

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

DANILO GABRIEL DOS SANTOS MATOS

AVALIAÇÃO DE MÉTODO QuEChERS MODIFICADO COM PARTIÇÃO A BAIXA
TEMPERATURA PARA EXTRAÇÃO DE ORGANOCORADOS EM PEIXES E
DETERMINAÇÃO POR GC-ECD

PONTA GROSSA
2020

DANILO GABRIEL DOS SANTOS MATOS

AVALIAÇÃO DE MÉTODO QuEChERS MODIFICADO COM PARTIÇÃO A BAIXA
TEMPERATURA PARA EXTRAÇÃO DE ORGANOCORADOS EM PEIXES E
DETERMINAÇÃO POR GC-ECD

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos

PONTA GROSSA
2020

M433 Matos, Danilo Gabriel dos Santos
Avaliação de método QuEChERS modificado com partição a baixa temperatura para extração de organoclorados em peixes e determinação por CG-ECD / Danilo Gabriel dos Santos Matos. Ponta Grossa, 2020.
81 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos.

1. Peixe. 2. Surrogate. 3. Extração. 4. QuEChERS. 5. Baixa temperatura. I. Campos, Sandro Xavier de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. III.T.

CDD:597

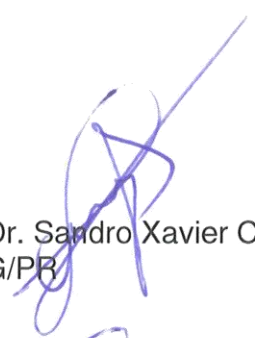
TERMO DE APROVAÇÃO


DANILO GABRIEL DOS SANTOS MATOS


“AVALIAÇÃO DE MÉTODO QUECHERS MODIFICADO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA, PARA EXTRAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM PEIXES E DETERMINAÇÃO POR CG-ECD”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador :


Prof. Dr. Sandro Xavier Campos
UEPG/PR


Profa. Dra. Elaine Regina Lopes Tiburtius
UEPG/PR


Prof. Dr. Carlos Magno de Sousa Vidal
UNICENTRO/IRATI/PR

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2020

Dedico a meus pais.
“Dou graças a Deus, a quem sirvo com pureza de consciência, tal
como aprendi de meus pais.”
(2Tm 1:3)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar a todo instante ao meu lado, mesmo nas horas em que parece não haver saída.

Aos meus pais Dirvete dos Santos Matos e João Maria Almeida Matos, por serem a minha motivação e inspiração de cada dia, por nunca desistirem de mim e de nenhuma de minhas irmãs, por sempre confiarem em nosso potencial, por insistirem em mim mesmo quando eu não o consigo, quisera eu que deus lhes concedesse o dom da eternidade. Eu vos amo imensamente e de todo meu coração.

As minhas irmãs Andréia, Keli, Solange e Sonia, que são exemplo de força e superação, obrigado por todo o suporte que me concedem, eu vos amo.

A minha amiga e irmã Evelyn de Fátima, por todos os momentos vivenciados juntos e por não me deixar desistir de minha formação em momento algum. Ao infinito e além.

A minha amiga e irmã Juliana, que cresceu junto a mim, e apesar de sermos de áreas diferentes sempre contribuímos e muito para a formação um do outro.

A minha amiga irmã Thayse Jeane, a qual sempre dividimos vários momentos e construímos um longo caminho juntos, por me ouvir e auxiliar sempre que preciso. Somos força um do outro.

A minha antiga professora de graduação e hoje em dia amiga da vida e profissão Carmem Lucia, por me apresentar o grupo e sempre me encher de conselhos valiosos pra vida.

A todos os meus amigos e familiares que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos, por ser uma das pessoas mais sensatas e compreensíveis que já conheci em toda minha vida, sem mencionar o incrível profissional que és e de suma competência, obrigado pelas orientações e conselhos.

A todos os colegas de laboratório e amigos, em especial a Cinthia por todos os ensinamentos e pela grande paciência, além de todas as etapas de auxílio e suporte durante a realização do projeto e a Ângela por dividir o que sabe e sempre estar de mão aberta a ajudar no que pode.

A todos os integrantes do grupo QAAS por me acolherem junto a vocês nesta que foi uma etapa das muitas que ainda teremos juntos.

A prof. Dr. Patrícia Los Weinert por todos os conselhos extremamente valiosos e que contribuíram e muito no desenvolvimento deste.

Ao Pro. Dr. Carlos Magno de Souza Vidal e ao doutorando Carlos Raphael Pedroso, do laboratório de Saneamento Ambiental e Qualidade da Água (UNICENTRO) pela disponibilidade do CG-ECD.

Aos graduandos Jose Osmar Costagnolli Junior, Tatiane Barbosa Bretas, a laboratorista Eliane Leal de Lara e as Pro. Dr. Maria Elena Payret Arrúa e Sandra Regina Masetto Antunes, do Laboratório de Análise de Biodiesel (LAC-BIO) pela disponibilidade do CG-ECD.

A todos que não estão citados aqui, mas que sempre estarão em minhas orações de agradecimento deixo o meu muito OBRIGADO!

“Seja o melhor que você possa ser em tudo. Não espere recompensa por isso, espere crescimento pessoal!”

Denis Veneno

RESUMO

Os pesticidas organoclorados (OCPs) possuem venda e utilização controladas ou proibidas desde a década passada, por conta da ação tóxica que os mesmos podem causar ao meio ambiente. Por consequência da presença destes OCPs, várias pesquisas buscam desenvolver ou modificar métodos de extração para determinação desses compostos em diversas matrizes. Neste estudo objetivou-se avaliar a modificação de fatores como quantidade da mistura de solventes, quantidade de sorventes e alteração de etapas como a de rotaevaporação e adição de uma partição a baixa temperatura, a um método de extração denominado QuEChERS, para aplicação em tecido de músculo de peixe. Para realização destas modificações do método, foram desenvolvidos dois planejamentos com duas e três variáveis e outro planejamento univariado. Em todas as etapas foi utilizado um padrão surrogate para avaliação das recuperações frente as modificações adotadas. Os resultados obtidos no decorrer do trabalho, trazem a adaptação do método à partição a baixa temperatura, promovendo a diminuição das quantidades do sorvente C₁₈. Foi possível também realizar a diminuição de 9,2 para 5,6 mL do volume da mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v), assim como diminuição proporcional das quantidades dos sorventes MgSO₄, NaCl, e Na₂SO₄ e eliminação da rotaevaporação. As recuperações obtidas na avaliação da extração de compostos organoclorados em tecido de peixe, utilizando o método QuEChERS modificado, encontram-se em uma faixa de 95,89% - 96,47%. Conclui-se que a baixa temperatura auxilia na diminuição das quantidades de C₁₈ da fase de *clean up*. O volume do solvente pode ser reduzido, assim como as quantidades de sorvente da etapa de extração. A etapa de rotaevaporação pode ser descartada do método diminuindo o tempo de extração.

Palavras-chave: Peixe, Surrogate, Extração, QuEChERS, Baixa Temperatura.

ABSTRACT

The selling of Organochlorine Pesticides (OCPs) has been closely watched and its use is either controlled or forbidden since last decade, due to the toxic risks it presents to the environment. Moreover, different researches have been seeking to develop or modify the extraction methods, as a result of the presence of these OCPs, so as to determine the compounds in several matrices. The current study aimed to assess the change of factors as though the amount of solvent mixture, the quantity of sorbents, the steps in the rotary evaporation alteration, and the addition of a partition at low temperatures using the QuEChERS extraction method, for application in fish muscle tissue. In order for the alterations in the method, were developed two stages of work, the first had two and three variables and the second was a univariate. A surrogate standart was adopted in all steps of the work to evaluate the recoveries and alterations obtained. According to the reached outcomes, the application of the chosen method has promoted a decrease in the amounts of solvent C18. Other results have been achieved, for instance, the reduction of the acetone/hexane mixture volume from 9,2 to 5,6 mL (1:1 v/v), as well as a turndown in the amounts of MgSO₄, NaCl, and Na₂SO₄ sorbents, also the exclusion of the rotary evaporation process. The results obtained in the recovery of organochlorine compounds from fish tissue, through the QuEChERS extraction method, showed a result ranging from 95,89% - 96,47% after analysis. This study has drawn the conclusion that the use of low temperatures aids in the decrease of C18 amounts in the clean up part of the process. The volume of solvents has been decreased in addition to a turndown in the amounts of sorbents from the extraction. The rotary evaporation process showed itself useless and, in the end, the extraction time encountered a reduction.

