualificação, foram utilizadas as razões das curvas na matriz (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016), (CDC, 2013).

Como a integração das áreas foi verificada uma a uma, de todos os experimentos, a relação sinal-ruído observada era a que o software de aquisição e tratamento dos resultados Xcalibur® calculava. Se fosse menor que 10, a área era descartada. Apesar das normas recomendarem que a relação sinal-ruído fosse maior ou igual 3, foi observado durante o processo de integração das áreas, que para o algoritmo utilizado pelo software do equipamento, uma relação menor que 10 representava um sinal muito baixo, da mesma intensidade ou menor ainda que os sinais gerados no ruído.

O tempo de retenção utilizado como critério de qualificação era sempre o tempo observado na mistura padrão injetada no mesmo dia do experimento. Nos experimentos de validação e na análise das amostras reais, também foram observadas variações de 0,5 a 1 minuto no tempo de retenção, ao longo de uma mesma sequência de injeção.

Tal fato não foi relatado em nenhum trabalho científico consultado, mas uma nota em um site especializado em cromatografia aponta para algumas possibilidades de causas, sendo uma delas a alteração da superfície da fase estacionária que pode ser modificada pelos componentes das amostras injetadas previamente. Alguns grupamentos silanóis podem se ligar com componentes do analito, o que causa a mudança de polaridade da fase estacionária (CRAWFORD SCIENTIFIC; LC-GC MAGAZINE). Há o relato de variações inter-dias, e que o tempo deve variar numa faixa aceitável pré-estabelecida (CDC, 2013).

Dessa forma, para não perder a possibilidade de comparar o tempo de retenção da curva padrão com as amostras, eram injetadas na mesma sequência, pelo menos três pontos da curva de calibração no início da sequência de injeções e no final dela para que fosse possível essa avaliação e comparação. Ainda que tenha ocorrido alteração do tempo de retenção, a integração manual a partir da observação individual de cada analito, em cada amostra, possibilitou a correção desta distorção.

Os resultados encontrados para cis e trans DCCA foram relacionados ao 3-PBA. A avaliação do padrão interno deve direcionar para a aceitação ou necessidade de reinjeção ou reanálise da amostra (CDC, 2013).

3.7 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação utilizados neste trabalho foram baseados na normativa do Inmetro DOQ-CGCRE-008 Revisão 4, de julho de 2011, que orienta a validação de métodos analíticos. A avaliação da maioria dos parâmetros foi realizada, mas os parâmetros de reprodutibilidade, robustez e comparações interlaboratoriais não puderam ser executados pela dificuldade de estabelecimento de cooperação com algum laboratório que dispusesse de equipamento semelhante, durante o período de execução deste trabalho.

Foram realizados testes de seletividade, linearidade, sensibilidade, faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Não foi avaliada a linearidade além da faixa de trabalho.

Foram coletados 1000 mL de urina de 3 voluntários profissionais do laboratório e após a fortificação, as urinas foram congeladas e mantidas em freezer à $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos experimentos de validação, o que demorou sete dias desde a coleta.

3.7.1 Seletividade

Para a demonstração da seletividade do método foram feitas fortificações nas concentrações de 0,5 e 5 ng mL⁻¹ em dois *pools* compostos por 3 urinas diferentes, com aspectos visuais distintos, e também uma análise em água tipo I, nas mesmas concentrações. As fortificações foram feitas antes e depois do método analítico, a fim de se determinar o percentual de recuperação dos analitos no método.

Os valores de porcentagem de recuperação foram comparados e foi aplicado o teste t de Student para comparação das médias (BRITO et al., 2003) (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

Para a avaliação do efeito matriz, foram comparados os resultados obtidos no experimento de seletividade (os de fortificação depois do método) com os resultados dos pontos das curvas de calibração equivalentes aos pontos de fortificação em solvente a fim

de se avaliar o percentual da perda (supressão) ou ganho de sinal, o que acaba sendo uma forma de expressar o efeito matriz do método.

Para a quantificação específica do efeito matriz, utiliza-se a equação abaixo:

$$\% \text{ efeito matriz} = \left(\frac{\text{Resposta pós - extração da amostra fortificada}}{\text{Resposta da Solução padrão}} \right) \times 100$$

A porcentagem aceitável foi de $\pm 15\%$ ($85\% < EM < 115\%$), como descrito na literatura (PERIAT et al., 2016). Valores abaixo de 85% foram considerados como supressão iônica, e acima de 115% como aumento de ionização.

3.7.2 Linearidade

Inicialmente foi produzida a curva de calibração dos analitos em solvente para avaliação da linearidade da resposta do equipamento em função ao aumento da concentração. A faixa desta curva foi escolhida em função da concentração que se esperava encontrar nas urinas, considerando estudos publicados em outros países, levando em conta o fator de concentração das amostras de 50 vezes, partindo de 5 mL de urina para o volume de 100 μL . A curva de calibração do equipamento tem seus valores demonstrados na tabela 14.

Tabela 14: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração

Metabólitos	Ponto 1 ng mL ⁻¹	Ponto 2 ng mL ⁻¹	Ponto 3 ng mL ⁻¹	Ponto 4 ng mL ⁻¹	Ponto 5 ng mL ⁻¹
cis DCCA	250	500	750	1000	1250
trans DCCA	250	500	750	1000	1250
DBCA	250	500	750	1000	1250
4FPBA	25	125	250	500	750
3PBA	25	125	250	500	750

Para o DBCA e DCCA a lógica da construção da curva não seguiu o fator de concentração, pois esses padrões são comercializados a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e não se dispunha de padrão suficiente para os pontos mais altos da curva. Por outro lado, se na curva da urina fosse diminuída a faixa de concentração, haveria dificuldade de identificação no equipamento, dada sua baixa resposta.

A curva de calibração na urina seguiu, portanto, para o 3-PBA e 4-FPBA, o mesmo intervalo da curva para calibração do equipamento, tendo seus valores demonstrados individualmente na tabela 15.

Tabela 15: Concentrações dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração para urina.

Metabólitos	Ponto 1 ng mL⁻¹	Ponto 2 ng mL⁻¹	Ponto 3 ng mL⁻¹	Ponto 4 ng mL⁻¹	Ponto 5 ng mL⁻¹
cis DCCA	10	20	30	40	50
trans DCCA	10	20	30	40	50
DBCA	10	20	30	40	50
4-FPBA	0,5	2,5	5	10	15
3-PBA	0,5	2,5	5	10	15

Foram feitas 3 replicatas para cada ponto da curva, de todo o preparo, já que pela orientação do Inmetro, o número de replicatas deve estar de acordo com o que é executado na rotina do laboratório e, em função dos custos dos cartuchos de extração em fase sólida, só é feita uma análise para cada amostra.

A transição de maior intensidade foi considerada para a quantificação dos metabólitos e, partir dela, com a utilização da equação da reta $y = ax + b$ foi possível fazer a determinação dos coeficientes linear (**b**) e angular (**a**), sendo **y** a resposta medida, e **x** a concentração.

A construção da curva de calibração foi feita através de regressão linear, e os valores aberrantes foram desconsiderados através da aplicação do teste de Grubbs (INMETRO, 2011). Os valores aberrantes (maior e menor) foram calculados pela fórmula a seguir, sendo:

$$G = \frac{\left(y_i - \bar{y} \right)}{s}$$

Onde y_i é o valor suspeito de ser aberrante, \bar{y} é a média dos valores obtidos para uma determinada concentração e s é o desvio padrão dos valores obtidos.

O critério para aceitar tanto o ponto superior quanto o ponto inferior é: se G calculado $< G$ tabelado, o valor suspeito não é aberrante; se G calculado $> G$ tabelado, o valor suspeito é considerado aberrante. O valor de G tabelado para 3 replicatas é de 1,15.

A homocedasticidade da curva de calibração também foi testada com a utilização do teste de Cochran (INMETRO, 2011).

$$C = \frac{s_{max}^2}{k \sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}},$$

Onde s_{max}^2 é a maior variância encontrada, s_i^2 é a soma de todas as variâncias de todas as concentrações da curva de calibração.

O critério para aceitar tanto o ponto superior quanto o ponto inferior é: se C calculado < C tabelado, o método analítico é homocedástico; se C calculado > C tabelado, o método analítico é heterocedástico. O valor de C tabelado para 3 replicatas em 5 níveis de concentração é de 0,684.

A sensibilidade do método é a razão da variação da resposta, por concentração, e é calculada por $S = dx / dc$, sendo S = sensibilidade, dx = variação da resposta do íon alvo e dc = variação da concentração (ng mL^{-1}). A sensibilidade foi expressa pelo coeficiente angular da reta de calibração, em unidades arbitrárias (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

3.7.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi determinada a partir da curva de calibração que foi produzida para a avaliação do parâmetro de linearidade, e levou em consideração a recuperação média obtida em cada ponto de fortificação.

Não foi avaliada toda a faixa linear, com a inclusão de pontos de maiores valores de concentração na curva elaborada.

3.7.4 Limite de detecção do método

O limite de detecção foi determinado a partir de 7 replicatas do ponto 1 da curva de calibração, feitas em dois dias diferentes. Esse ponto corresponde às concentrações de 0,5 ng mL⁻¹ para 3-PBA e 4-FPBA e de 10 ng mL⁻¹ para DBCA e DCCA. A partir dos resultados, o limite de detecção foi calculado a partir da expressão:

$$LD = t(n-1, 1-\alpha) \cdot s$$

Onde t é a distribuição de *Student*, para $n-1$ graus de liberdade, e grau de confiança de $1-\alpha$, e s é o desvio padrão do menor ponto de fortificação da faixa linear de trabalho (INMETRO, 2011), (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

O valor de t tabelado para 6 graus de liberdade com um intervalo de confiança de 95% é de 1,943, que foi usado para o cálculo do LD.

3.7.5 Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento (LDE) foi calculado da mesma forma que o limite de detecção do método, com injeções de 7 replicatas do menor ponto da curva de calibração em metanol, sendo:

$$LDE = t(n-1, 1-\alpha) \cdot s$$

Onde t é a abcissa da distribuição de *Student*, para $n-1$ graus de liberdade, e grau de confiança de $1-\alpha$, e s é o desvio padrão do menor ponto da curva de calibração em metanol (INMETRO, 2011), (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

O valor de t tabelado para 6 graus de liberdade com um intervalo de confiança de 95% é de 1,943, que foi usado para o cálculo do LDE.

3.7.6 Limite de quantificação do método

O limite de quantificação foi determinado a partir de 7 replicatas do ponto 1 da curva de calibração, feitas em dois dias diferentes. Esse ponto corresponde às concentrações de 0,5 ng mL⁻¹ para 3-PBA e 4-FPBA e de 10 ng mL⁻¹ para DBCA e DCCA. A partir dos resultados, o limite de quantificação foi calculado a partir da expressão:

$$LQ = 10 \times s$$

Onde s é o desvio padrão das 7 replicatas no ponto 1 da curva, com urina fortificada, que corresponde ao menor ponto da curva de calibração, por conseguinte, ao limite inferior da faixa de trabalho (INMETRO, 2011), (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

3.7.7 Recuperação

A recuperação foi avaliada através das fortificações de 3 replicatas em 3 pontos da curva de calibração, um baixo, um intermediário e um alto (pontos 1, 3 e 5). A primeira fortificação foi feita antes da execução do método analítico, correspondendo à concentração obtida e a segunda fortificação foi feita depois da execução do método, correspondendo a 100% de recuperação. Foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação para cada ponto da curva. O critério utilizado para que o método fosse considerado aceitável foi a recuperação média de todos os pontos compreendida na faixa de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

Assim, para melhor ilustrar o cálculo da recuperação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração adicionada}} \times 100$$

3.7.8 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada em termos de sua repetibilidade e precisão intermediária. Não foi avaliada a reprodutibilidade e robustez em toda sua extensão, nem foram feitas comparações interlaboratoriais.

3.7.8.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada para o mesmo analista em ensaios realizados em um mesmo dia (intradia), através do desvio padrão e coeficiente de variação entre as replicatas. Também foi avaliada pela comparação com ensaios realizados pelo mesmo analista em dias seguidos (interdia). Para todos os resultados foi aplicado o teste de

Grubbs, descrito anteriormente, e o ponto da curva de calibração só foi incluído quando não apresentava valores aberrantes.

3.7.8.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pela repetição do método analítico por dois analistas diferentes no mesmo dia. Foram feitas 2 replicatas em 3 pontos da curva de calibração e o resultado expresso através do desvio padrão e do coeficiente de variação entre as medidas observadas. No total foram comparadas 12 medidas.

3.8 AMOSTRAGEM

Um dos principais desafios deste trabalho foi a obtenção de uma amostra representativa da população adulta da cidade do Rio de Janeiro e, para que esse intuito se cumprisse, era necessário que qualquer morador acima de 18 anos da cidade tivesse a mesma probabilidade de ser sorteado. Por esta razão, não foram excluídos locais perigosos, de difícil acesso, enfim, todos os setores censitários da cidade foram considerados.

3.8.1 CARACTERIZAÇÃO DO INQUÉRITO POPULACIONAL

O inquérito foi realizado na cidade do Rio de Janeiro, que tem pela estimativa do IBGE de 2016, 6.498.837 pessoas, morando em 2.408.891 domicílios particulares, sendo moradores de área urbana distribuídos em 1.200.179 km², atribuindo densidade demográfica de 5.265,82 hab/km² (IBGE, 2016).

O desenho para coleta das amostras foi feito para que as mesmas fossem distribuídas em domicílios do município do Rio de Janeiro, através de estudo seccional por inquérito de base populacional com amostragem por conglomerados em dois estágios.

A população de estudo foi definida como sendo pessoas maiores de 18 anos, moradores da área urbana, o que foi redundante, pois no IBGE não há classificação rural para nenhum setor censitário da cidade, e que não trabalhasse em agricultura ou atividade que envolvesse o uso de insumos agrícolas.

3.8.2 CÁLCULO DO N AMOSTRAL REPRESENTATIVO DA POPULAÇÃO

O cálculo do número de participantes foi feito tomando como base a frequência de exposição a metabólitos de piretroides em outros estudos publicados. Ainda que não exista nenhum dado quantitativo no Brasil, alguns estudos qualitativos e percepção de risco realizados no país, inclusive no Estado do Rio de Janeiro, demonstram uma frequência elevada de uso de inseticidas domésticos nas residências, variando de 67% a 92% de relato de uso (MELLO; ROZEMBERG; CASTRO, 2015), (CÂMARA NETO; AUGUSTO, 2000), (DIEL; FACCHINI; DALL'AGNOL, 2003), (CORRÊA, 2005).

Sendo assim, foi considerada uma probabilidade mínima de 70% para a detecção de algum metabólito nos indivíduos participantes. O cálculo foi baseado na estimativa por amostragem aleatória simples, considerando-se um erro amostral de 5%, e um nível de confiança de 95%, além da proporção já mencionada de 70% (SILVA, 2004). Sendo a população considerada infinita, para quantidade acima de 100.000, a expressão utilizada para o cálculo foi:

$$n = \frac{Z^2 \times p \times (1 - p)}{e^2}$$

Onde:

n - amostra calculada

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança, nesse caso de 1,96 para intervalo de confiança de 95% (SNEDECOR; COCHRAN, 1996)

p - probabilidade do evento, neste caso considerada de no mínimo 70%

e - erro amostral, considerado de 5%

O valor de n obtido, ou seja, o tamanho da amostra representativa da população do município do Rio de Janeiro foi de 323 indivíduos.

A correlação existente entre indivíduos pertencentes a um mesmo conglomerado causa efeitos na variância, pois estes conglomerados estão relacionados a uma distribuição física da população e por isso não são distribuídos de forma randômica. Quando a razão de homogeneidade intrasetor é positiva, ela provoca o efeito de delineamento maior que 1, significando que o conglomerado tem maior variância que a variância por amostragem aleatória simples (KISH, 1995).

Na prática, a razão de homogeneidade é maior que zero, e para minimizar os fatores seletivos de agrupamento e exposição semelhante a mesmas influências, ou a combinação destes fatores, foi utilizado o efeito de delineamento (KISH, 1995).

Considerando o efeito de delineamento de 1,95, que multiplica o valor de n, sendo este fator útil para corrigir a homogeneidade da variância intrasetor censitário, o valor de n ficou em 630 indivíduos. Acrescentando-se 10% de perdas pela recusa, ausência, entre outros fatores, o n final ficou em 693, com a inserção de mais 2 amostras por setor censitário sorteado. A perda não foi inserida no cálculo do efeito de delineamento.

O efeito de delineamento foi dado por:

$$deff = 1 + \rho (b - 1)$$

Onde:

deff – efeito de delineamento

ρ - razão de homogeneidade intrasetor, 0,05 (KISH, 1995)

b – domicílios em cada setor, 20 (quantidade de coletas em um dia)

Este número ideal de domicílios foi calculado levando em consideração o custo da amostragem por conglomerados, a possibilidade de execução e a razão de homogeneidade dentro do setor que deve ser considerada de 0,05 (KISH, 1995).

$$b = \frac{\sqrt{\text{custo do conglomerado}}}{\text{custo por elemento}} \times \frac{\sqrt{1 - \rho}}{\rho}$$

Os indivíduos foram selecionados através de amostragem por conglomerados em dois estágios.

A seleção foi então realizada considerando a divisão geográfica do município do Rio de Janeiro por Regiões Administrativas, sendo estas 33, descritas pelo IBGE, com o intuito de garantir a distribuição geográfica das amostras pela cidade. Os bairros da cidade com o total da população de cada um estão no Anexo 2.

O número de setores foi calculado pela razão de n total, com a previsão de 10% de perdas, por b com a adição das 2 perdas por setor, obtendo-se o valor de 32.

$$n^{\circ} \text{ de setores} = \frac{n \text{ amostral}}{b}$$

Assim, para o sorteio de primeiro estágio, os setores censitários do município do Rio de Janeiro foram dispostos em ordem crescente de sua numeração e foram somados os domicílios de cada setor censitário, numa planilha de Excel®. Foi feita a amostragem

sistemática com probabilidade proporcional ao tamanho dos conglomerados, pela razão do número de domicílios (2.408.891) pelo número de setores.

$$\textit{intervalo de amostragem 1º estágio} = \frac{\textit{total de domicílios}}{\textit{nº de setores}}$$

O intervalo acumulado foi de 75.278 domicílios. Para registrar o primeiro setor, foi feito um sorteio aleatório no intervalo de 1 a 75.278, tendo sido sorteado aleatoriamente o setor de ordem 36.533. A tabela com os setores sorteados encontra-se no Anexo 3.

O segundo estágio foi determinado pela seleção aleatória de um endereço dentro do setor censitário sorteado no primeiro estágio, e se seguiu na lista de endereços do setor por 22 endereços, ou 22 domicílios pela fração de amostragem na listagem de endereços do IBGE, o cadastro nacional de endereços para fins estatísticos (IBGE, 2015), desde que fosse classificado como domicílio particular (KISH, 1995).

$$\textit{fração de amostragem} = \textit{fração no 1º estágio} \times \textit{fração no 2º estágio}$$

$$\textit{fração no 2º estágio} = \frac{\textit{b (com perda)}}{246} = \frac{22}{246} = \frac{1}{11}$$

Aos 22 endereços sorteados no segundo estágio foi enviada uma correspondência para avisar de que seriam visitados pela equipe (Anexo 6), num dia determinado, para serem entrevistados e fornecerem uma amostra de urina para análise de metabólitos de piretróides.

A logística de coleta foi organizada de forma que a equipe composta por 4 pessoas realizava a ida à campo. No período de março a junho de 2015 foram feitas 32 coletas, em 32 bairros, alguns dias com 3, outros dias com 4 entrevistadores, todos tendo sido treinados na abordagem aos participantes e realização das entrevistas (Anexo 4).

A lista de endereços sorteados era dividida entre os integrantes do trabalho de campo e a abordagem era feita através do contato inicial, por toque da campanha ou interfone da residência, identificação da pesquisa e do grupo, espera da resposta e fornecimento de mais informações, caso fossem solicitadas. Quando aceitava, ao participante era explicado e lido o termo de consentimento livre e esclarecido, o qual assinava uma cópia e ficava com outra cópia assinada por ele e pelo membro da equipe que o entrevistou. Era feita a aplicação do questionário estruturado com perguntas

fechadas, em sua maioria, e o participante fornecia uma amostra de urina em frasco fornecido pela pesquisa. As amostras eram identificadas e condicionadas em *cooler* com gelo reciclável e levadas ao final do dia ao laboratório, quando eram congeladas e agrupadas pelo setor censitário.

Em cada domicílio foi recrutado um participante que atendesse aos requisitos da pesquisa. Em um domicílio houve a participação de mais de um integrante da residência, por uma questão de pedido do participante que aceitou aderir previamente.

Muitas pessoas recusaram participar da pesquisa e, neste caso, o endereço subsequente, mesmo que não tivesse sido avisado pela correspondência, era contactado e todo procedimento refeito. Na maioria das vezes, o retorno do trabalho de campo ocorreu mesmo quando não era alcançado o n diário de 22 participantes, pelo tempo necessário para o retorno dos motoristas e da equipe às suas residências.

3.9 APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E TCLE

Para se avaliar o uso de inseticidas domésticos foi utilizado um questionário de perguntas fechadas, em sua grande maioria, com perguntas elaboradas em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo do Laboratório de Toxicologia do Cesteh e outras que foram estruturadas a partir de questionários utilizados por grupos de pesquisa dos Estados Unidos (WILEN, 2002),(WILEN, 2001), o qual durava cerca de 20 minutos. As perguntas foram feitas em campo através do uso de um *tablet* com o aplicativo Mobile Research®, desenvolvido por uma empresa contratada para esta finalidade. Este procedimento economizou um tempo enorme de digitação de questionários.

O questionário foi estruturado em três grandes grupos de variáveis dependentes: as sócio-econômicas, as que caracterizavam a exposição e aquelas sobre o estado de saúde, melhor descritas na tabela 16 e está disponível na íntegra para ser consultado no Anexo 8. Estas variáveis foram relacionadas aos níveis de metabólitos encontrados na população.

Tabela 16 – Grupos de variáveis do estudo

Variáveis sócio-econômicas	Variáveis de exposição	Variáveis sobre estado de saúde
Idade	Usa inseticida	Já passou mal (o próprio ou alguém da residência)
Sexo	Quem aplica inseticida (dentro e fora da residência)	Sinais e sintomas de exposição
Renda	Insetos presentes (dentro e fora da residência)	Procura de socorro
Anos de escolaridade	Tipo de inseticida que usa (dentro e fora da residência)	Intoxicação (o próprio ou alguém da residência)
Trabalho	Tempo da última utilização (dentro e fora da residência)	Problemas de saúde
Tipo de residência	Nº de frascos e como os guarda	Uso de medicamentos
Quant. de moradores (adultos e crianças)	Criação de animais	Dengue e alergias
Sistema de água, esgoto, lixo, presença de mata	Propaganda, como escolhe o inseticida	
	Percepção sobre efeito do inseticida à saúde	
	Medo de aplicar inseticida	
	Nível de preocupação com insetos	

3.10 ASPECTOS ÉTICOS PARA COLETA DE URINA

A pesquisa foi iniciada somente após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da ENSP/FIOCRUZ, sob parecer de número 942.318, de 19/01/2015.

Todos os participantes foram informados dos termos da pesquisa e, após livre concordância, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), descrito na sua íntegra no Anexo 5. A adesão à pesquisa foi voluntária, esclarecendo-se aos sujeitos que nenhum tipo de prejuízo seria imputado aos que não desejassem participar, seja em relação à pesquisa ou às instituições envolvidas. O estudo não envolveu riscos maiores do que aqueles proporcionados por uma coleta de urina normalmente realizada para análise de EAS (Elementos Anormais e Sedimentados).

O laudo com os resultados dos níveis de metabólitos de piretróides na urina foi confeccionado e será entregue em mãos e em envelope lacrado e a publicação dos resultados não citará, em nenhuma hipótese, os nomes dos participantes do estudo. Caso o sujeito da pesquisa tenha apresentado resultados de metabólitos de piretróides na urina muito acima de valores de referência estabelecidos por agências reguladoras internacionais ou dos encontrados neste trabalho, será avisado imediatamente, pessoal e reservadamente, e orientado para ser avaliado por profissionais devidamente capacitados, no CESTEH/ENSP - FIOCRUZ.

Todos os dados coletados nesta pesquisa foram confidenciais e foi assegurado o sigilo sobre o participante. Após o prazo de cinco anos, todos os registros (questionários

e arquivos eletrônicos) da pesquisa, que se encontrarem de posse do pesquisador, serão destruídos.

3.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DOS METABÓLITOS E VARIÁVEIS QUALITATIVAS

As amostras foram analisadas com o método otimizado e validado, conforme descrito no próximo capítulo deste trabalho, sendo aplicados a elas os critérios para identificação, tanto pela qualificação quanto pela quantificação. Todo procedimento de avaliação das amostras e cálculos de concentração foi feito no software Microsoft Excel®, versão 2010.

O cálculo das concentrações de metabólitos foi feito por padronização externa, através da curva de calibração fortificada em urina, realizada em cada lote de amostras, ajustando a construção da curva pela razão de áreas entre o analito e o padrão interno adicionado nas amostras. A expressão aplicada para o cálculo da concentração foi a equação da reta.

A análise estatística descritiva de frequências das variáveis nominais e as medidas de tendência central e de dispersão das variáveis contínuas (média, desvio padrão, percentis de distribuição) foram calculadas na caracterização da amostra. A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi avaliada por meio dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5%. A diferença das distribuições das variáveis sócio-econômicas e de exposição, nos participantes cuja presença de metabólitos de piretróides foi positiva, foi avaliada utilizando-se o teste não paramétrico do Qui-quadrado de Pearson - χ^2 , adotando-se um nível de significância de 5%. Para a comparação de médias dos níveis de metabólitos, por categorias das variáveis sócio-econômicas e de exposição, aplicou-se os testes *t* de Student, ANOVA, e os não paramétricos Mann-Whitney (*U*) ou Kruskal-Wallis (*H*). Testes de correlação de Person (*r*) e de Spearman (*rho*) foram realizados para as variáveis contínuas, em função da distribuição normal e não normal, respectivamente.

Considerando o grande número de variáveis que compuseram o banco de dados, foram utilizadas duas análises multivariadas para avaliar a estrutura do conjunto de variáveis, como estas se agrupavam e estavam relacionadas, a análise de clusters com algoritmo por correlação de Pearson e a análise fatorial por Componentes Principais. As relações entre cada variável original e os novos fatores gerados na análise por

Componentes Principais foram medidas pelas cargas nos componentes que variaram de -1 a 1. Para a obtenção da estrutura simples foi utilizada a rotação varimax para agregar um menor número de variáveis sobre cada fator. Para seleção dos fatores, obedeceu-se ao critério de Kaiser, priorizando os fatores com autovalor superior a 1. Todas as análises estatísticas foram realizadas com software IBM® SPSS® Statistics, versão 20.

Os níveis basais para metabólitos de piretroides em urina foram estabelecidos através dos níveis observados na população adulta estudada da cidade do Rio de Janeiro, nos percentis 95, segundo norma americana para estabelecimento de valores de referência (HOROWITZ; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DAS MISTURAS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO

As primeiras curvas de calibração do equipamento foram obtidas em condições cromatográficas diferentes das otimizadas, mas refletem uma boa correlação (R^2), variando de 0,9962 para o DCCA a 0,9981 para 3-PBA. Os valores de área ainda estavam em contagem baixa, dadas as proporções dos solventes da fase móvel não estarem na melhor condição.

As curvas de calibração realizadas depois da otimização da cromatografia e espectrometria foram obtidas no intervalo de 25 a 750 ng mL⁻¹ para 3-PBA e 4-FPBA e na faixa de 250 a 1250 ng mL⁻¹ para o DCCA e DBCA (Figura 7).

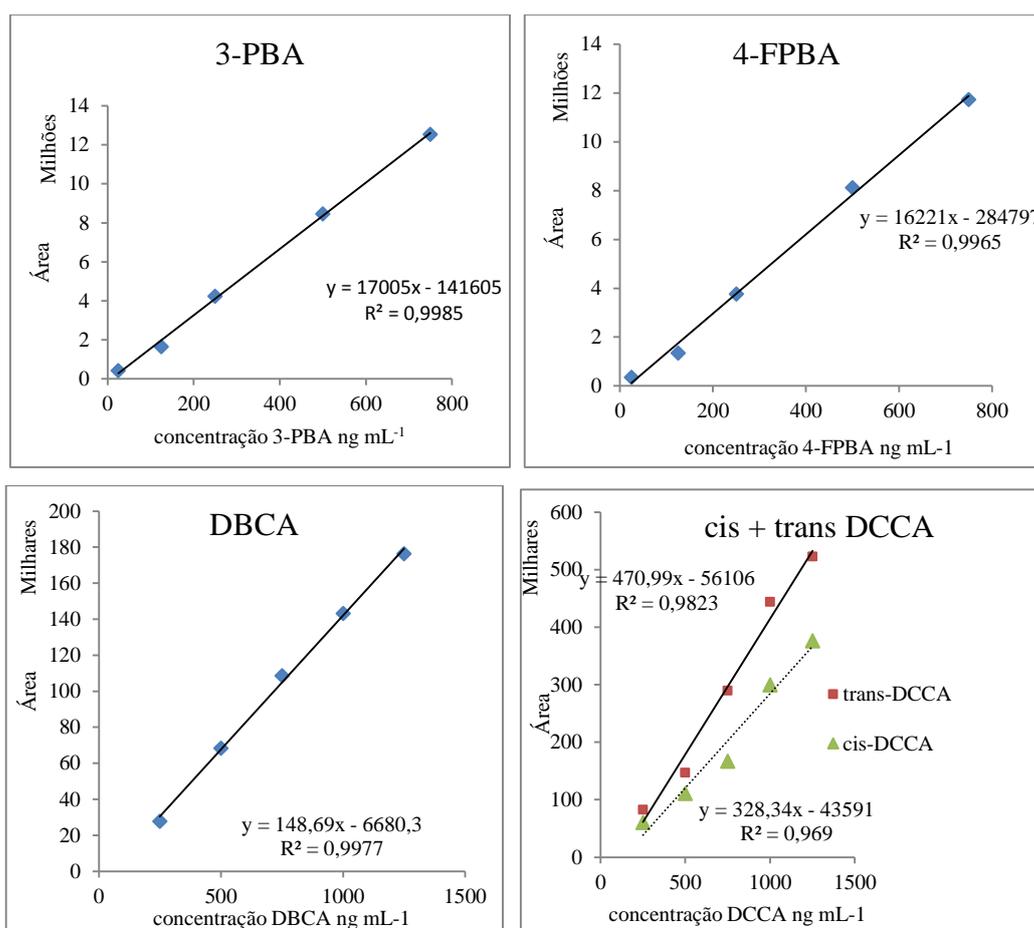


Figura 7: Curvas de calibração do equipamento para os metabólitos de piretroides.

Os valores de R^2 para 3-PBA, 4-FPBA e DBCA refletem boa correlação, esperada para uma curva construída em solvente. Os valores de R^2 para cis e trans DCCA não apresentam uma correlação esperada para um analito numa curva preparada em solvente. Isso se deve ao fato do padrão utilizado ser uma mistura racêmica sem concentração definida para cada um. A única informação sobre proporção entre eles foi no certificado de análise de um padrão muito antigo, o qual mencionava a proporção de 2:3 dos isômeros cis e trans, respectivamente. Entretanto, nos frascos utilizados neste trabalho não foi informada a proporção entre eles em nenhum dos certificados. Optou-se, dessa forma, pelo uso da expressão em ng mL^{-1} , mesmo sabendo-se que a massa reflete o somatório dos dois isômeros.

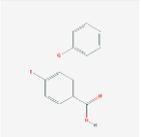
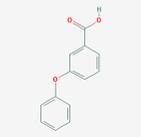
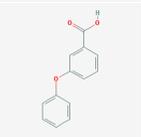
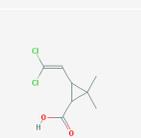
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS

4.2.1 Condições espectrométricas

As condições espectrométricas otimizadas pelo próprio equipamento e pelos ajustes manuais como o ajuste da posição da probe, modo de ionização, fluxo de solução injetado, bem como as transições do monitoramento de reações múltiplas (MRM) estão descritos nas tabelas 17, 18 e 19, que foram determinadas como as melhores para obtenção de sinais mais abundantes para todos os analitos, simultaneamente. Os resultados foram satisfatórios em relação a abundância dos sinais observados e estão compatíveis com outros trabalhos que descrevem métodos por CLAE-EM/EM (OLSSON et al., 2004), (DAVIS et al., 2013) e (LE GRAND et al., 2012).

Tabela 17: Condições otimizadas no espectrômetro de massas com triploquadrupolo.

Parâmetro	Condição Otimizada
modo de ionização	Negativo
voltagem do spray (spray voltage)	3500 V
posição da sonda (probe)	C
gás de bainha (sheath gas)	30 (unidades arbitrárias)
gás de contracorrente (ion sweep gas)	0 (unidades arbitrárias)
gás auxiliar (auxiliary gas)	10 (unidades arbitrárias)
temperatura do capilar (capillary temperature)	270°C
voltagem do capilar (capillary offset)	35 V
voltagem da lente do tubo de transferência (tube lens offset)	Para cada analito
voltagem do skimmer (skimmer offset)	0
pressão de colisão (collision pressure)	1,5 mTorr
largura do pico em Q1 (peak width)	0,7
largura do pico em Q3 (peak width)	0,3
chrom filter	3
fluxo da seringa na infusão	15 $\mu\text{L min}^{-1}$
fluxo da fase móvel na infusão	0,1 mL min^{-1}
válvula de desvio de fluxo (divert valve)	0 min – waste 4,08 – detector 11,96 – waste 20,49 – detector

Nome	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (g/mol)	pKa	CAS	Íon obs	Infusão direta	Tune Indiv ESI neg	MRM Pressão Colisão: 1,5mTor
4-Fluoro-3-phenoxybenzoic acid (4-FPBA)		C ₁₃ H ₉ FO ₃	232,21	3,1	77279-89-1	230,8	Conc: 0,5 ppm Infusão: 15µL/min Com FM 95% ACN e 5% H ₂ O Fluxo: 0,2mL/min	SV: 3500 SG: 30 AG: 5 CT: 270 TL: -50,8 IN: 3e6	187,3-15V 93,3-47V TL: -89
3-phenoxybenzoic acid (3-PBA-C13)		C ₆ H ₅ O C ₆ H ₄ COOH	220,2	3,9	3739-38-6	218,9	Conc: 0,5 ppm Infusão: 15µL/min Com FM 95% ACN e 5% H ₂ O Fluxo: 0,2mL/min	SV: 4000 SG: 20 AG: 5 CT: 270 TL: -58,3 IN: 1,5e6	99,3-32V 175,2-15V TL: -106,6
3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)		C ₁₃ H ₁₀ O ₃	214,217	3,9	3739-38-6	212,9	Conc: 0,5 ppm Infusão: 15µL/min Com FM 95% ACN e 5% H ₂ O Fluxo: 0,2mL/min	SV: 4000 SG: 30 AG: 5 CT: 270 TL: -58,3 IN: 2,5e6	93,3-26V 169,2-16V TL: -100
cis-3-(2,2-Dibromovinyl)-2,2-dimethyl 1 cyclopropane carboxylic acid (DBCA)		C ₈ H ₁₀ Br ₂ O ₂	297,972	3,4	63597-73-9	296,7 Isôm. cis	Conc: 0,5 ppm Infusão: 15µL/min Com FM 95% ACN e 5% H ₂ O Fluxo: 0,2mL/min	SV: 3500 SG: 20 AG: 5 CT: 270 TL: -20,3 IN: 3e5	79,2-63V 81,2-63V 185,3-21V TL: -96
3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl 1 cyclopropane carboxylic acid (DCCA)		C ₈ H ₁₀ Cl ₂ O ₂	209,070	3,3	55701-05-8	206,72 208,75 cis/trans 2/3	Conc: 0,5 ppm Infusão: 15µL/min Com FM 95% ACN e 5% H ₂ O Fluxo: 0,2mL/min	SV: 3500 SG: 30 AG: 5 CT: 270 TL: -47,5 IN: 9e5	206,72 TL: -97 35,63-16V 143,1-29V 208,75 TL: -104 37,63-16V 143,1-29V

Fonte: Estruturas químicas foram retiradas do site : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

SV: Spray Voltage; SG: Sheath Gas; AG: Auxiliary Gas; CT: Capillary Temperature; TL: Tube Lens; IN: Intensity; CE: Collision Energy

Tabela 19: Transições do monitoramento de reações múltiplas.

