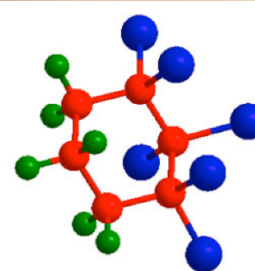


Dichlorodiphenyltrichloroethane ( $C_{14}H_9Cl_5$ )



Hexachlorocyclohexane ( $C_6H_6Cl_6$ )

Josiane Patrícia Lopes Dias Marques

## Resíduos de pesticidas Organoclorados em leite materno

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Josiane Patrícia Lopes Dias Marques

# Resíduos de pesticidas Organoclorados em leite materno

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **AGRADECIMENTOS**

Começo por agradecer à Professora Doutora Celeste Lino, docente da Faculdade de Farmácia por me ter ajudado nesta última etapa deste percurso académico. Um enorme e sincero obrigado pela sua disponibilidade, amabilidade, paciência que demonstrou ao longo da realização desta monografia.

Aos familiares, amigos e todos que de certa forma me acompanharam e me ensinaram que não se deve medir esforços para alcançar os meus objetivos.

## Índice

<b>Resumo</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>4</b>
<b>2. Caraterísticas Físico- químicas</b>	<b>6</b>
<b>3. Ocorrência</b>	<b>7</b>
<b>4. Implicações para a Saúde das Crianças Alimentadas com Leite Materno</b>	<b>15</b>
<b>5. Metodologias Analíticas</b>	<b>16</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>21</b>
<b>7. Referências</b>	<b>22</b>

## **Resumo**

Os pesticidas são os poluentes orgânicos mais frequentes na natureza. Ao longo das últimas décadas tem-se efetuado estudos relacionados com pesticidas organoclorados, analisando o seu impacto no meio ambiente e suas consequências para a saúde humana.

O leite materno revela ser uma das ferramentas de elevada importância para a avaliação das fontes de exposição humana, mas, também, é utilizado para determinar os riscos para o recém-nascido. Esta monografia tem como objetivo a análise dos níveis de resíduos de Ocs, tais como DDT e HCH, e os seus isómeros, análogos e principais metabolitos no leite materno. Os OCs foram muito utilizados nas décadas passadas como vetor de controlo de doenças em áreas de malária e uso na agricultura, mas devido á sua persistente e bioacumulação continuam a provocar grandes preocupações nos dias de hoje. Os estudos indicam que, desde a proibição de uso em 1980, os níveis residuais de OCs, têm verificado um declínio gradual em todo o mundo. Além disso, os dados permitem identificar as regiões que apresentam um leve aumento do nível destes pesticidas.

Os métodos cromatográficos são usados para determinar a concentração de OCs, com base nos métodos convencionais como a cromatografia gasosa acoplada ao detetor de captura eletrónica e a cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa.

## **Abstract**

Pesticides are the organic pollutants mostly usual in the environment. Studies about organochlorine pesticides have been done for decades analyzing their impact on the environment and their consequence for human health.

Human milk reveals to be an important tool for the assessment of human exposure sources but also for determine the hazard for newborn. This monograph focus on the analysis of level of OC residues, such as DDT and HCH, and their main metabolites in human breast milk. OCs were used in the past for disease vector control in malaria areas and used in agriculture but, due their persistence and bioaccumulation, they continued to cause great concerns. The reports indicate that since the ban in 1980s, the levels of OC residues suffered a gradual decline worldwide. Furthermore the data allows to identify the regions where a slight increase of this pesticides was observed.

Chromatography was used to evaluate the OC concentrations, based on conventional gas chromatography-electron capture detection and gas chromatography-mass spectrometry.

## **Abreviaturas**

**ASE** - *Accelerated Solvent Extraction*

**GC-ECD** - *Gas Chromatography coupled to Electron Capture Detector*

**GC-MS** - *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

**HRGC-HRMS** - *Gas Chromatography coupled to High Mass Spectrometry*

**IRS** - *Interior Residual Spaces*

**OCs** - *Organoclorados*

**POPs** - *Poluentes Orgânicos Persistentes*

**SPE** - *Solid- Phase Extraction*

**SS** - *Sistema de Solventes*

## I. INTRODUÇÃO

Os pesticidas organoclorados (OCs) são compostos químicos caracterizados como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Os POPs apresentam uma elevada solubilidade lipídica e, devido à sua persistência e à sua capacidade de bioacumulação, afetam o ecossistema e causam riscos para a saúde humana. São ubíquos na natureza. Os POPs sofrem evaporação e podem atingir regiões muito distantes, atingindo a região polar (Tiwari, Sahu e Pandit, 2016).

A partir dos anos 70, o uso de OCs foi restringido em muitos países devido aos seus potenciais efeitos nocivos mas, contudo, o seu uso e produção continuaram noutros países como vetor no controlo da malária e uso na agricultura (Tiwari, Sahu e Pandit, 2016).

Apesar do uso e produção de OCs ter sido banido em alguns países, em outros ainda se justifica o seu uso. É o caso de zonas endémicas da malária e zonas onde se verifica uma produção agrícola em grande escala.

A malária constitui um problema de saúde mundial tendo maior foco nos países da África subsaariana e no sudeste da Ásia. Nestas regiões, uma das medidas de controlo da doença consiste no processo de vaporização de espaços interiores (IRS) com DDT. A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso de DDT numa determinada quantidade, caso não haja outra alternativa e um elevado risco de morte associado à malária. Assim sendo, o IRS acaba por ser a principal fonte de contaminação por DDT e, em algumas dessas regiões, o nível de exposição acaba por ser maior do que o limite residual máximo. Devido aos riscos para a saúde humana associados à utilização do DDT, foram utilizados piretróides como alternativa no combate a malária. A classe dos piretróides tem origem na mimetização sintética da estrutura de inseticidas naturais extraídos das flores do crisântemo. Estes são muito pouco persistentes no ambiente, muito tóxicos para os insetos e menos tóxicos para os mamíferos do que as outras classes de pesticidas. De facto, esta alternativa foi bem-sucedida, mas ultimamente, tem-se verificado muitos casos de resistência a este pesticida (*Who Report 2015*, 2015 ; Initiative, 2014).

O uso de HCH na agricultura tem como objetivo o controlo de pestes. A Índia é um dos maiores consumidores de HCH e um dos países com maior nível de contaminação por HCH. Devido ao uso elevado e intensivo na década de 80, elevados níveis são ainda detetados na natureza e no organismo humano. Antes do período de restrição, usavam-se duas formulações comerciais de HCH, o técnico que era uma mistura dos seus isómeros e o lindano constituído inteiramente pelo  $\gamma$ -HCH, mas somente o lindano ficou disponível para



uso após a restrição. Uma das maiores preocupações dos países de África e da Ásia residem no uso ilegal de DDT e HCH para os fins desejados. Do uso inapropriado resulta muitas vezes a sua deteção na análise de resíduos de pesticidas. De acordo com a distribuição espacial de DDT e HCH verifica-se que, por exemplo, o DDT predomina nas regiões norte, leste e oeste da Índia enquanto o HCH predomina na parte sul da Índia (Mishra e Sharma, 2011).