Keyword: Fish, Surrogate, Extraction, QuEChERS, Low Temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs)	17
Figura 2 -	Estrutura molecular do aldrin	18
Figura 3 -	Estrutura molecular do dieldrin	19
Figura 4 -	Estrutura molecular do DDT	19
Figura 5 -	Estrutura molecular do DDE	20
Figura 6 -	Estrutura molecular do Endosulfan	21
Figura 7 -	Estruturas moleculares do α -Endosulfan e β -Endosulfan respectivamente	22
Figura 8 -	Estrutura molecular do Endosulfan sulfato	22
Figura 9 -	Distribuição espacial dos municípios que realizam o monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano – Brasil (2014)	25
Figura 10 -	Maiores produtores de pescado oriundo da aquicultura (2014) (Em milhões de toneladas)	27
Figura 11 -	Produção nacional de tilápia (1995 - 2015) (em 1 mil toneladas)	28
Figura 12 -	Crescimento médio anual da produção de carnes no Brasil (2004 - 2014)	28
Figura 13 -	Parcela de mercado na produção nacional de tilápia por regiões (2015) (Em %)	29
Figura 14 -	Dez maiores estados produtores de tilápia no Brasil (2013 - 2015) (Em %)	29
Figura 15 -	Incidência de mortalidade por intoxicação por agrotóxicos, por unidade da Federação - Brasil (2014)	31
Figura 16 -	Sistema cromatográfico	40
Figura 17 -	Cromatograma de amostra de peixe-gato (a) e corrida de amostra de peixe-gato (b) 1: α -BHC, 2: IC, 3: γ -BHC, 4: δ -BHC, 5: heptacloro, 6: aldrin, 7: heptacloro epoxido, 8: α -cloridano, 9: endrin, 10: β -endosulfan, 11: p, p' -DDD, 12:aldeído endrina, 13: endirna cetona	42
Figura 18 -	Animal utilizado como branco para fortificação e extração de surrogate	45

Figura 19 -	Tecido muscular de peixe	45
Figura 20 -	Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado	47
Figura 21 -	Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para planejamento 2 ²	48
Figura 22 -	Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para planejamento 2 ³	50
Figura 23 -	Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para planejamento univariado	52
Figura 24 -	Fluxograma das etapas realizadas	54
Figura 25 -	Curva analítica do padrão decaclorobifenil	55
Figura 26 -	Cromatograma do surrogate decaclorobifenil de 300 ugL ⁻¹	55
Figura 27 -	Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em C ₁₈ (1 presença de C ₁₈ / -1 ausência de C ₁₈) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura)	58
Figura 28 -	Gráfico de superfície (C ₁₈ em relação a Temperatura)	59
Figura 29 -	Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em Solvente (1 maior volume 9,2 mL / -1 menor volume 2 mL) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura)	62
Figura 30 -	Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em C ₁₈ (1 presença de C ₁₈ / -1 ausência de C ₁₈) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura)	63
Figura 31 -	Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 1	64
Figura 32 -	Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 4	64
Figura 33 -	Cromatogramas do surrogate decaclorobifenil: Experimento 2 em preto; Experimento 6 em rosa	66
Figura 34 -	Gráfico de distribuição normal: Experimentos do grupo 1, que contém a presença do sorvente C ₁₈ e a ausência da baixa temperatura (linha azulada); Experimentos do grupo 2, que contém a ausência do sorvente C ₁₈ e a presença da baixa temperatura (linha alaranjada)	69
Figura 35 -	Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 3	69
Figura 36 -	Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 4	70

Figura 37 -	Efeito dos sorventes d-SPE na área do pico dos analítos: sem sorvente (a), PSA-50 mg (b), C18 – 50 mg (c), e PSA – 50 mg + C18 – 50 mg (d)	71
Figura 38 -	Eficiência da remoção do co-extractivo (%) para diferentes sorventes em extratos de perca	72
Figura 39 -	Fluxograma das etapas propostas ao método QuEChERS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Relação entre OCPs e seu respectivo tempo de meia vida	23
Tabela 2	-	Características dos pesticidas	23
Tabela 3	-	Municípios com resultados analíticos acima do valor máximo permitido (VMP), para algum dos parâmetros de agrotóxicos – Brasil (2014)	26
Tabela 4	-	Planejamento fatorial 2^2 fatores codificados em C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura)	49
Tabela 5	-	Planejamento fatorial 2^3 fatores codificados em Temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura), C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e Volume do solvente (1 maior volume 9,2 mL e -1 menor volume 2 mL)	51
Tabela 6	-	Análise univariada	53
Tabela 7	-	Planejamento fatorial exploratório 2^2 fatores codificados em C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura)	56
Tabela 8	-	Comparação do tempo total entre as metodologias	61
Tabela 9	-	Planejamento fatorial 2^3 fatores codificados em Temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura), C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e Volume do solvente (1 maior volume 9,2 mL e -1 menor volume 2 mL)	61
Tabela 10	-	Análise univariada	67
Tabela 11	-	Tabela de média e variância para cada grupo (Grupo 1, experimentos 1, 2 e 3), (Grupo 2, experimentos 4, 5 e 6)	67
Tabela 12	-	Tabela de análise de variância (ANOVA)	68

LISTA DE SIGLAS

AOAC	Association of Official Agricultural Chemists (Associação Oficial de Químicos Agrícolas)
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Extração Acelerada por Solvente)
CG	Cromatografia a Gás
ECD	Electron Capture Detector (Detector de Captura de Elétrons)
LOD	Limite Ótimo de Detecção
LOQ	Limite Ótimo de Quantificação
MAE	Microwave Assisted Extraction
MS	Mass Spectrometer (Espectrômetro de Massa)
OCPs	Organochlorine Pesticides (Pesticidas Organoclorados)
PCBs	Polychlorinated Biphenyls (Bifenilas Policloradas)
POPs	Pollutants Organic Persistentes
PPB	Parte por Bilhão
PPM	Parte por milhão
PSA	Primary Secondary Amine (Amina Primária Secundária)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, e Seguro)
SISAGUA	Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade de Água
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
VMP	Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 CONTAMINAÇÃO POR ORGANOCLORADO: HISTÓRICO E RELATOS.....	16
2.2 CONTAMINAÇÃO DE PEIXES POR OCPs.....	26
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM PEIXE	33
2.3.1 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.....	34
2.3.2 EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE	35
2.3.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	35
2.3.4 QuEChERS.....	36
2.4 BAIXA TEMPERATURA	38
2.5 DETERMINAÇÃO DE ORGANOCLORADOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS.....	40
2.6 QUIMIOMETRIA.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 GERAL.....	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA BRANCO.....	45
4.2 PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO	45
4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO PROPOSTO.....	46
4.4 OTIMIZAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP UTILIZANDO A PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA.....	48
4.5 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR E ELIMINAÇÃO DA ROTA EVAPORAÇÃO	49
4.6 OTIMIZAÇÃO DA BAIXA TEMPERATURA FRENTE AOS FATORES C_{18} , VOLUME E ROTA EVAPORAÇÃO FIXADOS	51
4.7 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS OCPs	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 ETAPAS DA OTIMIZAÇÃO	54
5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	54
5.3 OTIMIZAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP UTILIZANDO A PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA.....	56
5.3 OTIMIZAÇÃO DA DIMINUIÇÃO VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR E ELIMINAÇÃO DA ROTA EVAPORAÇÃO.....	60
5.4 OTIMIZAÇÃO DA BAIXA TEMPERATURA FRENTE AOS FATORES C_{18} , VOLUME E ROTA EVAPORAÇÃO FIXADOS	67
5.5 MÉTODO PROPOSTO.....	73
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o homem utiliza da terra como uma fonte de sustento, dando origem à agricultura. Com o crescimento da demanda populacional esta prática sofre um aumento exponencial. A ação de pragas, fungos e insetos sobre plantações atrapalham o desenvolvimento e desaceleram a produção agrícola, fazendo com que o homem desenvolvesse maneiras para manter a qualidade do cultivo. Neste sentido ao longo dos anos foram sintetizados diversos princípios ativos para o controle destas pragas. Um dos fatores que levou ao crescimento do número destes princípios ativos foi a resistência biológica de pragas sobre os mesmos, levando ao surgimento de novos compostos eficazes neste processo, assim como o aumento de dosagens desses compostos lançados ao meio ambiente, para o controle das infestações.

Dentre as classes destes princípios ativos usados na agricultura, encontram-se alguns poluentes orgânicos persistentes (POPs), como os pesticidas; em uma subclasse destes pesticidas tem-se os Pesticidas Organoclorados (OCPs, do inglês Organochlorine Pesticides), que são caracterizados pela presença de átomos de cloro ao longo de suas estruturas cíclicas.

A eficácia e o bom desempenho dos OCPs no combate destas pestes, fez com que os mesmos tivessem sua utilização expandida além da agricultura. O homem passou a usar estes compostos até mesmo em pele humana para tratamento de doenças como piolho e malária, sem se preocupar com a possibilidade de ações tóxicas. Por decreto estabelecido nos parágrafos do documento da comissão de Estocolmo em 2013, nos dias atuais a maior parte dos OCPs tem sua utilização, importação, exportação e comércio banidos do mercado na maioria dos países. Entretanto estudos realizados relatam a presença destes compostos em matrizes ambientais.

Estes compostos estão presentes em rios e na biota aquática principalmente pelo escoamento superficial da água da chuva, fazendo com que este ambiente se torne a ponta da contaminação. Devido a sua dieta os peixes agregam grande quantidade destes compostos. Três características dos OCPs que aumentam sua capacidade de contaminação em peixes são a lipofilicidade que garante a infiltração destes compostos através de membranas e acumulação em tecidos adiposos; bioacumulação, que garante a persistência destes compostos no meio por um longo período e a biomagnificação, que sustenta e incrementa a concentração destes OCPs ao longo da cadeia trófica. A ação tóxica dos OCPs ao organismo está diretamente ligada a alterações no sistema hormonal, sendo estes classificados como

interferentes endócrinos. Sendo assim torna-se necessária a determinação destes OCPs neste tipo de matriz através de uma análise rápida, barata e segura.

Pela alta complexidade de se analisar matrizes como tecidos de peixes e o grau de importância da determinação destes compostos em matrizes ambientais, vários métodos de extração são desenvolvidos e modificados para este tipo de matriz. O método QuEChERS do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective Robust and Safe, destaca-se por ser rápido, necessitar de uma quantidade mínima de equipamentos, utilizar pouca quantidade de solventes, sorventes e amostra, além de ser um método confiável que garante altos níveis de recuperação.