Metabólito	Transições mais abundantes **		Energia de Colisão (V)	Tube Lens (V)
	(m/z)			
	Íon precursor	Íon Produto		
DCCA	206,7	35,6	16	97
	206,7	206,7	2	97
	208,7	37,6 *	16	97
DBCA	208,7	208,7 *	2	97
	294,7	79,2	63	96
	296,7	81,2 *	63	96
4FPBA	230,8	93,3	47	89
	230,8	187,3	15	89
3PBA	212,9	93,3	26	100
	212,9	169,2	16	100
3PBA-C ₁₃ (PI)	218,9	99,3	32	106
	218,9	175,2	15	106

* isótopos naturais

** íons precursores e íons produtos desprotonados

4.2.2 Condições cromatográficas

Apesar de terem sido testadas colunas de fase reversa com tamanhos de partículas, diâmetros e comprimentos diferentes, bem como algumas fases estacionárias diferentes, não foi possível fazer a separação cromatográfica com resolução adequada. Foram testadas várias colunas, C₁₈, C₈ e Fenil, porque os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA coeluíam. Os isômeros cis e trans foram separados, tal qual normalmente é relatado na literatura (OLSSON et al., 2004). A avaliação da separação dos interferentes presentes na urina também foi feita com as mesmas colunas, sendo a C₁₈ a coluna que proporcionou melhor separação de interferentes.

Dos 5 analitos, apenas o DBCA apresentou tempo de retenção diferente dos demais, o que está de acordo com o descrito por Olsson, que também só obteve separação cromatográfica para este analito (OLSSON et al., 2004). Outros métodos que fazem identificação por CG-EM, com derivatização dos metabólitos conseguiram obter separação cromatográfica (TAO et al., 2013; LE GRAND et al., 2012). Os metabólitos e o padrão interno foram diferenciados pelas

suas transições de MRM. Nas figuras 8 e 9 estão demonstrados um cromatograma de íons totais e os analitos coeluídos, um cromatograma com as transições de MRM extraídas, respectivamente.

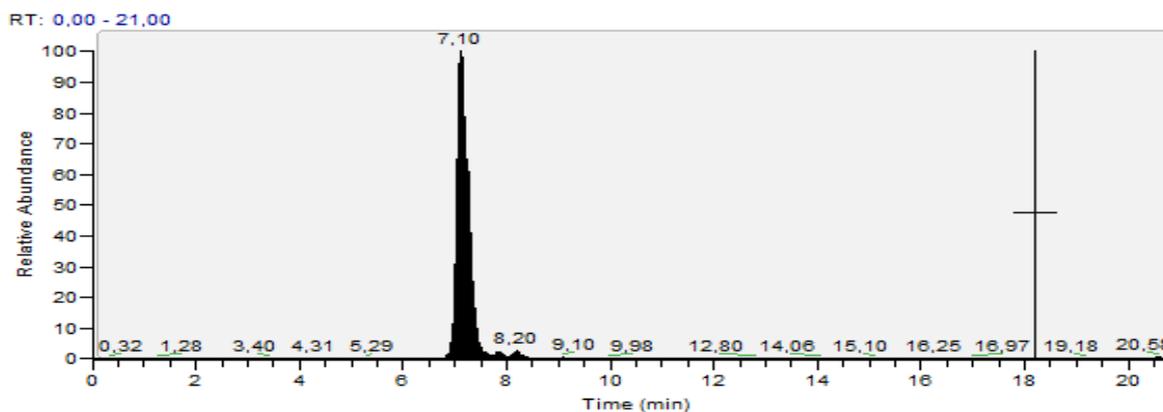
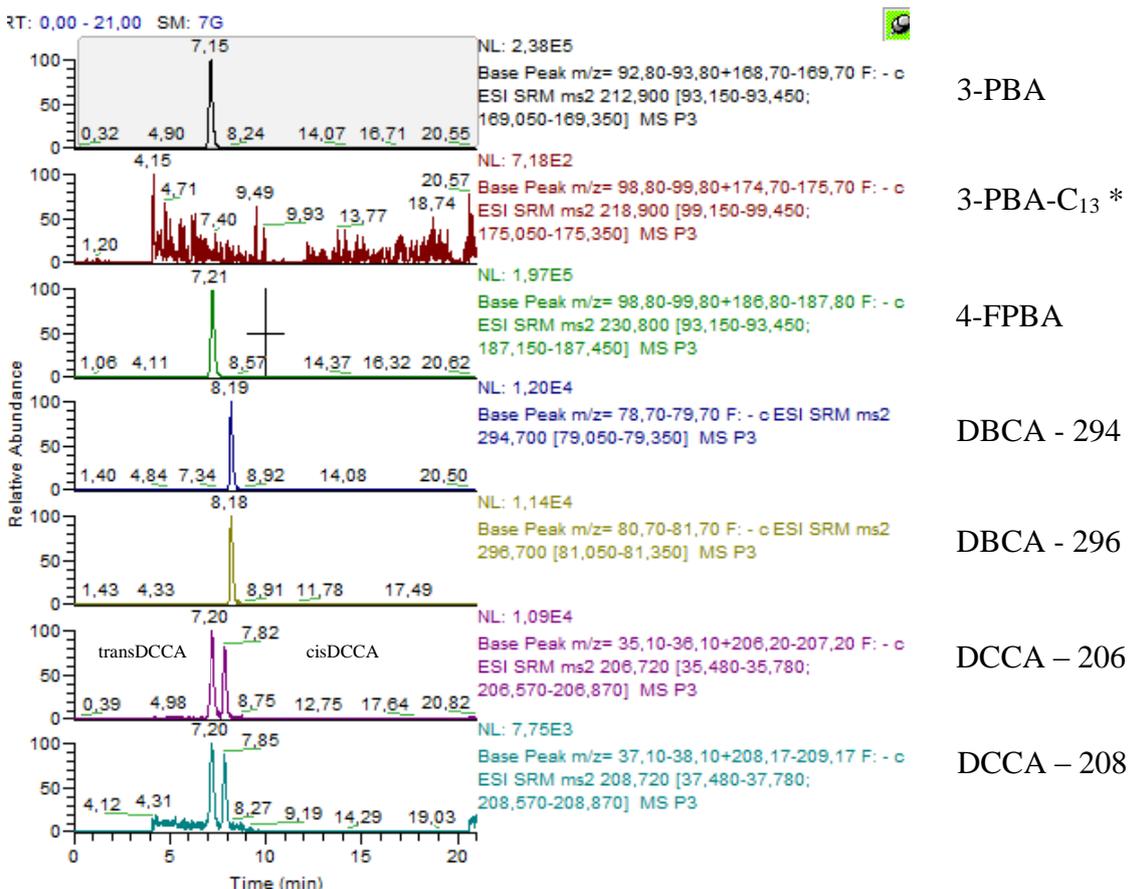


Figura 8: Cromatograma de íons totais, mistura de piretróides a 250 ng mL^{-1} (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL^{-1} (DBCA e DCCA) preparada em solvente.



* analito ausente na mistura padrão

Figura 9: Cromatograma com MRM extraídas, mistura de metabólitos a 250 ng mL^{-1} (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL^{-1} (DBCA e DCCA) preparada em solvente.

O fator de resposta do injetor foi testado a partir da injeção de uma mistura padrão a 200 ng mL⁻¹ nos volumes de 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 25 µL e para o 3-PBA foi verificado que a partir de 15 µL, a resposta começava a decrescer (Figura 10). Os demais analitos continuaram com uma resposta linear até 20 µL. DCCA e DBCA não foram avaliados pois não havia padrões disponíveis durante a realização deste teste. O mesmo comportamento foi observado para uma urina fortificada com 200 ng mL⁻¹. Sendo assim, o volume de injeção definido foi de 15 µL.

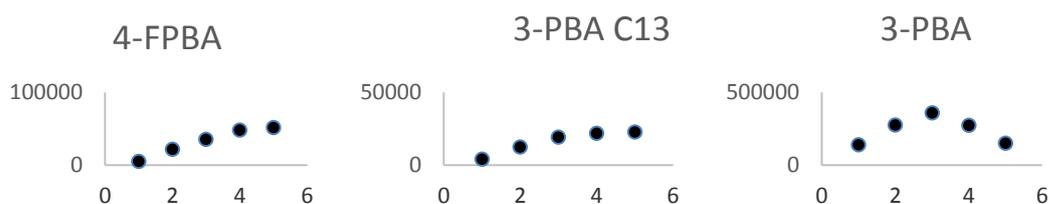


Figura 10: Fator de resposta do injetor.

Para o teste do modo de injeção permitido no software Xcalibur®, *loop* total, *loop* parcial ou *no waste* foram obtidos valores de áreas maiores e com menor coeficiente de variação entre as replicatas para o modo de injeção *loop* parcial, cujos resultados estão expressos na tabela 20.

Tabela 20: Áreas e coeficientes de variação para injeções nos diferentes modos de injeção do equipamento, a partir de mistura de metabólitos a 500 ng mL⁻¹.

Metabólitos	Loop total	Loop parcial	No waste
	Área CV	Área CV	Área CV
cis DCCA	24371 10%	33916 9%	28637 9%
trans DCCA	21002 15%	42787 7%	34625 10%
DBCA	143670 7%	191275 6%	166679 8%
4-FPBA	3343418 5%	4873489 5%	3103322 6%
3-PBA	6520227 8%	9819745 5%	6018420 7%
3PBA – C ₁₃	3567538 7%	4875441 5%	3213296 5%

Pelas condições que foram testadas e outras que foram determinadas por funcionarem em concordância com o que normalmente é descrito em outros trabalhos científicos, estão apresentadas as condições cromatográficas otimizadas na tabela 21.

Tabela 21: Condições otimizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Parâmetro	Condição Otimizada
volume de injeção	15 μL
volume de descarga	1000 μL
altura da agulha até o fundo do vial	2 mm
volume de lavagem	1500 μL
velocidade de descarga	100 $\mu\text{L s}^{-1}$
velocidade da seringa	8 $\mu\text{L s}^{-1}$
modo de injeção	partial loop
temperatura da bandeja de amostras	20°C
temperatura do forno da coluna	30°C
coluna cromatográfica	ACE Excel 2 100 mm x 2,1 mm x 2 μm
fluxo da fase móvel na coluna	0,3 mL min ⁻¹
gradiente de fase móvel	0 – 1 min → 65 % A + 35 % B
A – água tipo I (pH 5,5)	1 – 4 min → 50 % A + 50 % B
B – acetonitrila com 0,05% de ácido acético	4 – 12 min → 5 % A + 95 % B
(pH = 4,8)	12 – 12,5 min → 65 % A + 35 % B
	12,5 – 21 min → 65 % A + 35 % B

4.2.3 Otimização do método de extração

Os experimentos para escolha do método por ELL ou EFS foram realizados com a pretensão de avaliação do maior número possível de metabólitos de piretroides em urina. Todos os experimentos foram feitos nas concentrações de 1 ng mL⁻¹ e/ou 4 ng mL⁻¹.

No experimento onde foram avaliados os métodos ELL1, ELL2, EFS1 e EFS2, com a utilização de hidrólise ácida (HA) ou enzimática (HE), foram observados resultados com áreas muito baixas, próximas ao ruído. Os resultados dos experimentos EFS1-HE, EFS1-HA, EFS2-HA, ELL1-HA, ELL2-HA não foram aproveitados, pois as áreas obtidas ficaram abaixo de 10³ de intensidade e o aspecto do extrato apresentou coloração escura. Os valores de recuperação não puderam ser calculados em função da incoerência das áreas das fortificações anteriores ao método de extração, e das fortificações feitas ao final do método de extração.

Já para os experimentos EFS2-HE, ELL1-HE e ELL2-HE os valores de recuperação ficaram abaixo de 50%, e somente o experimento EFS2-HE continuou a ser otimizado. Os resultados insatisfatórios de recuperação para o ELL1-HE variaram de 33% a 260% de recuperação para os metabólitos, e no experimento ELL2-HE, de 27,2% a 168%. No experimento EFS2-HE, os valores variaram de 62 a 124%.

Na execução dos outros testes, os valores de recuperação para os procedimentos EFS3, EFS4, EFS5, EFS6 e EFS7 ficaram em sua maioria compreendidos fora da faixa aceitável pelos critérios da EU, de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016). Apenas para o 3-PBA foi aceitável (Tabela 22). Para o 4-FPBA a maioria dos experimentos não promoveu boa recuperação, e para o DBCA e DCCA, a maioria dos experimentos foi feita sem eles, pois estavam em processo de aquisição.

Assim, o critério que foi adotado para a escolha do método que ainda pudesse ser melhorado quanto ao limite de quantificação, efeito matriz pela limpeza do extrato, foi o procedimento EFS3. No final de toda avaliação, o método otimizado com as adaptações de condicionamento, lavagem e eluição foi o que mais se aproximou do método de Olsson (OLSSON et al., 2004).

Tabela 22: Resultados de recuperação (em %) dos experimentos de otimização.

Metabólitos	EFS2	EFS3	EFS4	EFS5	EFS6	EFS7
DCCA (cis + trans)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DBCA	259	ND	ND	NA	NA	NA
4-FPBA	191	70,7	22,1	28,0	25,1	66,6
3-PBA	111,3	79,7	54,7	84,5	95,2	59,1

NA – não avaliado, experimento realizado sem este padrão.

ND – não detectado.

Utilizando o procedimento EFS3, foi testada a influência dos pH 3, 5 e 7 na resposta do método (Tabela 23). Neste experimento não foi avaliada a recuperação, mas os valores de pH que apresentaram áreas acima de 10^5 , numa média de triplicatas. O valor de pH em que foram obtidas maiores áreas foi o pH 5, com coeficiente de variação menor que 10%, além de oferecer vantagem prática, já que este é o pH fisiológico da urina. O processo de desconjugação do metabólito do ácido glicurônico preferencialmente ocorre em pH 4,7 e o pH natural da urina de 5 é adequado para favorecer a reação de hidrólise enzimática (GOMES et al., 2009). Caso o pH ideal para a ionização dos analitos fosse 3 ou 7, seria necessário o ajuste após a etapa de desconjugação.

Tabela 23: Influência do pH na recuperação do método.

Metabólitos	pH 3	pH 5	pH 7
DCCA (cis + trans)	21	10	13*
DBCA	19	23	19*
4-FPBA	15457	17206	14562
3-PBA	20143	40337	34412

* ruído = ND

Na avaliação da influência do tempo de hidrólise, o procedimento de tempo de hidrólise de 2 horas a 55°C apresentou resultados de recuperação dentro da faixa de 70% a 120% (Tabela 24), o que não está de acordo com a maioria dos métodos descritos, quando normalmente é utilizada a hidrólise *overnight* (CDC, 2013), (BABINA et al., 2012), (OLSSON et al., 2004), (TAO et al., 2013), (LE GRAND et al., 2012), (BAKER; OLSSON; BARR, 2004). Entretanto, pela economia de tempo e possibilidade do experimento poder ser realizado no mesmo dia, e

pelos valores de recuperação terem ficado dentro da faixa aceitável, optou-se por utilizar o tempo de hidrólise de 2 horas a 55°C.

Tabela 24: Resultados de recuperação (%) obtidos em diferentes tempos de hidrólise.

Metabólitos	Hidrólise overnight (37°C/ 17h)	Hidrólise em 2h a 55 °C
DCCA (cis + trans)	NA	NA
DBCA	228,2	105,4
4-FPBA	73,6	105,2
3-PBA	49,5	118,4

Para testar a influência da filtração do extrato final, foram comparadas as recuperações do extrato não filtrado com o extrato filtrado com filtro de seringa de PTFE com diâmetro de poro de 0,22 µm (Tabela 25). Observou-se também que as áreas eram quase o dobro no extrato filtrado, apesar das recuperações em ambos os casos ficarem dentro da faixa aceitável para três metabólitos, levando à conclusão que a filtração realmente removeu interferentes que causaram supressão do sinal no extrato não filtrado.

Tabela 25: Resultados de recuperação considerando a influência da filtração do extrato final.

Metabólitos	Recuperação com filtro (%)	Recuperação sem filtro (%)
DCCA (cis + trans)	91,7	172
DBCA	56,4	59
4-FPBA	112	125
3-PBA	85	79

Na tentativa de remoção de proteínas e melhorar o aspecto do extrato, foram feitos dois procedimentos de precipitação de proteínas. Em nenhum dos dois procedimentos ocorreu a precipitação, através de visualização a olho nú. Nos procedimentos descritos na literatura consultada não houve o relato de remoção de proteínas por alguma etapa adicional.

A fim de manter a recuperação dentro da faixa aceitável e proporcionar menor supressão iônica para que a sensibilidade do método não fosse afetada pela presença de interferentes foram testadas diferentes soluções de lavagem do cartucho de EFS.

Os resultados para a solução de lavagem contendo de 10% a 40% de metanol e 1% de ácido acético em solução aquosa não apresentaram diferenças significativas, para o teste t de comparação de médias ($p > 0,05$) de recuperação dos analitos. Apesar do aspecto do extrato ser melhor nas maiores proporções de metanol, optou-se pela solução de 10% de metanol na solução de lavagem para que influenciasse menos na recuperação do DCCA e DBCA quando estes pudessem estar presentes nos ensaios futuramente realizados. Os testes de 10%, 20%, 30% e 40% foram realizados sem a presença destes compostos na mistura de fortificação, pois o padrão não estava disponível.

Na tabela 26, os resultados estão descritos de forma resumida, como a média da recuperação de uma duplicata na concentração de 1 ng mL^{-1} . Este resultado está coerente com os descritos na literatura, que apresentaram proporções na solução de lavagem que variaram de 5% a 25% de metanol (DAVIS et al., 2013), (TAO et al., 2013), (OLSSON et al., 2004), (BAKER; OLSSON; BARR, 2004). Na segunda coluna estão descritos os valores percentuais de supressão iônica, tomando-se como referência de 100% de resposta uma solução a 50 ng mL^{-1} , que corresponde à concentração que estaria presente na amostra após a EFS, partindo-se de 5 mL de urina até 100 μL de extrato, cujo fator de concentração é de 50 vezes.

Tabela 26: Média da recuperação com diferentes soluções de lavagem

	0%		5%		10%		20%		30%		40%	
	% REC	% EM										
DCCA (cis + trans)	18	NA	22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DBCA	10	NA	24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4FPBA	26	6	34	5	94	16	94	15	95	7	98	5
3PBA	ND	NA	ND	NA	105	20	98	12	94	10	106	4

ND – não detectado

NA – não avaliado

% EM – Percentagem de Efeito matriz, o efeito de supressão seria 100 - EM

% REC – Percentagem de Recuperação

$p_{\text{valor}} > 0,05$ para comparação entre as recuperações

A faixa aceitável para efeito matriz é de 85% a 115%, sendo abaixo de 85% considerado supressão iônica. Os valores de supressão para este procedimento foram muito altos, o que não é descrito na literatura pra esses metabólitos. No capítulo sobre os resultados de seletividade do método será discutido esse excessivo efeito de supressão.

A partir da escolha do melhor procedimento de lavagem, foi definido o segundo procedimento, o qual consistiu em testar o melhor solvente de eluição, partindo de acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetona (AC), em duplicata, no nível de 1 ng mL⁻¹, com o intuito de melhorar a limpeza do extrato, e diminuir a supressão de sinal.

Na tabela 27, os resultados estão descritos de forma resumida, como a média da recuperação de uma duplicata na concentração de 1 ng mL⁻¹. Este resultado também está coerente com os descritos na literatura, que apresentam como solventes mais utilizados para a eluição do cartucho de EFS tanto o metanol, quanto a acetona e a acetonitrila (DAVIS et al., 2013), (TAO et al., 2013), (OLSSON et al., 2004), (BAKER; OLSSON; BARR, 2004). Entretanto, não é verificada diferença entre as performances dos solventes, sendo os três igualmente citados por diferentes autores. Neste trabalho foram encontradas diferenças significativas entre os solventes, sendo a acetonitrila o solvente que apresentou melhores resultados de recuperação para 3-PBA e 4-FPBA.

Tabela 27: Média da recuperação com diferentes solventes de eluição

	ACN		MeOH		AC	
	% REC	% supressão iônica	% REC	% supressão iônica	% REC	% supressão iônica
DCCA (cis + trans)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DBCA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4-FPBA	94	3	28	2	66	4
3-PBA	105	1	85	9	59	2

NA – não avaliado

Como pode ser observado nos resultados de otimização, os metabólitos DBCA e DCCA não foram avaliados em diversos testes. Isto ocorreu pois os padrões destes analitos são comercializados em ampolas contendo 1 mL de solução a 10 µg mL⁻¹, enquanto os outros a 100 ou 1000 µg mL⁻¹. Além de ser necessário no mínimo 10 vezes mais volume que os demais, eles têm resposta inferior que os outros, e por isso devem ser fortificados sempre em concentrações maiores que os demais, por conseguinte com maiores volumes. Na etapa de otimização, em vários experimentos eles foram adicionados a 1 ng mL⁻¹, o que impossibilitava sua detecção.

Em suma, não foi possível prover toda quantidade de padrão necessária para o desenvolvimento do método de identificação desses dois analitos.

4.2.4 Condições de EFS otimizadas

A metodologia empregada se baseou na hidrólise enzimática para desconjugação dos analitos do ácido glicurônico e posterior extração dos metabólitos da urina através da extração em fase sólida com fase HLB (*Hidrophilic Lipophilic Balance*). Após a extração, as amostras foram concentradas à secura, ressuspensas e injetadas em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas com triplo quadrupolo.

O método consistiu em aliquotar 5 mL de urina descongelada a temperatura ambiente, adicionar 2,0 mL de tampão acetato (acetato de sódio/ácido acético a 0,2 mol L⁻¹) e 400 µL de β-glicuronidase a ≈1000 U e realizar hidrólise enzimática com incubação por 2 h a 55°C. Posteriormente foi feita extração em fase sólida com cartucho hidrofílico-hidrofóbico, Oasis® HLB 60 mg/3 mL, previamente condicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de acetonitrila e 3 mL de ácido acético a 1%. Depois, o cartucho foi lavado com 1,5 mL de uma solução de metanol a 10% e ácido acético a 1% em água tipo I. O cartucho foi seco por 10 minutos com a utilização de vácuo. Para eluição dos analitos, foram utilizados 3 mL de acetonitrila. O eluato foi evaporado a 1 mL e a 0,5 mL, sendo rinsado o tubo com acetonitrila e, quando o volume atingiu 0,5 mL, o eluato foi passado em filtro de seringa de PTFE 13 mm e 0,22 µm com seringa plástica de 1 mL, e transferido para um eppendorf. O eluato final foi evaporado à secura e ressuspenso com 10µL 3PBA-C13 (padrão interno), adicionado à 90µL de uma solução metanol:água (50:50 v/v).

Na figura 11, um fluxograma esquemático do procedimento detalha toda a marcha analítica otimizada do preparo de amostras para avaliação dos metabólitos de piretroides. Os cromatogramas obtidos são apresentados na figura 12.

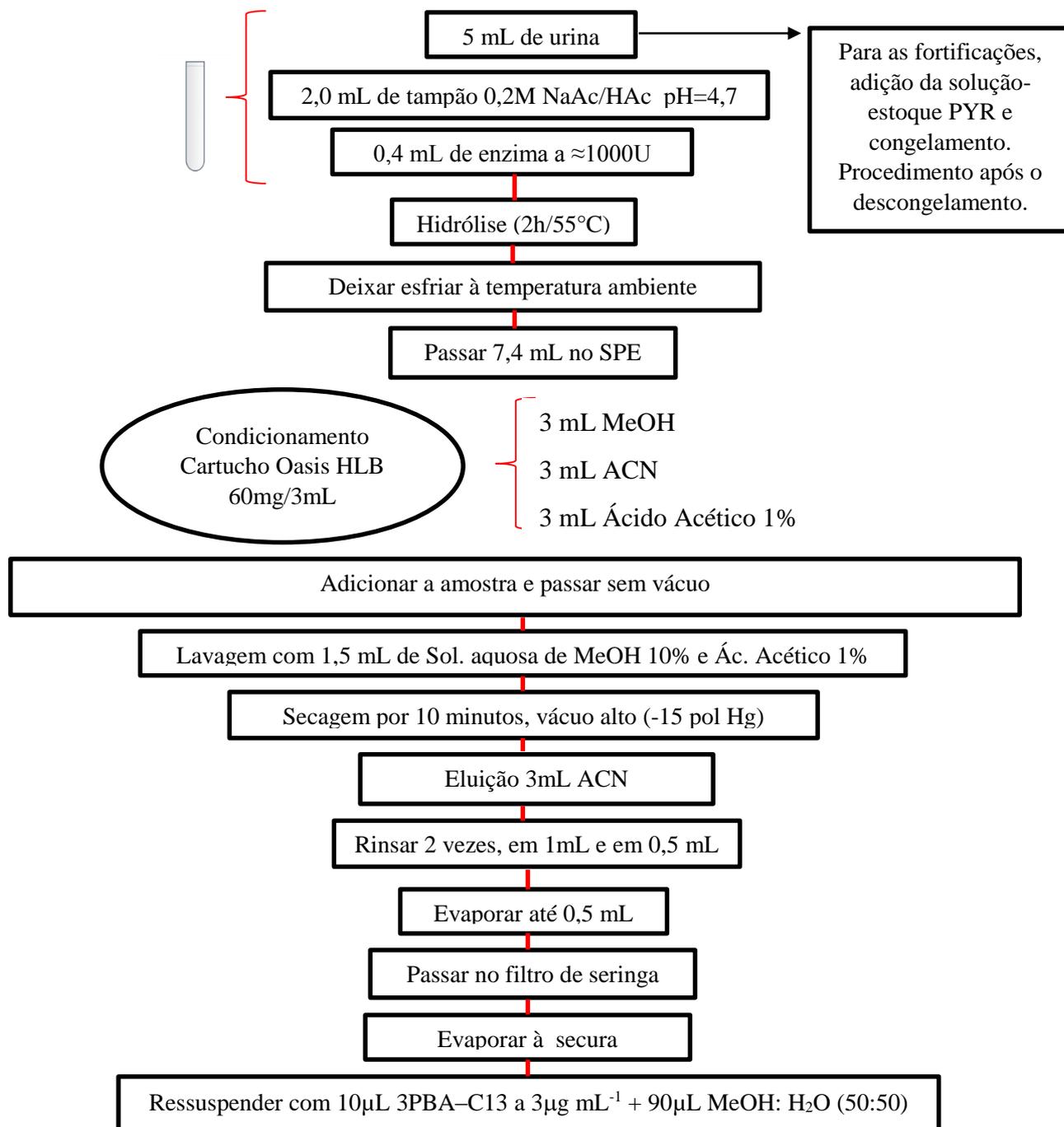


Figura 11: Fluxograma do procedimento de extração de metabólitos da urina.

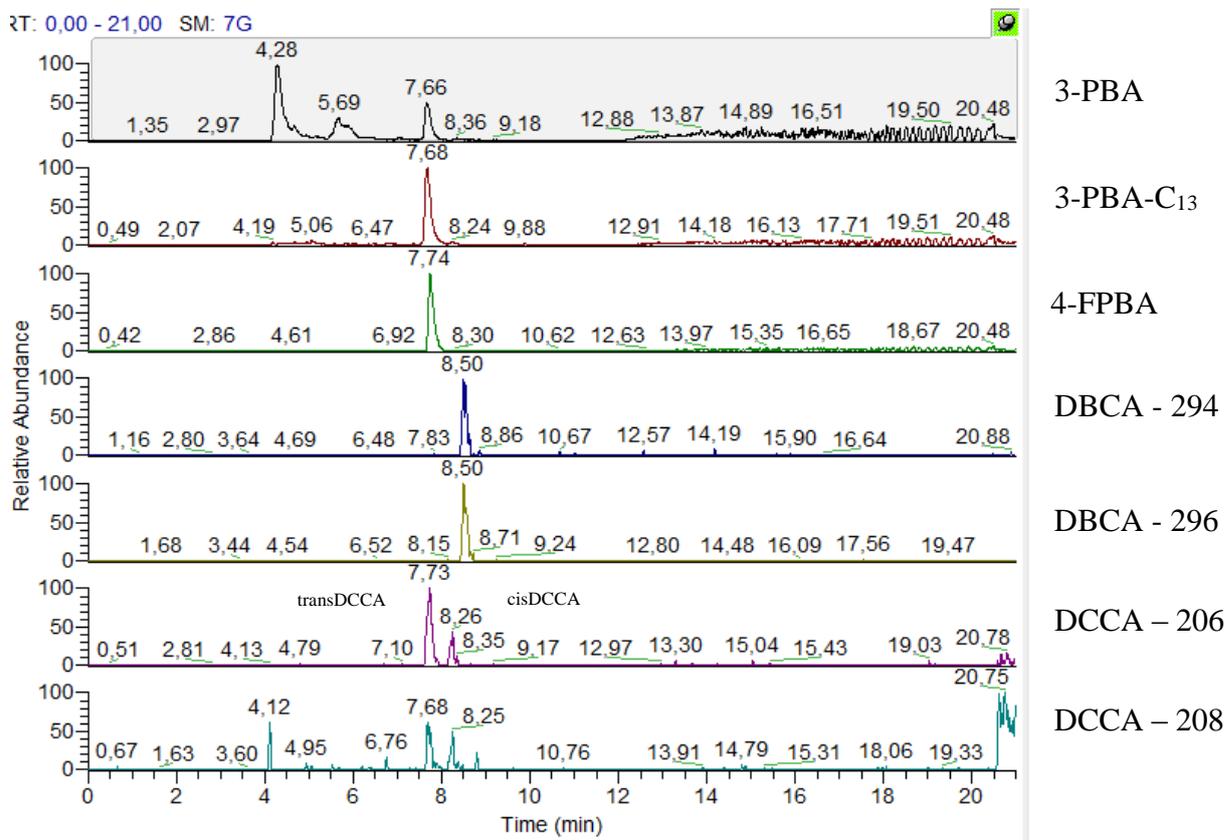


Figura 12: Cromatogramas com MRM extraídos, numa amostra de urina fortificada com uma mistura de metabólitos a 250 ng mL^{-1} (3-PBA e 4-FPBA) e 750 ng mL^{-1} (DBCA e DCCA), no extrato final, ou 5 ng mL^{-1} (3-PBA e 4-FPBA) e 30 ng mL^{-1} (DBCA e DCCA) na urina inicial.

4.3 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS

4.3.1 Parâmetros de validação

4.3.1.1 Seletividade

A matriz urina apresenta diversos interferentes para a análise dos metabólitos de piretroides e, portanto, a comparação dos resultados de fortificações em urinas diferentes, com quantidades diferentes de interferentes pode assegurar que o método é confiável para o que se dispõe. A presença de interferentes altera principalmente a razão dos íons produto nas duas transições selecionadas para cada analito e, para controlar essa relação, deve ser observada, através de injeções de padrões e amostras fortificadas, a razão, e estabelecer o critério para aceitar ou não a área do íon encontrado.

Na tabela 28 estão especificados, por analito, as faixas de razão de íons e de tempo de retenção, calculados a partir das áreas e tempos das replicatas de urina de todos os pontos da curva.

Para compostos não halogenados, a razão de íons pode ser determinada pela soma e subtração de 30% da razão de íons obtida das soluções dos padrões em solvente (CDC, 2013).

As transições de MRM (monitoramento de reações múltiplas) foram escolhidas a partir da solução-estoque de cada metabólito e foram verificadas nos pools de urina e na água a fim de garantir que os interferentes presentes na matriz urina não comprometiam a capacidade de monitoramento das transições importantes à qualificação e quantificação dos metabólitos de interesse.

O método foi baseado na diluição isotópica em CLAE-EM/EM (BAKER; OLSSON; BARR, 2004) para qualificação e quantificação, consistindo na identificação pela razão dos íons quantificador e qualificador e nos procedimentos para quantificação, pela razão das áreas dos íons quantificador do analito pela área do quantificador do padrão interno marcado isotopicamente, para a construção do eixo y da curva de calibração.

Nos experimentos de validação os metabólitos DBCA e DCCA foram adicionados, porém em concentrações menores do que as necessárias para que fosse garantida boa performance do método.

Tabela 28: Critérios para aceitabilidade das razões de íons.

Metabólitos	Faixa de razão dos íons do CDC	Faixa de razão de íons na solução padrão	Faixa de tempo de retenção
cis-DCCA	-	4,27 – 7,94	8,17 ± 0,25 min
trans – DCCA	0,88 -1,64	3,12 – 5,80	7,63 ± 0,20 min
DBCA	0,74 - 1,38	0,68 – 1,28	8,46 ± 0,20 min
4-FPBA	0,48 - 0,90	1,28 - 2,37	7,69 ± 0,25 min
3-PBA	0,70 - 1,30	0,68 – 1,27	7,65 ± 0,25 min
3-PBA-C13 (PI)	-	0,79 – 1,47	7,63 ± 0,25 min

PI – Padrão Interno
Fonte: (CDC, 2013)

As faixas de aceitação para qualificação dos analitos ficaram comparáveis às faixas descritas no procedimento do CDC para 3-PBA e DBCA (Tabela 29). Entretanto, para os analitos DCCA e 4-FPBA, as razões ficaram muito discrepantes. Não foi possível comparar esses resultados com outros métodos, pois os que são relatados em artigos científicos não descrevem tão detalhadamente seus critérios, apenas os citam. Apesar de não estarem comparáveis a um método já estabelecido, decidiu-se pela aceitação das razões, dada sua repetição nos outros ensaios de validação.

Tabela 29: Razões de íons nos “pools” de urina e água.

Metabólitos	Faixa de razão de íons na solução padrão	Razão de	Razão de	Razão de	Teste	Teste	Teste
		íons no Pool 1 Média 2 conc	íons no Pool 2 Média 2 conc	íons na Água Média 2 conc	F _{calc} 1 e 2 Ponto3	F _{calc} 1 e H ₂ O Ponto3	F _{calc} 2 e H ₂ O Ponto3
cis-DCCA	4,27 – 7,94	6,44	7,53	6,01	28,8	44,5	1,54
trans - DCCA	3,12 – 5,80	5,81	4,43	5,23	29,7	1,56	0,052
DBCA	0,68 – 1,28	0,96	0,97	0,92	1,02	1,52	1,52
4-FPBA	1,28 - 2,37	1,89	1,85	1,97	5,21	1,96	0,37
3-PBA	0,68 – 1,27	0,92	1,06	0,89	1,46	5,32	3,64
3PBA-C13 (PI)	0,79 – 1,47	1,13	1,15	1,13	0,62	2,21	3,53

PI – Padrão Interno

F para n = 3, gl = 2, F_{tab} = 9

Fonte: (CDC, 2013)

O teste F permitiu comparar as variâncias entre dois *pools* de urinas diferentes e também comparar cada *pool* com a fortificação da água com o ponto 3 da fortificação das urinas. Para a maioria dos testes feitos, F calculado foi menor que F tabelado, rejeitando a hipótese de que as variâncias dos dois grupos são diferentes, sendo elas, portanto, estatisticamente iguais. Assim, a matriz não interfere na razão de íons, muito embora se possa observar valores muito maiores ou muito menores que 1. Para os isômeros do DCCA, entretanto, os valores de F foram maiores que o tabelado, sendo a matriz, portanto, um importante influenciador da razão de íons e da qualificação destes analitos.