Face à relação risco/benefício foi criado um conjunto de normas e procedimentos que se encontram estabelecidos num tratado que gere o uso e produção de pesticidas. Este tratado designado por Convenção de Estocolmo determina medidas de controlo que abrange todo o ciclo de vida dos pesticidas. Segundo a Convenção de Estocolmo, a produção e emissão de POPs deve ser reduzido ou totalmente eliminado a nível global, mas, devido à fraca degradação e à capacidade de bioacumulação, muitos OCs persistem no meio ambiente por longos anos, onde os seus resíduos contaminam solos, águas, alimentos, criando assim um ciclo de contaminação na cadeia alimentar (Çok et al., 2012).

A exposição ocorre na população em geral através do aporte dietético diário e da inalação. No organismo humano, os OCs são detetados no sangue, em depósitos nos tecidos adiposos e no leite materno (Song et al., 2013). Uma das formas de estimar a exposição recente face à exposição passada é através da razão DDT/ DDE. Um elevado rácio indica uma contínua exposição ao DDT, enquanto o inverso, indica uma elevada persistência no ambiente (Bedi et al., 2013) ou seja uma exposição recente ou antiga, respetivamente.

A lactação é o meio de nutrição básico recomendado nos primeiros meses de vida. Deste modo, o leite materno serve como um biomarcador para avaliar a exposição maternal prolongada tanto pelo elevado teor lipídico como pela facilidade de obtenção da amostra que utiliza métodos não invasivos (Ennaceur et al., 2008).

Os fatores que influenciam a concentração de OCs no leite materno são referenciados por diversos autores, como sendo: idade das mães, o tipo de mães (primíparas, duíparas ou múltiparas), duração da amamentação, alimentos ingeridos, entre outros fatores. A idade das mães e o número de filhos são, no geral, os fatores mais predominantes.

Existe uma relação de dependência da idade na acumulação de OCs no leite materno. Mulheres menos jovens apresentam uma maior carga de OCs do que as mais jovens. Essa relação pode ser entendida através da ingestão dos alimentos ao longo da sua vida, que representa a maior fonte de aumento da carga corporal dos OCs. Assim sendo, a idade em que a mulher dá à luz o seu primeiro filho influencia muito a quantidade de OCs no leite.

Nas mulheres que tem mais de que um filho, múltíparas, a quantidade de OCs no leite materno normalmente é inferior à das mães de primeira viagem, devido à natureza lipofílica dos OCs e à sua capacidade de serem imobilizados dos depósitos no tecido adiposo para o leite materno. Desse modo, o primeiro filho recebe uma maior carga do que os outros filhos, sendo aquele o grupo de maior risco (Gyalpo *et al.*, 2012).

## 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Os pesticidas organoclorados abrangem um conjunto de compostos químicos tais como o DDT, o hexaclorociclohexano (HCH), o clordano, a dieldrina, o hexaclorobenzeno, o mirex, o toxafeno, entre outros compostos. As principais características físico-químicas de alguns deles encontram-se explicitadas na tabela 1.

Quando se fala de DDT (diclorodifeniltricloroetano) refere-se o composto químico 1,1 – (2,2,2-tricloroetilideno) -bis (4-cloro-benzeno) ou 1-cloro-2- (2,2,2-tricloro-1- [4-cloro-fenil] etil) benzeno que são dois isómeros, o p,p'-DDT e o,p'-DDT, respetivamente. Regra geral estes isómeros são substâncias sólidas cristalinas, de cor branca, inodoras, insípidas com a fórmula empírica  $C_{14}H_9Cl_5$ . Quando se refere a produtos comerciais, o DDT consiste em p,p'-DDT, em predominância, e porções menores dos outros compostos. O DDT técnico utilizado é composto por p,p'-DDT, 77,1%, o,p'-DDT, 14,9%, p,p'-TDE (DDD), 0,3%, o,p'-TDE (DDD), 0,1%, p,p'-DDE, 4%, o,p'-DDE, 0,1% e uma percentagem de 3,5 de produtos não identificáveis (WHO, 1989).

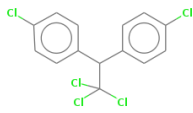
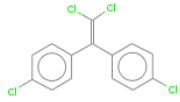
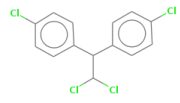
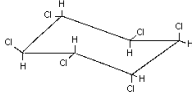
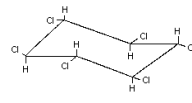
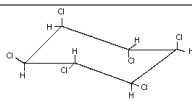
O p,p'-DDT possui uma baixa hidrossolubilidade, na ordem de  $1\mu\text{g/L}$ , tendo, porém, uma boa lipossolubilidade. Através do processo de metabolização, quer por degradação biológica ou ambiental (presença de luz ou catalisadores e temperatura acima do ponto de fusão), o p,p'-DDT perde uma molécula de HCl, transformando assim no seu maior metabolito o p,p'-DDE (2,2-bis[p-clorofenil] -1,1-dicloroetileno), que apresenta maior resistência à degradação do que a molécula mãe (WHO, 1989). Este apresenta uma solubilidade em água na ordem dos  $0,022\text{ mg/L}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (Mackay *et al.*, 1997). Outros metabolitos podem ser encontrados nos tecidos, como o p,p'-DDD (1,1'-(2,2-dicloroetilideno) bis[4-clorobenzeno]) e o p,p'-DDA (2,2-bis[4-clorofenil] - ácido acético) representativos da via de desintoxicação do composto. O DDD é a forma intermediária na formação do DDA (WHO, 1989), apresentando uma solubilidade em água na ordem dos  $0,02\text{ mg/L}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (Mackay *et al.*, 1997).