Modificações ao método QuEChERS são estudadas por diversos pesquisadores, levando-o cada vez mais a seu aperfeiçoamento. Recentemente uma proposta de modificação do método QuEChERS garantiu níveis de recuperação > 80% para músculo e vísceras de peixes, utilizando uma etapa de ultrassom para melhor interação da amostra com a mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v), assim como a diminuição da quantidade de amostra de 10 g do método original para 0,5 g. Outra proposta recente, mostrou que pode haver a diminuição de custos gastos pela implementação de uma etapa à baixa temperatura. Esta etapa é adicionada ao método QuEChERS para substituição do sorvente C₁₈, visto que ambas as metodologias são utilizadas na etapa de limpeza da amostra e auxiliam na eliminação do analito da gordura da matriz.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de modificar a metodologia QuEChERS diminuindo as quantidades de C₁₈ da etapa de *clean up* pela adição de uma etapa de partição a baixa temperatura. Foi também estudada a eliminação da etapa de rotaevaporação presente no método QuEChERS modificado para concentração do analito, a diminuição do volume da mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v) e quantidades dos demais sorventes da etapa de extração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTAMINAÇÃO POR ORGANOCOLORADO: HISTÓRICO E RELATOS

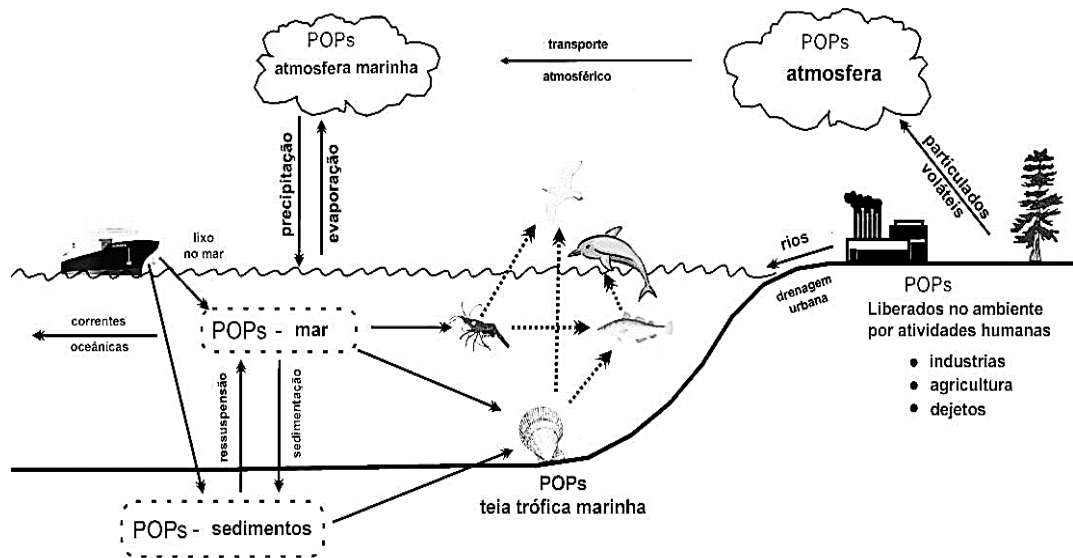
O homem, desde muito tempo, utiliza da terra como uma principal fonte de sustento e com os anos se passando a agricultura foi crescendo de acordo com a demanda populacional. Assim, diversos tipos de produtos químicos foram desenvolvidos para que a agricultura pudesse acompanhar este crescimento. A utilização destes compostos por agricultores, passou de aproximadamente 150 mil toneladas a 500 mil toneladas em 15 anos, com um percentual de 135% de aumento (BOMBARDI, 2017).

Existem aproximadamente 300 tipos diferentes de princípios ativos e mais de 2.000 formulações que já foram ou ainda são utilizados pelo homem visando aumento na produção. Alguns destes, caracterizam-se pela sua longa durabilidade no ambiente sendo conhecidos como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (FLORES et al., 2004).

Com o uso destes POPs na agricultura, o solo pode sofrer várias consequências, sendo contaminado e podendo agregar esta contaminação por muitos anos em matrizes como frutas, plantas, animais, corpo humano, recursos minerais, entre outros (BUAH-KWOFIE; HUMPHRIES; PILLAY, 2018; CEMBRANEL et al., 2017; COMBI et al., 2013; FLORES et al., 2004; FREIRE; KOIFMAN; KOIFMAN, 2017; GONZÁLEZ-GÓMEZ et al., 2018; MESQUITA et al., 2018; NEVES et al., 2018; PAZ et al., 2017; RIZZI et al., 2017; SAINT-HILAIRE et al., 2018; SANITÁRIA, 2008; STREMEL et al., 2017; WANG et al., 2018).

Uma vez que estes POPs são lançados no ambiente, eles podem ser evaporados causando a contaminação do ar, levando a uma ação tóxica quando inalados (FLORES et al., 2004; GONZÁLEZ-GÓMEZ et al., 2018). Com a chuva, estes compostos, são carregados, entrando em falhas e fraturas presentes no solo, levando a contaminação de lençóis freáticos (RODRÍGUEZ et al., 2018). A contaminação destes lençóis gera a contaminação de rios (AFFUM et al., 2018) e toda biota local (NEVES et al., 2018; RIZZI et al., 2017). A Figura 1 mostra o ciclo de exposição dos POPs quando lançados no ambiente.

Figura 1 - Ciclo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs).



Fonte: (BOFEPE, 2016)

Dentre as classificações destes POPs, encontram-se substâncias de cadeias relativamente grandes e cíclicas, que possuem um ou mais átomos de cloro. A estas substâncias dá-se a classificação de Pesticidas Organoclorados (OCPs) (FLORES et al., 2004).

A utilização destes OCPs espalha-se ao longo do globo tanto nas áreas menores quanto nas maiores cidades e países como na China, que entre 1985 e 1996 produziu cerca de 203 a 381 mil toneladas destes pesticidas (WANG et al., 2018).

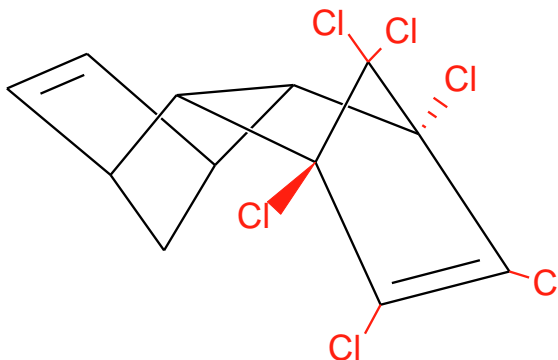
Os OCPs têm sua proibição ou dosagens controladas, a partir do tratado estabelecido pela convenção de Estocolmo de 17 de maio de 2004. Incluídos neste tratado encontram-se os compostos com princípios ativos como: aldrin, endrin, dieldrin, clordano, DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) e seus metabolitos, toxafeno, mirex, heptacloro, hexaclorobenzeno, PCB (bifeninas policloradas), dioxinas e furanos. (STREMEL et al., 2018). Mais tarde em 2009 compostos com o princípio ativo endosulfan também foram citados pela convenção.

A restrição destes compostos está diretamente ligada a seus ciclos de vida, desde a produção, importação, exportação, uso e destinação final. Suas características químicas e físico químicas permitem a bioacumulação, mobilidade pelo ambiente e até a sua afinidade por gordura (lipofilicidade) (BRASIL, 2005).

Dentre os OCPs que estão descritos na Convenção de Estocolmo, destacam-se, os mais presentes na literatura, como o aldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4a,5,8a,-hexahidro-exo-1,4-

endo-5,8-dimetanonaftaleno) (Figura 2) com fórmula molecular $C_{12}H_8Cl_6$, massa molecular 364,9 g (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Figura 2 – Estrutura molecular do aldrin.



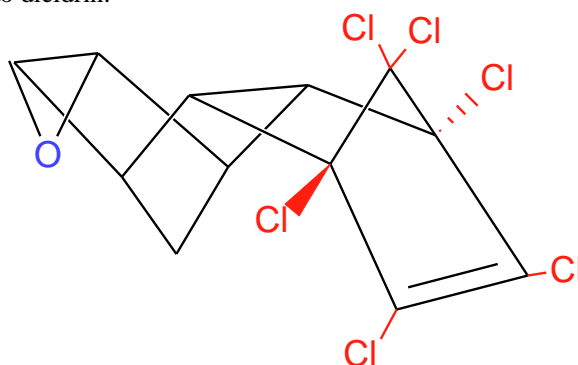
Fonte – (O autor).

O aldrin é praticamente insolúvel em água, ($0,027 \text{ mg L}^{-1}$), possui baixa solubilidade em etanol (aproximadamente 7%) e solubilidade média em benzeno aproximadamente 67%), acetona, xileno ($>600 \text{ g L}^{-1}$), à temperatura ambiente é estável, além de ter estabilidade em ácidos e bases diluídas (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Assim como os demais, é classificado como um pesticida, possui capacidade corrosiva, ponto de fusão próximo a $104 - 104,5^\circ\text{C}$; pode ser considerado tóxico quando ingerido cerca de $38 - 60 \text{ mg kg}^{-1}$ (dados calculados para ratos e coelhos). Em contato com a pele desenvolve uma ação tóxica em concentrações aproximadas de $600 - 1200 \text{ mg kg}^{-1}$. Na literatura, o aldrin já foi encontrado em tecidos de animais como boi, vaca, carneiro, rato e galinha (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Um dos metabólitos do aldrin é o dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a,-octahidro-1,4,5,8-endo-exo-dimetano-naftaleno) (Figura 3), com fórmula molecular $C_{12}H_8Cl_6O$, peso molecular 381,1 g e ponto de fusão aproximadamente a $172 - 175^\circ\text{C}$ (ALMEIDA; PIEDADE; SOUZA, 1962; BARBERA, 1974; WORTHING, 1987).

Figura 3 – Estrutura molecular do dieldrin.