A seletividade para os isômeros do DCCA ocorreu pelo uso do cloro como íons produto qualificador. Apesar dos inúmeros testes com energias de colisão diferentes e tantos outros parâmetros do espectrômetro, não foi possível encontrar outros íons de maior massa molecular.

Apesar deste problema, foi utilizada a razão entre os isótopos naturais, tanto do cloro, como do bromo (para o DBCA) para qualificação dos íons (BAKER; OLSSON; BARR, 2004).

A partir dos dados de recuperação, observou-se que apenas os analitos 3-PBA e 4-FPBA tiveram valores de recuperação dentro da faixa aceitável pelos critérios da norma europeia e puderam ser quantificados (Tabela 30). Os analitos cis e trans DCCA e o DBCA não puderam ser quantificados. Não foi identificada em qual etapa da extração ocorreu perda do analito, ocasionando a recuperação precária (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

Tabela 30: Recuperações nos “pools” de urina e água.

Metabólitos	Pool 1	Pool 1	Pool 2	Pool 2	H ₂ O	H ₂ O
	% de rec Ponto1	% de rec Ponto3	% de rec Ponto1	% de rec Ponto3	% de rec Ponto1	% de rec Ponto3
cis-DCCA	33	180	33	42	ND	ND
trans - DCCA	24	200	25	39	ND	ND
DBCA	29	160	23	44	25	34
4-FPBA	118	104	70	65	55	75
3-PBA	125	98	68	72	60	65

ND – Não detectado

Não foi evidenciado um efeito importante por influência da matriz na recuperação dos analitos 3-PBA e 4-FPBA.

O efeito matriz, propriamente dito, foi calculado a partir da razão da área fortificada no ponto 3, pela área na curva de solvente, multiplicando por 100.

Dessa forma, o efeito matriz para o 3-PBA foi de 42%, para o 4-FPBA de 48%, para o DBCA de 34%, para o cis-DCCA de 55% e para o trans-DCCA foi de 21%. Para todos os analitos foi verificada a supressão iônica, causada pela presença de interferentes, sais, proteínas, que alteram a formação das gotas no spray. Isso é amplamente discutido na literatura e outros métodos relatam também esse fenômeno (OLSSON et al., 2004), (BAKER; OLSSON; BARR, 2004). Le Grand e Davis relatam não terem observado no método desenvolvido pelos seus grupos, com valores de supressão de 2% e 10%, respectivamente, o que é atípico (LE GRAND et al., 2012), (DAVIS et al., 2013). Apesar da alta supressão o método apresentou um limite de quantificação satisfatório para dois analitos, 3-PBA e 4-FPBA, o que não inviabilizou sua aplicação.

4.3.1.2 Linearidade

A curva de calibração construída em metanol permitiu a compreensão da linearidade da resposta do equipamento, sem considerar o efeito da matriz urina sobre a resposta do espectrômetro de massas. Os resultados da equação da reta e coeficiente de correlação entre as variáveis concentração e resposta do detector estão expressos na tabela 31.

Tabela 31: Equação da reta em metanol.

Metabólitos	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear da reta (r)
cis-DCCA	$y = 11775 x - 56106$	0,9912
trans-DCCA	$y = 8208 x - 43591$	0,9843
DBCA	$y = 104 x - 2745$	0,9952
4-FPBA	$y = 6713 x - 117820$	0,9987
3-PBA	$y = 7084 x - 27669$	0,9973

A curva de calibração na urina seguiu, portanto, o mesmo intervalo da curva para calibração do equipamento, tendo seus valores de transição de maior intensidade demonstrados individualmente na tabela 32. Os valores gerados a partir das três replicatas foram analisados se eram discrepantes ou não a partir do teste de Grubbs. Todos os resultados não se mostraram discrepantes após a aplicação do teste, tendo sido, portanto, aproveitados para a construção da equação da reta.

Os coeficientes de variação da curva da urina ficaram em sua maioria abaixo de 20%, que é o mais aceito. Entretanto, pontualmente, ficaram acima de 20%. De uma maneira geral, observou-se que os pontos 1, 2 e 4 apresentaram maiores valores de CV.

A homocedasticidade, ou homogeneidade da variância dos resíduos, foi testada pelo teste de Cochran e os resultados estão demonstrados na tabela 33. Os metabólitos apresentaram resultados heterocedásticos, mas ainda puderam ser avaliados com a utilização do modelo de regressão linear simples nas amostras reais (Tabela 34).

O modelo ponderado usualmente é utilizado para resultados heterocedásticos, entretanto, foram testados os dois modelos sendo a correlação ponderada $r = 0,996$ para o 4-FPBA e $r = 0,995$ para o 3-PBA. Desta forma optou-se pelo modelo de regressão linear simples.

Tabela 32: Intensidade do íon de maior abundância dos metabólitos em cada ponto da curva de calibração na urina, expresso pelo valor médio das 3 replicatas.

Metabólitos	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4		Ponto 5	
	ng mL ⁻¹		ng mL ⁻¹		ng mL ⁻¹		ng mL ⁻¹		ng mL ⁻¹	
	Gsup_inf	CV (%)								
cis-DCCA	11051	ACEITO 18	32228	ACEITO 16	42783	ACEITO 8	65202	ACEITO 25	103875	ACEITO 12
trans-DCCA	5239	ACEITO 14	21365	ACEITO 3	26910	ACEITO 6	26810	ACEITO 14	61759	ACEITO 4
DBCA	14764	ACEITO 30	39512	ACEITO 14	58184	ACEITO 2	54554	ACEITO 9	93998	ACEITO 6
4-FPBA	64616	ACEITO 20	268346	ACEITO 10	645084	ACEITO 4	1210410	ACEITO 19	1919277	ACEITO 2
3-PBA	146917	ACEITO 19	315470	ACEITO 7	627045	ACEITO 5	1163015	ACEITO 18	1621471	ACEITO 4
3PBA-C13 (PI)	583587	ACEITO 2	706467	ACEITO 16	743823	ACEITO 10	508919	ACEITO 20	751606	ACEITO 20

PI – Padrão Interno

G_{sup_inf} - Resultado de Grubbs para os valores superior e inferior entre as 3 replicatas

CV - Coeficiente de variação entre as 3 replicatas

Tabela 33: Resultados da homocedasticidade.

Metabólitos	Teste de Cochran C_{calc} *	Condição de Homocedasticidade
cis-DCCA	0,565	HOMOCEDÁSTICO
trans-DCCA	0,624	HOMOCEDÁSTICO
DBCA	0,275	HOMOCEDÁSTICO
4-FPBA	0,936	HETEROCEDÁSTICO
3-PBA	0,879	HETEROCEDÁSTICO

* C_{tab} para l =2, 5 níveis é 0,684

Tabela 34: Equação da reta em urina.

Metabólitos	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear da reta (R)
cis-DCCA	$y = 2296 x + 15656$	0,9605
trans-DCCA	$y = 1377 x - 9050$	0,9658
DBCA	$y = 1949 x - 1992$	0,9966
4-FPBA	$y = 127638 x - 21299$	0,9988
3-PBA	$y = 103173 x + 89630$	0,9992

A sensibilidade foi expressa pelo coeficiente angular da reta de calibração, em unidades arbitrárias e está demonstrada na tabela 35.

Tabela 35: Sensibilidade expressa pelo coeficiente angular da equação da reta em urina.

Metabólitos	Coefficiente Angular
cis-DCCA	2296
trans-DCCA	1377
DBCA	1949
4-FPBA	127638
3-PBA	103173

A diferença da magnitude entre os coeficientes dos analitos 3-PBA e 4-FPBA e os do DBCA e isômeros do DCCA demonstraram a sensibilidade cerca de 100 vezes menor destes últimos em relação aos primeiros. O método tem maior capacidade de detectar menores variações de concentração para 3-PBA e 4-FPBA do que pra os demais.

4.3.1.3 Faixa de trabalho

Usualmente a faixa de trabalho está compreendida dentro da faixa linear, que é mais ampla. Neste trabalho apenas a faixa de trabalho foi determinada, através da mesma curva de calibração utilizada para a linearidade, considerando a recuperação média nos pontos inferior e superior da curva.

A tabela 36 apresenta a faixa linear de trabalho, mostrando o limite inferior e superior em ng mL^{-1} para os metabólitos. O intervalo de linearidade variou de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ a 15 ng mL^{-1} para 3-PBA e 4-FPBA e de 10 ng mL^{-1} a 50 ng mL^{-1} para DCCA e DBCA, em função das diferentes respostas que os analitos apresentaram.

Tabela 36: Faixa de trabalho linear e seus limites superior e inferior.

Metabólitos	Faixa de trabalho Limite inferior ng mL^{-1}	Faixa de trabalho Limite superior ng mL^{-1}
DCCA (cis + trans)	10	50
DBCA	10	50
4-FPBA	0,5	15
3-PBA	0,5	15

4.3.1.4 Limite de detecção do método

O limite de detecção observado variou em função da diferença de resposta do espectrômetro de massas para estes analitos e a influência do método de extração. Para os ácidos fenoxibenzóicos os limites foram aproximadamente $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$. Para os ácidos ciclopropanóicos, os limites variaram entre 7 a 17 ng mL^{-1} .

Os limites de detecção para os analitos 3-PBA e 4-FPBA são parecidos aos descritos na literatura, embora muitos relatem o limite de detecção como sendo o limite de quantificação (OLSSON et al., 2004), (DAVIS et al., 2013).

De uma maneira geral, os métodos que utilizam a CG-EM/EM apresentam menores valores de limite de detecção que os que utilizam CLAE-EM/EM, sendo para o 3-PBA os limites relatados entre 0,02 a 0,06 ng mL⁻¹ (BARR et al., 2007),(LENG; GRIES, 2005),(TAO et al., 2013). Para os métodos que utilizam CLAE-EM/EM, os valores de LD variaram entre 0,1 a 0,5 ng mL⁻¹ (FERLAND et al., 2015), (BABINA et al., 2012), (OLSSON et al., 2004), (CDC, 2013), (DAVIS et al., 2013). O único método que relata 0,02 ng mL⁻¹ em sistema de cromatografia líquida é de um laboratório francês (LE GRAND et al., 2012). A maioria dos autores utilizam a relação sinal/ruído multiplicado por 3 para calcularem o limite de detecção do método.

Dessa forma, o método desenvolvido neste trabalho apresenta limites de detecção adequados.

Para o DBCA e DCCA, os valores de limite estão muito acima dos limites descritos, reiterando que para estes analitos não foi possível a detecção em níveis esperados para a exposição populacional. Além disso, os coeficientes de variação para estes analitos também tiveram valores acima do que é aceitável para uma análise de resíduos (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

4.3.1.4.1 Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção para o equipamento também variou pelos mesmos motivos apresentados acima e os limites para cada analito estão demonstrados na tabela 37.

Tabela 37: Limites de detecção do equipamento

Metabólitos	Conc. Ponto 1 ng mL⁻¹	CV (%)	LDE* ng mL⁻¹
cis-DCCA	10	35	16
trans-DCCA	10	40	17
DBCA	10	32	7
4-FPBA	0,5	8	0,05
3-PBA	0,5	6,5	0,06

* determinado em solvente orgânico, não na matriz.

LD = t.s, com t para 6 graus de liberdade (1,94).

4.3.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado para os analitos que apresentaram recuperações entre 70 e 120 % na faixa linear de trabalho, como definido no critério de quantificação.

Para os ácidos fenoxibenzóicos os limites foram aproximadamente 0,2 ng mL⁻¹. Para os ácidos ciclopropanóicos, os limites variaram entre 37 a 88 ng mL⁻¹. A tabela 38 demonstra o limite de quantificação para todos agrotóxicos deste grupo.

Tabela 38: Limites de detecção e quantificação do método

Metabólitos	Conc. Ponto 1 ng mL⁻¹	CV (%)	LD** ng mL⁻¹	LQ** ng mL⁻¹
cis-DCCA	10	30	16	82
trans-DCCA	10	37	17	88
DBCA	10	33	7	37
4-FPBA	0,5	5,5	0,05	0,25
3-PBA	0,5	3,6	0,06	0,2

** t para 6 graus de liberdade (1,94).

LD = t.s e LQ = 10.s, sendo s o desvio padrão entre as replicatas.

LD – limite de detecção do método; LQ – limite de quantificação do método; CV – coeficiente de variação

4.3.1.6 Recuperação

A recuperação foi avaliada através das fortificações de 3 replicatas em 3 pontos da curva de calibração, um baixo, um intermediário e um alto (pontos 1, 3 e 5). A primeira fortificação foi feita antes da execução do método analítico, correspondendo à concentração obtida e a segunda fortificação foi feita depois da execução do método, correspondendo ao 100% de recuperação. Foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação para cada ponto da curva. O critério utilizado para que o método fosse considerado aceitável foi a recuperação média de todos os pontos compreendida na faixa de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 2016).

A tabela 39 expressa os valores de recuperação para todos os analitos. Mais uma vez, ficou demonstrado que 3-PBA e 4-FPBA apresentam valores dentro da faixa aceitável de recuperação, enquanto DCCA e DBCA muito abaixo da recuperação aceitável. Além de todos

os problemas para a avaliação destes compostos, Tao cita a etapa de evaporação como sendo crucial para a perda destes analitos, sendo necessária cautela nesta etapa para evitar a continuação do sopro de nitrogênio após a secagem, o que ele identifica como “super-secagem” (TAO et al., 2013).

Assim, para melhor ilustrar o cálculo da recuperação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração adicionada}} \times 100$$

Tabela 39: Recuperações nos pontos 1, 3 e 5.

Metabólitos	Rec % Ponto 1 ng mL⁻¹	Rec % Ponto 3 ng mL⁻¹	Rec % Ponto 5 ng mL⁻¹	Rec % média ng mL⁻¹
cis-DCCA	33	45	50	43
trans - DCCA	25	40	49	38
DBCA	29	37	54	40
4-FPBA	83	100	68	84
3-PBA	117	98	70	95

Rec% - Recuperação percentual em cada ponto

4.3.1.7 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada em termos de sua repetibilidade e precisão intermediária. Não foi avaliada a reprodutibilidade e robustez em toda sua extensão, nem foram feitas comparações interlaboratoriais.

4.3.1.7.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada para o mesmo analista através da análise de dois pontos da curva de calibração (P2 e P3) em ensaios realizados em duplicata em um mesmo dia (intradia), com a avaliação do coeficiente de variação entre as replicatas. Também foi avaliada pela comparação com mesmos ensaios realizados pelo mesmo analista em dias seguidos (interdia). Não foram avaliados critérios de repetibilidade interdia para DBCA e DCCA pelo fato dos resultados não apresentarem repetibilidade, só foram considerados os resultados intradia para estes analitos (Tabela 40).

Tabela 40: Coeficientes de variação para os testes de repetibilidade interdia e intradia.

	CV (%) Intradia		CV (%) Interdia	
	P2	P3	P2	P3
Metabólitos	P2	P3	P2	P3
trans - DCCA	9,5	16,2	NA	NA
DBCA	9,5	12,1	NA	NA
4-FPBA	6,6	7,5	5,9	5,9
3-PBA	2,4	3,3	11,6	4,8

CV – coeficiente de variação
NA – não avaliado

4.3.1.7.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada apenas pela repetição do método analítico por dois analistas no mesmo dia. Foram feitas 2 replicatas em 1 ponto (P2) da curva de calibração e o resultado expresso através do coeficiente de variação entre as medidas observadas. A tabela 41 expressa os resultados da precisão intermediária.

Tabela 41: Resultados da precisão intermediária.

	CV (%) Intradia Analista 1	CV (%) Intradia Analista 2
Metabólitos	P2	P2
trans - DCCA	9,5	10,8
DBCA	9,5	15,4
4-FPBA	6,6	2,9
3-PBA	2,4	4,5

CV – coeficiente de variação

Para os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação comparáveis aos descritos na literatura. Nos trabalhos publicados onde houve diferenciação entre os níveis de fortificação, optou-se por seleccionar os coeficientes do maior nível, por estar mais próximo do que foi utilizado nos pontos 2 e 3 deste trabalho. Em relação aos ensaios interdia, para o 3-PBA os coeficientes de variação

ficaram na faixa de 3,1% a 11,7%, para o 4-FPBA, variaram de 3,5% a 8,8%, para o DBCA, variaram de 2,0% a 20% e para o trans-DCCA, variaram de 1,7% a 10,2% (CDC, 2013), (DAVIS et al., 2013), (LE GRAND et al., 2012), (LENG; GRIES, 2005).

Já nos ensaios intradia foram observados menores coeficientes de variação, sendo para o 3-PBA os coeficientes de variação ficaram na faixa de 1,8% a 4,8%, para o 4-FPBA, variaram de 1,5% a 5,0%, para o DBCA, variaram de 0,9% a 9,8% e para o trans-DCCA, variaram de 1,5% a 7,6% (CDC, 2013), (DAVIS et al., 2013), (LE GRAND et al., 2012), (LENG; GRIES, 2005). Alguns métodos descreveram faixas mais amplas, sem discriminar por analito, mas também ficaram compreendidas entre 5,6% a 15,8% para os ensaios interdía e 2,0% a 10,4% para os ensaios intradia (BABINA et al., 2012), (SCHETTGEN et al., 2002), (TAO et al., 2013).

Mesmo para o DBCA e DCCA que apresentaram resultados ruins em todos os parâmetros de validação, os resultados de precisão ficaram comparáveis aos descritos por outros estudos. Os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA tiveram boa resposta também neste parâmetro.

4.3.1.8 Robustez

Apesar de terem sido feitos testes sobre a influência do pH da urina, temperatura e tempo de hidrólise, variações nos gradientes de lavagem e eluição, não foram realizados experimentos de verificação da robustez do método.

4.3.2 Amostragem

A principal pergunta deste trabalho foi o entendimento sobre a magnitude da exposição da população adulta do município do Rio de Janeiro a agrotóxicos piretroides.

Dentro das hipóteses prováveis, a população geral, não exposta ocupacionalmente, tem como principais fontes de exposição a estas substâncias a alimentação, pela presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos ingeridos, e o uso de inseticidas domésticos, sejam eles aplicados pelo próprio indivíduo, sejam eles aplicados por terceiros em áreas comuns de condomínios e locais públicos, no local de trabalho entre outros, normalmente através de contratação de empresas especializadas no controle de pragas e vetores.

Outras formas também são possíveis, porém menos usuais na cidade do Rio de Janeiro, tais como atividades laborais ou de lazer (cuidado de animais, jardinagem, paisagismo) que

envolvam a utilização frequente de agrotóxicos piretroides, ingestão acidental ou tentativa de suicídio.

Para a avaliação de todas as fontes prováveis de exposição seria necessário uma avaliação apurada sobre os hábitos alimentares de cada indivíduo participante da pesquisa. Pelo tamanho da equipe, do recurso e de tempo disponível, não foi possível a avaliação alimentar da população estudada e esta foi uma grande limitação deste estudo.

O histórico da coleta com todos os setores censitários percorridos, os domicílios abordados em cada setor estão listados nos Anexos 4 e 7. A cada dia de coleta foram levados aproximadamente a lista de endereços com o triplo do número dos domicílios que se precisava coletar, que eram de 22 por dia. No total, percorreu-se 2.586 residências, sendo casas de beira de rua, vilas, condomínios, apartamentos individuais, condomínios, entre outros. Não se determinou um padrão de dificuldade que relacionasse o tipo de residência com a recusa. Obviamente, negar a participação a um estudo que bate à porta, se torna mais fácil através do interfone do que da abordagem cara a cara. Mas em muitos apartamentos a abordagem e adesão transcorreram com certa facilidade.

A violência influenciou diretamente na coleta de três bairros: Maré, quando foi necessária fazer a substituição por outro setor censitário geograficamente próximo (Amorim), pois havia iminência de confronto armado; Realengo, quando no momento da coleta houve a incursão da polícia militar na rua onde a equipe trabalhava, e Padre Miguel, onde dias antes ocorrera um assassinato na rua da coleta e, por essa razão, os moradores estavam com medo de atender a equipe.

Na Barra da Tijuca também houve a necessidade de substituir o setor censitário inicialmente sorteado por outro geograficamente próximo, pois a administração do condomínio, após duas visitas da equipe ao local, havia “esquecido de avisar aos moradores”. Pela falta de tempo e recurso, o retorno ocorreu pela terceira vez ao bairro, quando foi realizada a coleta em outro condomínio próximo, sem transtornos.

No bairro do Vidigal, o setor censitário sorteado foi ao lado dos condomínios de classe social alta, que não atenderam a equipe sem uma entrevista prévia com o síndico. No lado oposto se localizava a comunidade do Vidigal. Pelo fato da proximidade geográfica acarretar uma distorção das características inicialmente sorteadas, foi tomada a decisão de assumir a perda deste setor, tendo sido coletadas apenas três amostras de moradores de residências que aceitaram participar do estudo.

O tempo de coleta foi um fator limitante para que toda a amostra fosse coletada, pois a equipe dispunha de carro institucional, o qual saía às 8 horas e precisava retornar às 17 horas. Se fossem considerados 2 dias de trabalho para cada setor censitário sorteado, a coleta toda demoraria o dobro do tempo e não haveria disponibilidade física, de tempo e financeira para custeio.

Não foi possível realizar a coleta aos sábados e após às 18 horas, quando muitos sorteados talvez estivessem em casa e disponíveis a participarem da pesquisa. Muitas vezes não foi obtida a quantidade de participantes desejada, e essas perdas foram consideradas um problema deste trabalho.

Poucos domicílios foram perdidos pelo fato do morador que atendeu a equipe ter menos de 18 anos, e este foi um critério de exclusão para participação no estudo.

Em domicílios abordados, alguns moradores demonstraram interesse em participar do estudo, mas quando foram informados sobre a necessidade de fornecimento de urina, desistiram de participar.

Na figura 13, o gráfico demonstra a distribuição dos domicílios quanto à participação ou causa da não participação no estudo.

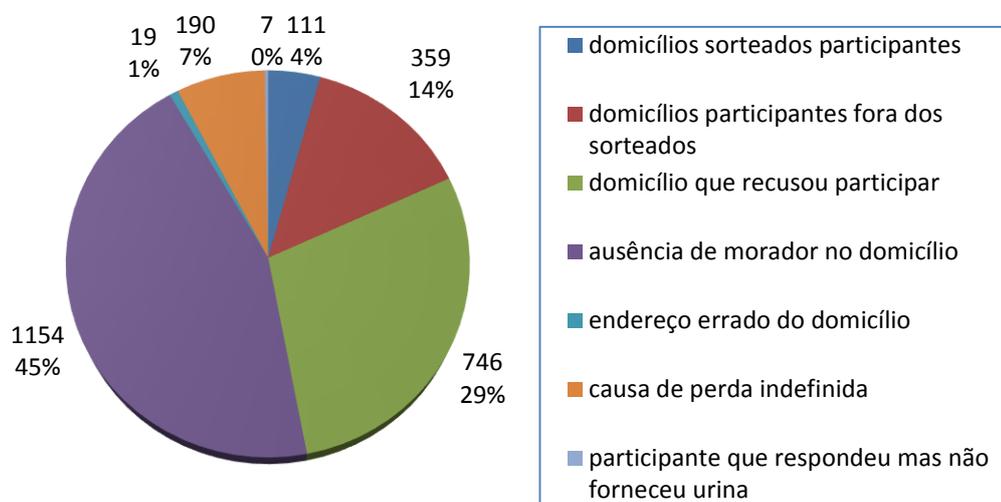


Figura 13: Gráfico de distribuição dos domicílios do estudo.

Observa-se que de todos os domicílios abordados, 45% não tinham nenhum morador em casa no momento da coleta. Pelos motivos descritos anteriormente, que se baseiam principalmente na impossibilidade de condução do estudo em horários em que seria muito mais provável dos moradores serem encontrados, houve a introdução de viés de seleção, o que quer dizer que pelo fato do morador sorteado não estar em casa, ele traz consigo características sócio-

econômicas, de saúde, de exposição a substâncias químicas fora de casa, inclusive o hábito de uso de inseticida doméstico, já que fica em casa a menor parte do dia.

Outra grande fonte de perda de participantes foi a recusa após a abordagem inicial, quando era explicada a pesquisa, seus objetivos e forma de participação, sendo esta de 29%. Este também é um tipo específico de viés de seleção que pode ter comprometido a precisão das estimativas feitas pelo questionário aplicado e também os níveis de exposição encontrados na população. Se a recusa também trouxer alguma característica comum aos que não aceitaram participar do estudo, pode haver diferenças entre os grupos, e estes diferirem sistematicamente entre si (RUPP et al., 2002).

Empiricamente, percebeu-se também que grande parte da recusa deveu-se ao estado de insegurança sob o qual a sociedade carioca vive. Muitas pessoas contactadas sequer ouviam toda fala de abordagem inicial. Quanto a isso, uma estratégia para modificação dessa reação seriam contatos prévios com os moradores do setor censitário sorteado, não somente através de correspondência, mas uma divulgação com folhetos em todo setor, e contato direto para esclarecimento de dúvidas sobre a pesquisa.

Uma forma de tentar compreender se houve essa diferenciação entre os participantes e os ausentes e/ou não participantes seria fazer uma investigação inserindo esses grupos, o que não foi feito.

No bairro de Realengo, quando a coleta foi interrompida pela operação policial, acredita-se também que os participantes responderam com brevidade e talvez com respostas imprecisas por estarem assustados, sendo introduzido viés de informação. Entretanto, como o n de participantes que estiveram com pressa por essa ou qualquer outra razão foi de sete participantes, optou-se por manter as amostras no estudo.

Nas figuras 14 e 15 estão ilustrados mapas da cidade do Rio de Janeiro, sendo o primeiro um mapa demográfico com distribuição da população residente e o segundo um mapa físico com os pontos de coleta marcados segundo as posições geográficas medidas no momento da coleta do primeiro domicílio de cada setor censitário. Os bairros com maiores densidades populacionais comportaram maiores quantidades de pontos de coleta, dado o tipo de amostragem que foi realizado, proporcional ao tamanho. Nota-se no segundo mapa que os locais onde não se observam pontos de coleta correspondem ao Parque Nacional da Tijuca, na zona norte da cidade, e ao Parque Estadual da Pedra Branca, na zona oeste da cidade.

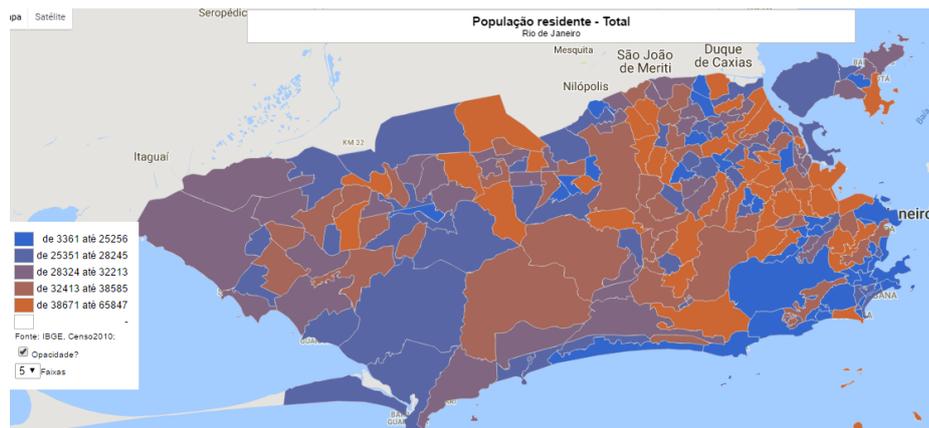


Figura 14: Mapa demográfico da cidade do Rio de Janeiro. Fonte: (IBGE, 2016).

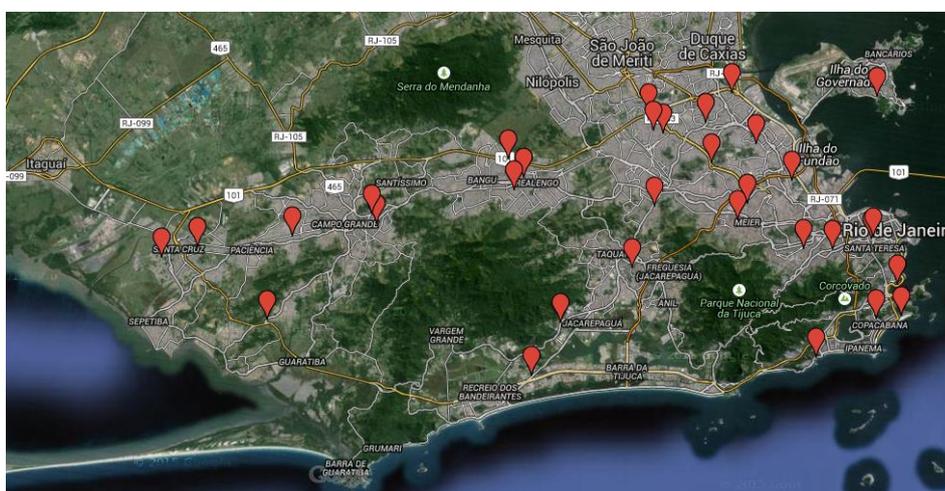


Figura 15: Mapa físico da cidade do Rio de Janeiro, como imagem de satélite, com os pontos de coleta marcados. Fonte: (IBGE, 2016)

4.3.3 Variáveis socioeconômicas e de saúde

As variáveis descritivas quanto aos aspectos socioeconômicos e de saúde estão demonstradas nas tabelas 42 e 43.

A amostra foi constituída por mulheres, em sua maioria, com idade média de 53,5, não diferindo muito da mediana, que foi de 55 anos. Pelo fato do estudo ter sido conduzido no horário comercial, a maioria dos participantes não trabalhava. Os participantes que trabalhavam fora informaram ocupações bastante diversificadas. A faixa de renda foi bastante ampla, sendo o valor da média quase o dobro da mediana, conforme descrito na tabela. Nenhuma destas variáveis apresentou distribuição normal.

O grau de escolaridade da população estudada foi de ensino médio completo em sua maioria, seguido de ensino superior completo, demonstrando que 64,4% possuíam escolaridade acima do ensino médio. Esse dado deve ter contribuído para uma coleta de informações adequada, no momento da aplicação do questionário, quando a comunicação e compreensão das questões podem representar uma importante fonte de incongruências no estudo.

O tipo de residências, se eram casas ou apartamentos, diferiram pouco na amostra, sendo bastante proporcionais, e a quantidade de moradores adultos foi, em média, de 3 pessoas. Este dado está de acordo com os dados apontados pelo IBGE, que no censo de 2010 demonstra que o número de domicílios com 1, 2, 3 e 4 adultos, estão distribuídos de forma censitária em 17,5 %, 26,3 %, 24,7 % e 18,3 %, respectivamente, pelo total de domicílios particulares (IBGE, 2016). Neste estudo estes valores foram de 14,4 %, 28,5 %, 29,4 % e 15,6 %, para 1, 2, 3 e 4 adultos, respectivamente.

Já para as crianças, o número foi bem menor, sendo o valor médio de menos de uma criança por domicílio. Na maioria dos domicílios (n = 367; 77,4%) não havia nenhuma criança, e em 81 domicílios (17,1%) havia apenas 1 criança.

Pensando a questão da exposição a inseticidas, a aplicação de sprays ou pastilhas elétricas, bem como outras formas de controle de insetos que são feitas no ambiente, muitas vezes todos os moradores ficam expostos ao produto. O fato de haver poucos moradores, e crianças menos ainda, explicita que a exposição das residências pesquisadas tem abrangência menos impactante, fato este que poderia ser modificado se a densidade de habitantes por residência fosse maior.

Quanto às condições sanitárias, de fornecimento de água e coleta de lixo apresentaram coberturas amplas de serviços, com boa opinião dos participantes, tendo 86,9% e 89 %, respectivamente, considerado os serviços bons. Já para o sistema de esgoto, 62,2% considerou o sistema bom, mas 22,3% considerou razoável a ruim, e 14,1 % péssimo ou inexistente.

A proliferação de vetores, principalmente insetos, está sabidamente relacionada à presença de esgotamento sanitário. Com a proliferação de vetores, é esperado que o uso de inseticidas seja intensificado.

Tabela 42: Variáveis sócio-econômicas (n = 473).

Tabela descritiva	N=473	%
<u>Sexo</u>		
Feminino	303	63,90%
Masculino	169	35,70%
<u>Idade</u>		
Média	53,5	
Mediana	55	
mínimo - máximo (anos)	19 - 93	
<u>Renda</u>		
Média	R\$ 3.633,00	
Mediana	R\$ 2.000,00	
mínimo - máximo (anos)	R\$ 0,00 - R\$ 25.000,00	
<u>Escolaridade</u>		
Analfabeto	7	1,50%
Primeiro Ciclo Fundamental	87	18,40%
Segundo Ciclo fundamental	74	15,60%
Ensino médio completo	189	39,90%
Ensino superior ou mais	116	24,50%
<u>Trabalha</u>		
Não	279	58,90%
Sim	194	40,90%
<u>Tipo de Residência</u>		
Casa	264	55,70%
Apartamento	209	44,10%
<u>Quantidade de moradores na residência</u>		
<u>Adultos</u>		
Média	3	
máximo – mínimo	1 - 13	
<u>Crianças</u>		
Média	0,5	
máximo – mínimo	0 - 4	
<u>Sistema de esgoto</u>		
Bom	295	62,20%
Razoável a ruim	106	22,30%
Péssimo ou inexistente	67	14,10%
<u>Coleta de Lixo</u>		
Bom	412	86,90%
Razoável a ruim	50	10,60%
Péssimo ou inexistente	9	1,90%
<u>Fornecimento de água</u>		
Bom	422	89,00%
Razoável a ruim	37	7,80%
Péssimo ou inexistente	12	2,50%

Tabela 43: Variáveis sobre estado de saúde (n = 473).

Tabela descritiva	N=473	%
<u>Já passou mal</u>		
Sim	122	25,7%
Não	344	72,6%
<u>Alguém passou mal</u>		
Sim	68	14,3%
Não	394	83,1%
<u>Sintomas</u>		
Irritação nas vias respiratórias	67	14,1%
Falta de ar	51	10,8%
Náuseas	23	4,9%
Dor de cabeça	15	3,2%
Vômitos	6	1,3%
Vertigens	8	1,7%
Irritação na pele	6	1,3%
Diminuição da visão	4	0,8
<u>Procurou socorro</u>		
Sim	11	2,3%
Não	112	23,6%
<u>Já teve dengue</u>		
Sim	161	34%
Não	306	64,6%
<u>Alguém na casa teve dengue</u>		
Sim	158	33,3%
Não	307	64,8%
<u>Tem problema de saúde</u>		
Sim	172	36,3%
Não	301	63,5%
<u>Tem alergia a insetos</u>		
Sim	114	24,1%
Não	354	74,7%
<u>Toma medicamentos</u>		
Sim	251	53%
Não	222	46,8%

A maioria da população relata não ter passado mal, nem outro morador da residência, após a aplicação de inseticidas. Os sintomas mais relatados pelos que já passaram mal foram irritação nas vias respiratórias, falta de ar, náuseas e dor de cabeça, sintomas esses relacionados à aspiração de produtos com potencial efeito nocivo à saúde. Em estudos realizados na população geral não houve avaliação do estado de saúde, principalmente pelo fato dos sinais de exposição crônica a agrotóxicos serem inespecíficos, sendo a maioria dos estudos baseados na relação da exposição à dieta (YE et al., 2015). Entretanto, em estudos realizados com trabalhadores cuja exposição também é crônica, mas em doses mais elevadas do que a

população geral exposta ambientalmente, há muitos relatos de associação de doenças respiratórias, tanto agudas quanto crônicas, com a exposição a agrotóxicos (HOPPIN et al., 2009), (HOPPIN et al., 2007), (YE et al., 2013).

4.3.4 Avaliação dos níveis dos metabólitos

As amostras foram todas processadas num período de 3 semanas, com experimentos programados para que todo setor censitário fosse analisado no mesmo dia. A cada dia de processamento era realizada uma curva de calibração com três pontos em duplicata, e branco em duplicata, com o mesmo pool de urina utilizado para todos os experimentos. O pool de urina foi constituído com urinas cedidas por 5 profissionais do laboratório e o critério era que não tivesse utilizado inseticida em casa pelos últimos 5 dias.