Os isómeros do hexaclorociclohexano (HCH) mais predominantes são o  $\alpha$ -HCH, o  $\beta$ -HCH e o  $\gamma$ -HCH, com fórmula empírica  $C_6H_6Cl_6$ . O HCH técnico é composto por  $\alpha$ -HCH (65-75%),  $\beta$ -HCH (7-10%),  $\gamma$ -HCH (14-15%) e 10% de outros isómeros. O  $\alpha$ -HCH é um estereoisómero do  $\gamma$ -HCH que se forma durante o processo de fabrico do lindano.  $\beta$ -HCH também é um estereoisómero do  $\gamma$ -HCH que se forma durante o fabrico do lindano, sendo o isómero mais persistente do HCH. A sua solubilidade em água é 1,5 mg/L a 20 °C e 0,2 mg/L a 28 °C. A 20 °C é solúvel em solventes orgânicos como acetona 103,9 g/L, clorofórmio, 3 g/L, éter de petróleo, 2 g/L (WHO, 1992). O lindano ( $\gamma$ -HCH) é um sólido cristalino, com um ligeiro ou nenhum odor. Possui uma fraca solubilidade em água, 10 mg/L a 20 °C, sendo solúvel em acetona e solventes aromáticos e clorados, moderadamente solúvel em etanol, 6,7% e ligeiramente solúvel em óleos minerais (WHO, 1991).

### 3. OCORRÊNCIA

Estudos realizados por Mishra e Sharma (2011) em amostras de leite materno da região de Assam, uma zona agrícola da Índia que não está imune à malária, foram selecionados dois distritos, Dibrugarh e Nagaon. O teor de resíduos de OCs nesses dois distritos não apresentou diferenças significativas. Contudo os níveis de resíduos em Nagaon foram ligeiramente superiores (Tabelas 2 e 3). O  $p,p'$ -DDT foi encontrado em todas as amostras analisadas, sendo este o composto predominante (1320 ng/g). O  $p,p'$ -DDE foi o segundo composto mais predominante com 1040 ng/g, (Tabela 2). Pelo facto da razão DDT/ DDE ser elevada, 1,36, há claras evidências da existência de uma fonte de exposição recente ao DDT. O isómero  $\beta$ -HCH apresentou uma frequência de 100% (Tabela 3), indicando um uso contínuo de HCH técnico. Outro aspeto também analisado foi a influência da urbanização na contaminação. Os resultados demonstram que em zonas rurais os níveis de  $p,p'$ -DDT,  $p,p'$ -DDE e HCH são mais elevados do que em zonas urbanas. Esses resultados podem ser explicados pelo facto de que as práticas agrícolas são desenvolvidas em regiões rurais, estando assim a população rural mais exposta a estes pesticidas. De forma a estimar a dimensão da exposição através do consumo de alimentos, os autores deste estudo calcularam a ingestão média diária e verificaram que os valores recomendados foram excedidos, 20  $\mu$ g/kg peso corporal / dia para DDT e 0.3  $\mu$ g/kg peso corporal / dia para o HCH.

**Tabela I - Características físico-químicas dos Ocs.**

Organoclorados	Estrutura	Ponto de fusão °C	Ponto de ebulição °C	Coefficiente de fugacidade	Pressão de vapor Pa	Log Pow	Bibliografia
<b>p,p'-DDT</b>		108,5-109	185	0,147	2,53 x10 <sup>-5</sup>	7,48	(Mackay et al., 1997; (WHO, 1989)
<b>p,p'-DDE</b>		88,5		0,233	8,60 x10 <sup>-4</sup>	6,72	(Mackay, et al., 1997)
<b>p,p'-DDD</b>		109-110		0,144	1,33 x10 <sup>-4</sup>	6,7	(Mackay et al., 1997)
<b>α-HCH</b>		158	288		2,67	3,82	(Mackay et al., 2006; WHO, 1992)
<b>β-HCH</b>		309		0,00164	0,67	3,80	(Mackay et al., 2006; WHO, 1992)
<b>γ-HCH Lindano</b>		112,8	288	0,12	0,434 x10 <sup>-2</sup>	3,2-3,7	(Mackay et al., 2006; WHO, 1992)

No estudo realizado na Tunísia verificou-se que, do total de 237 amostras provenientes de 12 regiões, o p,p'-DDE predominava em todas as amostras analisadas com uma concentração média de 676 ng/g (Tabela 2). Este resultado demonstra que existe uma variabilidade de fontes de exposição ao DDT e conseqüentemente, este é um dos maiores contaminantes ambientais daquele país. O β-HCH predominava em relação aos restantes isômeros do HCH, com uma concentração média de 42 ng/g (Tabela 3). Em termos de urbanização, a população rural apresenta níveis de resíduos de DDT mais elevados (59 ng/g) em relação à população urbana (18 ng/g). Já em relação ao HCH não houve variações nas concentrações entre a população rural e a urbana. Avaliando o fator tipo de mães e idade das mães, verificou-se um aumento dos níveis de DDT em relação às mães com idade superior a 30 anos. Desse mesmo modo, os níveis de DDT e HCH eram significativamente

mais elevadas em mães primíparas do que em múltiparas. Os resultados obtidos na análise do leite materno estavam correlacionados com o consumo de peixe pelas mães, demonstrando assim a forte influência da alimentação nos níveis de resíduos no leite (Ennaceur *et al.*, 2008).

Em Beijing, na China, foi realizado um estudo e este por sua vez foi comparado a um outro estudo realizado na mesma região no ano de 2005. Foram analisadas 48 amostras de leite materno obtidas de um grupo de mães de primeira viagem com a mesma idade. Desse estudo verificou-se uma diminuição considerável da concentração total de DDT (719,1 vs 349,4 ng/g), sendo o p,p'-DDE o isómero predominante com uma concentração média de 333,8 ng/g e 100% de frequência de detecção (Tabela 2). Em relação ao HCH houve um ligeiro aumento relativamente ao estudo de 2005 (169 vs 188,9 ng/g) com maior predominância do isómero  $\beta$ -HCH (174,6 ng/g) (Tabela 3). A razão DDE/DDT teve um aumento de 5 para 32 descartando assim a exposição recente ao DDT e evidenciando uma exposição passada pela permanência do isómero mais resistente à degradação. Numa estimativa da ingestão diária foram obtidos valores de 1,76  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal / dia para DDT e 0,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal / dia para HCH, valores que se encontram abaixo dos limites recomendados pela WHO (Song *et al.*, 2013).

No Irão, foram avaliadas duas cidades, Noushahr e Nour, da costa sul do mar Cáspio com objetivo determinar os níveis de resíduos de OCs e avaliar o estado de contaminação dessa região comparativamente a outras regiões. Os resultados obtidos não apresentam variações significativas entre as duas regiões. Contudo na tabela 2 apresentam-se os valores da cidade de Noushahr onde os níveis detetados são superiores. A concentração total de DDT é 3560 ng/g e o p,p'-DDE estava presente em todas as amostras. Os isómeros  $\beta$ -HCH e  $\alpha$ -HCH estavam presentes em todas as amostras, sendo o  $\beta$ -HCH o mais predominante (Tabela 3). Pelo facto de o total de HCH representar uma maior percentagem do total de OCs, indica que este ainda é continuamente usado neste país. A razão DDE/DDT de 5,4, comparativamente a valores de outros estudos, representa uma diminuição do uso de DDT na agricultura. Não foram encontradas diferenças de concentrações entre mães primíparas e múltiparas, assim como também não foram verificados qualquer relação entre a idade das mães e os níveis dos OCs. Neste estudo também ficou evidenciado uma relação entre o consumo de peixe e os níveis de OCs no leite materno, indicando assim uma fonte provável de exposição aos OCs. No entanto são necessários mais estudos para provar essa relação (Behrooz *et al.*, 2009).