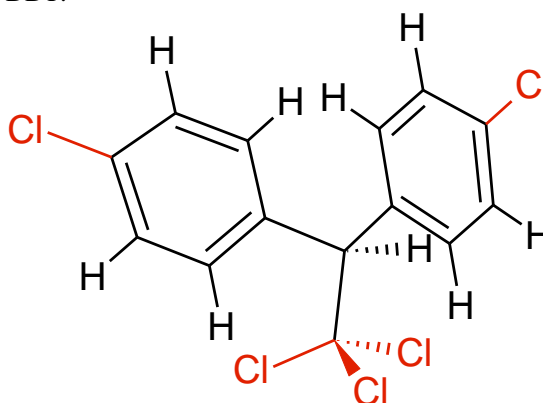


Fonte – (O autor).

É estável na presença de ácidos e bases orgânicos e inorgânicos fracos, mas se decompõe em ácidos minerais fortes, possui baixa solubilidade em água ($0,186 \text{ g L}^{-1}$). É tóxico se ingerido em porções de $37 - 87 \text{ mg kg}^{-1}$ (dados calculados para ratos) (ALMEIDA; PIEDADE; SOUZA, 1962; BARBERA, 1974; WORTHING, 1987).

Outro organoclorado comumente encontrado é o DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) (Figura 4). Com fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5$, massa molecular $354,5 \text{ g}$ e ponto de fusão aproximadamente a 95°C (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Figura 4 – Estrutura molecular do DDT.

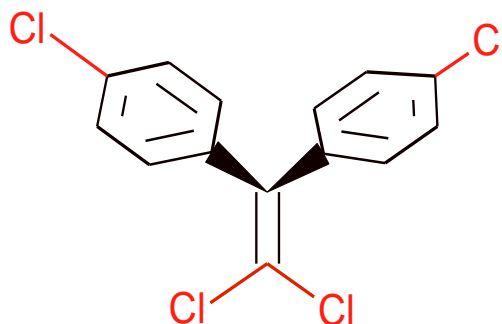


Fonte: (O autor).

Este composto é estável em ácidos, bases e praticamente insolúvel em água (aproximadamente $0,0012 \text{ g kg}^{-1}$), possui alta solubilidade em solvente orgânicos, assim como uma alta lipossolubilidade. Quando ingerido, em porções de $113 - 118 \text{ mg g}^{-1}$, pode ser tóxico ao organismo, assim como a exposição, em porções de 2510 mg g^{-1} pode ser tóxico à pele (testado em ratos) (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Este composto contém isômeros do tipo *p,p'*-DDT e *o,p'*-DDT, sendo que o mais abundante é o *p,p'*-DDT. Possui metabólitos como o *p,p'*-DDD e o DDE, que é produto da oxidação do DDT (Figura 5), é comumente encontrado em urina de vertebrados (BARBERA, 1974; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Figura 5 – Estrutura molecular do DDE.

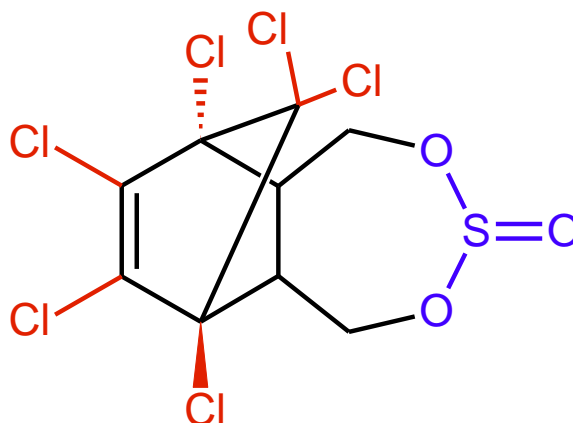


Fonte: (O autor).

Na literatura, tem-se dados de que o DDT é um dos organoclorados majoritariamente encontrado dentre os demais, seguido de seus metabólitos, em diversas matrizes (CHANG, 2018; EL NAHAS et al., 2017; KHALLAF; AUTHMAN; ALNE-NA-EI, 2018; ROSSELAND; TEIEN; BASNET, 2017). Esta alta gama de disposição do DDT, reluz ao fato do mesmo ter sido usado como um produto “milagroso” durante a segunda guerra mundial e pela sua utilização em grande escala como repelente, tanto em pele humana quanto na agricultura, e no combate à malária por volta de 1945 (BAIRD, RECIO, CARRERA, GRASSI, 2008; CHANG, 2018; EL NAHAS et al., 2017; KHALLAF; AUTHMAN; ALNE-NA-EI, 2018; ROSSELAND; TEIEN; BASNET, 2017).

Dentre estes compostos, o mais recentemente proibido, endossulfan (Figura 6), foi citado pela convenção de Estocolmo em 2009, porém, foi banido para consumo e produção agrícola no ano de 2013. É quimicamente conhecido como 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,5-benzodioxatiepín-3óxido, tem fórmula molecular $C_9H_6Cl_6O_3S$, massa molecular 406,9 g (ANVISA 2009; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Figura 6 – Estrutura molecular do endosulfan.



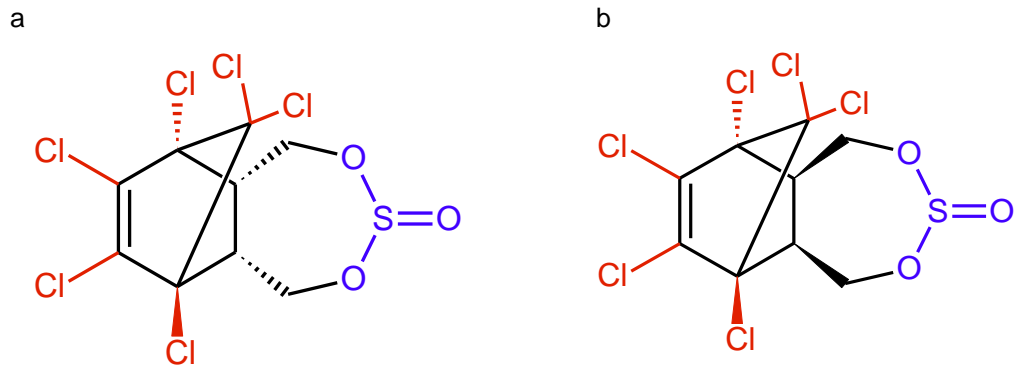
Fonte: (O autor).

O endosulfan apresenta características corrosivas quando em contato com o ferro, seu ponto de fusão é de aproximadamente 70 - 110°C, é praticamente insolúvel em água (aproximadamente 0,32 mg L⁻¹) e possui solubilidades médias em xileno (aproximadamente 450 g L⁻¹) e tolueno (aproximadamente 200 g L⁻¹) (ANVISA 2009; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987).

Quando ingerido, em porções de 78 - 104 mg kg⁻¹, pode causar toxicidade, assim como quando em contato com a pele, em porções de 200 - 365 mg kg⁻¹ (testados em ratos). Em humanos causam toxicidades genotóxicas, neurotóxicas, imunotóxicas, assim como problemas hormonais e na formação fetal através do cordão umbilical (ANVISA 2009; BRASIL, 1987; WORTHING, 1987). Em 2007 haviam algumas fábricas de endosulfan no Brasil, colocando-o no topo dos maiores produtores desse OCP, juntamente com a Índia e Israel (ANVISA, 2009).

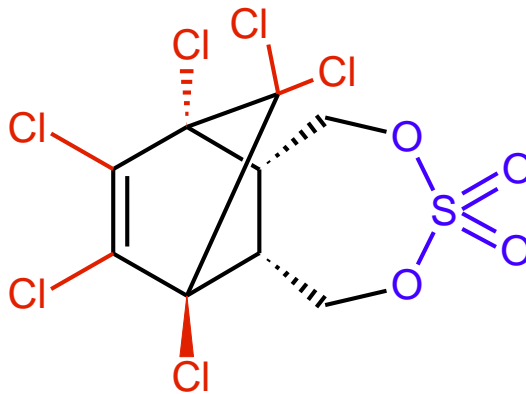
O endosulfan possui isômeros alfa (α-endosulfan) (Figura 7a) e beta (β-endosulfan) (Figura 7b), e como produto de oxidação, tem-se o endosulfan Sulfato (Figura 8) (6,7,8,9,10,10-Hexaclaro-1,5,5a, 6,9', 9a-hexa-hidro-6,9-metano-2,4,3- benzodioxatíepin 3-ido) com fórmula molecular C₉H₆Cl₆O₄S, quase insolúvel em água (aproximadamente <1 mg L⁻¹), ponto de fusão entre 181 - 182°C e lipossolúvel (CHEMSPIDER 2018; PUBCHEM 2018; WORTHING, 1987).

Figura 7 – Estruturas moleculares do α -endosulfan e β -endosulfan respectivamente.



Fonte: (O autor).

Figura 8 – Estrutura molecular do endosulfan sulfato.



Fonte: (O autor).

A presença do halogênio cloro (Cl) é uma característica comum a todos os OCPs, garantindo-os uma massa molecular elevada. Quando em contato com solos agrícolas, ricos em matéria orgânica, gera a persistência destes pesticidas, acarretando uma contaminação por um tempo prolongado. Sendo assim, estas moléculas são classificadas como persistentes, ou seja, possuem tempos de meia vida longos, garantindo que permaneçam por anos até que suas concentrações sejam reduzidas pela metade (FLORES et al., 2004). A Tabela 1 relaciona alguns destes compostos com seus respectivos tempos de meia vida.

Tabela 1 – Relação entre OCPs e seu respectivo tempo de meia vida.