Nos brancos sempre eram observadas áreas pequenas dos metabólitos, pelo fato de terem sido utilizadas urinas de doadores para o controle de qualidade. Esses valores foram descontados de todas as amostras, principalmente após a adição do padrão interno que é um composto isotópico do 3-PBA, quando também eram observadas áreas pequenas do 3-PBA no mesmo tempo de retenção do 3-PBA-C₁₃.

Foi realizada diariamente também, a injeção de uma curva calibração com 5 níveis de concentrações dos padrões, preparados em metanol, com o intuito de avaliar o efeito de supressão de sinal, erros durante a injeção, dentre outros problemas.

Para a avaliação e acompanhamento dos lotes de amostras e seus respectivos controles de qualidade, foram checadas as áreas e coeficientes angular e linear da curva no solvente, avaliação visual no módulo de avaliação qualitativa do software de processamento das amostras do equipamento sobre as áreas do padrão interno e nas fortificações em três níveis de concentração.

Para a avaliação final das amostras, foram calculadas as relações entre os íons quantificador e qualificador, nos casos do 3-PBA e 4-FPBA e para o DBCA e DCCA além dessa relação, também foi checada a relação entre os íons quantificadores dos isótopos com os nativos, do bromo e cloro, respectivamente, conforme demonstrado na tabela 44.

Tabela 44: Acompanhamento dos controles de qualidade diários durante a análise das amostras.

Metabólitos		Coefficiente angular	Coefficiente de correlação	Razão dos íons quanti. e quali.
3-PBA	1	0,1363	0,9475	1,080
	2	0,1204	0,9295	0,927
	3	0,1053	0,9997	0,914
	4	0,1102	0,9034	0,97
	5	0,1210	0,9135	0,991
4-FPBA	1	0,1462	0,9856	1,801
	2	0,1276	0,9786	1,771
	3	0,1183	0,9995	1,824
	4	0,1255	0,9560	2,432
	5	0,1362	0,9745	2,720
DBCA	1	0,00002	0,9149	1,071
	2	0,000003	0,9084	1,254
	3	0,00002	0,4526	1,555
	4	0,00001	0,9025	0,769
	5	0,00001	0,8072	0,674
trans-DCCA	1	0,0001	0,9185	7,84
	2	0,0001	0,9876	14,60
	3	-	-	5,14
	4	-	-	22,40
	5	-	-	-

Apenas os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA puderam ser identificados e quantificados neste estudo, já que as variações entre as razões de íons foram 4% e 14%, respectivamente.

Para os isômeros do DCCA e o DBCA, não foi possível fazer nenhuma qualificação nem quantificação, pois as razões de íons dos controles de qualidade feitos diariamente, juntos com as amostras, apresentaram coeficiente de variação de 62% e 39%, respectivamente.

Na tabela 45, estão descritos os níveis, expressos em termos da média, mediana, valores máximo e mínimo e os percentis 25, 50, 75 e 95.

Tabela 45: Concentrações dos metabólitos de piretroides em amostras de urina da população adulta do município do Rio de Janeiro, coletadas em 2015.

Metabólitos		Média	Mediana	Máximo	Mínimo	P25	P50	P75	P95
3-PBA n = 156	ng mL ⁻¹	2,16	1,20	60,8	0,17	0,52	1,20	0,26	6,85
	ng mg ⁻¹ de creatinina	1,52	0,84	24,7	0,07	0,35	0,84	1,60	5,52
4-FPBA n = 14	ng mL ⁻¹	1,01	0,63	3,46	0,26	0,38	0,63	1,41	-
	ng mg ⁻¹ de creatinina	1,02	0,67	3,80	0,15	0,30	0,67	1,48	-

Os níveis de 3-PBA e 4-FPBA foram testados quanto à normalidade e nenhum dos dois apresentou distribuição normal ($p < 0,05$). Os níveis de 3-PBA, logaritmizados, apresentaram distribuição normal ($p = 0,504$). Quando corrigidos pela creatinina, apenas os níveis de 4-FPBA apresentaram distribuição normal.

Os níveis de exposição apresentados neste trabalho estão comparáveis a resultados de outros estudos, tanto nos estudos pontuais como este, quando a população foi avaliada uma única vez, quanto nos trabalhos de inquérito populacional para monitoramento da exposição, que na Alemanha e Estados Unidos são feitos sistematicamente.

Estão descritos na tabela 46 os resultados para 3-PBA e 4-FPBA deste estudo e de outros, expressando os valores corrigidos sem correção pela creatinina nos percentis 50 e 95, em populações de adultos, não expostos ocupacionalmente. Os níveis encontrados se equiparam mais aos descritos por estudos americanos e chineses. Supõe-se que tal fato ocorra por questões climáticas e o uso de inseticidas possa ser um hábito da população, ou por serem países com maior tradição agrícola e os alimentos possam estar mais contaminados. Entretanto, os resultados desses estudos não permitem fazer maiores inferências.

Neste estudo, como já mencionado, não foi feita nenhuma investigação sobre hábitos ou procedência dos alimentos da população estudada.

Tabela 46 – Descrição dos estudos de avaliação do 3-PBA e 4-FPBA em população geral, em ng mL⁻¹, expressa nos percentis 50 e 95.

País	N	N > LQ	3-PBA		4-FPBA		Referência
			P50	P95	P50	P95	
Este estudo	474	156	1,20	6,85	0,63	1,41*	-
EUA	1174	-	0,42	6,65	<LQ	0,17	(CDC, 2017)
EUA	90	64	0,82	9,44	-	-	(TRUNNELLE et al., 2014a)
EUA	1311	773	0,76	5,23	<LQ	0,44	(MCKELVEY et al., 2013)
Canadá	120	99	0,17	4,23	<LQ	0,02	(FORTIN et al., 2008)
Países Caribenhos	297	100	-	3,51	-	0,11	(DEWAILLY et al., 2014)
China	1149	99	1,01	5,39	-	-	(QI et al., 2012)
China	18	18	1,1	-	-	-	(PERRY et al., 2007)
Polônia	140	112	0,26	1,15	-	-	(WIELGOMAS, 2013)
França	396	-	0,65	4,36	<LQ	0,82	(FRÉRY et al., 2012)
França	39	39	0,63	2,05	-	-	(LE GRAND et al., 2012)
Reino Unido	404	351	-	6,1	-	-	(BEVAN et al., 2013)
Alemanha	45	43	0,26	2,29	<0,01	-	(LENG et al., 2005)
Alemanha	46	32	0,16	0,67	<LQ	<LQ	(SCHETTGEN et al., 2002)
Alemanha	483	-	-	-	<LQ	0,10	(HEUDORF; ANGERER, 2001)
Japão	322	293	0,64	-	-	-	(YOSHINAGA et al., 2014)
Japão	231	226	0,35	-	-	-	(ZHANG et al., 2013)
Japão	448	-	0,29	1,96	-	-	(UEYAMA et al., 2009)
Equador	26	-	0,14	0,51	-	-	(HANDAL et al., 2016)

* no percentil 75

4.3.5 Variáveis de exposição

As variáveis de exposição para os todos os setores censitários agrupados estão descritas na tabela 47.

Observa-se nesta população que a preferência pela prevenção ao inseto se dá pelo uso de inseticidas, muito mais do que pelo repelente. Tal fato pode estar relacionado à possibilidade de proteção para toda família com o inseticida, enquanto que o repelente oferece proteção individual. Esses dados se relacionam com outros estudos realizados no Brasil, nas cidades de Goiânia, Pelotas, Recife, Niterói, e no estado do Piauí, onde os percentuais de uso de inseticidas domésticos foram de 80%, 89%, 51%, 77%, respectivamente (GUINATI; GONÇALVES; REED, 2014), (DIEL; FACCHINI; DALL'AGNOL, 2003), (CÂMARA NETO; AUGUSTO, 2000), (MELLO; ROZEMBERG; CASTRO, 2015) (CASTRO; ROZEMBERG, 2011), (OLIVEIRA et al., 2015).

Apesar das diferenças climáticas, culturais, socioeconômicas, dentre outras, também é comum observar o uso de inseticidas domésticos por todo mundo. Vários estudos demonstram em seus resultados que a população utiliza inseticida, mas não retratam esse percentual (FORTIN et al., 2008), (YE et al., 2015), (WIELGOMAS; NAHORSKI; CZARNOWSKI, 2013), (BABINA et al., 2012), (HANDAL et al., 2016), (SINGLETON et al., 2014), (RAYMER et al., 2014). Na maioria dos países a principal fonte de exposição estudada é a alimentar.

Tabela 47: Características da exposição a piretroides em setores censitários da população do Rio de Janeiro, em 2015.

Tabela descritiva	N=474	%
<u>Uso de repelente</u>		
sim	119	25,1%
não	353	74,5%
<u>Uso de inseticida</u>		
sim	355	74,9%
não	118	24,9%
<u>Última vez usou inseticida lado de fora</u>		
Média = 29 dias	142	30%
Até 2 dias		29,6%
Até 3,5 dias		40,1%
Até 7 dias		74,6%
<u>Usa quantos dias por mês lado de fora</u>		
Média = 5 dias por mês	136	28,7%
Todos os dias		2,7%
20 dias por mês		1,5%
15 dias por mês		0,8%
8 dias por mês		0,4%
4 dias por mês		2,3%
<u>Insetos e pragas lado de fora</u>		
Barata	201	42,4%
Mosquito/pernilongo	169	35,7%
Rato	85	17,9%
Formiga	63	13,3%
Mosca	49	10,3%
Pulga/carrapato	19	4,0%
Cupim	9	1,9%
<u>Inseticidas usados no lado de fora</u>		
Piretroide	54	11,4%
Aerossol	41	8,6%
Líquido concentrado	18	3,8%
Grãos	13	2,7%
Borrifamento + isca	12	2,5%
Carbamato	7	1,5%
Mírex	1	0,2%
Outros	16	3,4%
<u>Última vez usou inseticida lado de dentro</u>		
Média = 45 dias	353	74,5%
Até 1 dia		33,7%
Até 2 dias		39,9%
Até 4 dias		49,3%
Até 7 dias		61,8%
<u>Usa quantos dias por mês lado de dentro</u>		
Média = 13 dias por mês	353	74,5%
Todos os dias		21,1%
20 dias por mês		1,3%
15 dias por mês		3,1%
8 dias por mês		7,2%
4 dias por mês		8,4%
<u>Insetos e pragas lado de dentro</u>		
Mosquito/pernilongo	302	63,7%
Formiga	137	28,9%
Barata	129	27,2%

Mosca	68	14,3%
Rato	14	3,0%
Cupim	11	2,3%
Pulga/carrapato	7	1,5%
<u>Inseticidas usados no lado de dentro</u>		
Piretroide	327	69,0%
Aerossol	306	64,6%
Líquido concentrado		
Grãos		
Borrifamento + isca	25	5,7%
Pastilha de tomada	22	4,6%
Mirex		
Outros		
<u>Quem aplicou o inseticida</u>		
O próprio	298	62,9%
Outra morador da casa	51	10,8%
Empresa de desinsetização	8	1,7%
<u>Número de frascos em casa</u>		
1 a 5 frascos	362	76,4%
6 a 10 frascos	4	8,0%
Mais de 10 frascos	1	2,0%
<u>Faz diluição</u>		
sim	38	8,0%
não	365	77%
<u>Lê os rótulos das embalagens</u>		
Nunca	284	59,9%
Às vezes	74	15,6%
Frequentemente	115	24,3%
<u>Segue as recomendações dos rótulos</u>		
Nunca	293	61,8%
Às vezes	61	12,9%
Frequentemente	119	25,1%
<u>Acredita que o inseticida faz mal</u>		
Sim	416	87,8%
Não	53	11,2%
<u>Propaganda de inseticidas</u>		
Televisão	410	86,5%
Jornal, revista e internet	36	7,6%
<u>Motivo da escolha do inseticida</u>		
Pelo o que controla	145	30,6%
Segurança	143	30,2%
Custo	134	28,3%
Rapidez	42	8,9%
Embalagem	40	8,4%
Tem em casa	38	8,0%
Pelo princípio ativo	29	6,1%
Recomendação de alguém	28	5,9%
Tempo do efeito	11	2,3%
Aspectos ambientais	11	2,3%
Facilidade aplicação	9	1,9%
Instruções claras	4	0,8%
<u>Tem medo de aplicar inseticida</u>		
sim	111	23,4%
não	345	72,8%

Os metabólitos 3-PBA e 4-FPBA foram detectados em 156 e 14 pessoas, respectivamente. Apesar do uso de inseticida ser sido reportado por 74,9% dos participantes (355), 39,9% destes informaram ter feito uso pela última vez, tanto dentro quanto fora de casa, dois dias antes da data da coleta de urina, correspondendo, portanto, a 141 pessoas. Assim, o resultado positivo de 156 está coerente com o relatado pela população participante.

O tipo de inseticida especificado no estudo foi respondido como uma pergunta aberta e pelas marcas relatadas, chegou-se à classe química dos piretroides, não sendo possível rastrear os princípios ativos, já que uma mesma marca utiliza diferentes substâncias dependendo do uso pretendido. No questionário foi perguntada a marca, e não o princípio ativo, pois isso demandaria a procura do frasco pelo respondente, podendo acarretar mais demora e insatisfação do participante.

Apesar de não ter sido encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre a renda e frascos existentes no domicílio, durante o trabalho de campo observou-se expressivamente pessoas com baixo poder aquisitivo com quantidades acima de 1 frasco de inseticida em casa, o que chama a atenção visto que este produto não é barato, e 28,3% declararam que uma das razões para escolha do produto é o custo. Esse comportamento demonstra que a preocupação ou o incômodo com os insetos são grandes a ponto de fazerem a escolha pelo inseticida.

Embora os participantes tenham declarado, em sua maioria, que acreditam que o inseticida faz mal à saúde, a maior parte não tem medo de aplicá-lo, nem lêem ou seguem as recomendações dos rótulos. Isso pode estar relacionado à imagem de inocuidade que é passada pela propaganda desses produtos, principalmente na televisão, demonstrando que o inseticida é combativo ao vetor, mas não traz nenhuma consequência à saúde humana, tampouco aos animais de estimação. De fato, 30,6% e 30,2% dos entrevistados disseram que os principais motivos para escolha do inseticida são o inseto que controla e a segurança do inseticida, respectivamente. Essas informações sempre são bastante enfatizadas nos comerciais televisivos.

Isso também já foi demonstrado em outros estudos quando a propaganda e a dificuldade de compreensão das informações das embalagens de inseticidas foram relatadas num estudo conduzido em Niterói, Rio de Janeiro (MELLO; ROZEMBERG; CASTRO, 2015), (CASTRO; ROZEMBERG, 2011).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis de exposição e o uso de medicamentos, entretanto, nota-se que mais da metade faz uso de medicamentos e muitos

relataram medicamentos para doenças crônicas, tais como diabetes e hipertensão. Esse também foi limitador deste estudo, pois o tipo de inquérito que foi realizado não contemplou a investigação aprofundada dos medicamentos. Muitos interferem no metabolismo de excreção e podem influenciar nos níveis de metabólitos de agrotóxicos excretados, assim como foi encontrado num estudo realizado no Canadá, onde foi relacionado o uso de medicamentos não prescritos com os níveis de metabólitos, para homens (FORTIN et al., 2008).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos níveis de 3-PBA e 4-FPBA por categorias das variáveis socioeconômicas e de exposição.

Para avaliar a correlação das variáveis socioeconômicas e de exposição aos níveis de metabólitos, corrigidos pela creatinina, foram realizados testes de correlação de Spearman, obtendo-se correlações estatisticamente significativas com as variáveis *o uso de inseticida, a existência de barata dentro da residência, uso de aerossol dentro da residência, o hábito de lavar as mãos após o uso do inseticida.*

A variável que relata *o uso de inseticida* apresentou correlações significativas com *o uso de aerossol dentro de casa, a existência de pernilongo dentro de casa e o hábito de lavar as mãos após o uso do inseticida.* As correlações significativas demonstram que algumas variáveis de exposição não se relacionam de forma aleatória, atribuindo sentido e uma confirmação ao que foi observado empiricamente. A tabela 48 resume as correlações com os respectivos valores de significância.

Também houve significância nas correlações dos níveis de 3-PBA e das variáveis de *que alguém teve dengue em casa, e tipo de agrotóxico utilizado dentro de casa.* A variável *alguém teve dengue em casa* demonstra que o fato de alguém já ter tido essa doença na residência pode ser uma das causas de um excesso de exposição.

Entretanto, esperava-se que algumas variáveis socioeconômicas estivessem correlacionadas ao hábito de uso e mesmo aos níveis de metabólitos encontrados na população. Assim, foram necessárias análises exploratórias multivariadas para atribuição de alguma influência ou determinação de padrão pelas variáveis socioeconômicas e outras de exposição.

Tabela 48: Correlações entre as variáveis socioeconômicas, de exposição e dos níveis de metabólitos de piretroides.

Variável independente	Variável dependente	R	P
Existência de pernilongo	Uso de inseticida	0,34	p = 0,000
Uso de aerossol dentro de casa	Uso de inseticida	0,70	p = 0,000
Hábito de lavar as mãos após o uso	Uso de inseticida	0,50	p = 0,000
Hábito de lavar as mãos após o uso	Nível de 3-PBA	0,24	p = 0,003
Outro teve dengue na casa	Nível de 3-PBA	0,37	p = 0,044
Tipo de inseticida usado	Nível de 3-PBA	0,36	p = 0,041
Uso de inseticida	Nível de 3-PBA	0,28	p = 0,000
Uso de aerossol dentro de casa	Nível de 3-PBA	0,20	p = 0,013

R = coeficiente de correlação de Spearman

p = valor de p, estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Ainda para correlacionar exposição e fatores determinantes, observou-se através de testes qui-quadrado, categorizando o nível de 3-PBA em positivo ou negativo, que os níveis de 3-PBA puderam ser relacionados com significância estatística à variável *utiliza inseticida*, sendo que 80,1% dos que apresentaram níveis de metabólitos utilizaram inseticida ($p = 0,067$).

Para avaliação da utilização dos inseticidas pelos bairros, foi feito um gráfico (figura 16) levando em conta o percentual de participantes. Observa-se que em todos os bairros, mais da metade declarou o uso, não havendo nenhuma grande distorção, considerando a localização do participante.

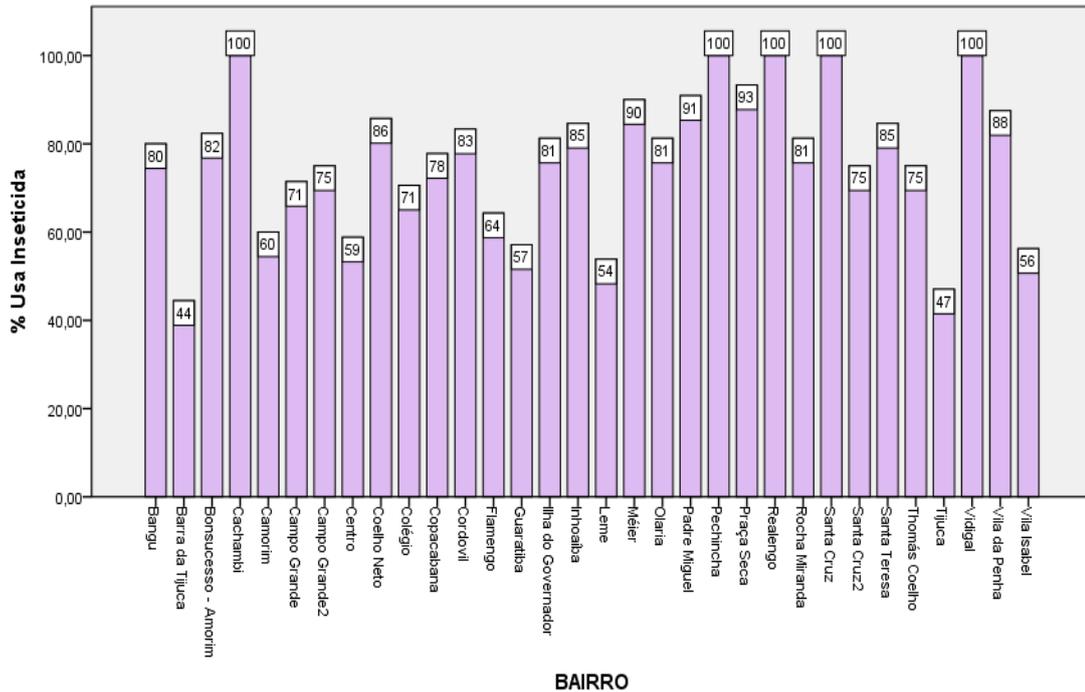


Figura 16: Uso de inseticida nos bairros do município do Rio de Janeiro.

Não foi encontrada correlação significativa entre o uso de inseticidas e o sistema de esgotamento, mas está demonstrado no gráfico abaixo (figura 17) que em alguns casos há a relação entre os bairros onde há uso maciço de inseticidas e o relato dos moradores quanto à precariedade do esgotamento sanitário, o que pode contribuir para a decisão de uso desses produtos.

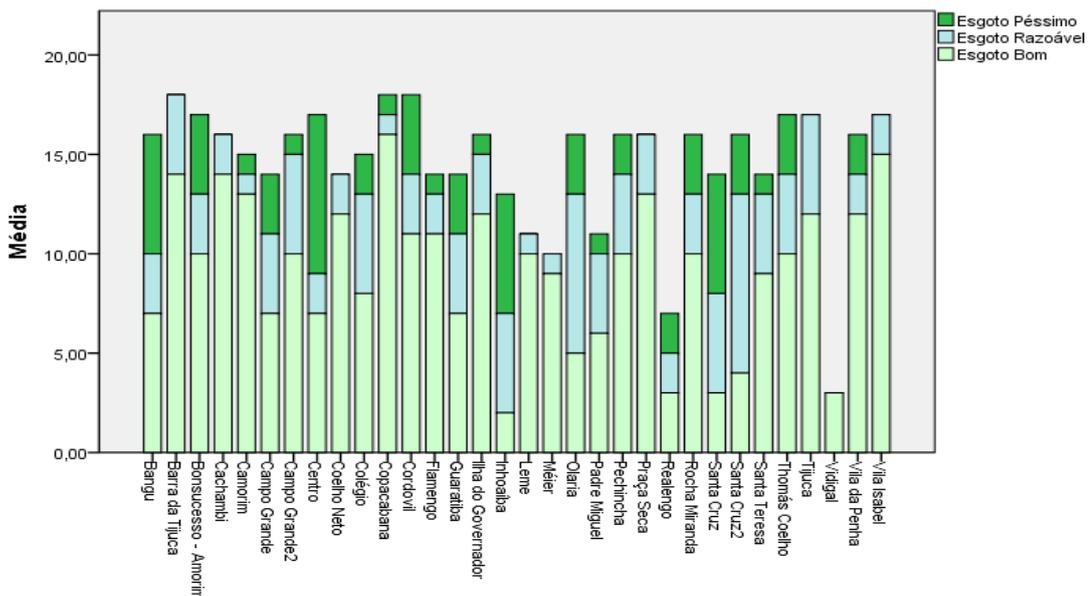


Figura 17: Condição do esgotamento sanitário por bairros do município do Rio de Janeiro.

As figuras 18, 19 e 20 ilustram a distribuição dos níveis de metabólitos pelos bairros onde foram realizadas as coletas. Observa-se que na totalidade dos 32 setores censitários, apenas em duas localidades não foram detectados níveis de metabólitos, sendo elas Bangú e Realengo. Apesar de geograficamente próximos, os locais de coleta mostraram-se distintos principalmente em relação às condições sanitárias e uma causa provável para que não fossem detectadas amostras positivas nestes locais é que o período médio da última utilização de inseticidas foi de 8 dias e 32 dias, respectivamente, sendo estes períodos maiores do que é possível de se detectar esses metabólitos na urina.

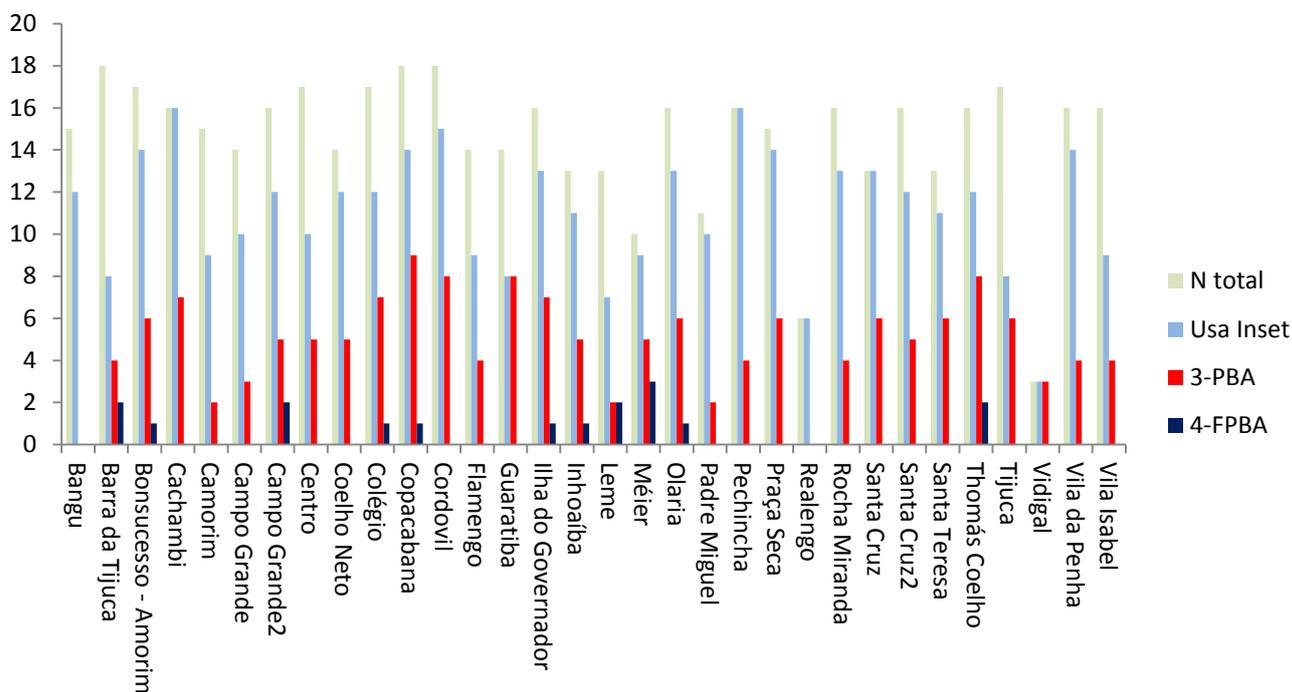


Figura 18: Comparação entre o n coletado, os que usam inseticidas e que apresentam níveis de 3-PBA e 4-FPBA por bairros do município do Rio de Janeiro.

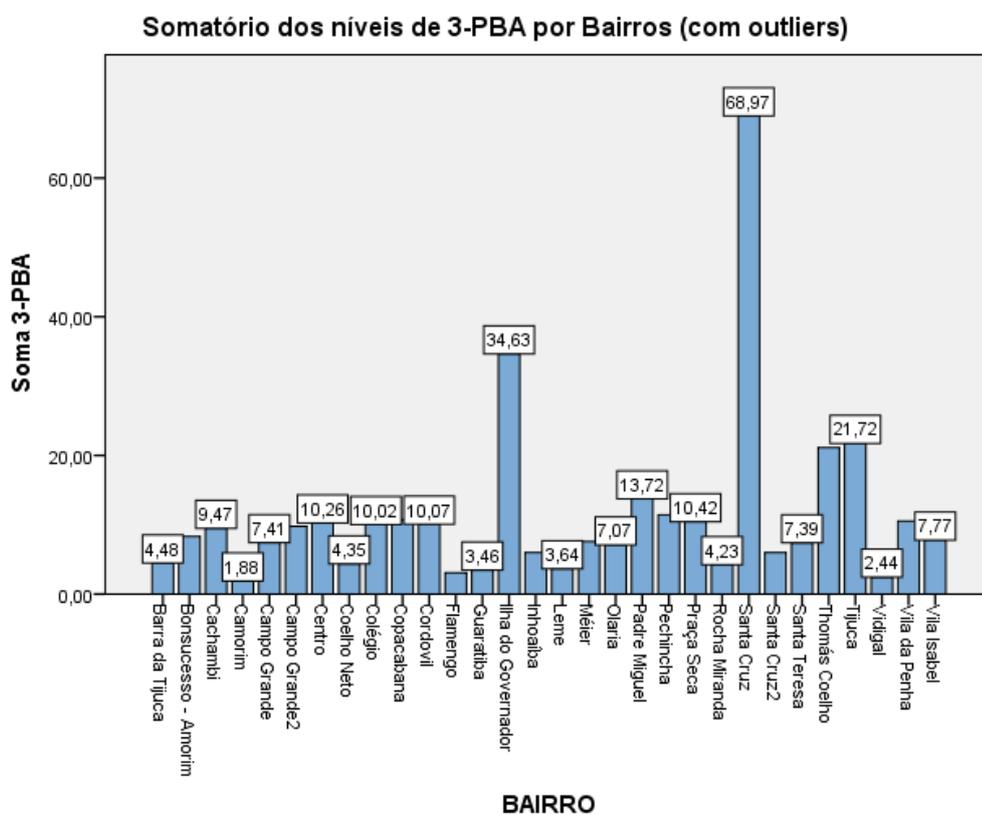


Figura 19: Somatório dos níveis de 3-PBA por bairros do município do Rio de Janeiro.

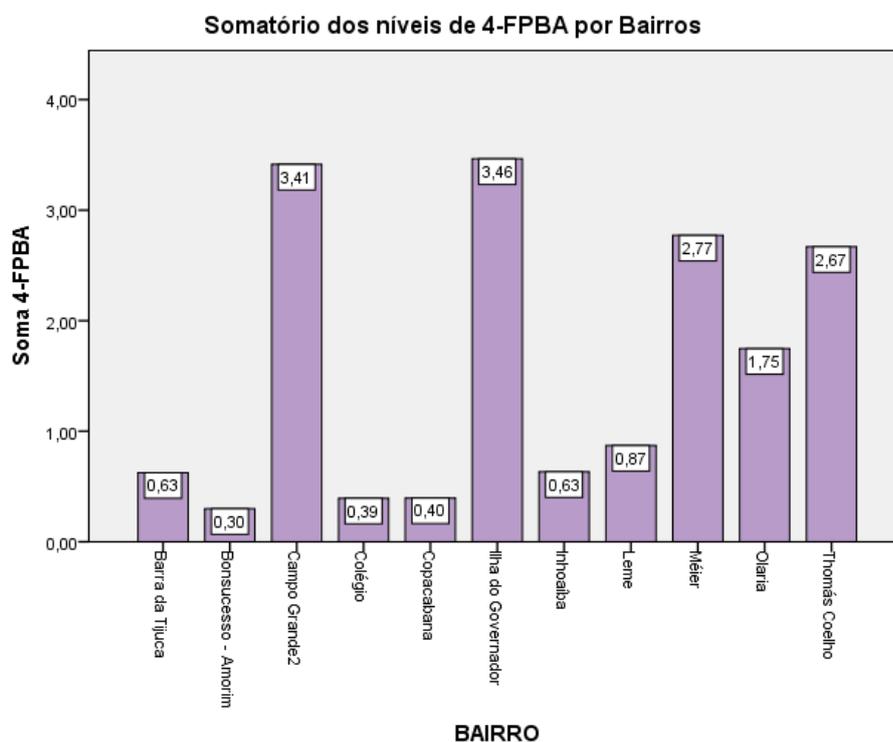


Figura 20: Somatório dos níveis de 4-FPBA por bairros do município do Rio de Janeiro.

Ainda considerando a distribuição geográfica e as variáveis, foi feita análise de aglomerados (clusters), ou dendogramas, sendo esta uma técnica multivariada para uma análise descritiva, utilizada como uma técnica exploratória, cujo objetivo foi agrupar dados de acordo com as similaridades socioeconômicas, de saúde e de exposição entre eles (YOSHIMITANAKA et al., 2015), (KOIFMAN; KOIFMAN, 1997). As figuras 21, 22 e 23, demonstram o agrupamento de clusters por variáveis socioeconômicas apenas, pelas variáveis socioeconômicas mais os níveis de metabólitos e somente pelos níveis, respectivamente.