Um estudo realizado em Punjab, na Índia, uma das regiões de maior uso de pesticidas, apresenta o p,p'-DDE como isómero mais predominante, com uma frequência de 55,9% em mães primíparas e 57,9% nas múltíparas. O  $\gamma$ -HCH predomina em relação ao isómero  $\beta$ , com 20,6% vs 8,8% no caso de mães primíparas, enquanto nas múltíparas se verifica o inverso. É de se esperar que o  $\gamma$ -HCH apresente níveis maiores do que o  $\beta$ -HCH, refletindo no uso de lindano ( $\gamma$ -HCH) na agricultura nesse país. Os valores relativos ao  $\beta$ -HCH (representativo de 13,2% do total das amostras) refletem a sua fraca degradação ambiental e a sua fraca eliminação do organismo, bem como também da metabolização de  $\gamma$ -HCH a  $\beta$ -HCH (Bedi *et al.*, 2013). O facto das razões DDT/DDE variarem entre 0,04-1,01, indica que na primeira razão a exposição é antiga e a segunda recente. Nesta região da Índia, os níveis de p,p'-DDT e p,p'-DDD são indicativos de uma exposição recente ao DDT. As populações rurais apresentam níveis superiores face às urbanas. De um modo geral, este estudo demonstra que os níveis de HCH são inferiores aos encontrados em outras regiões da Índia, sugerindo assim a preferência do uso do lindano ( $\gamma$ -HCH) face ao HCH técnico. Em relação ao DDT, os valores demonstram que este foi usado extensamente no passado (Bedi *et al.*, 2013).

Na África do Sul utiliza-se o IRS com DDT numa formulação de 2 g/m<sup>2</sup>, com uma aplicação por habitação entre 64 a 128 g de DDT. Foram analisadas amostras de leite provenientes de 4 vilas diferentes, sendo que 3 eram vilas onde foram realizados o IRS com DDT e 1 era a vila de referência. A tabela 4 demonstra os níveis obtidos em relação ao tipo de mães.

Verificou-se que em mães primíparas das vilas pulverizadas com DDT, os valores de resíduos eram maiores comparativamente aos de mães da vila de referência. Maguzi é uma das vilas que apresenta maiores níveis comparando com outras vilas. Neste estudo foi avaliada a relação entre género da criança e os níveis de DDT. Os resultados demonstraram que crianças do sexo feminino de mães primíparas apresentavam maiores concentrações de DDT total em duas das vilas de estudo. Também por outro lado, os estudos apontavam que crianças do sexo masculino de mães múltíparas apresentavam maiores concentrações de DDT total em todas as vilas de estudo. Apesar do aporte de leite por parte de crianças do sexo masculino ser cerca de 10% mais elevado, o que se refletia em maiores níveis de DDT ingeridos, os resultados obtidos não permitiam estabelecer de facto uma relação género da criança com os níveis de DDT devido a discrepâncias em evidências. Em relação ao aporte diário, os resultados demonstram que os níveis excretados via leite materno nas mães dessa região excediam os valores recomendados pela WHO, em que as mães primíparas de

Maguzi apresentavam valores 45 vezes superior aos limites recomendados (Bouwman *et al.*, 2012).

Em Moçambique após o período de restrição de uso de OCs, foi iniciado o IRS com piretróides (deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina), mas devido às resistências relatadas, em 2005, foi iniciado o processo com DDT, numa formulação com 3 g/m<sup>2</sup> para uso exclusivo em programas de saúde. No distrito de Manhiça, um distrito rural, foi iniciado o IRS com DDT no ano de 2006, processo realizado em 3 fases. Os estudos realizados nesta região demonstram que a reintrodução de DDT é a principal causa do aumento da concentração de pesticidas no leite materno. Foram feitos ensaios utilizando amostras recolhidas em anos diferentes, em 2002 e 2006, sendo que os valores obtidos no ano 2006 foram superiores aos de 2002 (um aumento de 3,9 ng/ $\mu$ L para 11 ng/ $\mu$ L). Apesar de neste distrito a reintrodução de DDT ter sido realizada em 2006, os resultados obtidos da amostra neste mesmo ano demonstram que um aumento dos níveis de DDT no leite é significativo na primeira fase de implementação do IRS. Comparando o valor da concentração média de DDT obtido no ano de 2006 em Manhiça com outros países, Moçambique apresenta um valor semelhante a regiões de baixa exposição. Este resultado pode ser justificado através de questões socioeconómicas e da guerra civil vivenciada naquele país, que levou à restrição do uso de DDT (Manaca *et al.*, 2011).

Analisando os resultados de acordo com a idade das mães e com tipo de mães, verificou-se que o tipo de mães teve uma maior influencia, em que as mães primíparas apresentavam maiores concentrações de DDT e dos seus principais metabolitos tanto em Moçambique (Manaca *et al.*, 2011), como na África do Sul (Bouwman *et al.*, 2012) e na Índia, na região de Punjab, exceto para o p,p'- DDT (Bedi *et al.*, 2013) (Tabela 4).

**Tabela 2** - Frequência de detecção (%) e níveis (ng/g) de DDT e seus isômeros em amostras do leite materno em diferentes países.

Pais/ região	Parâmetros	p,p'- DDT	p,p'- DDE	p,p'- DDD	o,p'- DDT	o,p'- DDE	o,p'- DDD	∑ DDT	Bibliografia
<b>Índia</b> <b>Assam</b> <b>Nagaon</b> <b>n=21</b>	[ ] média ng/g	1320	1040	270	330	110	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	(Mishra e Sharma, 2011)
	Min	500	220 3810	Nd	Nd	Nd	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	
	Máx	6090		2300	1020	250			
	Frequência detecção %	100	100	86	88	71	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	
<b>Tunísia</b> <b>n=237</b>	[ ] média ng/g	256	676	92	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	1931	(Ennaceur et al., 2008)
	Min	1	3	2	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	8	
	Máx	2499	6800	2461				7060	
	Frequência detecção %	80	100	46	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	
<b>Turquia</b> <b>Mersin</b> <b>n=47</b>	[ ] média ng/g	10,536	325,047	0,932	1,394	0,267	0,208	338,4	(Çok et al., 2012)
	Min	0,414	16,782	<LOD	0,068	<LOD	<LOD	<sup>a</sup>	
	Máx	63,662	1071,208	5,059	32,375	1,254	2,884		
<b>Irão</b> <b>Noushahr</b> <b>n=10</b> <b>Nour</b> <b>n=23</b>	[ ] média ng/g	460	2936	34	<sup>a</sup>	130	<sup>a</sup>	3560	(Behrooz et al., 2009)
	Min	30	240	Nd	<sup>a</sup>	Nd	<sup>a</sup>	270	
	Máx	1580	16040	300		450		18370	
	[ ] média ng/g	460	1814	10	<sup>a</sup>	400	<sup>a</sup>	2685	
	Min	Nd	70	Nd	<sup>a</sup>	Nd	<sup>a</sup>	70	
	Máx	3740	6340	180		2320		12580	
<b>China</b> <b>Beijing</b> <b>n=48</b>	[ ] média ng/g	11,4	333,8	4,18	0	0	<sup>a</sup>	349,4	(Song et al., 2013)
	Frequência detecção %	22	100	10	0	0	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	