OCPs	t _{1/2} (anos)	Referência
Aldrin	5-10	(NAKAMURA, 2015)
DDT	2,4 - 13,6	(WANG et al., 2007)
DDE	7	(STREMEL et al., 2017)
Dieldrin	7	(NAKAMURA, 2015)
Endosulfan	5-7	(NAKAMURA, 2015)
Endosulfan Sulfato	5-7	(NAKAMURA, 2015)

Fonte: (O autor).

Outra característica importante nos OCPs, é a alta resistência a degradação química e biológica (BUAH-KWOFIE; HUMPHRIES; PILLAY, 2018; FLORES et al., 2004). Esta característica garante a estes compostos químicos uma alta lipofilicidade (log P) (Tabela 2), bioacumulação e biomagnificação, fazendo com que os mesmos adentrem a camadas celulares e percorram a cadeia trófica, através do acúmulo em tecidos lipídicos (BUAH-KWOFIE et al., 2018; FLORES et al., 2004).

Tabela 2 - Características dos pesticidas.

Organoclorado	LogP	Referências
DDE	6,36	(PAZ et al., 2017; STREMEL et al., 2017)
DDT	6,91	(PAZ et al., 2017; STREMEL et al., 2017)
Aldrin	6,21	(PAZ et al., 2017)
Dialdrin	4,6	(KASEMODEL, 2012; PAZ et al., 2017)
Endosulfan	3,55-3,62	(ANVISA, 2009; KHALLAF; AUTHMAN; ALNE-NA-EI, 2018)
endosulfan sulfato	3,55	(NAKAMURA, 2015)

Fonte: (O autor).

Sabe-se que todos os OCPs citados, tem sua utilização restrita nos dias atuais. Contudo, na literatura ainda são relatados muitos casos da presença destes compostos em diversos tipos de matrizes como solo, água, frutas, verduras e organismos, creditada ao meio em que o organoclorado está presente e as suas características físico-químicas (FLORES et al., 2004).

No norte da África do Sul, foi comprovada a contaminação através da presença de DDT em sedimentos na região (BUAH-KWOFIE; HUMPHRIES; PILLAY, 2018). Nas cidades de Martinica e Guadalupe na França, 8% dos solos encontram-se contaminados pelo uso excessivo de OCPs como DDT e DDE. Isso se deve, ao grande uso destes compostos até os anos de 1990, em plantações de banana para combater o Chiflado de Banana Preta (*Cosmopolites sordidus*) (SAINT-HILAIRE et al., 2018).

Solos argilosos como sedimentos tendem a reter a contaminação destes compostos, isso pode ser comprovado através de estudos realizados na cidade de Belém-PA com amostras de sedimentos de rios que desaguam na cidade vindos da Amazônia, que trazem valores de

concentração de contaminação de aproximadamente 100 ngg^{-1} de OCPs como o DDT (FLORES et al., 2004). No período de 2013 a 2014 ao analisar sedimentos de 8 pontos do Rio Pelotas, foram detectados níveis de OCPs como p,p'DDT maiores que $0,158 \mu\text{g L}^{-1}$ e aldrin, dieldrin, endosulfan, endosulfan sulfato abaixo dos limites de quantificação (LOQ) e determinação (LOD) (MODEL et al., 2018). Na Baía de Guaratuba-PR, foram encontrados níveis de OCPs como o DDT em amostras de sedimentos coletadas em novembro de 2010 em uma faixa de concentração equivalente a $0,19\text{-}0,49 \text{ ngg}^{-1}$. Estas contaminações eram provenientes da agricultura, que utilizavam desses pesticidas para controle de qualidade de plantações de banana nas regiões (COMBI et al., 2013).

No Paraná, estas contaminações se mostraram presentes na cidade de Curitiba, onde na análise de amostras de sedimentos coletadas em 8 estações do litoral Sul do Paraná, comprovaram a presença de OCPs, como DDT, na faixa de concentração que vão de $0,57 - 1.89 \text{ ng g}^{-1}$. Estas regiões eram influenciadas por atividades portuárias, navegação e próximas a efluentes urbanos. (RIZZI et al., 2017). Em Cascavel-PR, foram analisados sedimentos de um lago onde a predominância de ocupação de sua área de drenagem é urbana. Foram encontrados níveis de contaminação por DDT com aproximadamente $0,15 \text{ ng g}^{-1}$ e aldrin $0,11 \text{ ng g}^{-1}$ (CEMBRANEL et al., 2017).

Outras matrizes comumente afetadas por esta contaminação relatadas na literatura, são frutas, verduras e legumes. Em Fortaleza no Estado do Ceará foi comprovada a presença de OCPs como aldrin, dieldrin, DDT, DDE e endosulfan, em amostras comerciais de polpa frutas de açaí (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia emarginata* DC.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) vendidas em supermercados da cidade. As concentrações dos OCPs encontrados nestes estudos permeiam na faixa de concentração entre $10,44 - 20,16 \text{ mgkg}^{-1}$ (PAZ et al., 2017).

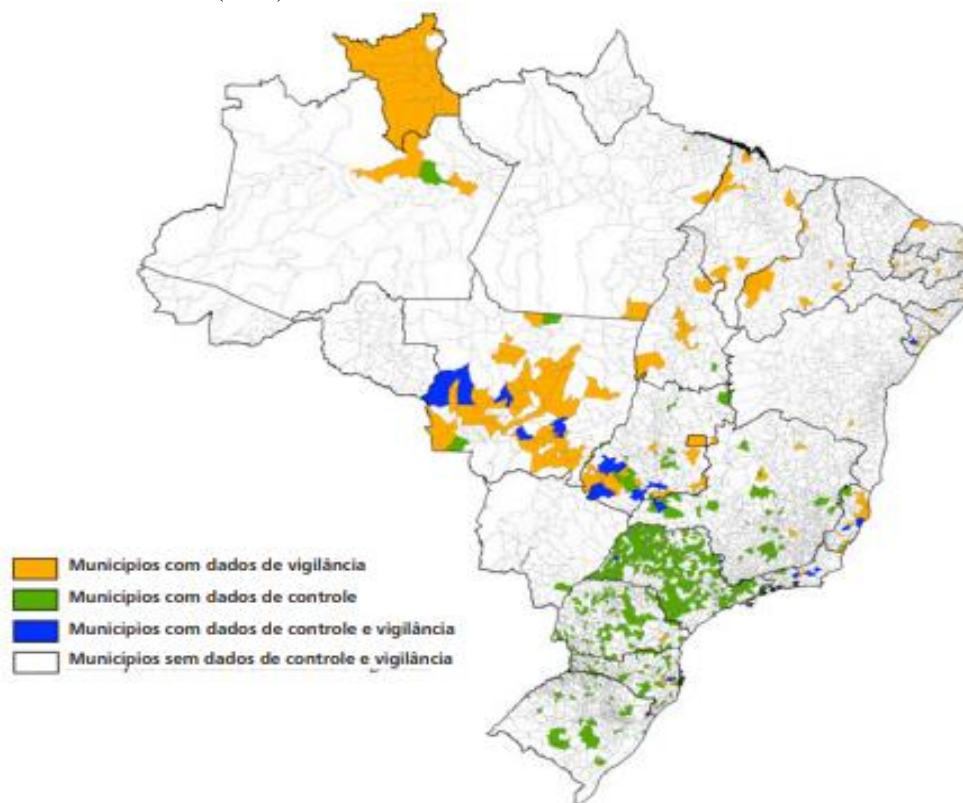
Animais terrestres são outro alvo de OCPs. Na Espanha, estudos realizados com pelos de ratos e coelhos, apontaram um nível de acumulação de DDT na faixa de $0.29 - 139 \text{ ngg}^{-1}$ (GONZÁLEZ-GÓMEZ et al., 2018).

O ser humano também está exposto a este tipo de contaminação, alguns estudos comprovam este fato na análise dos níveis séricos realizado com 547 pacientes doadores de sangue dentro dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Espírito Santo e Bahia. Foram encontradas quantidades de DDT em uma faixa de $0.8 - 100,00 \mu\text{gdL}^{-1}$ (DO NASCIMENTO et al., 2017). Na Coreia Kim et al. (2013) relatam a identificação de DDT em uma mulher grávida e no feto através da análise de níveis séricos. Estes casos evidenciam um possível

problema à saúde pública causado pela contaminação de OCPs. A contaminação humana é uma consequência da utilização de recursos naturais pelo homem, como por exemplo o consumo de água potável.

Matrizes ambientais tendem a agregar a contaminação por OCPs facilmente, entretanto, na literatura é retratada a presença destes compostos em matrizes que possuem certo controle de contaminação, como em água potável, utilizada para consumo humano, que passa por um tratamento prévio até o abastecimento. O controle deste tipo de matriz, no Brasil é realizado pelo Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), disponível no Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Neste relatório são encontrados dados do controle realizado pelo órgão, no país. A Figura 9 abaixo, faz referência ao monitoramento realizado no Brasil, por região (BRASIL, 2018).

Figura 9 – Distribuição espacial dos municípios que realizam o monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano – Brasil (2014).



Fonte: (BRASIL, 2018).

Grande parte dos municípios de cada estado do Brasil possui esse tipo de monitoramento, representando um total de 2,5% dos 5.570 municípios do país que são monitorados. A maioria dos estados apresentam os resultados de análises em água para

consumo humano, dentro do padrão permitido, mas o destaque está para dois estados (Minas Gerais e São Paulo) (tabela 3), que apresentam municípios com níveis de contaminações por OCPs como aldrin e dieldrin, dentre outros acima do padrão permitido, podendo levar a contaminação humana por estes compostos. O padrão permitido, chamado pela SISAGUA de Valor Máximo Permitido (VMP), varia de 0,03 – 180,00 μgL^{-1} dependendo da substância (BRASIL, 2018).