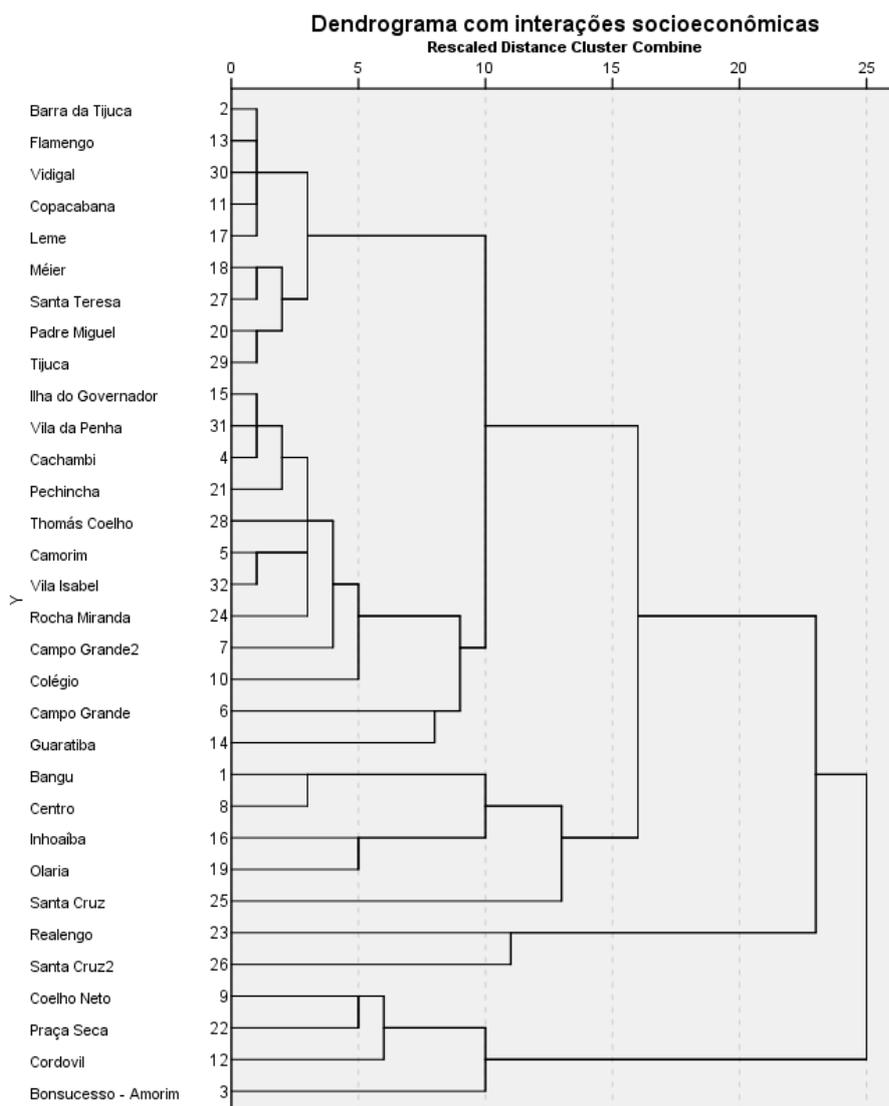


Figura 21: Análise de clusters considerando apenas variáveis socioeconômicas em bairros do município do Rio de Janeiro

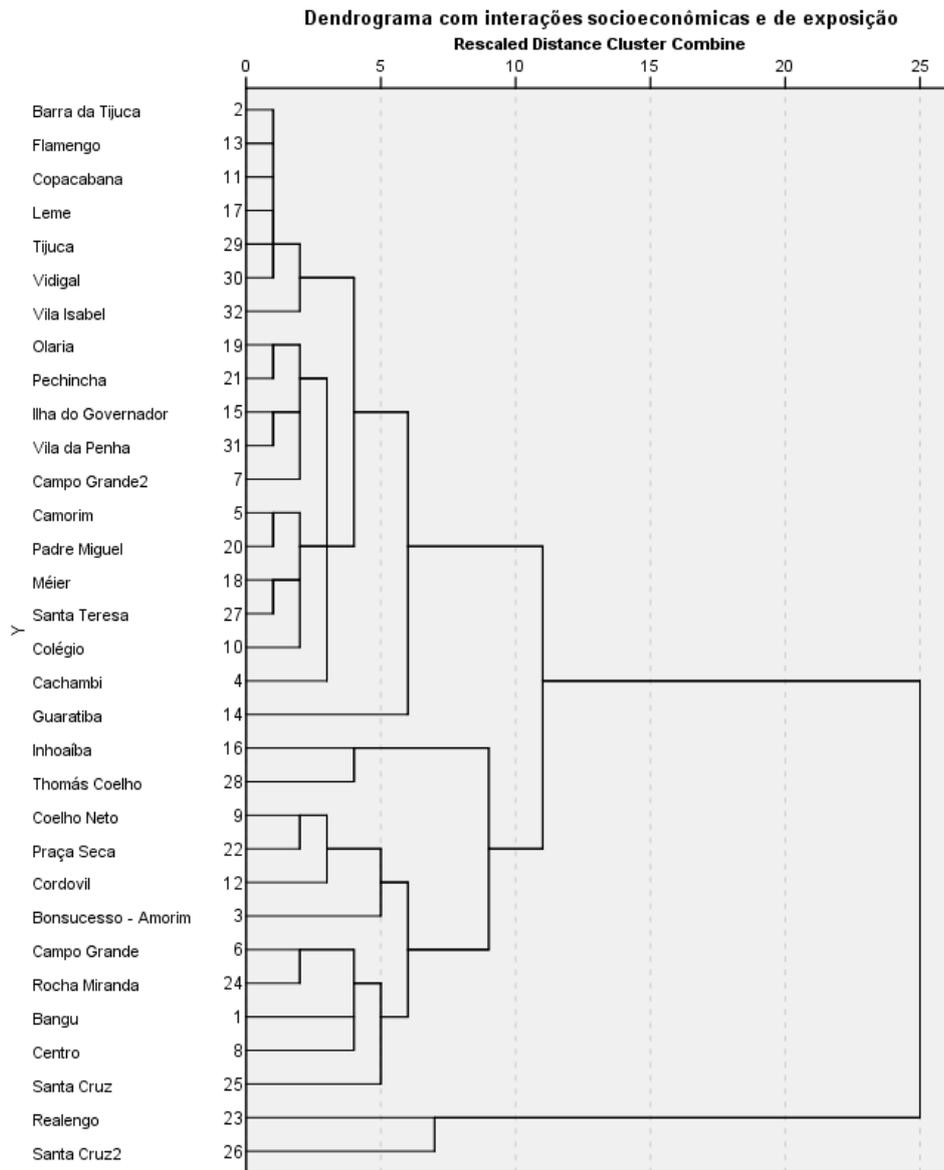


Figura 22: Análise de clusters considerando variáveis socioeconômicas e dos níveis de exposição em bairros do município do Rio de Janeiro

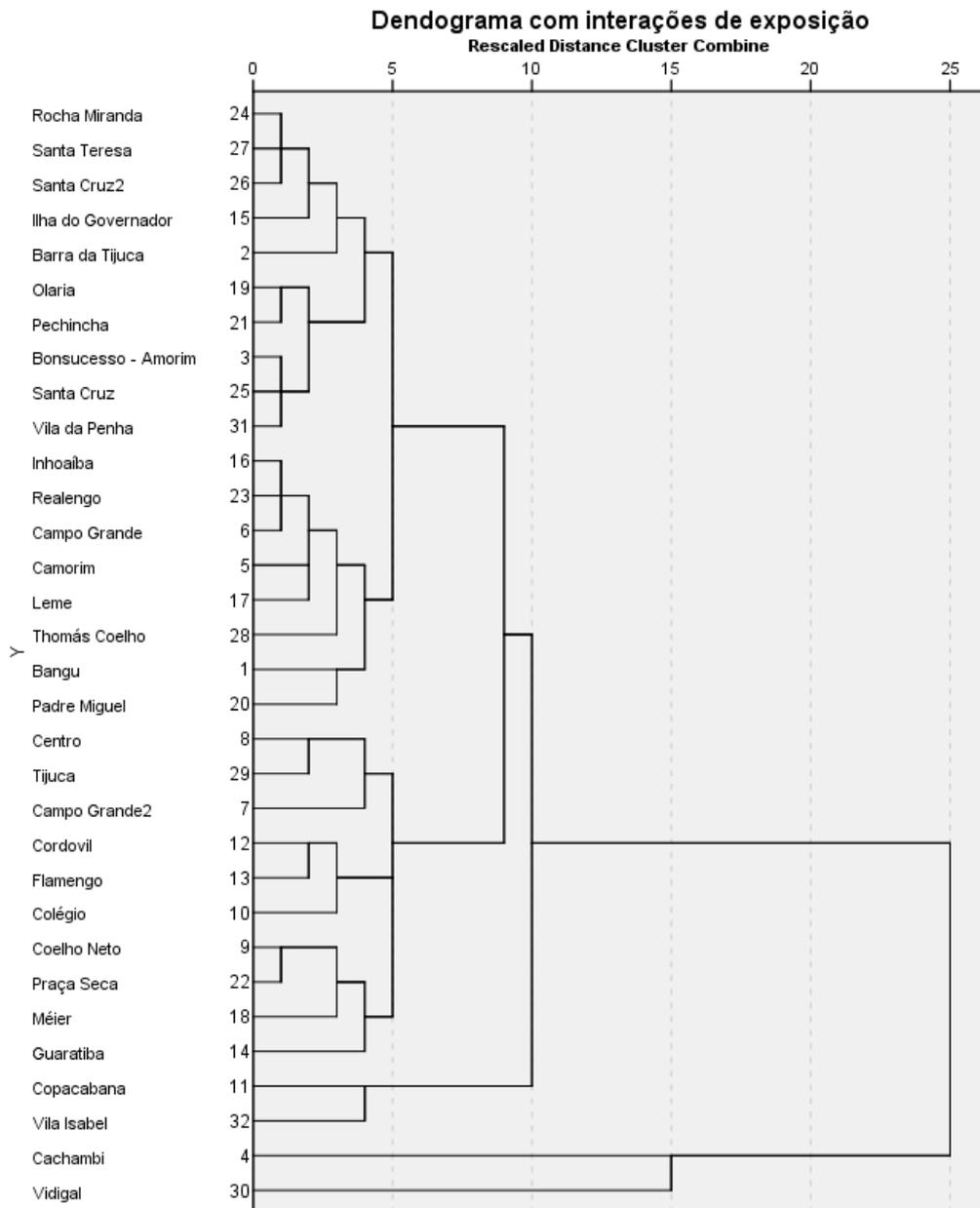


Figura 23: Análise de clusters considerando apenas os níveis de exposição em bairros do município do Rio de Janeiro

O perfil do agrupamento dos bairros, quando comparando os dendogramas das figuras 21 e 22, ou seja, nos agrupamentos pelas variáveis socioeconômicas apenas e com a inclusão das variáveis de exposição, observa-se um padrão similar de aproximação dos bairros, ainda que a formação dos degraus tenha maior intensidade nas variáveis socioeconômicas. As variáveis relacionadas apenas à exposição modificam consideravelmente os agrupamentos dos bairros, comparando aos anteriores. Esses perfis podem significar que as variáveis

socioeconômicas preponderam sobre às de exposição, mantendo as similaridades interbairros, portanto a proximidade do agrupamento entre eles.

Para que as relações entre as variáveis continuassem a ser investigadas, foi feita a análise por componentes principais. Essa análise permitiu evidenciar as comunalidades das variáveis selecionadas, ou seja, a proporção da variância comum explicada por uma variável. A variável de maior comunalidade foi de fornecimento de água bom, seguida de outra variável que também trata das condições sanitárias locais (tabela 49).

A variável IDH (índice de desenvolvimento humano) por bairro foi acrescentada à matriz, entretanto ela não modificou o perfil dos agrupamentos. Optou-se por utilizar a percepção dos participantes como determinante das variáveis socioeconômicas por captarem a realidade mais próxima dos entrevistados, em detrimento do IDH.

Tabela 49: Comunalidades com a matriz de extração

Comunalidades	Matriz de Extração
Fornecimento de água bom	0,958
Coleta de lixo boa	0,957
Ensino superior	0,926
Percepção do risco para uso do inseticida	0,911
Sistema de esgoto razoável	0,904
Sistema de esgoto bom	0,869
Fornecimento de água razoável	0,860
4-FPBA positivo	0,844
Dias da última utilização fora de casa	0,820
Coleta de lixo razoável	0,810
Frequência de uso dentro de casa	0,804
Fornecimento de água ruim	0,794
Ensino fundamental	0,781
Usa inseticida dentro da casa	0,776
Frequência de uso fora de casa	0,764
3-PBA positivo	0,756
Coleta de lixo ruim	0,752
Outro morador da casa teve dengue	0,742
Sistema de esgoto ruim	0,722
Já teve dengue	0,713
Usa inseticida fora da casa	0,647
Dias da última utilização dentro de casa	0,574

A análise de componentes principais permitiu relacionar as variáveis selecionadas do questionário aplicado aos participantes, bem como as amostras positivas para metabólitos medidos nos mesmos. Dessa forma, através das variáveis agrupadas em sete componentes, obteve-se a explicação de 80% da variância total dos resultados. As variáveis de amostras positivas para 3-PBA e 4-FPBA ficaram em componentes separados. Na tabela 50 estão relacionadas as cargas calculadas e agregadas na matriz de componente rotativa pelo método de rotação varimax, que limita o número de variáveis com cargas elevadas em um fator facilitando a sua interpretação (KOIFMAN; KOIFMAN, 1997). Estão marcadas em negrito as variáveis que apresentaram maiores cargas e que, portanto, determinaram maior representatividade e a nomeação de cada um dos sete componentes, os quais estão descritos na própria tabela.

A fim de realizar a análise exploratória para identificar componentes que pudessem justificar a similaridade ou diferenças interbairros, foram determinados os scores dos bairros do município no plano cartesiano, em função da combinação dos seguintes fatores:

Figura 24 – Componente 1 (boas condições sanitárias e socioeconômicas) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso);

Figura 25 – Componente 3 (Escolaridade fundamental, condições sanitárias ruins, frequência de uso dentro de casa e dengue) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).

Figura 26 - Componente 4 (dengue e última utilização do inseticida) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso);

Variáveis*	Componente 1 Boas condições sanitárias e socioeconômicas	Componente 2 Razoáveis condições sanitárias	Componente 3 Escolaridade fundamental, condições sanitárias ruins, frequência de uso dentro de casa e dengue	Componente 4 Dengue e última utilização do inseticida	Componente 5 Condições sanitárias ruins e uso do inseticida	Componente 6 4-FPBA positivo e dengue	Componente 7 3-PBA positivo e frequência de uso
Ensino fundamental	-0,058	0,281	0,815	0,105	0,029	-0,062	0,136
Ensino superior	0,892	0,006	-0,331	-0,042	0,075	0,111	0,015
Percepção para uso do inseticida	0,882	0,232	0,183	0,037	0,195	-0,059	0,052
Já teve dengue	0,115	-0,121	0,409	0,406	-0,125	0,405	0,417
Outro morador teve dengue	0,239	0,433	0,403	0,430	0,138	0,362	-0,006
Sistema de esgoto bom	0,808	-0,244	-0,266	-0,037	-0,222	0,120	0,144
Sistema de esgoto razoável	0,040	0,843	0,261	0,311	0,166	-0,003	-0,003
Sistema de esgoto ruim	-0,050	0,065	0,697	-0,046	0,424	-0,211	-0,059
Coleta de lixo boa	0,870	-0,154	0,285	0,156	-0,254	-0,005	0,076
Coleta de lixo razoável	-0,031	0,724	-0,113	-0,104	0,496	0,121	0,032
Coleta de lixo ruim	-0,079	0,183	0,109	-0,147	0,812	-0,125	0,061
Fornecimento de água bom	0,886	-0,304	0,110	0,154	0,079	0,144	0,132
Fornecimento de água razoável	-0,276	0,850	0,134	-0,094	0,029	-0,095	-0,158
Fornecimento de água ruim	-0,383	0,640	0,198	-0,219	-0,046	-0,380	0,065
Usa inseticida dentro da casa	0,241	0,499	0,438	-0,057	0,390	0,225	0,267
Usa inseticida fora da casa	0,086	0,092	0,377	0,202	0,594	0,304	-0,059
3-PBA positivo	0,428	0,232	0,038	-0,173	-0,071	0,134	0,682
4-FPBA positivo	0,094	-0,043	-0,204	-0,106	0,005	0,883	-0,017
Dias do último uso dentro de casa	0,099	0,014	-0,349	0,603	-0,246	0,118	-0,070
Dias do último uso fora de casa	0,019	-0,025	0,015	0,888	0,052	-0,163	0,001
Frequência de uso fora de casa	-0,026	0,404	0,223	-0,080	-0,211	0,260	-0,657
Frequência de uso dentro de casa	0,031	0,107	0,792	-0,314	0,070	-0,060	-0,239

* Método de extração: análise do componente principal.

Matriz de componente rotativa pelo método de rotação varimax com normalização de Kaiser.

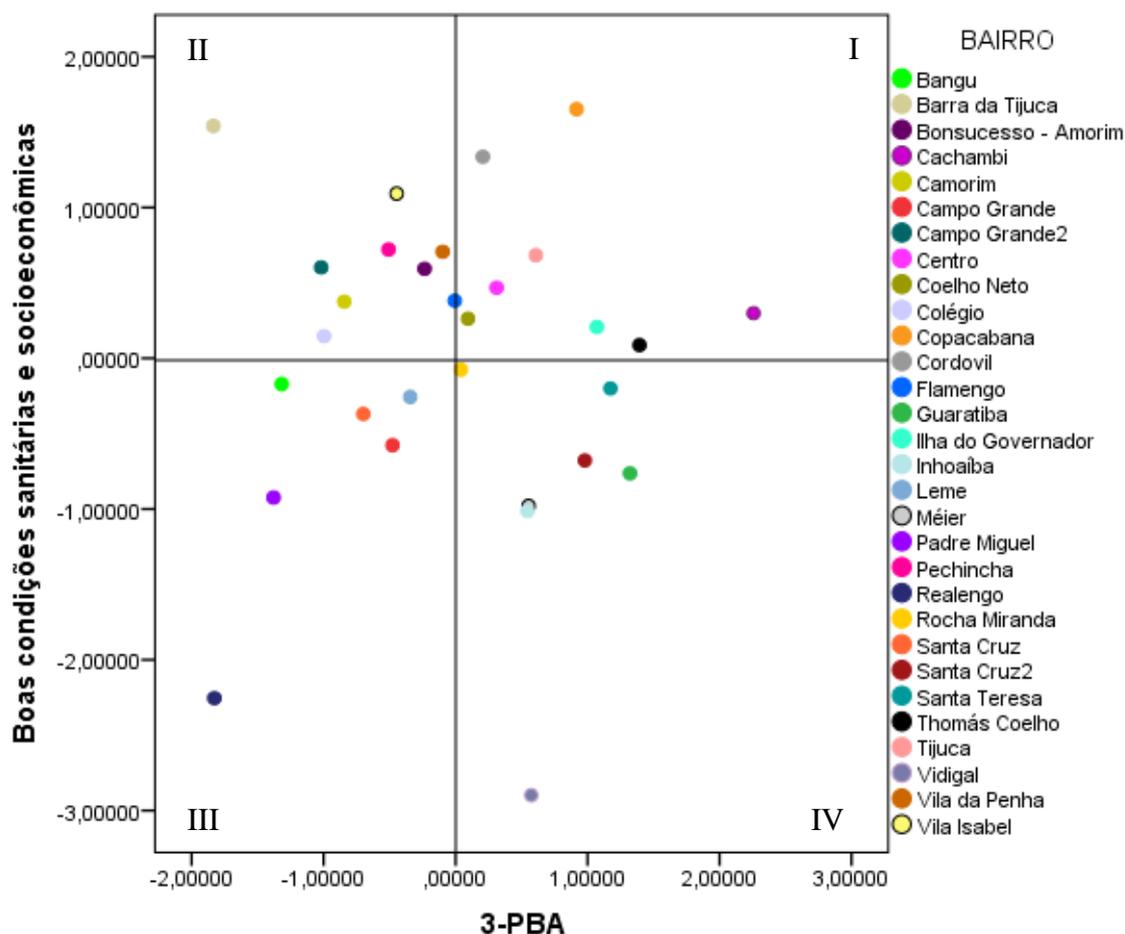


Figura 24 – Componente 1 (boas condições sanitárias e socioeconômicas) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).

Na avaliação da figura 24, considerando o sentido do círculo trigonométrico, percebe-se que no quadrante I, se tem melhores condições sanitárias e socioeconômicas, quanto mais acima do zero do eixo x, e mais amostras positivas para 3-PBA, quanto mais à direita do eixo y. No quadrante II, também se tem boas condições sanitárias, porém menos amostras positivas para 3-PBA. No quadrante III, se tem condições sanitárias e socioeconômicas piores que do quadrante anterior e menos amostras positivas para 3-PBA e no quadrante IV, também se tem condições sanitárias e socioeconômicas piores que do segundo quadrante anterior, porém mais amostras positivas para 3-PBA.

Em cada quadrante foi possível observar bairros das zonas Norte, Sul, Centro e Oeste juntos, agrupados pelas suas similaridades.

Como as principais variáveis de agrupamento foram relacionadas a boas condições sanitárias e socioeconômicas, através da distribuição dos bairros pelos quadrantes não foi

possível observar se determinada região geográfica ou condição foi determinante para o aumento dos níveis. Entretanto, quando foi utilizado o componente 3 (figura 25) que agrupou as variáveis escolaridade fundamental, condições sanitárias ruins, frequência de uso dentro de casa e dengue, observou-se que os quadrantes com maiores casos de condições ruins (I e II) refletiram de fato maiores quantidades de positivos para 3-PBA, como caso do quadrante I da que incluiu os bairros Santa Cruz, Santa Teresa, Rocha Miranda, Guaratiba e Tijuca. Com exceção do bairro da Tijuca, empiricamente observou-se de fato similaridades entre os bairros supracitados.

Dessa forma, embora não tenha sido determinado um padrão específico, seja geográfico ou por condições sociais, para a explicação dos níveis de 3-PBA, observou-se através das associações das variáveis de condições socioeconômicas que estas influenciam no aumento da quantidade de níveis positivos para o metabólito 3-PBA.

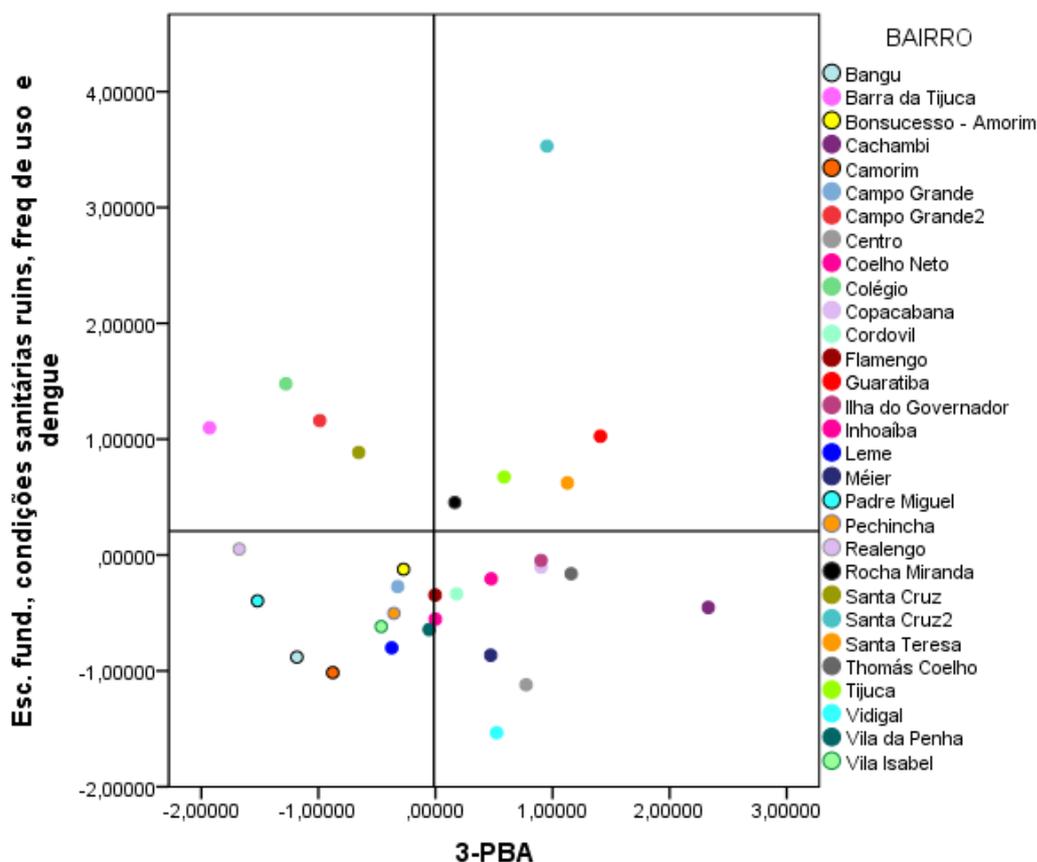


Figura 25 – Componente 3 (Escolaridade fundamental, condições sanitárias ruins, frequência de uso dentro de casa e dengue) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso).

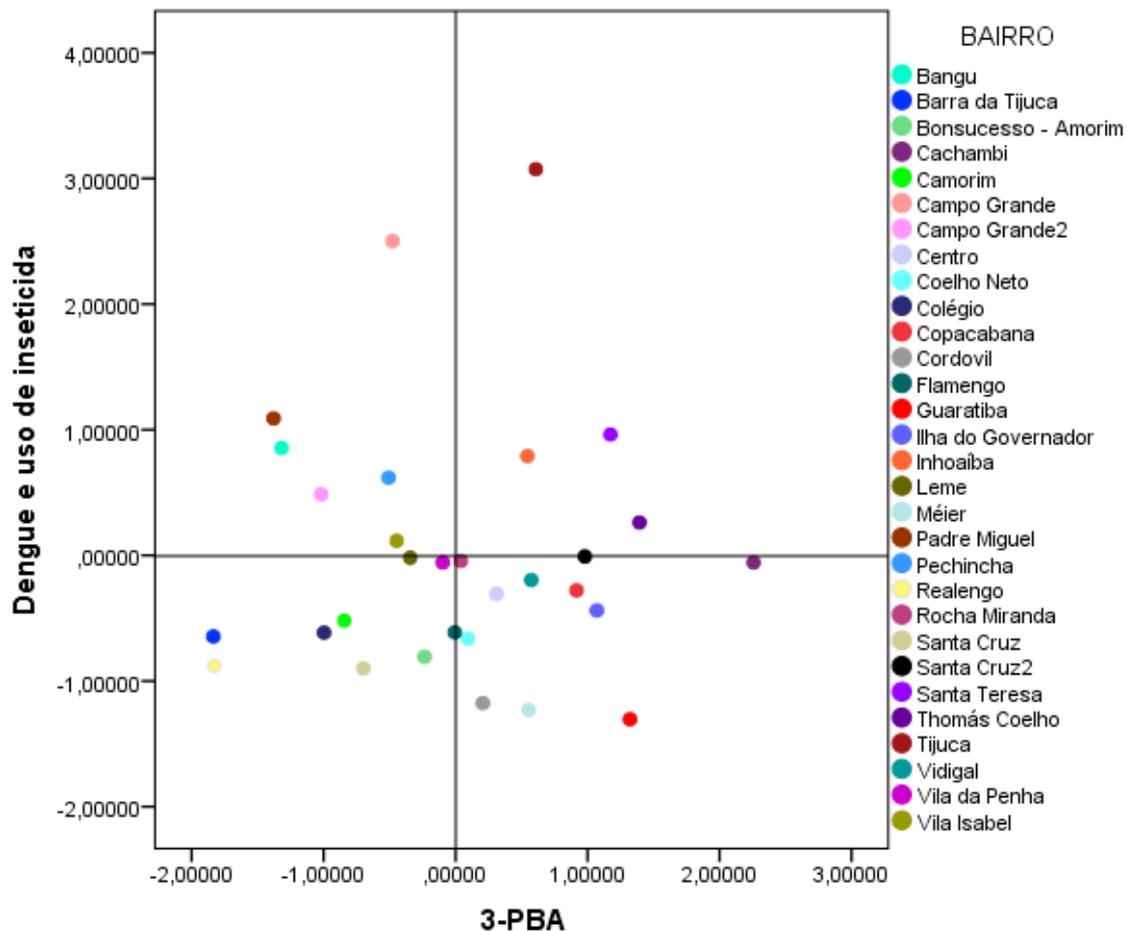


Figura 26 - Componente 4 (dengue e última utilização do inseticida) e Componente 7 (3-PBA positivo e frequência de uso)

Na avaliação da figura 26, os quadrantes III e IV representam menos dias desde a última utilização do inseticida e menos casos de dengue. Por causa do metabolismo do inseticida, o quadrante IV deveria ser o de maior número de bairros agrupados, o que de fato foi observado.

Em estudos conduzidos em outros países, poucos fazem correlações com padrões de uso, condições socioeconômicas ou hábitos alimentares. De forma geral, os estudos que fazem avaliações além das medidas dos níveis privilegiam a abordagem da exposição ambiental via alimentar. Em um estudo conduzido na Carolina do Norte, EUA, Raymer e colaboradores (2014) avaliaram correlações positivas entre o aumento dos níveis de 3-PBA e infestações por baratas nas residências e que, dada a sazonalidade do uso e rápido metabolismo dessas substâncias, essas correlações podem ser voláteis (RAYMER et al., 2014).

Na Austrália, os fatores determinantes do aumento da exposição foram relacionados à proximidade de áreas agrícolas, mas de forma geral não foram relacionados às variáveis investigadas no estudo (BABINA et al., 2012).

Já na Polônia, os fatores determinantes para a exposição aparecem como sendo através da via alimentar, e por aplicação de inseticidas para controle de infestações em animais nos últimos 6 meses, sendo que não foi demonstrada a investigação da exposição alimentar (WIELGOMAS; PISKUNOWICZ, 2013).

Em um estudo canadense, houve correlação dos níveis de metabólitos com fumo, uso de medicamentos não prescritos e uso de medicamento para controle de piolho (FORTIN et al., 2008)

Na avaliação da população canadense, várias variáveis socioeconômicas foram relacionadas aos níveis de metabólitos como o sexo (feminino apresentou maiores níveis, devido ao hábito de maior consumo de frutas e legumes), imigrantes, pessoas que utilizam inseticidas para tratamento de piolho e pulgas, e inseticida para uso em jardinagem no último mês. Além destas, o consumo de determinados alimentos como legumes, nozes, vegetais, peixes e frutos do mar, por mais de uma vez por semana, também tiveram correlações positivas com os maiores níveis do somatório de piretroides. Também foi evidenciado que o uso de inseticidas em casa ou no jardim foi fator preditivo para o aumento dos níveis de metabólitos (YE et al., 2015). Este foi o único estudo que relacionou com significância estatística o uso de inseticidas com os níveis de metabólitos encontrados na população estudada, e que podemos comparar aos resultados deste estudo.

Nos Estados Unidos, em um estudo conduzido com crianças, Lu *et al* (2006) relacionam níveis com o uso de inseticidas em casa e hábitos alimentares, atribuindo grande influência deste uso no aumento dos níveis.

4.3.6 Determinação dos níveis basais da população

Uma vez que se conheça o perfil de exposição da população carioca, serão possíveis proposições concretas e efetivas para a regulação deste tema na nossa cidade em primeira instância. A ideia principal foi que este modelo de avaliação da exposição e respectivo cálculo dos níveis basais para grupos não expostos ocupacionalmente possa ser utilizado em outras regiões do país, gerando mais conhecimento sobre essa temática.

Esta ação poderá ser entendida como uma possibilidade de indivíduos que estejam expostos ocupacionalmente, ou mesmo em casos de exposição aguda, acidentais ou intencionais, sejam diagnosticados através de um exame laboratorial sensível e específico para tal indicador.

Os resultados da pesquisa serão divulgados aos participantes do estudo e também será proposta uma ação educativa para que a população de forma geral possa estar mais atenta ao uso excessivo de inseticidas, sob risco de estar contaminando a si a à família (ANEXOS 9 e 10).

Considerando apenas um princípio ativo por frasco e sabendo que a maioria das formulações é vendida em embalagens de 300 mL, a cada frasco utilizado no interior de uma residência são borrifados no mínimo cerca de 0,25 g a 1,65 g de piretróides no ambiente doméstico, no período em que esse frasco for utilizado.

Não se teve a pretensão de abordar uma avaliação de risco, mas apenas para ilustrar, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os piretróides varia de 0,01 a 0,05 mg/kg de peso corpóreo e o Threshold Limit Value (TLV) (EPA, 2007) para alguns piretróides é de 5 mg/m³. Supondo que um cômodo domiciliar de 16 m² tem uma altura de 2 m, teremos 32 m³. Se for borrifado 1,65 g (1650 mg) neste volume teremos 51,6 mg/m³ o que ultrapassa em muito o valor limite recomendado. Entretanto é difícil estimar o quanto uma pessoa irá inspirar de piretróide junto com ar, sem fazer uma avaliação mais precisa, mas 1,65 g por frasco é uma quantidade grande se a exposição ocorrer em curto espaço de tempo.

Após a realização da consulta em supermercados a alguns inseticidas domésticos quanto à sua formulação, foi verificado que os mais utilizados são praletrina, imiprotrina, cipermetrina, deltametrina, esbiotrina, permetrina, d- fenotrina, d-aletrina, tetrametrina. O metabolismo destes princípios ativos geram os metabólitos cis/trans DCCA, cis DBCA, 3-PBA e 4-FPBA, sendo possível apenas a quantificação do 3-PBA e 4-FPBA. O 4-FPBA é específico pra ciflutrina e o 3-PBA é um metabólito comum aos princípios permetrina, cipermetrina, deltametrina, aletrina, resmetrina, fenvalerato, λ-cialotrina, fenotrina e fenpropatrina (BARR et al., 2010).

Pela recusa e ausência do participante, principalmente, o n perdido total foi de 32%, tendo-se este percentual variado nos bairros. A tabela 51 demonstra o percentual perdido em cada bairro. Através de teste binomial foi avaliada se essa perda foi seletiva ou aleatória, obtendo-se um pvalor com significância de 0,3. Dessa forma, considerou-se que a perda foi aleatória entre os bairros e a perda provocará um efeito de subestimação das variáveis, podendo, portanto, o valor de referência calculado ainda ser maior do que foi encontrado, havendo uma ampliação do n amostral.

Tabela 51 – Perda por bairro com n = 22 esperado

Bairro	N coletado	Percentual de perda (%)
Bangu	15	32
Barra da Tijuca	18	18
Bonsucesso - Amorim	17	23
Cachambi	16	27
Camorim	15	32
Campo Grande	14	36
Campo Grande2	16	27
Centro	17	23
Coelho Neto	14	36
Colégio	17	23
Copacabana	18	18
Cordovil	18	18
Flamengo	14	36
Guaratiba	14	36
Ilha do Governador	16	27
Inhoaíba	13	41
Leme	13	41
Méier	10	55
Olaria	16	27
Padre Miguel	11	50
Pechincha	16	27
Praça Seca	15	32
Rocha Miranda	16	27
Santa Cruz	13	41
Santa Cruz2	16	27
Santa Teresa	13	41
Thomás Coelho	16	27
Tijuca	17	23
Vila da Penha	16	27
Vila Isabel	16	27
Realengo	6	73
Vidigal	3	86

Silva e Roncalli afirmam que amostras com desempenho inferior a 50% do tamanho esperado podem se afastar dos critérios de precisão, e estimativas de erros padrão e efeitos de delineamento e precisam ser analisadas e, no caso deste estudo, apenas em 3 bairros houve uma perda maior do que esta (SILVA; RONCALLI, 2013).

Os critérios seguidos para determinação dos níveis basais foram baseados numa norma americana explicitados por Jones e Barker (2008), que recomenda toda a preparação para seleção, medição e avaliação da substância que se deseja determinar o valor de referência, (JONES; BARKER 2008), (HOROWITZ; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

Assim, o motivo da utilização dos metabólitos de piretróides, o método analítico utilizado, sua precisão e especificidade, os parâmetros estatísticos para intervalo de confiança, os parâmetros de seleção e amostragem, já foram descritos e discutidos em outros capítulos deste trabalho.

Para definição dos valores, foram ainda retirados os outliers a partir do teste de Grubbs, e feito o teste Qui-quadrado para avaliar se havia diferença significativa entre os níveis de homens e mulheres e idade. Não houve diferença entre os sexos, sendo o p-valor de 0,462 para o 3-PBA, e p-valor de 0,386 para o 4-FPBA. Também não houve diferença entre idades, sendo o p-valor de 0,319 para o 3-PBA e 0,242 para o 4-FPBA. Assim, os valores de referência não precisaram ser estratificados, nem por sexo, nem por idade.

Dessa forma, considerando o percentil 95 para o 3-PBA e o percentil 75 para o 4-FPBA, os valores basais desta população foram, respectivamente, 6,85 ng mL⁻¹ e 1,41 ng mL⁻¹.

Em relação à representatividade da amostra frente à população estudada, verificou-se que apesar das distribuições pelas faixas etárias estipuladas pelo IBGE serem diferentes (Figura 27), a dispersão dos valores ocorre dentro do intervalo de ± 1 desvio-padrão, sendo aceitável admitir que não é dependente da idade (Figura 28). Assim, caso a distribuição do estudo estivesse correlata à encontrada na população, seria esperado que os níveis fossem maiores com um n maior nas faixas etárias mais jovens, e o contrário nas faixas etárias mais idosas.