Nd- valores não detetados; <LOD- valores inferiores ao limite de detecção; <sup>a</sup> Valores não mencionados.



**Tabela 3** - Frequência de detecção (%) e níveis (ng/g) de HCH e seus isômeros em amostras do leite materno em diferentes países.

Pais/ região	Parâmetros	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\Sigma$ HCH	Bibliografia
<b>India Assam Nagaon n= 21</b>	[ ] média ng/g	1180	1350	680	3350	(Mishra e Sharma, 2011)
	Min	200	560	100	1310	
	Máx	3420	3200	2520	9130	
	Frequência detecção %	96	100	98	<sup>a</sup>	
<b>Tunísia n=237</b>	[ ] média ng/g	<sup>a</sup>	42	31	65	(Ennaceur et al., 2008)
	Min	<sup>a</sup>	1	<LOD	1	
	Máx		285	116	310	
	Frequência detecção %	<sup>a</sup>	60	48	<sup>a</sup>	
<b>Turquia Mersin n=47</b>	[ ] média ng/g	0,233	36,297	0,336	37,317	(Çok et al., 2012)
	Min	0,059	4,88	0,089	<sup>a</sup>	
	Máx	1,864	367,433	1,939		
<b>Irão Noushahr n=10 Nour n=23</b>	[ ] média ng/g	1537	4000	200	5740	(Behrooz et al., 2009)
	Min	30	120	Nd	150	
	Máx	4390	10860	920	16170	
	[ ] média ng/g	1044	1610	350	3000	
	Min	30	20	Nd	50	
	Máx	5080	6390	2520	13990	
<b>China Beijing n=48</b>	[ ] média ng/g	6,57	174,6	7,76	188,9	(Song et al., 2013)
	Frequência detecção %	20	100	10	<sup>a</sup>	

Nd- valores não detetados; <LOD- valores inferiores ao limite de detecção; <sup>a</sup> Valores não mencionados.

**Tabela 4** - Frequência de detecção (%) e níveis (ng/ g) de DDT e HCH consoante o grupo de mães.

		Primíparas			Multíparas			
País	OCs	[ ] média ng/g	Min Máx	Frequência detecção %	[ ] média ng/g	Min Máx	Frequência detecção %	Bibliografia
<b>Índia Punjab</b> n <sub>1</sub> =34 n <sub>2</sub> =53	p,p'- DDT	85,3	849,6 1167,8	8,8	127,1	642,8 978,5	15,8	(Bedi et al., 2013)
	p,p'- DDE	1751,3	660,0 28965,9	55,9	1251,5	593,9 4327,8	57,9	
	p,p'- DDD	321,9	697,5 6065,5	17,6	92,9	718,8 1046,6	10,5	
	∑DDT	2158,6	660,0 36199,2	61,8	1471,5	593,6 4327,8	63,1	
	β-HCH	92,4	849,3 1423,4	8,8	107,9	429,9 563,7	21,1	
	γ-HCH	132,5	486,1 928,3	20,6	46,5	Nd 883,7	5,3	
	∑HCH	224,9	486,1 1423,4	29,4	154,4	429,9 883,7	26,3	
<b>África do Sul Maguzi</b> n <sub>1</sub> =20 n <sub>2</sub> =23	p,p'- DDT	10000	720 74000	a	4000	950 14000	a	(Bouwman et al., 2012)
	p,p'- DDE	11000	1200 310000	a	5100	860 15000	a	
	p,p'- DDD	3500	470 24000	a	2000	170 6700	a	
	o,p'- DDT	1700	180 11000	a	820	330 2500	a	
	∑DDT	25000	1900 140000	a	11000	3100 34000	a	
<b>Moçambique Manhiça</b> n <sub>1</sub> =16 n <sub>2</sub> =32	p,p'- DDT	390	21 3300	a	130	3,3 1900	a	(Manaca et al., 2011)
	p,p'- DDE	530	102 1700	a	230	0,01 1800	a	
	p,p'- DDD	9,6	0,02 33	a	6,4	0,02 54	a	
	o,p'- DDT	30	4,8 140	a	23	0,02 320	a	
	∑DDT	930	140 5100	a	370	13 3800	a	

Nd- valores não detetados; a Valores não mencionados; n<sub>1</sub>-número de amostras obtidas do grupo das mães primíparas; n<sub>2</sub>-número de amostras obtidas do grupo das mães multíparas.

#### **4. IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE DAS CRIANÇAS ALIMENTADAS COM LEITE MATERNO**

A exposição aos OCs leva a algumas alterações nas funções biológicas. Muitos OCs como os PCBs, o p,p'-DDT e o p,p'-DDE são caracterizados por causarem alterações na função endócrina. O potencial efeito na desregulação endócrina causado por esses OCs poderá influenciar o crescimento e o desenvolvimento infantil. O leite materno é o meio ideal de nutrição recomendado nos primeiros seis meses de vida, mas, este por sua vez constitui a maior fonte de exposição aos OCs para as crianças (Pan *et al.*, 2010).

Através dos estudos realizados tem sido demonstrado o potencial efeito tóxico do DDT na reprodução humana, no desenvolvimento de cancro e os efeitos de desregulação do sistema endócrino. Estudos retrospectivos dos potenciais efeitos reprodutivos de DDT avaliam a exposição materna, fundamentando as propriedades anti-androgénicas e estrogénicas do DDT e DDE, evidenciando que os níveis de resíduos de OCs induzem alterações hormonais. Mas, no entanto, os resultados entre os diferentes estudos são inconsistentes. A exposição aos OCs pode induzir uma ampla gama de efeitos adversos, incluindo o potencial impacto a longo prazo no desenvolvimento neurológico e na disfunção intelectual em crianças. Os efeitos a longo prazo sobre a função do sistema nervoso central também foram relatados (Wang *et al.*, 2008).