Tabela 3 – Municípios com resultados analíticos acima do valor máximo permitido (VMP), para algum dos parâmetros de agrotóxicos – Brasil (2014).

UF	Município	Substância	Resultado acima do VMP (μgL^{-1})	VMP (μgL^{-1})	Análises abaixo do VMP (n)	Análises acima do VMP (n)
Minas Gerais	Pirapora	aldrin + dieldrin	0,050	0,03	1	2
	Body Bassit	Endrin	5,00	0,60	29	1
	Bauru	Clorpirifós + clorpirifósoxon	39,00	30,00	2	1
	Itapetininga	aldrin + dieldrin	0,10	0,03	13	1
	Itapura	aldrin + dieldrin	0,05	0,03	0	1
	Lavínia	aldrin + dieldrin	0,05	0,03	0	1
São Paulo	Nova Castilho	clordano	1,00	0,20	0	1
	Palestina	clordano	0,50	0,20	10	1
	Parisi	aldrin + dieldrin	0,049	0,03	0	1
	Potirendaba	aldrin + dieldrin	0,30	0,03	21	2
		clordano	1,00	0,20	21	5
		endrin	1,00	0,60	19	1
	Suzanópolis	clordano	1,00	0,20	50	1
Turiuba	mancozebe	800,00	180,00	5	1	

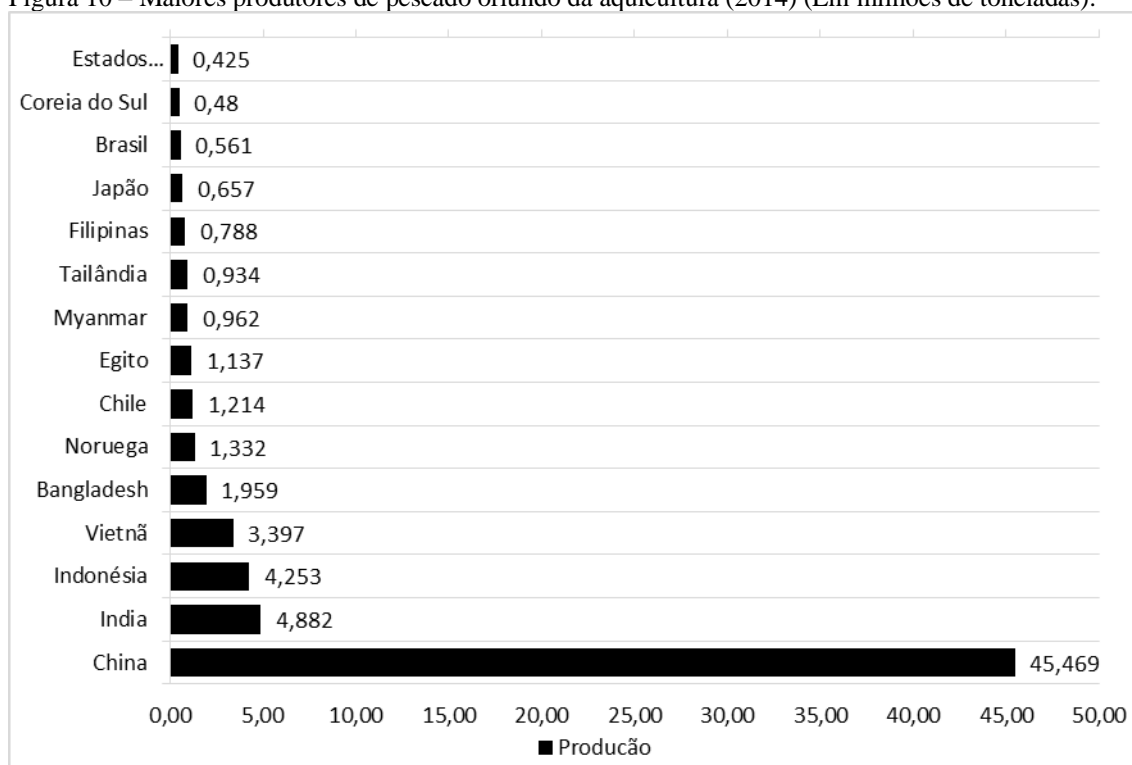
Fonte: (BRASIL, 2018).

Quando em contato com os rios, estes compostos bioacomulam podendo ser encontrados em sedimentos e na fauna local (DANG et al., 2018).

2.2 CONTAMINAÇÃO DE PEIXES POR OCPs

De 1961 a 2015, o consumo per capita global de peixe aumentou de 9,0 a 20,2 kg, com uma porcentagem de crescimento de 1,5% ao ano atingindo aproximadamente 149 milhões de toneladas consumida, mostrando que a piscicultura é uma atividade que tende a crescer nesses países e se estender a demais países, desenvolvidos ou não (SCHULTER; FILHO, 2017). China, Índia, Indonésia e Vietnã, estão no topo dos países em relação a aquicultura, a nível mundial (Figura 10).

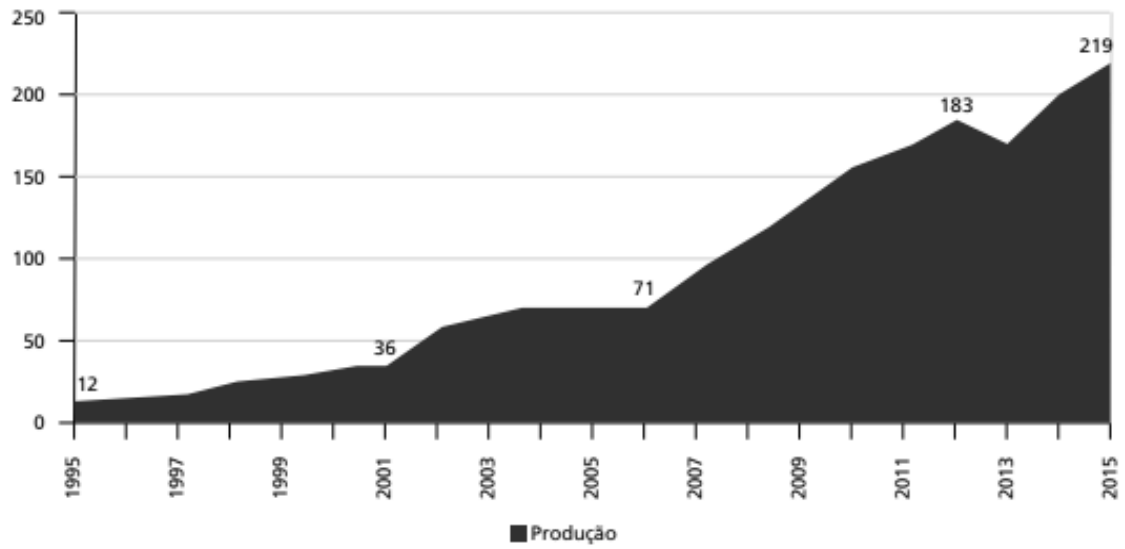
Figura 10 – Maiores produtores de pescado oriundo da aquicultura (2014) (Em milhões de toneladas).



Fonte: (SCHULTER; FILHO, 2017).

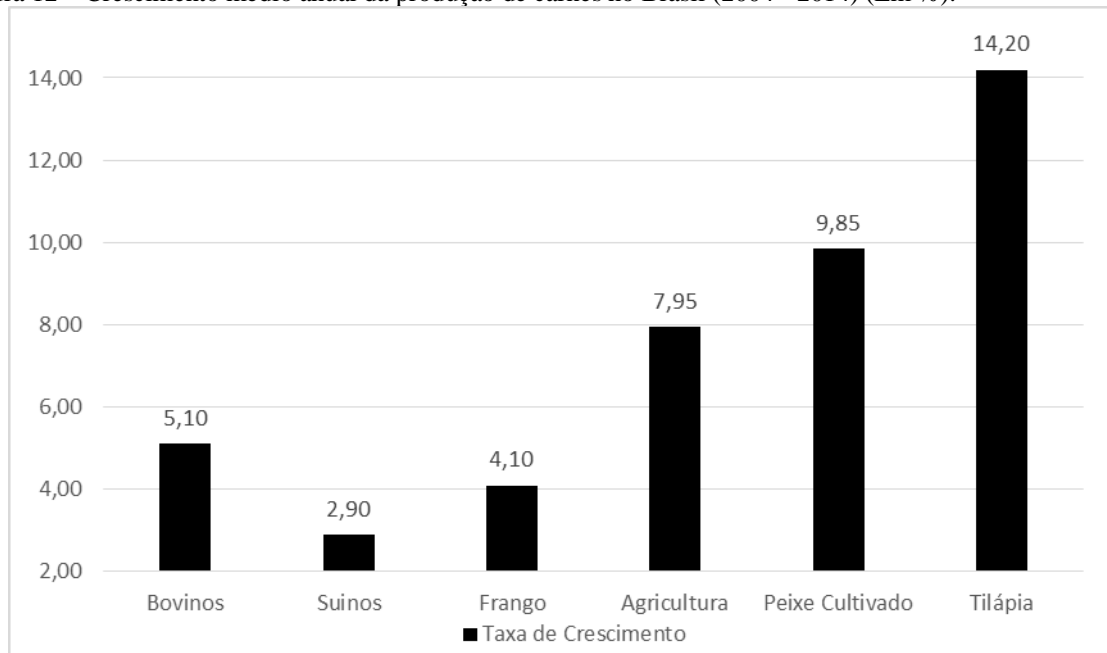
O Brasil está logo a seguir na 13ª colocação no ranking mundial dos países que mais consomem peixe. Em 2018 foram consumidas cerca de 722 mil de toneladas de peixe no país. (CREA-PR, 2019). Dentre as espécies mais consumidas no país, tem-se a tilápia com uma média de consumo de 400.280 toneladas anualmente (Figuras 11 e 12), onde as espécies predominantes são tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*). O Paraná foi o pioneiro no cultivo e produção de tilápia no país, tornando-se o maior estado produtor de peixe no Brasil em meados de 2002. Com uma produção de 12,8 mil toneladas de peixe anualmente, o estado garantiu também à região Sul, a maior parcela de contribuição da tilapicultura no país (Figura 13). Desde então o estado destaca-se anualmente tanto na piscicultura quanto na tilapicultura (Figura 14) (SCHULTER; FILHO, 2017).