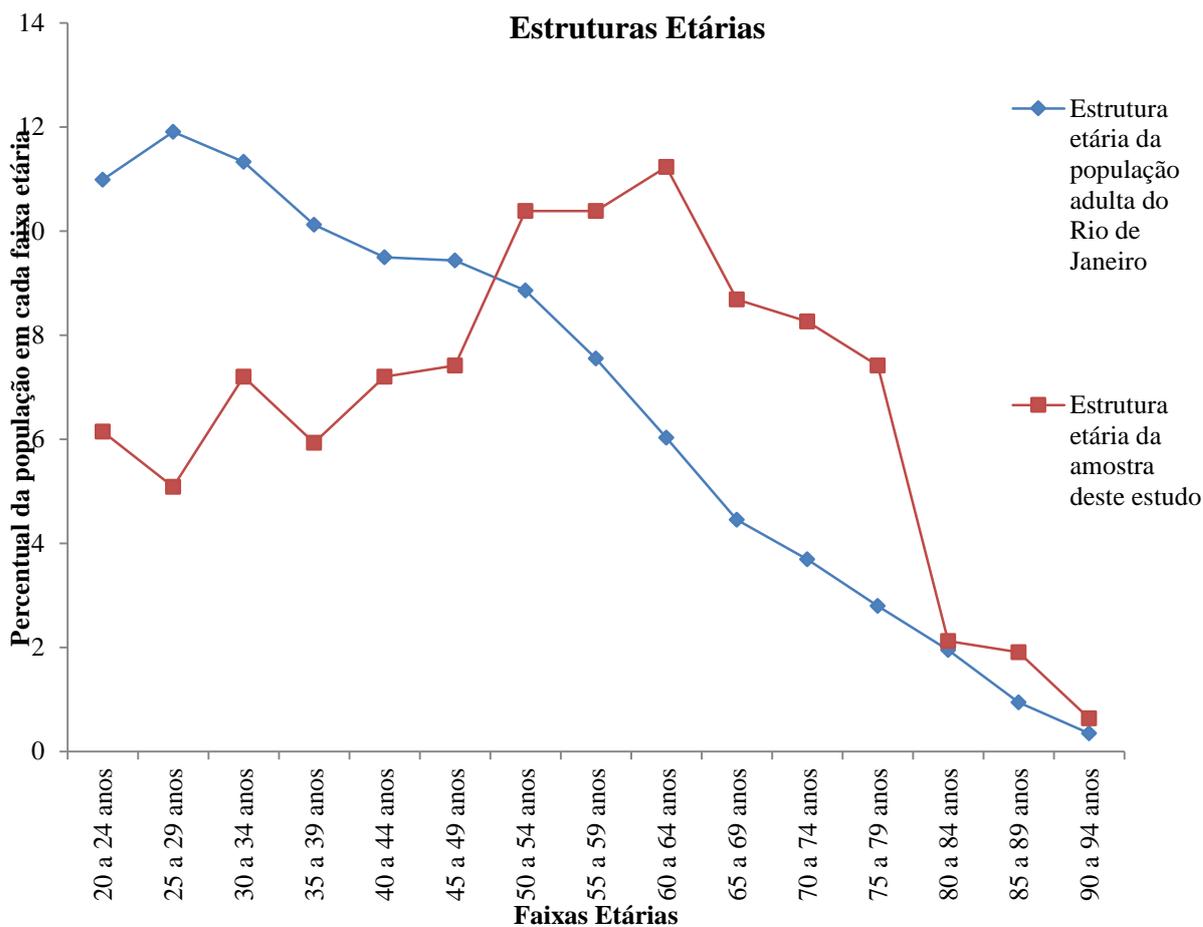


Figura 27 – Estruturas etárias da população adulta do Rio de Janeiro, segundo IBGE, e da amostra deste estudo.

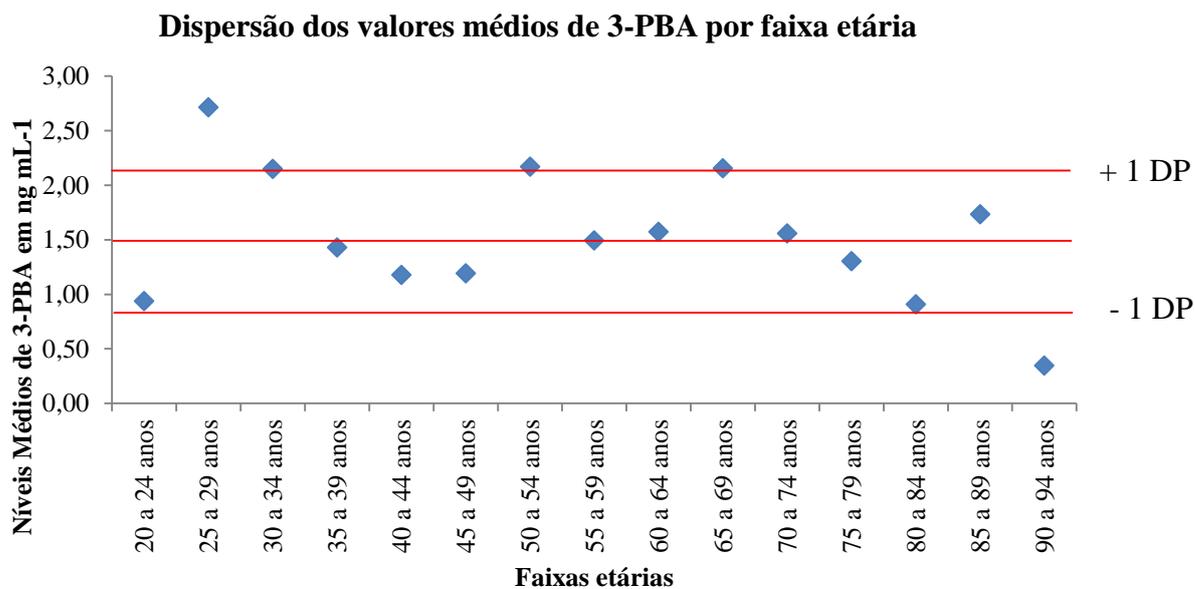


Figura 28 – Dispersão dos valores médios de 3-PBA por faixa etária, com valores médios e ± 1 desvio-padrão.

Vale enfatizar que este é o primeiro dado gerado para esses metabólitos em nosso país, portanto, precisam ser acumulados mais resultados para de fato expressarem um dado de monitoramento humano. Não podem ser utilizados isoladamente para avaliação do estado de saúde e servem apenas como um alerta para que a exposição seja minimizada. Como os piretróides são substâncias com curta meia-vida, devem ser reavaliados no caso de serem excedidos, pois se continuarem a ser excedidos pode significar uma fonte contínua de exposição como o uso de inseticidas para controle de vetores e alimentos e água contaminados (BEVAN et al., 2013), (HEUDORF et al., 2006).

4.3.7 Possibilidades de ações de prevenção e educação

Diante do cenário de grande exposição da população ocupacionalmente e ambientalmente exposta, o Ministério da Saúde está criando, desde 2007, mecanismos de fortalecimento das vigilâncias estaduais para que adotem estratégias adequadas à realidade local para efetivação do Plano Integrado de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Desde 2013, a partir da Portaria nº 2.938, de 20 de dezembro 2012, está autorizado repasse financeiro aos fundos estaduais de saúde, com inclusão de metas e indicadores nas Programações Anuais de Saúde com esta finalidade (BRASIL, 2012). Dentro destas estratégias de inclusão, acompanhamento e gestão do tema “agrotóxicos” nas vigilâncias estaduais e municipais, há também a obrigatoriedade de atendimento à Portaria MS Nº 2.914, de 12/12/2011, que estabelece os parâmetros de garantia da potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011c).

São apontados pelo Ministério da Saúde como grandes desafios à inclusão da exposição aos agrotóxicos como tema prioritário (BRASIL, 2010),(BRASIL, 2011a), a formação dos profissionais em vigilância em saúde ambiental, sanitária e saúde do trabalhador e a difusão da informação organizada para a população.

Existem também instâncias de discussão e parcerias intersetoriais que tratam deste tema como o Programa Nacional de Redução de Agrotóxicos – PRONARA, propostas de GT durante os eventos organizados para Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, eventos nacionais que contam com a participação de movimentos sociais como a Marcha das Margaridas, Confederação Nacional dos Trabalhadores na Agricultura – CONTAG, Articulação Nacional de Agroecologia – ANA, Associação Brasileira de Saúde Coletiva -

ABRASCO, Campanha Permanente Contra os Agrotóxicos e Pela Vida, Rede Brasileira de Justiça Ambiental – RBJA, dentre outros.

Os fóruns organizados de discussão sobre a temática dos agrotóxicos também costumam privilegiar a exposição humana urbana não só através da alimentação, mas também pelo uso massivo de inseticidas domésticos.

Alguns estudos apontam que a população ainda faz uso de telas e mosquiteiros para a proteção mecânica contra os insetos, principalmente os mosquitos (DIEL; FACCHINI; DALL'AGNOL, 2003). Poucos estudos são feitos para verificação da eficácia desta proteção mecânica, mas seria uma alternativa mais barata por ter maior durabilidade e que não oferece risco à saúde humana e ambiental.

A preferência pelo uso de inseticidas pode estar relacionada à desinformação da população sobre a toxicidade destas substâncias. O que é agravado pelo tipo de propaganda que chega à população, que imprime a estes produtos a ideia de proteção à saúde da família e segurança quanto ao uso, principalmente quando o inseticida tem odor agradável, o que pode aumentar ainda mais a exposição, já que a pessoa tende a permanecer no local após a aplicação do inseticida.

As embalagens dos inseticidas domésticos em geral não informam claramente ao consumidor sobre os riscos e toxicidade dos produtos e quando o fazem usam letras pequenas, de difícil leitura, e sobre a necessidade de esclarecimento da população com cartilhas de fácil compreensão para empregados domésticos e patrões, contendo inclusive formas de limpeza com substâncias mais simples e caseiras com mesma eficiência que os produtos comerciais, com sugestão que essas campanhas sejam encaminhadas pela Anvisa – MS (CORRÊA, 2005).

Num estudo conduzido pela SUCEN-SP (LEFEVRE et al., 2003), foram consideradas as ideias e valores dos profissionais na decisão de retirar a aplicação dos inseticidas nos domicílios, levando em conta a toxicidade dos produtos, o prejuízo à saúde ambiental, a retirada mecânica do vetor, e a necessidade de educação da população. Foram apontadas, por outro lado, a visão cética destes profissionais quanto à efetividade da campanha educativa para a população e a sua crença no uso dos inseticidas.

Estudos realizados pelo Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) da FIOCRUZ mostram que os jovens e as crianças em idade escolar devem ser os alvos prioritários para campanhas de esclarecimento sobre o uso seguro destas substâncias. Isto porque os trabalhadores adultos têm maior resistência a mudanças de hábito e à aceitação de verdades que eles dificilmente poderão constatar na prática, mas se preocupam muito com a

qualidade de vida de seus familiares. Para isto, foram elaboradas uma fotonovela para os jovens (Menina Veneno) e uma cartilha para as crianças (Descobrimo a Agricultura com o Jovem Neno) (DOMINGUEZ, 2010).

O Departamento de Vigilância Sanitária do Paraná – DEVS (“Inseticidas domésticos - cuidados em seu uso”, [s.d.]), elaborou um material sobre inseticidas domésticos que alerta sobre os riscos, cuidados durante o uso e outras formas de prevenção dos insetos. Materiais deste tipo poderiam servir de exemplo para que o Ministério da Saúde replicasse para toda população.

Ainda que a exposição esteja comparável a outros países, os dados apresentados neste trabalho apontam para a necessidade de adoção de outras condutas de prevenção e controle de vetores, ao invés do uso massivo de inseticidas, tais como campanhas de esclarecimento da população quanto ao uso de inseticidas domésticos, sua toxicidade e possibilidade de danos à saúde da família, incentivo ao uso de proteção mecânica para insetos, aumento do rigor quanto aos critérios de comercialização e propaganda dos inseticidas de venda livre, mudança na forma de atuação do poder público quanto à prevenção de focos de insetos, privilegiando outras estratégias como a ampliação expressiva da rede de esgotamento sanitário, não apenas o uso de inseticidas.

5 CONCLUSÃO

Um método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação de metabólitos de agrotóxicos piretroides, sendo eles o 3-PBA e 4-FPBA. Os metabólitos DBCA e DCCA não puderam ser avaliados, pois a otimização do método para esses compostos não foi eficiente. O custo para aquisição de padrões comercialmente disponíveis muito diluídos foi um grande entrave para o provimento deste material.

Foi feita uma amostragem por conglomerados, representativa da população adulta da cidade do Rio de Janeiro em 474 domicílios distribuídos proporcionalmente pelos setores censitários da cidade e, muito embora tenha ocorrido viés de seleção, foi avaliada que a perda entre os bairros ocorreu de forma aleatória, não comprometendo a inferência da amostra.

A prevalência da exposição a piretroides na população adulta carioca foi de aproximadamente 32%, apresentando médias de 2,16 ng mL⁻¹ para o 3-PBA e 1,01 ng mL⁻¹ para o 4-FPBA.

As variáveis qualitativas foram avaliadas e comparadas aos níveis de metabólitos tendo sido encontradas poucas correlações estatisticamente significativas.

Os níveis de basais de exposição para piretroides foram estabelecidos para os metabólitos sendo 6,85 ng mL⁻¹ para o 3-PBA e 1,41 ng mL⁻¹ para o 4-FPBA, sendo estes comparáveis a países que têm histórico de monitoramento populacional.

Este estudo transversal possibilitou a observação da prevalência da exposição da piretroides na população adulta do município do Rio de Janeiro, não sendo possível avaliar uma exposição crônica da população, seja pela via alimentar, seja pelo uso de inseticidas. Outros estudos precisam ser realizados para ampliação do escopo do método para que outros metabólitos possam ser investigados, bem como para que sejam investigadas outras vias de exposição, principalmente a alimentar e a sazonalidade do uso do inseticida, pelo menos em subamostras da população.

O perfil e a magnitude de exposição da população brasileira a agrotóxicos ainda é pouco conhecido, principalmente através de avaliação de indicadores de dose interna. No município do Rio de Janeiro, esse dado é inexistente e a proposta deste trabalho foi estabelecer um valor de referência para piretróides na população carioca para, dessa forma, compreender e extrapolar o modelo para a avaliação em outras regiões do país. Muitos problemas que ocorreram neste trabalho poderão ser evitados por outros pesquisadores.

Além disso, grupos mais vulneráveis, como as crianças, precisam também ser avaliados, dada a toxicidade destes produtos e possível influência na saúde deste grupo populacional.

Os níveis de exposição a agrotóxicos piretróides da população carioca, que não tem tradição de prática agrícola, estão intrinsicamente relacionados ao uso de inseticidas domésticos por uso próprio ou por empresas de desinsetização, alimentação e ingestão de água que contém resíduos destes princípios ativos. Ainda que não configurada uma exposição elevada, tanto quanto as exposições ocupacionais, é de total relevância o conhecimento destes níveis de exposição para que ações de vigilância possam ser estruturadas. Não se pode determinar valor de referência apenas usando estudos de outros países, visto que apresentam realidades muito diferentes do Brasil.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPLA. **Anuário 2015**. [s.l.] ABIPLA, 2015.

ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 8–16, nov. 1996.

ANNESLEY, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1041–1044, 1 jul. 2003.

ANTIGNAC, J.-P. et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1–2, p. 129–136, jan. 2005.

ANVISA. RDC nº 52. Dispõe sobre o funcionamento de empresas especializadas na prestação de serviço de controle de vetores e pragas urbanas e dá outras providências. . 22 out. 2009, Sec. 204, p. 61.

ANVISA. Resolução RDC 34 de 16/08/2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos saneantes desinfestantes. . 18 ago. 2010 a, Sec. I, p. 42.

ANVISA. Resolução-RDC 59 de 17/12/2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. . 22 dez. 2010 b, Sec. I, p. 80.

ANVISA. **Monografias Autorizadas de Agrotóxicos**, 2016a. . Acesso em: 10 abr. 2016

ANVISA. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS - PARA RELATÓRIO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS MONITORADAS NO PERÍODO DE 2013 A 2015**, 25 nov. 2016b.

AQUINO NETO, F. R. DE; NUNES, D. DA S. E S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciencia, 2003.

ARAÚJO, D. V. Análise: Impacto econômico da epidemia do vírus zika. 13 mar. 2016.

ARAÚJO, A. P. DE; OTHERS. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco**. [s.l.] Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2013.

ASTDR, E. **Toxicological profile for Pyrethrins e Pyrethroids**. [s.l.: s.n.].

BABINA, K. et al. Environmental exposure to organophosphorus and pyrethroid pesticides in South Australian preschool children: A cross sectional study. **Environment International**, v. 48, p. 109–120, nov. 2012.

BAKER, S. E. et al. Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 10, n. S1, p. 789, 2000.

BAKER, S. E.; OLSSON, A. O.; BARR, D. B. Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography?Tandem Mass Spectrometry Method for Quantifying Urinary Metabolites of

Synthetic Pyrethroid Insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, abr. 2004.

BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 85–103, out. 2014.

BARR, D. B. et al. Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 3, p. 811–818, 20 set. 2007.

BARR, D. B. et al. Urinary Concentrations of Metabolites of Pyrethroid Insecticides in the General U.S. Population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 742–748, 3 fev. 2010.

BECKER, K. et al. GerES IV Pilot Study: Assessment of the exposure of German children to organophosphorus and pyrethroid pesticides. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, n. 3, p. 221–233, maio 2006.

BECKER, K.; CONRAD, A.; MUSSIG ZUFKA, M. **German Environmental Survey for Children 2003/06 - GerES IV - Human Biomonitoring Levels of selected substances in blood and urine of children in Germany**, jan. 2008.

BERENDSEN, B. J. A. et al. A critical assessment of the performance criteria in confirmatory analysis for veterinary drug residue analysis using mass spectrometric detection in selected reaction monitoring mode: Assessment of performance in veterinary drug residue analysis. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 5–6, p. 477–490, maio 2016.

BEVAN, R. et al. Reference ranges for key biomarkers of chemical exposure within the UK population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 2, p. 170–174, mar. 2013.

Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. . [s.l.] Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Decreto de Lei nº 467 de 13/02/1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências. . 13 fev. 1969.

BRASIL. 7802. 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. . 7 dez. 1989.

BRASIL. 4074 de 04/01/2002. 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. . 1 abr. 2002.

BRASIL. 298. Institui Grupo de Trabalho para elaboração das diretrizes para as atividades das áreas da Toxicologia no Sistema Único de Saúde (SUS). . 2 set. 2010.

BRASIL. 104. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. . 25 jan. 2011 a.

BRASIL. 2914. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. . 12 dez. 2011 b.

BRASIL. 2914 de 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. . 12 dez. 2011 c.

BRASIL. 397. Autoriza o repasse do Fundo Nacional de Saúde aos Fundos Estaduais de Saúde e do Distrito Federal, para o fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, destinado aos Estados e Distrito Federal. . 20 dez. 2012.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BURNS, C. J. et al. Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 16, n. 3–4, p. 127–283, abr. 2013.

CALDAS, E. D.; DE SOUZA, M. V.; JARDIM, A. N. O. Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 1, p. 71–79, jan. 2011.

CÂMARA NETO, H.; AUGUSTO, L. **Condições sanitárias do ambiente urbano e o uso de pesticida doméstico: implicações para a saúde**. Dissertação—Recife: Fundação Oswaldo Cruz/NESC/CPqAM/FIOCRUZ, 2000.

CARNEIRO, F. F.; ABRASCO (EDS.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro : São Paulo: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio ; Expressão Popular, 2015.

CASARETT, L. J.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. (EDS.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed ed. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2001.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 99–117, 7 jan. 2013.

CASTRO, J.; ROZEMBERG, B. **Práticas e sentidos atribuídos ao uso e divulgação de agentes químicos potencialmente tóxicos no ambiente doméstico**. Tese—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ, 2011.

CAZORLA-REYES, R. et al. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 183–196, jul. 2011.

CDC. Laboratory Procedure Manual. **Specific organophosphorous pesticides, synthetic pyrethroids and select herbicides in urine**, v. 6103.03, 1 maio 2013.

CDC. **Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals**. [s.l.] CDC, 2017.

CHASKOPOULOU, A. et al. Nontarget effects of aerial mosquito adulticiding with water-based unsynergized pyrethroids on honey bees and other beneficial insects in an agricultural ecosystem of north Greece. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 720–724, maio 2014.

CHUANG, J. C. et al. Biological monitoring of 3-phenoxybenzoic acid in urine by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1317–1323, fev. 2011.

CONSTENLA, D. et al. Costing Dengue Fever Cases and Outbreaks: Recommendations from a Costing Dengue Working Group in the Americas. **Value in Health Regional Issues**, v. 8, p. 80–91, dez. 2015.

CORRÊA, L. M. L. **Saneantes Domissanitários e Saúde: um Estudo Sobre a Exposição de Empregadas Domésticas**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2005.

COSTA, C. et al. Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: An observational study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 796–800, nov. 2013.

CRAWFORD SCIENTIFIC; LC-GC MAGAZINE. **Retention Time Variability in HPLC**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.chromacademy.com/chromatography-retention-time-variability-in-HPLC.html>>. Acesso em: 20 jan. 2017

DAVIS, M. D. et al. Semi-automated solid phase extraction method for the mass spectrometric quantification of 12 specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, and select herbicides in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 929, p. 18–26, jun. 2013.

DAWSON, P. H. et al. The use of triple quadrupoles for sequential mass spectrometry: 1—The instrument parameters. **Organic Mass Spectrometry**, v. 17, n. 5, p. 205–211, maio 1982.

DE, A. et al. Worldwide Pesticide Use. In: DE, A. et al. (Eds.). . **Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles**. New Delhi: Springer India, 2014. p. 5–6.

DEWAILLY, E. et al. Evaluation of pyrethroid exposures in pregnant women from 10 Caribbean countries. **Environment International**, v. 63, p. 201–206, fev. 2014.

DIEL, C.; FACCHINI, L. A.; DALL'AGNOL, M. M. Inseticidas domésticos: padrão de uso segundo a renda per capita. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 83–90, 2003.

DOMINGUEZ, B. Agrotóxicos. Proteção pra quem? **Revista Radis**, v. 95, p. 13, jul. 2010.

DOS SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 339–349, 2007.

EGEGHY, P. P. et al. Review of Pesticide Urinary Biomarker Measurements from Selected US EPA Children's Observational Exposure Studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 12, p. 1727–1754, 24 maio 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Permethrin e ResmethrinTEACH Chemical Summary US EPA**, 18 jan. 2007. Disponível em: <nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100BNR5.txt>. Acesso em: 4 out. 2016

EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed - SANTE/11945/2015**, 1 jan. 2016.

FERLAND, S. et al. Detailed Urinary Excretion Time Courses of Biomarkers of Exposure to Permethrin and Estimated Exposure in Workers of a Corn Production Farm in Quebec, Canada. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 59, n. 9, p. 1152–1167, nov. 2015.

FIORI, M. et al. Evaluation of two different clean-up steps, to minimise ion suppression phenomena in ion trap liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of beta agonists in calves urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1–2, p. 207–210, jan. 2005.

Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/424/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 19 set. 2016.

FOOK, S. M. L. et al. Avaliação das intoxicações por domissanitários em uma cidade do Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 1041–1045, maio 2013.

FORTIN, M.-C. et al. Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. **Environmental Research**, v. 107, n. 3, p. 343–350, jul. 2008.

FRÉRY, N. et al. Exposure of the French population to environmental pollutants – Environmental components of the French National Survey on Nutrition and Health – Initial results. **French Institute for Public Health Surveillance**, p. 12, set. 2012.

FUREY, A. et al. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. **Talanta**, v. 115, p. 104–122, out. 2013.

GOMES, R. L. et al. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 5, p. 1133–1140, jul. 2009.

GUINATI, B.; GONÇALVES, M.; REED, E. INSETICIDAS DOMÉSTICOS – COMPOSIÇÃO QUÍMICA, RISCOS E PRECAUÇÕES NA SUA MANIPULAÇÃO. **Estudos, Goiânia**, v. 41, n. 1, p. 86–94, mar. 2014.

HANDAL, A. J. et al. Characterization of Pesticide Exposure in a Sample of Pregnant Women in Ecuador. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 4, p. 627–639, maio 2016.

HEUDORF, U. et al. Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, n. 3, p. 293–299, maio 2006.

HEUDORF, U.; ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 3, p. 213, 2001.

HEUDORF, U.; ANGERER, J.; DREXLER, H. Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 77, n. 1, p. 67–72, 1 jan. 2004.

HOPPIN, J. A. et al. Pesticide use and chronic bronchitis among farmers in the agricultural health study. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 12, p. 969–979, dez. 2007.

HOPPIN, J. A. et al. Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the Agricultural Health Study. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 6, p. 1296–1303, 1 dez. 2009.

HOROWITZ, G. L.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline**. [s.l: s.n.].

IBAMA. **Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil - 2014**. Brasília, DF: IBAMA, MMA, 2016.

IBGE. **Agroindústria**. [s.l: s.n.].

IBGE. **Cadastro Nacional de Endereços para Fins Estatísticos**, fev. 2015. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demografico_2010/Cadastro_Nacional_de_Enderecos_Fins_Estatisticos/RJ/>

IBGE. **Síntese do município do Rio de Janeiro**, 2016.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – JUL/2011. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS** Documento de caráter orientativo. . jul. 2011.

INMETRO. **Vocabulário Internacional de Metrologia–Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM)**. 2012.

Inseticidas domésticos - cuidados em seu uso. Departamento de Vigilância Sanitária do Paraná, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/ACS/InformeDEVUSodeInseticidasDomesticos.pdf>>

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Análises e Indicadores do Agronegócio. Defensivos agrícolas: em 2014, faturamento do segmento foi o destaque**, v. 10, p. número 5, 2015.

INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009**. Geneva: International Programme on Chemical Safety, 2010.

JAENSSON, A. et al. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 1–9, fev. 2007.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607–616, jun. 2012.

JONES, G.; BARKER, A. Reference intervals. **Clin Biochem Rev**, v. 29, n. Suppl 1, p. S93–7, 2008.

KIMATA, A. et al. Comparison of urinary concentrations of 3-phenoxybenzoic acid among general residents in rural and suburban areas and employees of pest control firms. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, n. 10, p. 1173–1178, nov. 2009.

KISH, L. **Survey sampling**. New York: Wiley, 1995.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J. Stomach cancer incidence in Brazil: an ecologic study with selected risk factors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, p. S85–S92, 1997.

KOLACZINSKI, J. H.; CURTIS, C. F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 697–706, maio 2004.

KOUREAS, M. et al. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. **Toxicology Letters**, v. 210, n. 2, p. 155–168, abr. 2012.

LE GRAND, R. et al. Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. **Toxicology Letters**, v. 210, n. 2, p. 248–253, abr. 2012.

LEFEVRE, A. M. C. et al. Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 4, dez. 2003.

LENG, G. et al. Pyrethroids used indoor - ambient monitoring of pyrethroids following a pest control operation. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 208, n. 3, p. 193–199, maio 2005.

LENG, G.; GRIES, W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 814, n. 2, p. 285–294, 25 jan. 2005.

LENG, G.; KÜHN, K.-H.; IDEL, H. Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. **Science of the total environment**, v. 199, n. 1–2, p. 173–181, 1997.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 2a edição ed. Rio de Janeiro: Rede Brasileira de Justiça Ambiental : Articulação Nacional de Agroecologia, 2012.

MARGARITI, M. G.; TSAKALOF, A. K.; TSATSAKIS, A. M. Analytical methods of biological monitoring for exposure to pesticides: recent update. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 29, n. 2, p. 150–163, 2007.

MCCARTHY, A. R. et al. Estrogenicity of pyrethroid insecticidemetabolites. **J. Environ. Monit.**, v. 8, n. 1, p. 197–202, 2006.

MCKELVEY, W. et al. Population-Based Biomonitoring of Exposure to Organophosphate and Pyrethroid Pesticides in New York City. **Environmental Health Perspectives**, 27 set. 2013.

MEI, H. et al. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 1, p. 97–103, 15 jan. 2003.

MELLO, M. G. DA S.; ROZEMBERG, B.; CASTRO, J. S. M. Domissanitários ou domitóxicos? A maquiagem dos venenos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 23, n. 2, p. 101–108, jun. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 397. Constitui Grupo de Trabalho, no âmbito do Ministério da Saúde, em caráter permanente, para elaborar e acompanhar a implementação do Plano Integrado de ações de vigilância em saúde relacionada a riscos e agravos provocados por agrotóxicos e de medidas preventivas e de controle do uso de agrotóxicos visando à proteção à saúde humana e dá outras providências. . 10 set. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações da Secretaria de Vigilância em Saúde sobre o uso de larvicidas**, 27 mar. 2014. . Acesso em: 8 abr. 2016

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Rio de Janeiro recebe larvicida para tratar 300 milhões de litros de água**, 14 dez. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21239-rio-de-janeiro-recebe-larvicida-para-tratar-300-milhoes-de-litros-de-agua>>. Acesso em: 4 ago. 2016

MORGAN, M. K. et al. An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in Ohio: Environmental pathways to cis- and trans-permethrin exposure. **Environmental Research**, v. 104, n. 2, p. 266–274, jun. 2007.

MORGAN, M. K. Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 12, p. 2964–2985, 17 ago. 2012a.

MORGAN, M. K. Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 12, p. 2964–2985, 17 ago. 2012b.

OLIVEIRA, L. B. et al. Perfil do uso populacional de inseticidas domésticos no combate a mosquitos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 79, 6 nov. 2015.

OLSSON, A. O. et al. A Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Multiresidue Method for Quantification of Specific Metabolites of Organophosphorus Pesticides, Synthetic Pyrethroids, Selected Herbicides, and DEET in Human Urine. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 9, p. 2453–2461, maio 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Pesticides and their application for control of vectors and pests of public health importance** WHOPEP, , 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/69223>>. Acesso em: 4 out. 2016

PANUWET, P. et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 93–105, 3 mar. 2016.

PERIAT, A. et al. Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1439, p. 42–53, mar. 2016.

PERRY, M. J. et al. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 113–118, jan. 2007.

QI, X. et al. Urinary pyrethroid metabolites among pregnant women in an agricultural area of the Province of Jiangsu, China. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 5, p. 487–495, set. 2012.

RAYMER, J. H. et al. Pesticide exposures to migrant farmworkers in eastern NC: Detection of metabolites in farmworker urine associated with housing violations and camp characteristics: Pesticide Markers and Migrant Camp Characteristics. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 57, n. 3, p. 323–337, mar. 2014.

RUPP, I. et al. Selection bias due to non-response in a health survey among patients with rheumatoid arthritis. **EUROPEAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH**, v. 12, n. 131–135, 2002.

SAILLENFAIT, A.-M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J.-P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 3, p. 281–292, maio 2015a.

SAILLENFAIT, A.-M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J.-P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 3, p. 281–292, maio 2015b.

SCHETTGEN, T. et al. New gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. **Journal of Chromatography B**, v. 778, n. 1, p. 121–130, 2002.

SCHLITTENBAUER, L.; SEIWERT, B.; REEMTSMA, T. Matrix effects in human urine analysis using multi-targeted liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1415, p. 91–99, out. 2015.

SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; KEIL, F. Before the Curtain Falls: Endocrine-Active Pesticides – A German Contamination Legacy. In: WHITACRE, D. M. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213**. New York, NY: Springer New York, 2011. v. 213p. 137–159.

SCHULZ, C. et al. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 6, p. 637–647, nov. 2009.

SHAFER, T. J.; MEYER, D. A.; CROFTON, K. M. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 123–136, 14 out. 2004.

SILVA, N. N. DA. **Amostragem probabilística: um curso introdutório**. São Paulo: EDUSP, 2004.

SILVA, N. N. DA; RONCALLI, A. G. Plano amostral, ponderacao e efeitos do delineamento da Pesquisa Nacional de Saude Bucal. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 3–11, dez. 2013.

SINGLETON, S. T. et al. Characterization of α -cypermethrin exposure in Egyptian agricultural workers. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 4–5, p. 538–545, abr. 2014.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6th ed ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8 ed., 7. print ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press, 1996.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3–59, 2002.

SODERLUND, D. M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 165–181, fev. 2012.

TAO, L. et al. Simultaneous quantitation of seven pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry: Sample Preparation. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 4, p. 773–780, fev. 2013.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, set. 2004.

TEIXEIRA, C. F.; DA SILVA AUGUSTO, L. G.; MORATA, T. C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 417–423, 2003.

THIPHOM, S. et al. Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 1, p. 15–22, 2 jan. 2014.

TORRE, C. A. L. DE LA et al. Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1–9, 2015.

TRUNNELLE, K. J. et al. Urinary Pyrethroid and Chlorpyrifos Metabolite Concentrations in Northern California Families and Their Relationship to Indoor Residential Insecticide Levels, Part of the Study of Use of Products and Exposure Related Behavior (SUPERB). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 1931–1939, 4 fev. 2014a.

TRUNNELLE, K. J. et al. Concentrations of the urinary pyrethroid metabolite 3-phenoxybenzoic acid in farm worker families in the MICASA study. **Environmental Research**, v. 131, p. 153–159, maio 2014b.

UEYAMA, J. et al. Urinary excretion of 3-phenoxybenzoic acid in middle-aged and elderly general population of Japan. **Environmental Research**, v. 109, n. 2, p. 175–180, fev. 2009.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. **Center for Urban Ecology and Sustainability**, 2013.

VIACAVA, F.; OTHERS. Informações em saúde: a importância dos inquéritos populacionais. 2002.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, jun. 2007.

WALDMAN, E. A. et al. Inquéritos populacionais: aspectos metodológicos, operacionais e éticos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 168–179, 2008.

WIELGOMAS, B. Variability of urinary excretion of pyrethroid metabolites in seven persons over seven consecutive days—Implications for observational studies. **Toxicology Letters**, v. 221, n. 1, p. 15–22, jul. 2013.

WIELGOMAS, B.; NAHORSKI, W.; CZARNOWSKI, W. Urinary concentrations of pyrethroid metabolites in the convenience sample of an urban population of Northern Poland. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 3, p. 295–300, jun. 2013.

WIELGOMAS, B.; PISKUNOWICZ, M. Biomonitoring of pyrethroid exposure among rural and urban populations in northern Poland. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2547–2553, nov. 2013.

WILEN, C. Survey of residential pesticide use in the Chollas Creek area of San Diego county and Delhi channel of Orange county, California. **University of California Statewide IPM project**. URL http://www.cdpr.ca.gov/docs/sw/contracts/chollas_survey.pdf, 2002.

WILEN, C. A. Survey of residential pesticide use and sales in the San Diego Creek Watershed of Orange County, California. **Prepared for the CDPR, Univ. Calif-Riverside Statewide Integrated Pest Management Program**, 2001.

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 19 set. 2016.

WU, Y.; MIAO, H.; FAN, S. Separation of chiral pyrethroid pesticides and application in pharmacokinetics research and human exposure assessment. **Pesticides in the modern world—Effects of pesticides exposure**. Rijeka, Croatia: InTech, p. 139–166, 2011.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4451–4459, set. 1984.

YE, M. et al. Occupational Pesticide Exposures and Respiratory Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6442–6471, 28 nov. 2013.

YE, M. et al. Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 7, p. 616–626, out. 2015.

YOSHIMITANAKA, O. et al. Uso da análise de clusters como ferramenta de apoio à gestão no SUS. **Saúde e Sociedade**, v. 24, n. 1, p. 34–45, mar. 2015.

YOSHINAGA, J. et al. Pyrethroid insecticide exposure and reproductive hormone levels in healthy Japanese male subjects. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 416–420, maio 2014.

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

ANEXO 1

1. MATERIAIS PARA ANÁLISE LABORATORIAL

Frascos de vidro âmbar com rosca, com capacidade para 4 mL e tampa com selo de teflon

Frascos de plástico com rosca, com capacidade para 50 mL

Pipetas graduadas de 5 mL

Seringas para cromatografia Hamilton, com capacidade de 10 μ L

Seringas para cromatografia Hamilton, com capacidade de 50 μ L

Seringas para cromatografia Hamilton, com capacidade de 250 μ L

Seringas para cromatografia Hamilton, com capacidade de 500 μ L

Pipetas Pasteur

Bécheres de vidro com capacidade de 250 mL

Balões volumétricos de vidro, com capacidade de 50 mL

Balões volumétricos de vidro, com capacidade de 25 mL

Balões volumétricos de vidro, com capacidade de 5 mL

Tubo de ensaio de vidro com fundo cônico, com capacidade para 15 mL

Tubo concentrador de vidro, graduado, com capacidade para 25 mL

Vial transparente com capacidade de 2 mL

Micro vial com capacidade para 150 μ L

Tampa rosqueada com septo de teflon para vial

Fitas para medição de pH, marca Merck

Pipeta automática monocanal Eppendorf com volume variável de 100-1000 μ L

Pipeta automática monocanal Eppendorf com volume variável de 20-200 μ L

Pipeta automática monocanal Eppendorf com volume variável de 1-5 mL

Filtro de seringa descartável Millipore, diâmetro 13 mm, PTFE, poro de 0,22 μ m.