Investigadores como Mishra e Sharma (2011) descrevem que a exposição prolongada aos OCs está relacionada com um aumento de risco de desenvolvimento de cancro, como o cancro do pulmão, da próstata, da mama, do endométrio, e algumas anomalias a nível do sistema reprodutor. Relacionam também a exposição aos casos de desordem neurológica e imunitária. Relativamente à exposição pré-natal e pós-natal, os mesmos autores evidenciam um elevado fator de risco de malformações urogenitais à nascença em recém-nascidos do género masculino, e alterações no desenvolvimento mental e psicomotor uma vez que nas crianças os sistemas enzimáticos e metabólicos não estão completamente ativos.

Pan *et al.* (2010) avaliaram a relação entre a exposição via leite materno aos PCBs, p,p'-DDT e p,p'-DDE e o desenvolvimento da criança nos primeiros doze meses de vida. Deste estudo, concluiu-se que, a baixas concentrações, a influência desses OCs no desenvolvimento da criança não é mensurável.

Segundo a avaliação feita por Yalçın *et al.* (2014) sobre a influência no desenvolvimento das crianças dos níveis de resíduos de DDT e HCH no leite materno, demonstrou-se que

elevados níveis de DDT e HCH induziam a pequena alteração no perímetro cefálico, sem ter qualquer outra alteração antropométrica.

De facto, a descrição dessa relação por diversos autores tem sido muito discrepante. Os resultados inconsistentes relacionam-se com diferentes períodos de exposição avaliados (exposição pré-natal, exposição via leite materno e exposição na infância), com diferentes misturas de OCs utilizadas a nível ambiental e com outros fatores que influenciam o desenvolvimento (Yalçin *et al.*, 2014).

## **5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS**

Para se proceder á análise de resíduos de pesticidas são utilizados alguns métodos analíticos que permitem proceder à sua extração, purificação, deteção e quantificação (Tabela 5).

A extração constitui um processo fundamental na análise de substâncias, sendo uma etapa prévia de preparação da amostra. Um processo complexo, que requer técnicas específicas para a extração dos pesticidas. Os principais objetivos dessa preparação da amostra é promover a extração, concentrando o analito de interesse, e remover o quanto possível os interferentes da amostra. Uma das técnicas de extração/ purificação utilizada é a extração em fase sólida (SPE). A SPE baseia-se em quatro etapas: acondicionamento da coluna, percolação da amostra, lavagem da coluna e a eluição dos analitos. O fundamento da técnica é fazer uma eluição da solução amostra sob vácuo ou pressão, através de colunas com suporte sólido, constituída por estruturas de sílica ou por polímeros de diferentes grupos funcionais ou polaridade. As colunas de sílica gel possuem características polares com uma superfície ligeiramente ácida, que permite a retenção de compostos básicos e extração de compostos polares. As colunas sílica octadecilgada C<sub>18</sub> são também utilizadas na extração/ purificação de extratos de amostras contendo pesticidas. Na percolação com a adição da amostra na coluna, o analito e os interferentes ficam retidos na coluna por meio de ligações químicas que dependem do tipo de coluna utilizada. A lavagem da coluna tem por finalidade a eliminação de interferentes nelas retidas. No fim do processo, o analito de interesse é recuperado por eluição utilizando um determinado volume de solvente, que terá como função romper as ligações químicas entre o analito e a fase sólida (Barbosa, 2012).

A SPE possui por sua vez algumas limitações como a possibilidade de existência de partículas sólidas nos extratos, podendo assim induzir alterações no fluxo da eluição, induzindo a

variabilidade nos valores de recuperação. Assim sendo, existe um outro método de extração, um método que reúne numa só etapa a extração e purificação da amostra, o método de Quechers. Este método baseia-se na extração com acetonitrilo, seguido de uma partição líquido-líquido em que se adiciona sulfato de magnésio e acetato de sódio, finalizando com uma purificação por SPE. É uma metodologia analítica rápida, fácil, económica, eficiente, robusta e segura em que todo o processo de extração e purificação é feito numa só etapa (Barbosa, 2012, Fernandes, 2014). Um exemplo da utilização deste método é o estudo feito por Bouwman *et al.*, (2012).

Nas análises de resíduos de pesticidas, é mais comum utilizar a SPE como método de purificação e pré-concentração da amostra. A extração ocorre então através do uso de um sistema de solvente recorrendo a uma partição líquido-líquido e do uso do método ASE. Os solventes mais usados na extração de resíduos de OCs no leite materno são o DMC usado isoladamente ou em mistura com o n-hexano, o éter petróleo em mistura com o acetonitrilo (Tabela 5). No processo de purificação poder-se-á usar alumina ou Florisil (Tabela 5).

A extração acelerada por solvente (ASE) é uma técnica de extração que combina o aumento da temperatura e da pressão permitindo uma maior eficiência e menor uso de solvente, maior percentagem de recuperação e reprodutibilidade. As amostras são colocadas nas células do sistema onde durante o processo vão ser preenchidas com o solvente pressurizado, enquanto o sistema é aquecido. A elevação da temperatura para valores acima do ponto de ebulição do solvente e com o aumento da pressão que permite que o solvente permaneça no estado líquido e facilita a solubilização de bolhas de ar, faz com que haja uma maior exposição da amostra ao solvente de extração. A automatização desta técnica permite redução de possíveis erros, como o da manipulação da amostra (Lau *et al.*, 2010).

Após estas etapas cruciais de preparação da amostra segue-se a fase de deteção e quantificação.

Os métodos analíticos utilizados para a deteção e quantificação de resíduos de pesticidas presentes numa matriz baseiam-se em métodos cromatográficos. A cromatografia é um método que consiste na separação, identificação e quantificação de compostos químicos numa mistura complexa. Devido a uma boa resolução, permite a análise de diversas substâncias presentes numa amostra. A sensibilidade cromatografia é consideravelmente elevada e, dependendo da substância a analisar e do detetor, obtêm-se resultados quantitativos numa gama de concentração que varia entre picogramas e miligramas.

Diferentes métodos cromatográficos são utilizados, entre os quais, a cromatografia gasosa (CG) acoplada a um determinado detetor. Os detetores utilizados nessas análises são o detetor de captura eletrônica (ECD) e o detetor de fosforo-azoto (NPD). Por vezes a aplicação desses métodos podem não ser suficientes para a correta identificação dos analitos, assim sendo, recorre-se a uma etapa adicional de confirmação. Deste modo para uma identificação estrutural com maior rigor e precisão, procede-se a utilização de um espectrómetro de massa, permitindo para além da quantificação, a confirmação estrutural do composto (Barbosa, 2012).