Figura 11 – Produção nacional de tilápia (1995 - 2015) (em 1 mil toneladas).



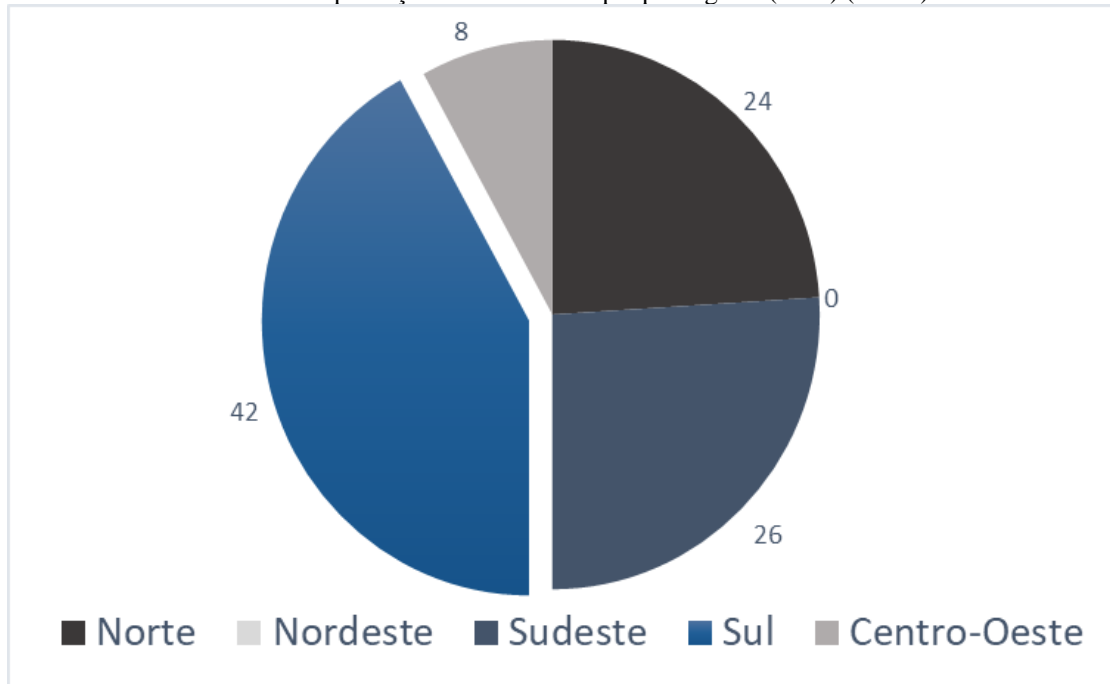
Fonte: (SCHULTER; FILHO, 2017).

Figura 12 – Crescimento médio anual da produção de carnes no Brasil (2004 - 2014) (Em %).



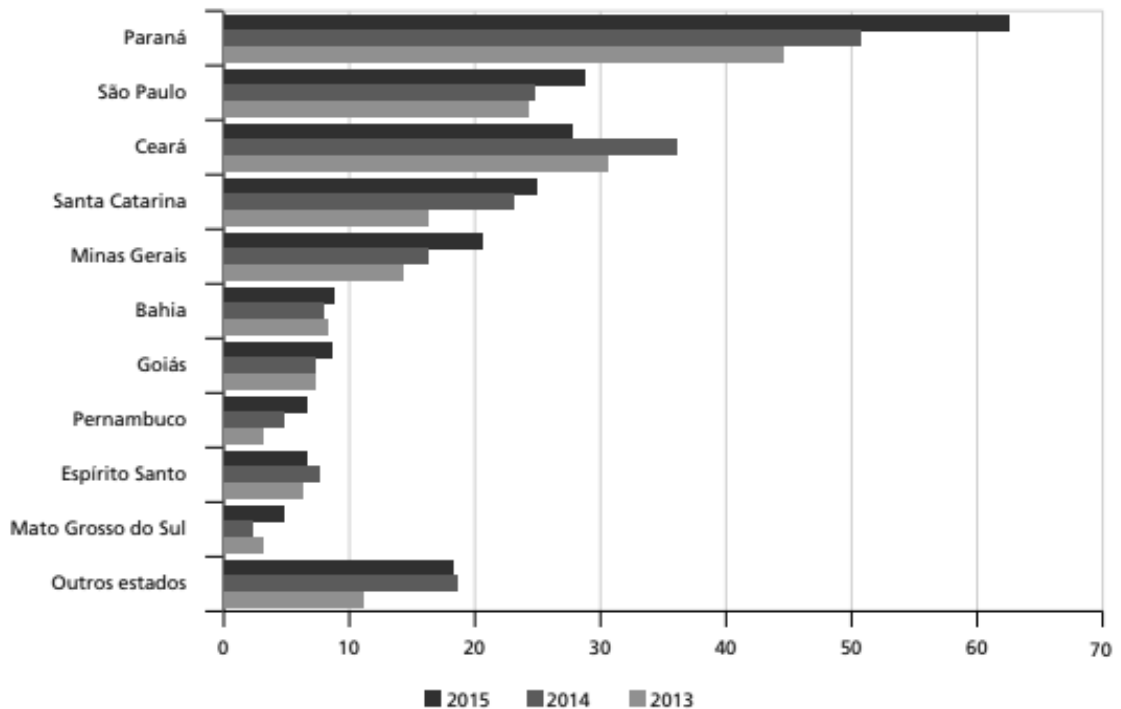
Fonte: (SCHULTER; FILHO, 2017)

Figura 13 – Parcela de mercado na produção nacional de tilápia por regiões (2015) (Em %).



Fonte: (SCHULTER; FILHO, 2017)

Figura 14 - Dez maiores estados produtores de tilápia no Brasil (2013-2015) (Em 1 mil toneladas).

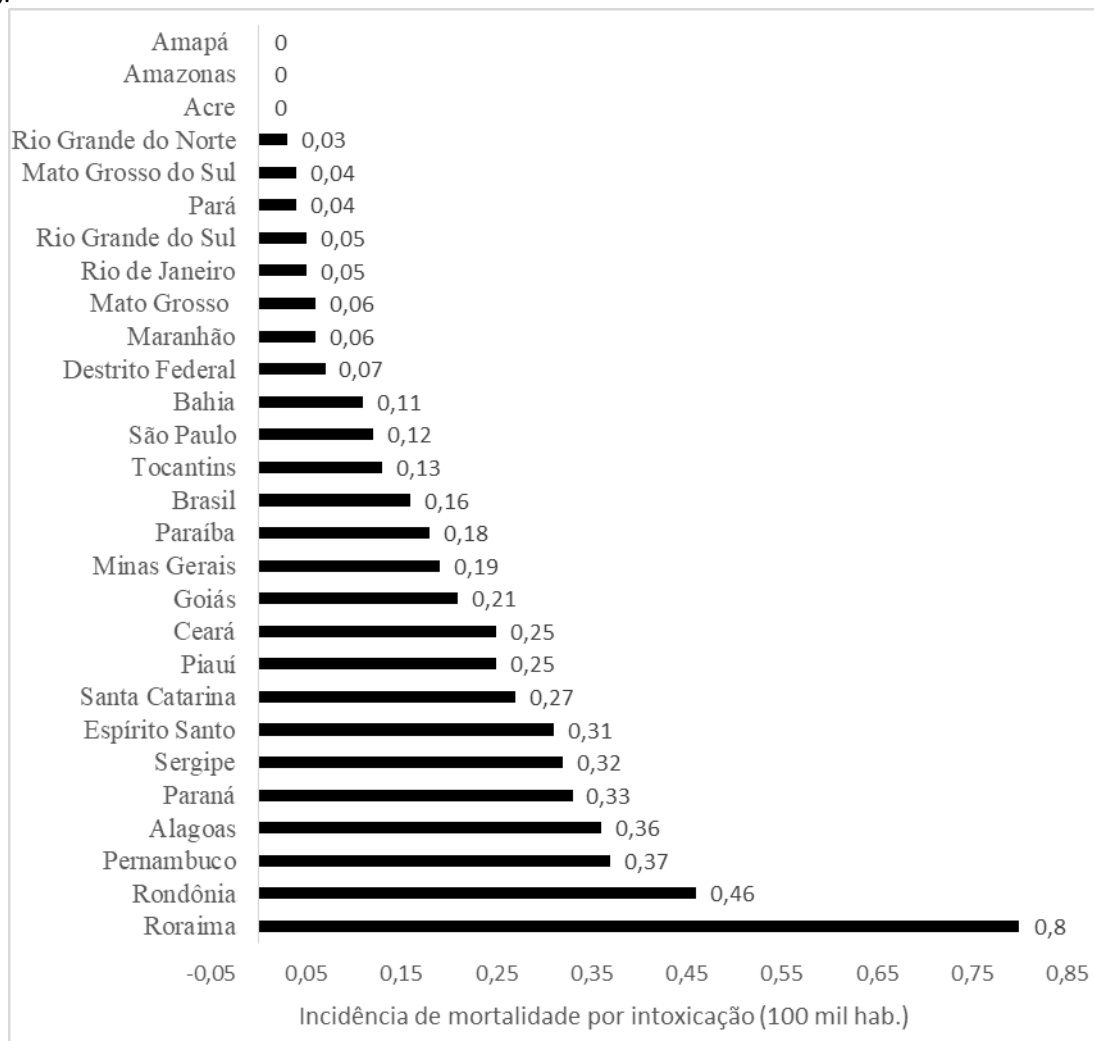


Fonte: (SCHULTER; FILHO, 2017)