Seringa de plástico descartável para insulina, capacidade de 1 mL

Ponteiras plásticas com capacidade para até 200 μ L

Ponteiras plásticas com capacidade para até 1000 μ L

Ponteiras plásticas com capacidade para até 5000 μ L

Coluna para extração em fase sólida, Oasis® HLB 60mg/3mL, marca Waters

Coluna para extração em fase sólida, C₁₈ 500mg/6mL, marca JTBaker

Coluna para extração em fase sólida, SAX 500mg/6mL, marca Agilent

2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Acetona grau resíduo de pesticida J.T. Baker

Metanol grau HPLC J.T. Baker

Metanol grau LC-MS J.T. Baker

Acetonitrila grau HPLC J.T. Baker

Água Tipo 1

Ácido acético, pureza 96%, marca Merck

Ácido fórmico, pureza 89%, marca Merck

β glicuronidase, frasco com 3.107.000U/g, marca Sigma

Padrão para calibração do Espectrômetro de Massas, Politirosina, com os constituintes, Tyr1 a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tyr3 a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tyr6 a 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, metanol/ácido fórmico a 50%/0,1% e água

2.1 Padrões de Metabólitos de Agrotóxicos

Padrões de metabólitos, com seus respectivos CAS, marcas comerciais, graus de pureza e concentrações.

Metabólitos	CAS	Marca	Pureza (%)	Concent. Padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano) ácido carboxílico DCCA, solução em metanol Lote 40813ME Validade 26/08/19 Proporção 2/3 dos isômeros cis/trans	55701-05-8	Dr. Ehrenstorfer	99,0	10,000
3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano) ácido carboxílico DBCA, solução em metanol Lote 41020ME Validade 20/10/17	63597-73-9	Dr. Ehrenstorfer	99,3	10,000
4-fluor-3-fenoxi ácido benzoico – 4FPBA, solução em acetonitrila Lote 40417AL Validade 24/04/17	77279-89-1	Dr. Ehrenstorfer	95,5	100,000
3-fenoxi ácido benzoico 3PBA Lote 90127 Validade 09/02/15	3739-38-6	Dr. Ehrenstorfer	99,0	---

2.2 Padrão interno

Padrão interno, com seu respectivo CAS, marca comercial, grau de pureza e concentração.

Metabólitos	CAS	Marca	Pureza (%)	Concent. padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
3-fenoxi ácido benzoico (fenoxi – $^{13}\text{C}_6$, 99%)		Cambridge		
3PBA-C13, solução em acetonitrila Lote SDBD-008 Validade 08/09/21	3739-38-6	Isotope Laboratories, Inc	98,8	100,000

2.3 Gases

Nitrogênio comercial (99,99%)

Argônio ultra puro (99,9999%)

2.4 EQUIPAMENTOS

Evaporador com atmosfera de nitrogênio, de vidro, com dez posições

Evaporador com atmosfera de nitrogênio, com 27 posições, marca Pierce®

Banho de sonificação, marca Branson® modelo 5210

Sistema de ultra-purificação de água, marca Millipore®

Balança analítica com precisão de 0,1 mg, marca Mettler®, modelo AE 200

Câmara de vácuo com 24 posições, marca JT Baker®

Bomba de vácuo, marca Primatec®

Cromatógrafo em fase líquida, marca Thermo Scientific®, modelo Surveyor

Espectrômetro de massas com triplo quadrupolo, marca Thermo Scientific®, modelo TSQ Quantum, com software Xcalibur®.

ANEXO 2

	População total	Homens	Mulheres
Rio de Janeiro	6 320 446	2 959 817	3 360 629
Anchieta	158 318	74 195	84 123
Anchieta, Guadalupe, Parque Anchieta, Ricardo de Albuquerque			
Bangu	428 035	208 541	219 494
Bangu, Gericinó, Padre Miguel, Senador Camará			
Barra da Tijuca	300 823	144 136	156 687
Barra da Tijuca, Camorim, Grumari, Itanhangá, Joá, Recreio dos Bandeirantes, Vargem Grande, Vargem Pequena			
Botafogo	239 729	105 433	134 296
Botafogo, Catete, Cosme Velho, Flamengo, Glória, Humaitá, Laranjeiras, Urca			
Campo Grande	542 084	258 078	284 006
Campo Grande, Cosmos, Inhoaíba, Santíssimo, Senador Vasconcelos			
Centro	41 142	19 289	21 853
Cidade de Deus	36 515	17 189	19 326
Complexo do Alemão	69 143	33 800	35 343
Copacabana	161 191	68 944	92 247
Copacabana, Leme			
Guaratiba	123 114	60 132	62 982
Barra de Guaratiba, Guaratiba, Pedra de Guaratiba			
Ilha de Paquetá	3 361	1 629	1 732
Ilha do Governador	212 574	99 965	112 609
Bancários, Cacua, Cidade Universitária, Cocotá, Freguesia, Galeão Jardim Carioca, Jardim Guanabara, Moneró, Pitangueiras, Portuguesa Praia da Bandeira, Ribeira, Tauá, Zumbi			
Inhaúma	134 349	61 957	72 392
Del Castilho, Engenho da Rainha, Higienópolis, Inhaúma, Maria da Graça, Tomás Coelho			
Irajá	202 952	92 654	110 298
Colégio, Irajá, Vicente de Carvalho, Vila da Penha, Vila Kosmos, Vista Alegre			
Jacarepaguá	572 617	271 553	301 064
Anil, Curicica, Freguesia, Gardênia Azul, Jacarepaguá, Pechincha Praça Seca, Tanque, Taquara, Vila Valqueire			
Jacarezinho	37 839	18 236	19 603
Lagoa	167 774	75 034	92 740
Gávea, Ipanema, Jardim Botânico, Lagoa, Leblon, São Conrado, Vidigal			
Madureira	371 968	171 289	200 679
Bento Ribeiro, Campinho, Cascadura, Cavalcanti, Engenheiro Leal Honório Gurgel, Madureira, Marechal Hermes, Oswaldo Cruz, Quintino Rocha Miranda, Turiaçu, Vaz Lobo			
Maré	129 770	63 743	66 027
Méier	397 782	180 821	216 961
Abolição, Água Santa, Cachambi, Encantado, Engenho de Dentro, Engenho Novo, Jacaré, Lins de Vasconcelos, Méier, Piedade, Pilaes Riachuelo, Rocha, Sampaio, São Francisco Xavier, Todos os Santos			
Pavuna	208 813	98 750	110 063
Acarí, Barros Filho, Coelho Neto, Parque Columbia, Pavuna			
Penha	185 716	88 609	97 107
Brás de Pina, Penha, Penha Circular			
Portuária	48 664	23 435	25 229
Caju, Gamboa, Santo Cristo, Saúde			
Ramos	153 177	71 153	82 024
Bonsucesso, Manguinhos, Olaria, Ramos			
Realengo	243 006	114 236	128 770
Campo dos Afonsos, Deodoro, Jardim Sulacap, Magalhães Bastos Realengo, Vila Militar			
Rio Comprido	78 975	36 548	42 427
Catumbi, Cidade Nova, Estácio, Rio Comprido			
Rocinha	69 356	34 212	35 144
Rocinha			
Santa Cruz	368 534	177 205	191 329
Paciência, Santa Cruz, Sepetiba			
Santa Teresa	40 926	19 247	21 679
Santa Teresa			
São Cristóvão	84 908	41 194	43 714
Benfica, Manqueira, São Cristóvão, Vasco da Gama			
Tijuca	181 810	79 776	102 034
Alto da Boa Vista, Praça da Bandeira, Tijuca			
Vigário Geral	136 171	65 007	71 164
Cordovil, Jardim América, Parada de Lucas, Vigário Geral			
Vila Isabel	189 310	83 827	105 483
Andaraí, Grajaú, Maracanã, Vila Isabel			

ANEXO 3

Setor Censitário	Região		Bairro	Nº domicílios	Nº domicílios acumulado	Nº sorteado fator=75278
330455705070084	CENTRO	3304557001	Centro	209	36373	36533
330455705090180	BOTAFOGO	3304557009	Flamengo	215	111802	111811
330455705100021	COPACABANA	3304557017	Leme	166	186877	187089
330455705100384	COPACABANA	3304557018	Copacabana	175	262216	262367
330455705110289	LAGOA	3304557024	Vidigal	107	337440	337645
330455705130138	TIJUCA	3304557030	Tijuca	358	412878	412923
330455705140133	VILA ISABEL	3304557033	Vila Isabel	279	488143	488201
330455705150154	RAMOS	3304557039	Olaria	337	566210	566479
330455705160262	PENHA	3304557042	Brás de Pina	296	641497	641757
330455705170268	MÉIER	3304557054	Todos os Santos	312	716693	717035
330455705170587	MÉIER	3304557055	Cachambi	129	792144	792313
330455705190262	IRAJÁ	3304557067	Colégio	290	867528	867591
330455705200266	MADUREIRA	3304557076	Rocha Miranda	290	942540	942869
330455705210010	JACAREPAGUÁ	3304557087	Pechincha	286	1017798	1018147
330455705210275	JACAREPAGUÁ	3304557090	Praça Seca	194	1093423	1093425
330455705210533	JACAREPAGUÁ	3304557081	Jacarepaguá	177	1168680	1168703
330455705220049	BANGU	3304557098	Padre Miguel	392	1243687	1243981
330455705220348	BANGU	3304557099	Bangu	239	1319095	1319259
330455705230067	CAMPO GRANDE	3304557102	Campo Grande	377	1394304	1394537
330455705230330	CAMPO GRANDE	3304557102	Campo Grande	449	1469773	1469815
330455705230657	CAMPO GRANDE	3304557104	Inhoaíba	182	1545050	1545093
330455705240209	SANTA CRUZ	3304557107	Santa Cruz	310	1620202	1620371
330455705240568	SANTA CRUZ	3304557107	Santa Cruz	129	1695465	1695649
330455705250283	ILHA DO GOVERNADOR	3304557111	Cacua	167	1770908	1770927
330455705280034	SANTA TERESA	3304557128	Santa Teresa	81	1846067	1846205
330455705290223	BARRA DA TIJUCA	3304557135	Recreio dos Bandeirantes	180	1921178	1921483
330455705300015	PAVUNA	3304557137	Coelho Neto	167	1996752	1996761
330455705310034	GUARATIBA	3304557142	Guaratiba	361	2071805	2072039
330455705320137	INHAÚMA	3304557151	Tomás Coelho	352	2147099	2147317
330455705360014	MARÉ	3304557158	Maré	130	2222521	2222595
330455705370137	REALENGO	3304557097	Realengo	253	2297653	2297873
330455705390051	VIGÁRIO GERAL	3304557043	Cordovil	288	2372952	2373151

ANEXO 4

Setor Censitário	Região	Bairro	Nº domicílios	RUA PRINCIPAL DA COLETA	Linha do endereço sorteado
330455705070084	CENTRO	Centro	209	RUA DO SENADO	171
330455705090180	BOTAFOGO	Flamengo	215	AVENIDA RUI BARBOSA	50
330455705100021	COPACABANA	Leme	166	RUA GUSTAVO SAMPAIO	9
330455705100384	COPACABANA	Copacabana	175	RUA SIQUEIRA CAMPOS	21
330455705110289	LAGOA	Vidigal	107	ESTRADA DO VIDIGAL	23
330455705130138	TIJUCA	Tijuca	358	RUA DOUTOR SATAMINI	289
330455705140133	VILA ISABEL	Vila Isabel	279	RUA GONZAGA BASTOS	60
330455705150154	RAMOS	Olaria	337	RUA JORGE GONCALVES DE ARAUJO	274
330455705160262	PENHA	Brás de Pina	296	RUA GENERAL MARQUES DE SOUSA	249
330455705170268	MÉIER	Todos os Santos	312	RUA NOSSA SENHORA DO SION	13
330455705170587	MÉIER	Cachambi	129	AVENIDA DOM HELDER CAMARA;5067	34
330455705190262	IRAJA	Colégio	290	RUA JURUCE	35
330455705200266	MADUREIRA	Rocha Miranda	290	RUA TAQUARICHIM, RUA GUARAMA	161
330455705210010	JACAREPAGUÁ	Pechincha	286	RUA PROFESSOR HENRIQUE COSTA	123
330455705210275	JACAREPAGUÁ	Praça Seca	194	RUA MARICA	59
330455705210533	JACAREPAGUÁ	Jacarepaguá	177	ESTRADA DOS BANDEIRANTES, 7800, CAMORIM	148
330455705220049	BANGU	Padre Miguel	392	RUA JUSTINO DE ARAUJO	347
330455705220348	BANGU	Bangu	239	ESTRADA GENERAL AFONSO DE CARVALHO	28
330455705230067	CAMPO GRANDE	Campo Grande	377	AVENIDA CESARIO DE MELO;1061	51
330455705230330	CAMPO GRANDE	Campo Grande	449	VILA IRMA;23	250
330455705230657	CAMPO GRANDE	Inhoaíba	182	RUA ANA ANGELICA, 70, INHOAIBA	111
330455705240209	SANTA CRUZ	Santa Cruz	310	BECO BARAO DE LUCENA	241
330455705240568	SANTA CRUZ	Santa Cruz	129	AVENIDA PRADO JUNIOR	5
330455705250283	ILHA DO GOVERNADOR	Cacuaia	167	AVENIDA ALMIRANTE ALVES JUNIOR	116
330455705280034	SANTA TERESA	Santa Teresa	81	RUA PAULA MATOS	1
330455705290223	BARRA DA TIJUCA	Recreio dos Bandeirantes	180	AVENIDA DAS AMERICAS	67
330455705300015	PAVUNA	Coelho Neto	167	AVENIDA BRASIL;19770	38
330455705310034	GUARATIBA	Guaratiba	361	ESTRADA DO MAGARCA	95
330455705320137	INHAÚMA	Tomás Coelho	352	AVENIDA PASTOR MARTIN LUTHER KING JUNIOR;4676	130
330455705360014	MARÉ	Maré	130	RUA OCTAVIANO LEAO	121
330455705370137	REALENGO	Realengo	253	RUA LOMAS VALENTINAS	17
330455705390051	VIGÁRIO GERAL	Cordovil	288	RUA DO FUNDÃO	17

ANEXO 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **Avaliação da exposição a agrotóxicos na população da cidade do Rio de Janeiro: construção de valores de referência como contribuição para a vigilância em saúde no país.**

Esta pesquisa está sendo desenvolvida pelo pesquisador Sérgio Rabello Alves e sua equipe técnica, funcionários da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ).

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa.

O principal objetivo deste trabalho é estabelecer valores de referência para metabólitos de agrotóxicos das classes dos piretróides e organofosforados para a população carioca, exposta ambientalmente a essas substâncias através dos inseticidas domésticos e pela alimentação.

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá em: a) responder às perguntas feitas durante a aplicação de um questionário com questões fechadas de múltipla escolha e algumas questões abertas, que leva em torno de 20 minutos para ser respondido e b) fornecer amostra de urina para análise. A urina será coletada em frascos de plástico, em banheiro reservado e nenhum desconforto deverá ocorrer neste procedimento.

As amostras de urina serão utilizadas exclusivamente para as análises deste projeto, sendo descartadas após o término das análises laboratoriais, segundo a Resolução CNS 441/11 e o plano de gerenciamento de resíduos da Fiocruz.

Os riscos relacionados à sua participação na pesquisa referem-se à sua identificação como informante. Para evitar esta situação, as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Você será identificado apenas por um número de identificação. Os dados do questionário por você respondido serão reproduzidos apenas em publicações científicas, respeitando-se o sigilo do seu nome. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 196/96 e orientações do CEP/ENSP.

O benefício relacionado com a sua participação nessa etapa refere-se à possibilidade de identificação das quantidades de piretróides e organofosforados que a população carioca apresenta em sua urina. Além disso, você também estará contribuindo para uma melhor compreensão sobre um problema que atinge nossa sociedade atual.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação.

Os resultados da pesquisa serão divulgados em orientações dirigidas e entrega dos resultados de análises para os entrevistados.

Pesquisador Responsável – CESTE/ENSP/FIOCRUZ

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Manguinhos - Rio de Janeiro – RJ - CEP: 21041-210, CESTE, ENSP, FIOCRUZ, Laboratório de Toxicologia, Sala 91, Telefones: 2598-2982 e 2598-2991 anacris@ensp.fiocruz.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

(Assinatura do sujeito da pesquisa)

_____/_____/_____
Data

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ENSP:

Tel e Fax - 25982863

E-Mail: cep@ensp.fiocruz.br

<http://www.ensp.fiocruz.br/etica>

ANEXO 6

CARTA ENVIADA AOS MORADORES SORTEADOS

Prezado(a)

Tenho a satisfação de convidá-lo(a) para participar como voluntário(a) de uma pesquisa que vem sendo realizada pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, sobre o uso de inseticidas domésticos e exposição da população carioca a essas substâncias. O título da pesquisa é “**Avaliação da exposição a agrotóxicos na população da cidade do Rio de Janeiro: construção de valores de referência como contribuição para a vigilância em saúde no país.**”

Esta pesquisa está sendo desenvolvida por mim, Ana Cristina S. Rosa, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio R. Alves e minha equipe técnica, funcionários da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ).

Seu endereço foi sorteado no CNEFE (Cadastro Nacional de Endereços para Fins Estatísticos), no site do IBGE com o link <http://www.censo2010.ibge.gov.br/cnefe/>, e sua participação consiste em responder a um questionário por cerca de 20 minutos, e ceder cerca de 60mL de urina em pote cedido pela pesquisa.

Essa carta é para avisá-lo de que entre os meses de março e maio, o Sr.(a) receberá a visita de um pesquisador da Fiocruz, convidando-o(a) para participar da pesquisa. Sua participação não será obrigatória, contudo será muito importante para a execução da pesquisa. Em cada dia será feita a visita num bairro diferente da cidade e, o dia exato da visita ao seu endereço, está escrito junto com o seu endereço no início desta carta. Caso queira confirmar, o(a) Sr(a). pode entrar em contato através de e-mail ou telefone, ambos informados ao final desta carta.

As amostras de urina serão utilizadas exclusivamente para as análises do projeto, sendo descartadas após o término das análises. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Você será identificado apenas por um número de identificação. Os dados do questionário por você respondido serão reproduzidos apenas em publicações científicas, respeitando-se o sigilo do seu nome.

O benefício relacionado com a sua participação nessa pesquisa refere-se à possibilidade de identificação das quantidades de agrotóxicos que a população carioca apresenta em sua urina. Além disso, você também estará contribuindo para uma melhor compreensão sobre um problema que atinge nossa sociedade atual.

Os resultados da pesquisa serão divulgados aos voluntários por meio de entrega de um resultado de análise.

No momento da visita, você receberá uma cópia de um termo de consentimento livre e esclarecido onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação.

Para saber mais sobre a pesquisa, basta consultar o link abaixo, onde a mesma está divulgada, com seus objetivos principais.

Site: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/projeto-de-agrotoxicos/>

Entrevista: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/37220>

MSc. Ana Cristina S. Rosa

Integrante da Equipe da Pesquisa

Contato para esclarecimentos: anacris@ensp.fiocruz.br

Tel: 2598-2982

ANEXO 7

	Dia	Local	Equipe				Total de domicílios que levamos pra campo	Total de domicílios abordados	Participou dentre os 16	Participou fora dos 16	Se recusou	Ausente	Endereço errado	Outros	Perda de urina	Total	Total de urina	S	W
16/03/2015	Segunda	Brás de Pina	Ana	Amanda	Taty	Zé	64	90	4	12	4	8			28	16	22°50'12.2"	043°18'37.0"	
18/03/2015	Quarta	Colégio	Ana	Amanda	Taty	Zé	64	64	3	15	10	14	5	1	48	17	22°50'34.6"	043°20'24.2"	
23/03/2015	Segunda	Olaria	Ana	Amanda	Taty	Zé	64	80	4	12	10	51			77	16	22°51'00.0"	043°16'26.7"	
24/03/2015	Terça	Cachambi	Ana	Amanda	Taty		48	80	8	8	8	23		1	47	16	22°53'27.4"	043°16'52.0"	
30/03/2015	Segunda	Campo Grande	Ana	Amanda	Taty	Zé	128	47	8	6	15	10	6		45	14	22°54'09.5"	043°32'32.3"	
30/03/2015	Segunda	Campo Grande	Ana	Amanda	Taty	Zé	87	87	6	10	10	36		2	64	16	22°53'54.5"	043°32'56.9"	
31/03/2015	Terça	Cordovil	Ana	Amanda	Taty		144	80	2	15	17	46			80	18	22°49'01.6"	043°17'29.5"	
06/04/2015	Segunda	Cacuaia	Ana	Taty	Zé	Amanda	76	101	0	16	19	26	1	18	80	16	22°49'14.2"	043°11'15.3"	
07/04/2015	Terça	Santa Cruz	Ana	Amanda	Taty		66	75	5	8	13	31		1	57	13	22°55'27.5"	043°41'48.0"	
08/04/2015	Quarta	Tijuca	Ana	Taty	Zé	Amanda	64	95	7	10	23	48		7	95	17	22°55'12.5"	043°13'13.1"	
13/04/2015	Segunda	Vila Isabel	Ana	Amanda	Taty	Zé	80	82	0	17	24	35		6	82	16	22°55'11.9"	043°12'22.4"	
14/04/2015	Terça	Coelho Neto	Ana	Amanda	Taty		64	78	2	12	30	29	6		79	14	22°49'45.4"	043°21'06.1"	
15/04/2015	Quarta	Realengo	Ana	Taty	Zé		48	13	4	3	3	3			13	6	22°52'21.4"	043°26'22.6"	
27/04/2015	Segunda	Jacarepaguá	Ana	Taty	Zé	Amanda	120	168	1	14	37	87		29	168	15	22°58'06.0"	043°24'48.1"	
28/04/2015	Quarta	Todos os Santos	Ana	Taty	Amanda		96	117	2	8	35	57		15	117	10	22°54'01.9"	043°17'20.4"	
29/04/2015	Quarta	Rocha Miranda	Ana	Taty	Zé	Amanda	64	71	7	9	21	29			66	16	22°50'25.7"	043°20'41.8"	
04/05/2015	Segunda	Padre Miguel	Ana	Amanda	Taty	Zé	64	116	0	11	43	59		3	116	11	22°52'54.2"	043°26'42.6"	
04/05/2015	Quarta	Bangu	Ana	Amanda	Zé	Taty	64	60	4	12	16	30		3	65	15	22°50'50.6"	043°27'37.7"	
05/05/2015	Terça	Praça Seca	Ana	Amanda	Taty		64	132	1	15	58	45		13	132	15	22°53'27.5"	043°20'43.3"	
06/05/2015	Segunda	Leme	Ana	Taty	Zé	Amanda	163	163	2	11	34	94		22	163	13	22°57'48.1"	043°10'18.6"	
11/05/2015	Quarta	Pechincha	Ana	Taty	Zé	Amanda	64	54	5	11	7	31			54	16	22°55'54.1"	043°21'44.6"	
12/05/2015	Terça	Copacabana	Ana	Amanda	Taty		64	73	3	14	15	38		4	74	18	22°57'52.2"	043°11'23.9"	
13/05/2015	Quarta	Inhoaíba	Ana	Taty	Zé		64	81	6	7	30	34		4	81	13	22°54'39.2"	043°36'13.2"	
18/05/2015	Segunda	Centro	Ana	Amanda	Taty	Zé	64	39	2	15	12	7		3	39	17	22°54'41.6"	043°11'29.1"	
19/05/2015	Terça	Flamengo	Ana	Amanda	Taty		64	133	1	13	48	59		12	133	14	22°56'33.35"	043°10'26.6"	
20/05/2015	Quarta	Santa Cruz	Ana	Amanda	Zé	Taty	64	51	5	11	18	15	1	1	51	16	22°55'05.7"	043°40'18.3"	
25/05/2015	Segunda	Santa Teresa	Ana	Taty	Zé		64	110	3	11	31	51		14	110	13	22°54'51.8"	043°11'28.1"	
26/05/2015	Terça	Guaratiba	Ana	Amanda	Taty		64	69	2	12	21	31		3	69	14	22°56'59.4"	043°36'05.8"	
27/05/2015	Quarta	Amorim	Ana	Taty	Amanda	Zé	64	63	3	14	26	19		1	63	17	22°52'30.1"	043°14'59.6"	
29/05/2015	Terça	Vidigal	Ana	Amanda	Taty		64	38	3	0	29	6			38	3	22°52'41.4"	043°15'01.0"	
01/06/2015	Quarta	Tomás Coelho	Ana	Amanda	Zé	Taty	64	65	4	13	18	27		3	65	16	22°51'56.5"	043°18'15.7"	
03/06/2015	Quarta	Barra	Ana	Amanda	Taty	Zé	120	180	4	14	61	75		26	180	18	22°58'15.0"	043°23'01.8"	
							2456	2755	111	359	746	1154	19	190	7	2579	465		

ANEXO 8

LEVANTAMENTO DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL A AGROTÓXICOS PIRETRÓIDES

Coordenadas GPS: Latitude: S °' '' Longitude: WO °' ''

1-Identificação: _____ 2-Data: ___/___/___

3-Nome: _____ 4-Idade: _____

5-Sexo: 1-feminino 2-masculino

6-Endereço: _____

7-Bairro: _____ 8-Telefone para contato: _____

9-Raça/Etnia:

1-branco 2-negro 3-pardo 4-asiático 5-índio

10-Anos de escolaridade:

analfabeto

primeiro ciclo do ensino fundamental completo – 5 anos

segundo ciclo do ensino fundamental completo – 9 anos

ensino médio completo – 12 anos

ensino superior completo (com duração de 4 anos) – 16 anos

pós-graduação *latu e/ou strictu sensu*

11- Você trabalha?

1-sim 0-não se não, pular para 13.

12 -Qual a sua ocupação? _____

13-Renda familiar: _____

14 – De que tipo é a sua residência?

1-casa 2-apartamento

15-Quantos cômodos tem a sua casa? _____

16-Quantas pessoas vivem na sua casa? _____

17-Quantas crianças (menos de 10 anos) moram na sua casa? _____

18-Você usa repelente?

1-sim 0-não se não, pular para 20

19-Qual? abrir campo de texto

20-Você usa inseticidas na sua casa?

1-sim 0-não se não, pular para 29.

21-Onde você comprou este produto?

1- supermercado 2- loja de departamento 3- farmácia 4- mercearia 5- pela internet
99- não sabe

22-Quem aplica algum inseticida ou outra substância do lado de FORA da sua residência?

1-Você

2-Outra pessoa da casa

3-Alguma empresa de desinsetização contratada por você

4-Alguma empresa de desinsetização contratada por outra pessoa

- 5-Você e alguma empresa de desinsetização
 6-Outra forma abrir campo de texto
 7-Não é feito nenhum tratamento do lado de fora da residência
 99-Não sabe

23-Qual o maior problema com insetos/pragas do lado de fora da casa, na sua opinião? Permitir marcar mais de uma opção

1-Barata	4- Mosquito/pernilongo	7-Pulga e Carrapato
2-Rato	5-Mosca	8-Outro abrir campo de texto
3-Formiga	6-Cupim	9-Não tem problema se marcar 9, pular para 32.

99-Não sabe

24-Que tipo de produto você usa?

- 1-Spray tipo borrifador 2-Spray tipo aerossol 3-Concentrado que você precisa adicionar água
 4-Grãos secos 5-Isca 6-Espiral 7-Pastilha de tomada 8-Outro abrir campo de texto 99-Não sabe

25-Qual o nome do produto que você usa para controlar os insetos do lado de fora da casa?

_____ 99-Não sabe

26-Quando foi a última vez que você utilizou inseticida do lado de fora da casa? ___ dias ___ meses ___ anos 99-não sabe

Espaço para digitar números em dias, meses e anos.

27-Com que frequência você aplica inseticidas do lado de fora da casa? ___ dias/semana ___ dias/mês ___ dias/ano
 99-não sabe

Espaço para digitar números em dias, meses e anos.

28-Qual o maior problema com insetos/pragas do lado de DENTRO da sua casa, na sua opinião?

1-Barata	4- Mosquito/pernilongo	7-Pulga e Carrapato
2-Rato	5-Mosca	8-Outro abrir campo de texto
3-Formiga	6-Cupim	9-Não tem problema se marcar 9, pular para 32.

99-Não sabe

29-Quem faz o controle de pragas dentro da sua residência?

- 1-Você
 2-Outra pessoa da casa
 3-Alguma empresa de desinsetização contratada por você
 4-Alguma empresa de desinsetização contratada por outra pessoa
 5-Você e alguma empresa de desinsetização
 6-Outra forma abrir campo de texto
 7-Não é feito nenhum tratamento do lado de fora da residência
 99-Não sabe

30-Que tipo de produto você usa?

- 1-Spray tipo borrifador 2-Spray tipo aerossol 3-Concentrado que você precisa adicionar água
 4-Grãos secos 5-Isca 6-Espiral 7-Pastilha de tomada 8-Outro abrir campo de texto 99-Não sabe

31-Qual o nome do produto que você usa para controlar os insetos do lado de DENTRO da sua casa?

_____ 99-Não sabe

32-Quando foi a última vez que você utilizou inseticida do lado de DENTRO da casa? ___ dias ___ meses ___ anos 99-não sabe Espaço para digitar números em dias, meses e anos.

33-Com que frequência você aplica inseticidas do lado de DENTRO da casa? ___ dias/semana ___ dias/mês ___ dias/ano 99-não sabe Espaço para digitar números em dias, meses e anos.

34-Os problemas/infestações ocorrem:

2-freqüentemente

1-sazonalmente (exemplo somente no verão)

0-raramente

99-não sabe

35-No caso dos mosquitos, eles picam preferencialmente:

0-de dia

1-a partir do entardecer entrando pela noite

99-não sabe

36-Ainda no caso dos mosquitos, com que eles se parecem:

1-imagens grupo 1 (Culicidae ou verdadeiros mosquitos – vetores malária, dengue, filariose)

2-imagens grupo 2 (Flebótomos família Psychodidae – vetores da Leishmaniose)

3-imagens grupo 3 (borrachudos família Simuliidae)

0-nenhuma das imagens

99-não sabe

37-Você faz alguma mistura, diluição, manipulação no inseticida que você usa?

1-sim

0- não

99-não sabe

38-Você mede ou estima a quantidade de inseticida que vai usar?

2-medede

1- estima

0- não mede nem estima

99-não sabe

39-Você lê o rótulo das embalagens de inseticidas que você usa?

2-freqüentemente

1-às vezes

0-nunca

40-Você lê e segue as recomendações contidas no rótulo das embalagens de inseticidas que você usa?

2-freqüentemente

1-às vezes

0-nunca

41-Onde você costuma ver propaganda de inseticidas? Permitir marcar mais de uma opção

1-televisão

2-jornal

3-revista

4-internet

5-outro: _____

99-não sabe

42-Como você escolhe o inseticida que vai comprar? Permitir marcar mais de uma opção

1-Pelo que ele controla	4-Pela embalagem	7-Pela segurança	10-Pela facilidade para aplicação	13-Outro abrir campo de texto
2-Pelo ingrediente ativo	5-Pelo tempo que dura o efeito	8-Pela recomendação de alguém	11-Pelas instruções claras	99-não sabe
3-Pelo custo	6-Pela rapidez como funciona	9-Pelos aspectos ambientais	12-Se já tem em casa	

43-Qual o lugar onde são armazenados os inseticidas?

1-local arejado

2-dentro de um armário

3-local com outros materiais

4-outro: _____

99-

não sabe

44-Quantos frascos de inseticidas tem armazenados na sua casa?

1- 1 a 5

2- 6 a 10

3- mais de 10

4-outro: _____

99-não sabe

45-Como você descarta os produtos para controle de pragas que você não vai mais utilizar?

1-Joga no ralo dentro de casa

2-Joga no ralo fora de casa

3-Joga no lixo

4-Joga na rua

5-Joga no local para lixo especial/perigoso

6-Outro abrir campo de texto

99-Não sabe

46-Você costuma lavar as mãos logo após aplicar o inseticida?

2-freqüentemente

1-às vezes

0-nunca

47-Como estão distribuídas as janelas na sua casa?

1-em todos os cômodos

2-na maioria dos cômodos

3-em poucos cômodos

48-Você acredita que o inseticida pode fazer algum mal para a saúde?

1-sim 0- não 99-não sabe

49-Você já passou mal depois de ter aplicado inseticida?

1-sim • 0- não 99-não lembra se não, pular para 54.

50-Quantas vezes? _____

51-Quais os sintomas e/ou sinais que sentiu durante ou após a aplicação? Permitir marcar mais de uma opção

1-náuseas 2-dor de cabeça 3-vômitos 4-vertigens 5-diminuição da visão
6-diarréia 7-dores no peito 8-tremores 9-irritação da pele 10-outros: _____

52-Procurou socorro?

1-sim 0- não

53-Onde procurou socorro?

1-hospital 2-posto de saúde 3-farmácia 4-outro: _____

54-Alguém já passou mal por causa do inseticida na sua casa?

1-sim 0- não 99-não lembra se não, pular para 57

55-Quantos? _____

56-Como estas pessoas passaram mal? Permitir marcar mais de uma opção

1-náuseas 2-dor de cabeça 3-vômitos 4-vertigens 5-diminuição da visão
6-diarréia 7-dores no peito 8-tremores 9-irritação da pele 10-outros: _____

57-Você tem medo de aplicar o inseticida?

1-sim 0- não 99-não usa

58-Como você diria seu nível de preocupação com as infestações de insetos/pragas;

0-despreocupado 1-pouco preocupado 2-preocupado 3-muito preocupado
99-não sabe

59-Você está com algum problema de saúde atualmente?

1-sim 0- não se não, pular para 61

60-Qual? _____

61-Está tomando algum medicamento?

1-sim 0- não se não, pular para 63

62-Qual? _____ 99-não sabe

63 – Vc já teve dengue?

1-sim 0- não 99-não sabe se não, pular para 65

64-Quando foi a última vez?

1-último mês 2-de 1 a 3 meses 3-de 3 a 12 meses 4-há mais de um ano 99-
não sabe

65-Alguém na sua casa já teve dengue?

1-sim 0- não 99-não sabe se não, pular para 68

66-Quem? Permitir marcar mais de uma opção

1-filho(a) 2-marido/esposa 3-pai 4-mãe 5-sogra(o) 6-irmã(o)

67-Quando foi a última vez?

1-último mês 2-de 1 a 3 meses 3-de 3 a 12 meses 4-há mais de um ano 99-
não sabe

68-Vc já teve alergia (coceiras, irritações, inchaços) ou outro problema (leishmaniose, febre maculosa, por exemplo) por causa de insetos/pragas?

1-sim 0- não 2-outro problema abrir campo de texto 99-não sabe se não, pular para 70

69-Quando foi a última vez?
1-último mês 2-de 1 a 3 meses 3-de 3 a 12 meses 4-há mais de um ano 99-
não sabe

70-Alguém na sua casa já teve alergia?
1-sim 0- não 99-não sabe se não, pular para 73

71-Quem? Permitir marcar mais de uma opção
1-filho(a) 2-marido/esposa 3-pai 4-mãe 5-sogra(o) 6-irmã(o)

72-Quando foi a última vez?
1-último mês 2-de 1 a 3 meses 3-de 3 a 12 meses 4-há mais de um ano 99-
não sabe

73-O sistema de esgoto é:
3-bom 2-razoável 1-ruim 0-péssimo ou inexistente 99-não sabe

74-A coleta de lixo é:
3-bom 2-razoável 1-ruim 0-péssimo ou inexistente 99-não sabe

75-O fornecimento de água é:
3-bom 2-razoável 1-ruim 0-péssimo ou inexistente 99-não sabe

76-O local é muito próximo ou dentro de mata?
1-sim 0- não 99-não sabe

77-É próximo de rios / riachos?
1-sim 0- não 99-não sabe

78-É próximo de pântanos/mangues?
1-sim 0- não 99-não sabe

79-Tem animais de estimação ou que se alimentam / dormem dentro ou ao redor do local onde usou inseticidas (cães, gatos, cavalos)?
1-sim 0- não 99-não sabe

80-Tem criação de animais nesse local (galinheiro, chiqueiro, outros)?
1-sim 0- não 99-não sabe

81-Atenção do entrevistado:
• 1-orientado e atencioso
• 2-pouco atencioso
• 3-mal informado
• 4-muito mal informado e confuso

82-Veracidade e exatidão das respostas:
• 1-francas e exatas
• 2-provavelmente francas e exatas
• 3-nem sempre francas e exatas
• 4-poucas vezes francas e exatas
• 5-não foram francas e exatas

83-Atitude do entrevistado
• 1-cooperadora e interessada
• 2-cooperador
• 3-indiferente
• 4-não cooperadora

ANEXO 9

CARTA ENVIADA COM OS RESULTADOS AOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Prezado Participante,

Agradeço sua participação na pesquisa “AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS PIRETRÓIDES NA POPULAÇÃO DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO: construção de valores de referência como contribuição para a vigilância em saúde no País”. Também quero lhe pedir desculpas pelo atraso no envio do seu resultado de análise. A coleta de sua urina foi realizada entre março e junho de 2015, e minha expectativa inicial era de devolver o resultado até agosto de 2015.