Métodos como a cromatografia gasosa associada ao detetor de captura eletrônica (GC-ECD), cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa (CG-MS) e a cromatografia líquida acoplada ao espectrómetro de massa (LC-MS) são dos mais usados para determinação de resíduos de pesticidas.

A cromatografia gasosa é o método de eleição, pois devido à possibilidade de poder ser acoplado a diferentes detetores, permite uma análise com maior rapidez, sensibilidade e resolução. O fato de ter um elevado número de pratos teóricos, assegura uma elevada seletividade e eficiência ao método utilizado. A CG baseia na separação de componentes numa mistura, através de uma fase gasosa móvel sobre uma fase estacionária líquida. Primeiramente a amostra é injetada numa corrente de gás puro e inerte, o gás transportador. O fluxo de gás passa pela coluna através da qual os componentes da amostra se vão deslocar a diferentes velocidades, dependendo do grau de interação de cada componente com a fase estacionária. As que apresentam uma maior interação com a fase estacionária, são retidas por mais tempo, sendo assim, separadas das de menor interação. Assim sendo, dependendo da interação cada componente fica retido na coluna em diferentes tempos permitindo a sua separação e distinção. À medida que os componentes são eluídos da coluna podem ser quantificadas através de um detetor (Barbosa, 2012).

A GC-ECD recorre ao detetor de captura eletrônica (ECD). É um dos detetores muito utilizado na análise de OCs, pois deteta componentes que apresentam uma elevada eletronegatividade, sendo seletivo para os halogenados. Funciona através da emissão de um elétron por um emissor, levando à ionização do gás de transporte e causando um aumento súbito de elétrons. Esses por sua vez originam uma corrente elétrica constante entre os eléctrodos que constituem o detetor. Como os pesticidas OCs possuem grupos eletronegativos, estes captam elétrons, fazendo baixar bruscamente a intensidade da corrente elétrica e assim serão identificados (Barbosa, 2012).

Outro detetor que normalmente é utilizado é o espectrómetro de massa. Este constitui numa boa técnica de deteção pois permite identificar, quantificar e caracterizar molecularmente e estruturalmente os analitos, com base na composição elementar dos componentes da amostra. O princípio da CG-MS consiste na ionização das moléculas no estado gasoso, levando à formação de iões livres. Esses iões livres são acelerados por um campo elétrico, permitindo a sua separação consoante a relação massa/carga elétrica ( $m/z$ ). No final ocorre o registo do número de iões formando um espectro de massas. A identificação é feita comparando os resultados obtidos com valores de uma base de dados e confirmados pela avaliação do tempo de retenção e espectros de massa (Fernandes, 2014).

Como se pode observar na tabela 5 a instrumentação analítica mais utilizada é a CG-ECD e a CG-MS.

**Tabela 5** - Metodologias analíticas usadas na determinação de OCs em leite materno.

<b>Extração</b>	<b>Purificação</b>	<b>Deteção e quantificação</b>	<b>Bibliografia</b>
<p><b>ASE</b>  <b>Leite: 10-20 ml</b>  <b>Sol: DMC-Hexano</b>  <b>(80: 20 v, v)</b></p>	<p>SPE            Adsorvente: alumina e            PSA            Sol. Eluição: acetoneitrilo</p>	CG-MS	(Weldon <i>et al.</i> , 2011)
<p><b>SS</b>  <b>Leite: 5-10 ml</b>  <b>Sol: éter petróleo-</b>  <b>acetoneitrilo</b>  <b>(5 ml- 30 ml).</b>  <b>500 ml água destilada, 30</b>  <b>ml cloreto de sódio, 100</b>  <b>ml éter petróleo</b></p>	<p>SPE            Adsorvente: 5% alumina e            sulfato sódio anidro            Sol. Eluição: n-Hexano-            Benzeno            (1:1 v, v)</p>	CG-ECD CG-MS	(Rai <i>et al.</i> , 2012)
<p><b>SS</b>  <b>Leite: 20 ml</b>  <b>Sol: ácido sulfúrico</b></p>	<p>SPE            Adsorvente: alumina e            sulfato de sódio anidro            Sol. Eluição: n- hexano:            benzeno (1: 1 v, v)</p>	CG-ECD	(Mishra e Sharma, 2011)

**Tabela 5** - Metodologias analíticas usadas na determinação de OCs em leite materno. (Continuação)

<b>Extração</b>	<b>Purificação</b>	<b>Deteção e quantificação</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>Leite: 5 ml</b> <b>Sol: DMC 40 ml</b>	SPE Adsorvente: sílica gel e sulfato de sódio anidro	CG-ECD CG-MS	(Bedi <i>et al.</i> , 2013)
<b>SS</b> <b>Leite: 10 ml</b> <b>Sol: n-Hexano 4 ml</b> <b>DMC-n-Hexano (1: 4 v, v)</b>		CG-ECD CG-MS	(Song <i>et al.</i> , 2013)
<b>SS</b> <b>Leite: 10 ml</b> <b>Sol: n-hexano 20 ml</b> <b>Acetonitrilo 5 ml</b> <b>Etanol 1ml</b>	SPE Adsorvente: Florisil (2g) e (1g) sulfato de sódio anidro Sol. Eluição: 30 ml DMC: n- hexano (1: 9 v, v)	CG-ECD	(Ennaceur <i>et al.</i> , 2008)
<b>SS</b> <b>Leite: 20 g</b> <b>Sol: 1-2 ml</b> <b>DMC: n-Hexano (1:1 v, v)</b>	SPE Adsorvente: C18 Sol. Eluição: acetonitrilo	HRGC-HRMS	(Çok <i>et al.</i> , 2012)



## CONCLUSÃO

Com o decorrer dos tempos, tem-se verificado uma diminuição significativa dos níveis de resíduos de pesticidas. Este decréscimo reflete a política de utilização implementada assim como nos esforços em buscas de alternativas para contrabalançar os seus riscos e benefícios.

De uma forma clara, ficou evidenciado que o leite materno é uma das matrizes mais utilizadas na avaliação dos níveis de resíduos de pesticidas. E de se notar que dentro deste grupo abrangente de poluentes orgânicos persistentes (POP), apenas um número limitado de POPs é avaliado. Existe uma variedade de estudos, mas dentro de cada um destes estudos há uma variação na estratificação de determinados fatores que conduzem a diferentes objetivos. Dai advém a pouca evidência que permitem comparações fiáveis.

Contudo, com o avanço tecnológico, poderão surgir mais ferramentas que auxiliarão nos estudos futuros permitindo decifrar determinadas questões relacionadas as vias de exposição bem como as relacionadas aos fatores que influenciam as suas concentrações em determinadas matrizes.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, S. C. B. - Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD. Universidade de Lisboa- Faculdade de Ciências- departamento de Biologia Animal, 2012 . [Acedido em 4 de julho de 2016].

BEDI, J. S.; GILL, J. P. S.; AULAKH, R. S.; KAUR, P.; SHARMA, A.; POONI, P. A. - Pesticide residues in human breast milk: Risk assessment for infants from Punjab, India. **Science of the Total Environment**. ISSN 00489697. 463-464:2013) 720–726. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.066.

BEHROOZ, R. D.; SARI, A. E.; BAHRAMIFAR, N.; GHASEMPOURI, S. M. - Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human milk from the Southern Coast of Caspian Sea, Iran. **Chemosphere**. ISSN 00456535. 74:7 (2009) 931–937. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.014.

BOUWMAN, H.; KYLIN, H.; SEREDA, B.; BORNMAN, R. - High levels of DDT in breast milk: Intake, risk, lactation duration, and involvement of gender. **Environmental Pollution**. ISSN 02697491. 170 (2012) 63–70. doi: 10.1016/j.envpol.2012.06.009.

ÇOK, I.; MAZMANCI, B.; MAZMANCI, M. A.; TURGUT, C.; HENKELMANN, B.; SCHRAMM, K. W. - Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey. **Environment International**. ISSN 01604120. 40:1 (2012) 63–69. doi: 10.1016/j.envint.2011.11.012.

ENNACEUR, S.; GANDOURA, N.; DRISS, M. R. - Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. **Environmental Research**. ISSN 00139351. 108:1 (2008) 86–93. doi: 10.1016/j.envres.2008.05.005.

FERNANDES, C. M. M. - Aplicação de Técnicas Analíticas para Detecção de Resíduos de Pesticidas por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Tomar: Escola de Tecnologia de Tomar, 2014. [Acedido a 4 de julho de 2016].

GYALPO, T.; FRITSCH, L.; BOUWMAN, H.; BOUWMAN, R.; SCHERINGER, M.; HUNGERBUHLER, K. - Estimation of human body concentrations of DDT from indoor residual spraying for malaria control. **Environmental Pollution**. ISSN 02697491. 169 (2012) 235–241. doi: 10.1016/j.envpol.2012.04.032.

INITIATIVE, Malaria - Preserving pyrethroids. **Bulletin of the World Health Organization**. ISSN 00429686. 92:3 (2014) 158–159. doi: 10.2471/BLT.14.020314.

LAU, E. V; GAN, S.; NG, H. K. - Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **International Journal of Analytical Chemistry**. ISSN 1687-8760. (2010) 398381. doi: 10.1155/2010/398381.

MACKAY, D. SHIU, W. Y.; MA, K. C. - Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Second Edition. CRC Press, 2006. ISBN: 1420044397. p. 3818-3898.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C. - Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties of Environmental Fate for Organic Chemicals, Volume 5. CRC Press, 1997. ISBN: 978-1-56670-687-2. p. 383- 401.

MANACA, M. N.; GRIMALT, J. O.; SUNYER, J.; MANDOMANDO, I.; GONZALEZ, R.; SACARLAL, J.; DOBANO, C.; ALONSO, P. L.; MENENDEZ, C. - Concentration of DDT compounds in breast milk from African women (Manhiça, Mozambique) at the early stages of domestic indoor spraying with this insecticide. **Chemosphere**. ISSN 00456535. 85:3 (2011) 307–314. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.015.

MISHRA, K.; SHARMA, R. C. - Assessment of organochlorine pesticides in human milk and risk exposure to infants from North-East India. **Science of the Total Environment**. ISSN 00489697. 409:23 (2011) 4939–4949. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.038.

PAN, I. J.; DANIELS, J.L.; HERRING, A.H.; RAGON, W. J.; SIEGARIZ, A. M.; GOLDMAN, B. D.; SJODIN, A. - NIH Public Access. ISSN 1878-5832. 48:Suppl 2 (2010) 1–6. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening.

RAI, S.; DUA, V. K.; CHOPRA, A. K. - Bio-monitoring of persistent organochlorines in human milk and blood samples from Sub-Himalayan region of India. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. ISSN 00074861. 89:3 (2012) 592–597. doi: 10.1007/s00128-012-0741-5.

SONG, S.; MA, X.; TONG, L.; TIAN, Q.; HUANG, Y.; YIN, S.; SUN, H.- Residue levels of hexachlorocyclohexane and dichlorodiphenyltrichloroethane in human milk collected from Beijing. **Environmental Monitoring and Assessment**. ISSN 01676369. 185:9 (2013) 7225–7229. doi: 10.1007/s10661-013-3096-4.

TIWARI, M.; SAHU, S. K.; PANDIT, G. G. - Distribution and ecotoxicological concerns of persistent organic pollutants in sediment from creek ecosystem. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. ISSN 0360-1234. 1234m(2016) 1–6. doi: 10.1080/03601234.2016.1181907.

WANG, Y. R.; ZHANG, M.; WANG, Q.; YANG, D. Y.; LI, C. L.; LIU, J.; LI, J. G.; LI, H.; YANG, X. Y. - Exposure of mother-child and postpartum woman-infant pairs to DDT and its metabolites in Tianjin, China. **Science of the Total Environment**. ISSN 00489697. 396:1 (2008) 34–41. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.060.

WELDON, R. H.; BARR, D. B.; TRUJILLO, C.; BRADMAN, A.; HOLLAND, N.; ESKENAZI, B. - A pilot study of pesticides and PCBs in the breast milk of women residing in urban and agricultural communities of California. **Journal of Environmental Monitoring**: ISSN 1464-0333. 13:11 (2011) 3136–3144. doi: 10.1039/c1em10469a.

WHO - Environmental Health Criteria Monographs (EHCs)-ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 83 FOR DDT AND ITS DERIVATIVES - ENVIRONMENTAL ASPECTS. **WHO-Internacional Programme on Chemical Safety; Environmental Health Criteria 83**. 1989).

WHO - Environmental Health Criteria Monographs (EHCs)- ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 124-LINDANE. **WHO-Internacional Programme on Chemical Safety; Environmental Health Criteria 124**. 1991).

WHO - Environmental Health Criteria Monographs (EHCs)-ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 123 ALPHA- and BETA-HEXACHLOROCYCLOHEXANES. **WHO-Internacional Programme on Chemical Safety; Environmental Health Criteria 123**. 1992).

Who Report 2015 - ISSN 08966273. 2015). doi: ISBN 978 92 4 1564403.

YALÇIN, YALÇIN, S. S.; ORUN, E.; YALÇIN, S.; AYKUT, O.- Organochlorine pesticide residues in breast milk and maternal psychopathologies and infant growth from suburban area of Ankara, Turkey. **International Journal of Environmental Health Research**. ISSN 1369-1619. 3123 (2014) 1–9. doi: 10.1080/09603123.2014.945515.