Entretanto, nessa época ocorreu a quebra do equipamento onde foram feitas as análises e, devido à falta de recursos financeiros da instituição, o equipamento demorou cerca de 10 meses para retornar ao seu funcionamento. Essa quebra ocasionou o atraso. Dessa forma, estou agora encaminhando seu resultado e aproveitando a oportunidade para fazer alguns esclarecimentos.

1º - Seu resultado compõe a 1ª pesquisa realizada no país sobre os níveis de inseticidas na população adulta do município do Rio de Janeiro.

2º - Foram encontrados níveis basais na faixa de 0,67 ng mL⁻¹ a 60,79 ng mL⁻¹ para o metabólito 3-PBA (que é metabólito dos inseticidas cipermetrina, deltametrina, permetrina, esbiotrina, fenotrina, cialotrina, fenpropatrina, esfenvalerato) e na faixa de 0,26 ng mL⁻¹ a 3,46 ng mL⁻¹ para o metabólito 4-FPBA (que é metabólito da ciflutrina).

Metabólitos são produtos da degradação de uma substância externa ao corpo que sofre transformação para que o corpo possa ser capaz de eliminá-la.

3º - Estes resultados representam uma “fotografia” do seu nível de exposição na ocasião da coleta, não significando que hoje o nível de exposição esteja o mesmo. O fato de você apresentar nível acima do limite de quantificação, não significa que você está contaminado ou doente pelo inseticida, significa que em 2015 você apresentava esta exposição.

4º - Você está recebendo um folheto informativo elaborado pela Ouvidoria da Anvisa, que você pode acessar através do link:

<http://www.justica.gov.br/seus-direitos/consumidor/educacao-para-o-consumo/boletim-consumo-e-saude/anexos/2012consumosaude28.pdf>

Lá você pode encontrar informações sobre as normas da Anvisa que devem ser seguidas para as embalagens de inseticidas domésticos.

5º - Lembre-se sempre que os inseticidas são substâncias para matar insetos e apresentam grau de toxicidade mediano para seres humanos. Utilize com cuidado e moderação.

6º - Quaisquer dúvidas que você tenha, poderá entrar em contato através dos telefones: 2598-2982 / 2598-2991 ou pelo email: anacris@ensp.fioruz.br

Ana Cristina Simões Rosa

ANEXO 10

FOLHETO EXPLICATIVO ENVIADO AOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Consumo e Saúde

Inseticidas, Repelentes e Raticidas – Entenda melhor

Ouvidoria/Anvisa e Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor/Senacon

FATO

Os produtos químicos exercem uma importante função para a vida humana, controlando e prevenindo doenças. Esse segmento compreende um conjunto de produtos saneantes, dentre esses, os desinfestantes. Essa categoria inclui os inseticidas, os repelentes e os raticidas, os quais são destinados à aplicação em domicílios e suas áreas comuns, no interior de instalações, em edifícios públicos ou coletivos e ambientes afins, para o controle de insetos, roedores e de outras pragas incômodas ou nocivas à saúde. Esses produtos podem ser de venda livre ao consumidor, como por exemplo, nos supermercados, ou de venda restrita às instituições ou empresas especializadas prestadoras de serviços de controle de vetores e pragas urbanas.

CONCEITO

Por conter substâncias tóxicas, os desinfestantes devem ser obrigatoriamente registrados na Anvisa. O número de registro desse produto deve estar presente no rótulo e apresentar, no mínimo 9 dígitos e começar com o número 3. Para a venda livre ao consumidor, esses produtos deverão ser comercializados em embalagens de pronto uso e devem ter o(s) ingrediente(s) ativo(s) na(s) concentração(ões) necessária(s) para assegurar ação eficaz conforme suas indicações, instruções de uso e monografias (avaliação toxicológica das substâncias ativas) aprovadas pela Anvisa. As embalagens devem ser quimicamente compatíveis com o produto e de difícil ruptura, de modo a minimizar eventuais acidentes durante a armazenagem, transporte ou uso, sendo proibido o uso de embalagens de vidro.

Os rótulos dos saneantes desinfestantes devem conter informações claras e verdadeiras sobre o produto, seu uso e características essenciais. O texto não pode induzir a erro sobre a composição do produto, nem sobre sua eficácia. Não podem fazer referência, de forma direta ou indireta, a um produto como sendo recomendado por algum órgão nacional ou internacional e/ou por profissionais. Não é permitido também empregar frases como “confiável”, “seguro”, “não tóxico para humanos e animais domésticos”, “natural” ou “naturalmente”, “biodegradável”, “máxima eficácia”, “ultra-potente”, “o melhor do mercado”. Além disso, devem conter informações da empresa fabricante, como a razão social, CNPJ, endereço e telefone de SAC e informações detalhadas do produto, como a categoria de uso, descrição da eficácia e modo de aplicação de uso, incluindo ainda as frases de advertências, precauções obrigatórias e indicações para uso médico.

Fique atento a estes itens!

A inserção de imagens e/ou desenhos na rotulagem nesses produtos é permitida, desde que não inclua: imagens de alimentos, flores, ou qualquer outro elemento que permita associar a imagem do produto a alimentos, medicamentos, cosméticos, brinquedos, etc; imagens nas quais as pessoas aplicam o produto sem equipamento de proteção individual, se o mesmo está indicado no texto do rótulo; imagens de insetos que não são controlados pelo produto; imagens, símbolos que possam significar que o produto não é tóxico.

A embalagem do produto não pode ter imagens de pessoas aplicando o produto na presença de crianças e animais domésticos, sendo que o mesmo deve ser aplicado em sua ausência.

No rótulo dos produtos desinfestantes que contenham mascarantes (substâncias que têm a função de “suprimir” o odor exalado por um ou mais componentes), não devem ser utilizadas as expressões “perfume”, “fragrância” ou similar, que possam levar a confundir o produto com aromatizantes de ambientes, cosméticos, detergentes, limpadores ou outros de uso comum.

As frases “CUIDADO! PERIGOSO!” (inseticidas e repelentes) e “CUIDADO! VENENO”, com o símbolo da caveira (raticidas/rodenticidas) devem ser colocadas no painel principal do rótulo em letras maiúsculas, em destaque, negrito, na cor preta, tendo as letras uma altura mínima de 0,3 cm. A frase “ANTES DE USAR LEIA AS INSTRUÇÕES DO RÓTULO” também deve constar em maiúsculas, em destaque, negrito, imediatamente abaixo das frases de advertências.

Entendendo melhor...

INSETICIDAS:

Destinados ao combate, à prevenção e ao controle dos insetos em habitações, recintos e lugares de uso público e suas cercanias.

Podem ser comercializados nas formas líquidos para pronto uso, líquidos premidos (aerossol), líquidos voláteis, pós secos, tabletes fumigantes, granulados, peletizados, pastas e gel.

As embalagens em aerossol devem apresentar dispositivos de segurança que indiquem o direcionamento do jato e dificultem o contato com o produto.

Já os produtos inseticidas líquidos à base de solventes devem possuir dispositivo de segurança à prova de abertura por crianças.

Por questão de segurança sanitária não são permitidas as iscas inseticidas líquidas.

REPELENTES:

Substâncias aplicadas sobre superfícies ou ambientes que desencorajam a aproximação de insetos.

Podem ser comercializados nas mesmas formas que os inseticidas.

São permitidas formulações de ação repelente para pragas, para aplicação em superfícies ou para volatilização em ambientes, com liberação do ingrediente ativo, por aquecimento elétrico, outra forma de energia ou espontaneamente.

NOTA: Os repelentes que são aplicados em superfícies ou ambientes são registrados como desinfestantes, na categoria de saneantes. Já os repelentes que são aplicados sobre a pele são registrados como cosméticos!

RATICIDAS:

Destinado ao combate a ratos, camundongos e outros roedores, em locais como domicílios, embarcações, recintos e lugares de uso público, contendo substâncias que não ofereçam risco à vida ou à saúde do homem e dos animais úteis de sangue quente (aves e mamíferos), quando aplicado em conformidade com as recomendações contidas em sua apresentação.

Podem ser comercializados nas formas: blocos sólidos, iscas, grãos, totalmente resinados ou parafinados em todos os casos.

Por questão de segurança sanitária, não são permitidas formulações líquidas, premidas (aerossol), em pastas, pós solúveis, pós molháveis e iscas em pó.

IMPORTANTE SABER:

- O produto deve ser mantido na embalagem original e as embalagens vazias não devem ser reaproveitadas.
- Não aplicar sobre alimentos e utensílios de cozinha, plantas e aquários.
- Em caso de contato direto com o produto, lavar a parte atingida com água em abundância e sabonete.
- Se inalado em excesso, remover a pessoa para local ventilado.
- Em caso de intoxicação, procurar o Centro de Intoxicações ou Serviço de Saúde, levando a embalagem ou o rótulo do produto.

NOTA: O uso irregular e/ou clandestino do Aldicarbe (mais conhecido como chumbinho) como raticida deve ser denunciado à vigilância sanitária local. O Aldicarbe é uma substância extremamente tóxica. É comercializada no Brasil sob a forma exclusiva de agrotóxico e possui autorização de uso exclusivamente agrícola.

PROVIDÊNCIAS e SUPORTE LEGAL

Resoluções da Anvisa RDC nº 34, de 16 de agosto de 2010 e RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Decreto 79.094/1977. Manual de Protocolos para Testes de Eficácia em Produtos Desinfestantes. Nota Técnica da Reavaliação do Ingrediente Ativo Aldicarbe. Cartilha da Anvisa: Orientações para os consumidores de saneantes. Lei 8.078/90 (CDC) art.4º caput, incisos I a III; art6ºI, II, III; art 8º, art.10 e art.18.

Produtos com suspeitas de irregularidades devem ser denunciados à Vigilância Sanitária mais próxima do consumidor. Denúncias também para o e-mail: ouvidoria@anvisa.gov.br

Pedidos de informação: Central de Atendimento da Anvisa – 0800 642 9782. Disque Saúde 136.

Orientações podem ser obtidas pelo Disque-Intoxicação (0800 722 6001). Mais informações: www.anvisa.gov.br

Revisão Técnica: Gerência-Geral de Saneantes OUVIDORIA/ANVISA E DPDC/SENACON – ANO 5 N.28, SETEMBRO DE 2012

ANEXO 11

NÍVEIS DE METABÓLITOS DETERMINADOS NOS PARTICIPANTES

Identificação do Banco	Identificação do CESTEHE	Concentração 3PBA ng.mL ⁻¹	Concentração 4FPBA ng.mL ⁻¹	Creatinina mg.dL ⁻¹
5070084AC1805-1	2015_382			110,7465
5070084AC1805-2	2015_383			55,0656
5070084AC1805-3	2015_384			177,9635
5070084AM1805-1	2015_376			102,4405
5070084AM1805-2	2015_377			77,6148
5070084AM1805-3	2015_378			149,5078
5070084AM1805-4	2015_379			177,7789
5070084AM1805-5	2015_380			76,3843
5070084AM1805-6	2015_381			46,3290
5070084TA1805-1	2015_372			82,6907
5070084TA1805-2	2015_373			118,1911
5070084TA1805-3	2015_374			109,2084
5070084TA1805-4	2015_375			84,5057
5070084ZC1805-1	2015_368			130,5271
5070084ZC1805-2	2015_369			139,8790
5070084ZC1805-3	2015_370			158,0291
5070084ZC1805-4	2015_371			161,5361
5090180AC1905-1	2015_385	0,2761		166,1362
5090180AC1905-2	2015_386			135,9790
5090180AC1905-3	2015_387			289,1217
5090180AM1905-1	2015_388			56,5068
5090180AM1905-2	2015_389			44,1176
5090180AM1905-3	2015_390			121,0516
5090180AM1905-4	2015_391			61,0395
5090180AM1905-5	2015_392			50,1612
5090180TA1905-1	2015_393			224,4259
5090180TA1905-2	2015_394			69,5306
5090180TA1905-3	2015_395	0,3915		76,3598
5090180TA1905-4	2015_396			99,9597
5090180TA1905-5	2015_397			148,7309
5090180TA1905-6	2015_398			170,0342
5100021AC0806-1	2015_314		0,368	116,4338
5100021AC0806-2	2015_315	2,1651	0,257	267,1626
5100021AC0806-3	2015_316	1,6440		168,7119
5100021AM0806-1	2015_317	2,3550	0,299	227,1870
5100021AM0806-2	2015_318	2,9881		100,6075
5100021AM0806-3	2015_319			201,7313
5100021AM0806-4	2015_320			44,7448
5100021TA0806-1	2015_308			25,6987
5100021TA0806-2	2015_309			40,1276
5100021TA0806-3	2015_310	0,4008		131,0146
5100021TA0806-4	2015_311	0,3765		263,2442
5100021ZC0806-1	2015_312			261,5601
5100021ZC0806-2	2015_313			58,6574
5100384AC1205-1	2015_348			82,8068
5100384AC1205-2	2015_349			92,7096
5100384AC1205-2a	2015_350			221,6586
5100384AC1205-3	2015_351	0,5349		96,1422
5100384AC1205-4	2015_352			143,5298
5100384AC1205-5	2015_353	1,6664		59,4168

5100384AC1205-6	2015_354			48,7242
5100384AM1205-1	2015_337			88,7303
5100384AM1205-2	2015_338	1,3846		165,4313
5100384AM1205-3	2015_339	2,6373		310,6926
5100384AM1205-4	2015_340			237,7278
5100384AM1205-5	2015_341	0,8004		86,9988
5100384AM1205-6	2015_342			21,3244
5100384TA1205-1	2015_343			161,9988
5100384TA1205-2	2015_344			25,0608
5100384TA1205-3	2015_345	1,2982		131,9563
5100384TA1205-4	2015_346	2,4440		123,7242
5100384TA1205-5	2015_347			27,0049
5110289AC0206-1	2015_459			117,4589
5110289AM0206-1	2015_461	0,6726		69,5225
5110289TA0206-1	2015_460			118,3665
5130138AC0804-1	2015_178	0,2357		69,02985
5130138AC0804-2	2015_179			159,04851
5130138AC0804-3	2015_180			89,05473
5130138AC0804-4	2015_181			108,67537
5130138AM0804-1	2015_182			37,00249
5130138AM0804-2	2015_183			209,29726
5130138AM0804-3	2015_184			219,27861
5130138AM0804-4	2015_185			57,61816
5130138TA0804-1	2015_173			117,22637
5130138TA0804-2	2015_174			86,53607
5130138TA0804-3	2015_175			84,26617
5130138TA0804-4	2015_176			92,38184
5130138TA0804-5	2015_177			68,90547
5130138ZC0804-1	2015_186	1,6646		165,67164
5130138ZC0804-2	2015_187	0,2173		48,19652
5130138ZC0804-3	2015_188			137,18905
5130138ZC0804-4	2015_189			152,08333
5140133AC1304-1	2015_204			55,3913
5140133AC1304-3	2015_205			110,2519
5140133AM1304-1	2015_193			25,7598
5140133AM1304-2	2015_194	2,6409		302,9038
5140133AM1304-3	2015_195	0,3885		126,0824
5140133AM1304-4	2015_196			156,3072
5140133AM1304-5	2015_197			103,9446
5140133TA1304-1	2015_198			70,6911
5140133TA1304-2	2015_199			27,7893
5140133TA1304-3	2015_200	4,3780		274,6149
5140133TA1304-4	2015_201			273,8968
5140133TA1304-5	2015_202			66,0387
5140133TA1304-6	2015_203			327,9142
5140133ZC1304-1	2015_190			74,8439
5140133ZC1304-2	2015_191			256,0679
5140133ZC1304-3	2015_192	0,4886		200,6141
5150001AC2705-1	2015_442	1,4414	1,432	165,14303
5150001AC2705-2	2015_443	1,4191	1,982	123,32090
5150001AC2705-3	2015_444	3,3446		52,08333
5150001AC2705-4	2015_445	3,0606		121,98383
5150001AC2705-5	2015_446			203,79353
5150001AM2705-1	2015_451			214,24129
5150001AM2705-2	2015_452			176,74129
5150001AM2705-3	2015_453			185,91418
5150001AM2705-4	2015_454			110,35448

5150001TA2705-1	2015_455			125,93284
5150001TA2705-2	2015_456			33,08458
5150001TA2705-3	2015_457			101,64801
5150001TA2705-4	2015_458			317,84826
5150001ZC2705-1	2015_447			121,36194
5150001ZC2705-2	2015_448			139,76990
5150001ZC2705-3	2015_449	1,2984		62,18905
5150001ZC2705-4	2015_450	1,7028		53,60697
5150154AC2303-1	2015_068			2,6591
5150154AC2303-2	2015_069			43,6039
5150154AC2303-3	2015_070			91,6499
5150154AC2303-4	2015_071			81,2248
5150154AM2303-1	2015_063			126,7023
5150154AM2303-2	2015_072	5,5032		65,8139
5150154AM2303-3	2015_073	0,2983		402,2562
5150154AM2303-4	2015_074	1,4560		174,3856
5150154TA2303-1	2015_065			216,4182
5150154TA2303-2	2015_064			39,7361
5150154TA2303-3	2015_066			40,7635
5150154TA2303-4	2015_067			127,5483
5150154ZC2303-1	2015_075			153,8981
5150154ZC2303-2	2015_076			152,4778
5150154ZC2303-3	2015_077			269,4198
5150154ZC2303-4	2015_078			31,4565
5160262AC1603-1	2015_030	0,4781		246,4469
5160262AC1603-2	2015_031	2,9578		239,7367
5160262AC1603-3	2015_032			52,2046
5160262AC1603-4	2015_033	0,3801		148,6836
5160262AC1603-5	2015_035			39,0090
5160262AC1603-6	2015_036	0,3674		157,7055
5160262AC1603-7	2015_037	0,1674		60,1670
5160262AM1603-1	2015_040			146,7894
5160262AM1603-2	2015_041			93,2363
5160262AM1603-3	2015_045			67,2624
5160262AM1603-4	2015_044			221,6289
5160262TA1603-1	2015_038			177,0013
5160262TA1603-2	2015_039	0,5900		304,7517
5160262TA1603-3	2015_042	2,1326		27,0013
5160262TA1603-4	2015_043			81,8065
5160262ZC1603-1	2015_034			101,9050
5170268AC2804-1	2015_244	1,7890		197,8392
5170268AC2804-2	2015_245			119,9870
5170268AC2804-3	2015_246			124,3626
5170268AC2804-4	2015_247	1,0487		178,5220
5170268AM2804-1	2015_248			58,3081
5170268AM2804-2	2015_249			102,8738
5170268AM2804-3	2015_250			24,1789
5170268TA2804-1	2015_241	2,7721		299,5462
5170268TA2804-2	2015_242		0,394	83,6538
5170268TA2804-3	2015_243	1,3657		145,3652
5170587AC2403-1	2015_084			101,0024
5170587AC2403-2	2015_085	0,3195		190,7959
5170587AC2403-3	2015_086			59,5383
5170587AC2403-4	2015_087			18,3171
5170587AC2403-5	2015_088			221,3244
5170587AM2403-1	2015_090	1,4707		119,3196
5170587AM2403-2	2015_091	2,3032		252,7035

5170587AM2403-3	2015_092			102,7643
5170587AM2403-4	2015_093			75,0911
5170587AM2403-5	2015_094			86,1482
5170587AM2403-6	2015_095			164,1252
5170587TA2403-1	2015_079	2,9239	0,396	120,5043
5170587TA2403-2	2015_080			
5170587TA2403-3	2015_081	0,2798		130,5589
5170587TA2403-4	2015_082			83,0194
5170587TA2403-5	2015_083	1,0675		193,1956
5190262AC1803-1	2015_050	0,7498		154,32214
5190262AC1803-2	2015_051	0,3521		199,16045
5190262AC1803-3	2015_054	1,0315		208,1112
5190262AC1803-4	2015_052			125,21766
5190262AC1803-5	2015_053	0,5591		85,5824
5190262AM1803-1	2016_1192			17,94154
5190262AM1803-2	2015_055	0,7732		122,6825
5190262AM1803-3	2015_056	0,7353		125,9742
5190262AM1803-4	2015_057	1,0300		181,0398
5190262AM1803-5	2015_058			351,1895
5190262TA1803-1	2015_059	0,4211		0,0000
5190262TA1803-2	2015_060			44,06095
5190262TA1803-3	2015_061	1,0076		97,29478
5190262TA1803-4	2015_062			90,76493
5190262ZC1803-1	2015_046	0,3431		160,82090
5190262ZC1803-2	2015_047			70,52239
5190262ZC1803-3	2015_048	2,9094		312,25124
5190262ZC1803-4	2015_049	2,8528		255,78358
5200266AC2904-1	2015_251			84,3429
5200266AC2904-2	2015_252			245,9653
5200266AC2904-3	2015_253			134,4927
5200266AC2904-4	2015_254			116,6096
5200266AM2904-1	2015_255			65,8497
5200266AM2904-2	2015_256			51,2735
5200266AM2904-3	2015_257			47,0355
5200266AM2904-4	2015_258			122,7098
5200266AM2904-5	2015_259			245,9011
5200266TA2904-1	2015_260	0,2341		144,4777
5200266TA2904-2	2015_261			61,9328
5200266TA2904-3	2015_262	1,5451		240,2504
5200266ZC2904-1	2015_263			202,0120
5200266ZC2904-2	2015_264			45,2697
5200266ZC2904-3	2015_265			0,1605
5200266ZC2904-4	2015_266			90,7641
5210010AC1105-1	2015_321			104,4709
5210010AC1105-2	2015_322			137,5103
5210010AC1105-3	2015_323	0,1873		75,9537
5210010AM1105-1	2015_332	1,1094		90,8121
5210010AM1105-2	2015_333	0,7246		244,6267
5210010AM1105-3	2015_334	0,7141		145,1395
5210010AM1105-4	2015_335	0,4343		80,2605
5210010AM1105-5	2015_336	0,2939		122,5595
5210010TA1105-1	2015_324			117,2683
5210010TA1105-2	2015_325	0,2784		86,5053
5210010TA1105-3	2015_326			51,3741
5210010TA1105-4	2015_327			120,9290
5210010ZC1105-1	2015_328	0,2002		197,7748
5210010ZC1105-2	2015_329			151,4459

5210010ZC1105-3	2015_330	0,3339		132,5574
5210010ZC1105-4	2015_331	0,4789		123,5439
5210275AC0505-1	2015_304			191,3352
5210275AC0505-2	2015_305			143,5014
5210275AC0505-3	2015_306			63,3878
5210275AC0505-5	2015_307			190,3054
5210275AM0505-1	2015_293			47,6563
5210275AM0505-2	2015_294	10,6088	3,464	102,2727
5210275AM0505-3	2015_295			85,0142
5210275AM0505-4	2015_296			82,4219
5210275AM0505-5	2015_297			147,4787
5210275AM0505-6	2015_298			17,0099
5210275TA0505-1	2015_299	2,9074		170,3480
5210275TA0505-2	2015_300	0,4908		314,6307
5210275TA0505-3	2015_301			134,0199
5210275TA0505-4	2015_302	3,7910		153,8707
5210275TA0505-5	2015_303	14,1708		89,0980
5210533AC2704-1	2015_226	2,2022		80,5398
5210533AM2704-1	2015_236	0,4630		141,7614
5210533AM2704-2	2015_237	0,8172	0,633	210,3338
5210533AM2704-3	2015_238			75,0000
5210533AM2704-4	2015_239	2,5620		159,9432
5210533AM2704-5	2015_240			119,3892
5210533TA2704-1	2015_231	0,2992		149,2188
5210533TA2704-2	2015_232	1,2256		467,1165
5210533TA2704-3	2015_233			7,7060
5210533TA2704-4	2015_234			93,7500
5210533TA2704-5	2015_235			30,7173
5210533ZC2704-1	2015_227			35,6534
5210533ZC2704-2	2015_228			115,4474
5210533ZC2704-3	2015_229			118,0398
5210533ZC2704-4	2015_230	1,0708		237,9972
5220049AC0405-1	2015_285			183,9362
5220049AC0405-2	2015_286	3,2576		297,1426
5220049AC0405-3	2015_287	0,3842		158,0586
5220049AC0405-4	2015_288			94,4242
5220049AM0405-1	2015_289			71,3720
5220049AM0405-2	2015_290			149,4542
5220049AM0405-3	2015_291		0,541	282,5985
5220049TA0405-1	2015_292			14,2551
5220049ZC0405-1	2015_282			28,0608
5220049ZC0405-2	2015_283			0,3853
5220049ZC0405-3	2015_284			143,7714
5220348AC0605-1	2015_267		0,330	68,1229
5220348AC0605-3	2015_268			95,3495
5220348AC0605-4	2015_269			74,6336
5220348AM0605-1	2015_278	0,6307		81,8771
5220348AM0605-2	2015_279			95,2649
5220348AM0605-3	2015_280			94,9549
5220348AM0605-4	2015_281			185,2311
5220348TA0605-1	2015_274	1,9659	1,345	91,8828
5220348TA0605-2	2015_275	1,6756		87,3450
5220348TA0605-3	2015_276	1,6999	1,027	63,3033
5220348TA0605-4	2015_277	1,6172	0,400	72,5479
5220348ZC0605-1	2015_270			102,9876
5220348ZC0605-2	2015_271			156,4543
5220348ZC0605-3	2015_272			47,3788

5220348ZC0605-4	2015_273	2,1575	1,747	84,5547
5230067AC0106-1	2015_118			61,4927
5230067AC0106-2	2015_119			175,9577
5230067AC0106-3	2015_120			170,0793
5230067AC0106-4	2015_121			61,7900
5230067AC0106-5	2015_122			86,4597
5230067AM0106-1	2015_116			50,8917
5230067AM0106-2	2015_117	1,2769		130,0528
5230067AM0106-3	2015_110	0,6795		127,8732
5230067AM0106-4	2015_115			137,7477
5230067TA0106-1	2015_111	1,2421		259,8745
5230067TA0106-2	2015_112	1,0172		43,9564
5230067TA0106-3	2015_113	0,7010		215,7860
5230067TA0106-4	2015_114	10,0779		90,9841
5230067ZC0106-1	2015_123			80,7464
5230067ZC0106-2	2015_124			47,2589
5230067ZC0106-3	2015_125	3,6437		97,9194
5230330AC3003-1	2015_103			148,6189
5230330AC3003-2	2015_104			26,9448
5230330AC3003-3	2015_105			29,7351
5230330AM3003-1	2015_106			109,1601
5230330AM3003-2	2015_107			151,3811
5230330AM3003-3	2015_108			172,9425
5230330AM3003-4	2015_109			132,3281
5230330TA3003-1	2015_096	7,3390		54,6787
5230330TA3003-2	2015_097			17,1082
5230330TA3003-3	2015_098			46,5051
5230330TA3003-4	2015_099	0,6729		127,1702
5230330ZC3003-1	2015_100			62,4859
5230330ZC3003-2	2015_101			126,2120
5230330ZC3003-3	2015_102			111,1612
5230657AC2804-1	2015_355			41,2153
5230657AC2804-2	2015_356			89,4980
5230657AC2804-3	2015_357			95,0462
5230657AC2804-4	2015_358			56,6711
5230657TA2804-1	2015_363			35,3038
5230657TA2804-2	2015_364	0,9702		31,1427
5230657TA2804-3	2015_365			209,7094
5230657TA2804-4	2015_366			93,1638
5230657TA2804-5	2015_367	2,4331		93,9234
5230657ZC2804-1	2015_359			110,7332
5230657ZC2804-2	2015_360			51,7503
5230657ZC2804-3	2015_361			179,5905
5230657ZC2804-4	2015_362	0,5461		125,4954
5240209AC2005-1	2015_411	2,1101		136,2575
5240209AC2005-2	2015_412	2,9202		55,2695
5240209AC2005-3	2015_413	2,7666		212,9341
5240209AC2005-4	2015_414	1,6278		27,6048
5240209AM2005-1	2015_404			71,4371
5240209AM2005-2	2015_405			31,3174
5240209AM2005-3	2015_406			131,4970
5240209AM2005-4	2015_407			119,7305
5240209TA2005-1	2015_399	0,4541		131,0180
5240209TA2005-2	2015_400			202,8443
5240209TA2005-3	2015_401			76,6168
5240209TA2005-4	2015_402			128,1138
5240209TA2005-5	2015_403			92,3952

5240209ZC2005-1	2015_408		111,1377
5240209ZC2005-2	2015_409		107,3054
5240209ZC2005-3	2015_410		176,8563
5240568AC0704-1	2015_160		94,1579
5240568AC0704-2	2015_161		20,4271
5240568AC0704-3	2015_162		72,9754
5240568AC0704-4	2015_163	1,5139	102,9210
5240568AC0704-5	2015_164		63,6684
5240568AM0704-1	2015_165		105,3989
5240568AM0704-2	2015_166	2,2177	106,2450
5240568AM0704-4	2015_167		108,9343
5240568AM0704-5	2015_168		104,7643
5240568TA0704-1	2015_169	0,2025	251,2591
5240568TA0704-2	2015_170		64,6656
5240568TA0704-3	2015_171		78,8981
5240568TA0704-4	2015_172		96,5451
5250283AC0604-1	2015_157		164,4567
5250283AC0604-2	2015_158		131,7340
5250283AC0604-3	2015_159		79,1216
5250283AM0604-1	2015_144		49,0120
5250283AM0604-2	2015_145	0,3002	364,9102
5250283AM0604-3	2015_146	1,0680	152,7844
5250283AM0604-4	2015_147	0,5621	92,7545
5250283TA0604-1	2015_153		103,4138
5250283TA0604-2	2015_154	2,6518	55,9534
5250283TA0604-3	2015_155	60,7921	20,8264
5250283TA0604-4	2015_156		176,3843
5250283ZC0604-1	2015_148		105,2695
5250283ZC0604-2	2015_149		131,6467
5250283ZC0604-3	2015_150		95,0000
5250283ZC0604-4	2015_151		248,9521
5250283ZC0604-5	2015_152	1,7161	169,6087
5280034AC2505-1	2015_422		146,1648
5280034AC2505-2	2015_423		82,8125
5280034AC2505-3	2015_424	2,1787	231,2500
5280034AC2505-4	2015_425		124,1122
5280034AC2505-5	2015_426		31,6761
5280034AC2505-6	2015_427		125,9588
5280034AM2505-1	2015_419		110,8310
5280034AM2505-2	2015_420	2,7928	81,4631
5280034AM2505-3	2015_420		90,1969
5280034AM2505-4	2015_421		81,9247
5280034TA2505-1	2015_417	1,3277	190,1989
5280034TA2505-2	2015_418		345,0284
5280034ZC2505-1	2015_415		94,4247
5280034ZC2505-2	2015_416		202,7344
5290180AC0306-1	2015_493	0,8081	77,2156
5290180AC0306-2	2015_494	0,3480	114,4311
5290180AC0306-3	2015_495		211,8563
5290180AM0306-1	2015_488		112,7545
5290180AM0306-2	2015_489	0,7020	107,6946
5290180AM0306-3	2015_490		106,6467
5290180AM0306-4	2015_491		77,9341
5290180AM0306-5	2015_492		158,6527
5290180TA0306-1	2015_483		106,4970
5290180TA0306-2	2015_484		85,3293
5290180TA0306-3	2015_485	1,0388	86,5868

5290180TA0306-4	2015_486	0,7101		73,5928
5290180TA0306-5	2015_487	0,5269		141,2575
5290180ZC0306-1	2015_478	2,5554		75,3892
5290180ZC0306-2	2015_479	2,0349		241,4970
5290180ZC0306-3	2015_480	0,5247		149,4311
5290180ZC0306-4	2015_481			185,8683
5290180ZC0306-5	2015_482			162,6048
5300015AC1404-1	2015_206			152,6494
5300015AC1404-2	2015_207			85,1184
5300015AC1404-3	2015_208	1,9877		155,1015
5300015AC1404-4	2015_209			103,8613
5300015AC1404-5	2015_210			65,1917
5300015AM1404-1	2015_211			70,2649
5300015AM1404-2	2015_212			88,3315
5300015AM1404-3	2015_213			116,0090
5300015AM1404-4	2015_214	7,1271		198,1962
5300015AM1404-5	2015_215			31,9899
5300015TA1404-1	2015_216	1,5364		230,1297
5300015TA1404-2	2015_217	2,3124		182,4126
5300015TA1404-3	2015_218	2,8263	1,277	94,6167
5300015TA1404-4	2015_219	2,2773	1,392	92,0237
5310034AC2605-1	2015_433			110,8653
5310034AC2605-2	2015_434			195,2114
5310034AC2605-3	2015_435	1,8090		173,7120
5310034AC2605-4	2015_436	1,2414		117,8336
5310034AM2605-1	2015_428	0,3524		357,0674
5310034AM2605-2	2015_429	18,6754		75,7596
5310034AM2605-3	2015_430			70,2114
5310034AM2605-4	2015_431	0,9200		220,3435
5310034AM2605-5	2015_432	1,0557		65,9181
5310034TA2605-1	2015_437	0,1808		134,0159
5310034TA2605-2	2015_438			275,0661
5310034TA2605-3	2015_439			85,4690
5310034TA2605-4	2015_440			100,8917
5310034TA2605-5	2015_441			129,1281
5320137AC0106-1	2015_462			54,5484
5320137AC0106-2	2015_463			110,2312
5320137AC0106-3	2015_464			57,4978
5320137AC0106-4	2015_465			38,9261
5320137AM0106-1	2015_466			35,1664
5320137AM0106-2	2015_467	0,5372		112,2083
5320137AM0106-3	2015_468			99,5354
5320137AM0106-4	2015_469	0,5355		74,5787
5320137TA0106-1	2015_474	1,4768		250,0540
5320137TA0106-2	2015_475	0,4268		137,1975
5320137TA0106-3	2015_476			67,5778
5320137TA0106-4	2015_477			50,0108
5320137ZC0106-2	2015_470	1,0902		176,2532
5320137ZC0106-3	2015_471			254,3323
5320137ZC0106-4	2015_472			187,4676
5320137ZC0106-5	2015_473			61,5169
5370137AC1504-1	2015_222			146,4672
5370137AC1504-2	2015_223			100,2485
5370137TA1504-1	2016_927			140,6007
5370137TA1504-2	2015_224			267,7831
5370137TA1504-3	2015_225			22,1694
5370137ZC1504-1	2015_220	1,9535		181,6011

5370137ZC1504-2	2015_221	0,6868		233,8159
5390051AC3103-1	2015_138	6,8075		84,2735
5390051AC3103-2	2015_139			26,8838
5390051AC3103-3	2015_140			129,5483
5390051AC3103-4	2015_141			25,9159
5390051AC3103-5	2015_142			61,9484
5390051AC3103-6	2015_143			97,5125
5390051AM3103-1	2015_126			110,2206
5390051AM3103-2	2015_127			31,8172
5390051AM3103-3	2015_128	1,1843		217,2877
5390051AM3103-4	2015_129	3,2698		104,8501
5390051AM3103-5	2015_130	0,2856		240,0187
5390051TA3103-1	2015_131			128,7989
5390051TA3103-2	2015_132			146,9400
5390051TA3103-3	2015_133			88,6449
5390051TA3103-4	2015_134			143,5054
5390051TA3103-5	2015_135	3,0350		62,0108
5390051TA3103-6	2015_136			227,4355
5390051TA3103-7	2015_137			256,6923
voluntario	2015_089			79,5261