O controle de qualidade no processo de produção destes peixes é imprescindível para que se tenha um bom alimento no mercado. Este controle estabelece a forma com o pescado deve ser tratado desde o armazenamento até a ponta de consumo e é regido pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da

Agricultura (CLEOFAS, 1952) Artigo 439. Porém, durante o processo de cultivo e preparação do peixe para consumo humano, não há uma etapa que preveja a eliminação de OCPs, tornando-se uma das matrizes a gerar intoxicação e até mesmo óbito por ingestão destes compostos. O homem também sofre a influência desta contaminação por conta da alimentação de peixes e frutos do mar. Uma vez que denominados seres aquáticos, estes indivíduos podem aderir esta contaminação, vinda da agricultura ou pela contaminação local. Através do processo de biomagnificação estes pesticidas percorrem ao longo da cadeia trófica chegando a predadores maiores e até mesmo ao ser humano (AFFUM et al., 2018). Somente no Paraná, no ano de 2007 a 2012, mais de 4000 casos de intoxicação por OCPs foram confirmados (ERVILHA, 2015). A taxa de mortalidade por intoxicação destes compostos no Brasil, apresentada na Figura 15, chegou a atingir no ano de 2014, cerca de 0,16% da população, com destaque para os estados de Rondônia e Roraima (BRASIL, 2018).

Figura 15 – Incidência de mortalidade por intoxicação por agrotóxicos, por unidade da Federação - Brasil (2014).



Fonte: (BRASIL, 2018)

Estudos realizados no estado do Paraná, apontam que a presença de compostos como OCPs é evidente tanto em amostras oriundas da aquicultura como da pesca. Na cidade de Ponta Grossa-PR, amostras de músculo e fígado de pira-tatu (*Hypostomus commersoni*), coletados em um lago na cidade, foram utilizados para análise e apresentaram níveis de contaminação de 0,3 - 73.4 ng g⁻¹ para agrotóxicos (BUSSOLARO et al., 2012). Em outro estudo na mesma cidade foram encontradas quantidades de OCPs como α -endosulfan, p,p'-DDE, β -endosulfan e p,p'-DDT, em músculo de peixes das espécies tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e lambari (*Astyanax sp*), comercializados em supermercados na região. Estes OCPs estavam em uma faixa de concentração de 9,0 - 447 $\mu\text{g kg}^{-1}$ onde o mais abundante encontrado foi o β -endosulfan (447 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e o menos abundante encontrado foi o p,p'-DDT (4 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (STREMEL et al., 2017).

No rio Mandacaru, na cidade de Maringá-PR, na análise de amostras de água foram encontradas quantidades de OCPs como DDT em concentrações próximas a $0,227 \text{ mg L}^{-1}$ (DE FIGUEIREDO; CHIAVELLI; COSTA, 2013).

Na análise de tecido e músculo de maria-luísia (*Paralichthys brasiliensis*), peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) e bagre-amarelo (*Cathorops spixii*), retirados de regiões do porto e nas saídas de esgoto de Santos, foram encontradas quantidade de DDT em uma faixa de concentração de $0.11 - 0.63 \text{ ng g}^{-1}$ (MAGALHÃES et al., 2017).

No estado de São Paulo, nas regiões litorâneas de Praia Grande, Ubatuba e Vitória no Espírito Santo, através do projeto TAMAR-ICMBio e Biopesca, foram analisados um total de 64 cascos de tartaruga (*Chelonia mydas*), nas quais foram encontrados níveis de OCPs como endosulfan, endosulfan sulfato, DDT e DDE na faixa de $6 - 31 \text{ ng g}^{-1}$ (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2017).

Dados de estudos realizados em tecidos lipídicos de 12 exemplares de Golfinho (*Delphinus delphis*) no estado de Maringá-PR, entre os anos de 2003 e 2004, apontaram níveis de concentração de DDT em uma média de 5277 ng g^{-1} (LAILSON-BRITO et al., 2010).

Peixes oriundos de pesca, são expostos a contaminações pela falta de controle ambiental; porém, quando se trata de peixes comercializados, há controles tanto químicos quanto físicos durante o processo da piscicultura, para que a qualidade do peixe seja mantida. Uma água de qualidade para produção de peixe, tem seus parâmetros físicos (temperatura, cor, turbidez e transparência) e químicos (pH, alcalinidade, dureza, oxigênio dissolvido, nitrogênio amoniacal, nitratos e fosfatos) controlados (OLIVEIRA, 2015). Apesar deste controle, peixes oriundos de produção, possuem níveis de contaminação por estes compostos acima do VMP, relatados na literatura.

Em Taiwan, estudos realizados com amostras de peixes da espécie tilápia (*Pseudocrenilabrinae*), peixe leite (*Chanos chanos*) e perca (*Perca*), os quais são muito consumidos na região, comprovam a presença de OCPs como o *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDE e seus metabólitos e dieldrin nas faixas de concentração de $0,09 - 2,74 \text{ ng g}^{-1}$ (CHANG, 2018).

Na análise de tecidos, como músculo, de amostras de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), coletadas no Canal Bahr Shebeen e no Canal do Rio Nilo foram encontradas quantidades de OCPs como *p,p*-DDT, *pp'*-DDE, dieldrin, endosulfan, aldrin. Estes pesticidas apresentaram uma faixa de concentração na escala de ng.g^{-1} que vão de $0,294 - 9,312$. Dentre

estes pesticidas, o dieldrin não foi encontrado em alguns pontos de coleta (KHALLAF; AUTHMAN; ALNE-NA-EI, 2018).

Na análise de água e resíduos de tecidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), coletadas em três pontos do lago Barullus, no Egito foram identificadas modificações no DNA dos peixes pela presença de OCPs e organofosforados como, endosulfan, dieldrin, endrin, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD e *p,p'*-DDT. As faixas de concentração desses compostos, vão de 28,9 - 139,5 ng g⁻¹, sendo que em dois pontos de coleta, denominados como sessão leste e sessão oeste, não foram encontradas quantidades de DDT e dieldrin nas amostras coletadas (EL NAHAS et al., 2017).

Em 2013, em amostras de bagre africano (*Clarias gariepinus*) coletados na região de Soweto e Lenasia, banhadas pelo Rio Kliper, no Sul da África, foram encontradas quantidade de DDT, na ordem de ng g⁻¹, que vão de 0,2 - 1800, indicando a presença desses compostos naqueles organismos (PHEIFFER et al., 2018).

Em amostras de tecidos de salmónete-da-vasa (*Mullus barbatus*) e sedimentos coletadas nas Baías de Izmir e Çandarli na Turquia, foram extraídos e detectados OCPs como: aldrin, dieldrin, endosulfan, *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDE, na faixa de ng g⁻¹ que vão de 0,09 atribuído ao dieldrin, a 8,4 atribuído ao endosulfan. O método de extração utilizado para estas análises foi o sistema de digestão em micro-ondas e quantificados por GC-MS (Cromatógrafo a gás acoplado ao detector espectrômetro de massa) (MUZYED; KUCUKSEZGIN; TUZMEN, 2017).

Ao analisar amostras de tecido de mahseer (*Tor putitora*), mastacembelus armatus (*Mastacembelus armatus*), bagre-africano (*Clarias gariepinus*) e tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), coletadas no lago Phewa no Nepa, foram quantificados níveis de DDE, DDD e aldrin. Para estes pesticidas, a faixa de concentração equivalente encontrada foi de µg kg⁻¹ que vão de 1,8 - 11,6, 4,5 - <1 e 28,5 - <1 respectivamente (ROSSELAND; TEIEN; BASNET, 2017).

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM PEIXE

Para que haja um controle da contaminação em tecido de peixe por OCPs é preciso identificar a presença destes compostos nestas matrizes. Neste sentido, diversos pesquisadores buscam desenvolver e modificar métodos de extração para OCPs. O estudo destas metodologias de extração é cada vez mais presente na literatura juntamente a uma melhor

forma de detecção e quantificação para OCPs, em busca de um método que seja eficaz, rápido e com custos reduzidos.

2.3.1 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

A extração assistida por micro-ondas (do inglês microwave assisted extraction- MAE) é um procedimento de extração onde o solvente utilizado é normalmente acetonitrila ou n-hexano, juntamente a NaSO₄ (Sulfato de Sódio) para desidratação da amostra. A interação da matriz com o solvente é realizada por uma etapa a micro-ondas, seguida de uma filtração para finalização do método com controle do pH (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

Há relatos, na literatura, que mostram a ineficácia deste método de extração quando se trabalha a baixa temperatura, obtendo recuperações baixas e que não representam o total amostral (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

Dentre as porcentagens de recuperação de pesticidas como DDT, DDE, aldrin, endosulfan e outros presentes na literatura, podemos encontrar faixas de 87,8 a 91,1%, 93 a 105%, 86,1 a 97,9%, em análises de amostras de peixes coletadas em supermercados e rios. Levando em consideração que as faixas de recuperação devem estar entre 70 a 120% de acordo com a Associação Oficial de Químicos Agrícolas (Association of Official Agricultural Chemists - AOAC)¹, podemos concluir que os valores encontram-se dentro da faixa de recuperação, mas próximos aos limites inferiores da mesma (FRANCO-BARRIOS et al., 2014; HE et al., 2017; WANG et al., 2010).

O controle do pH demanda de um cuidado maior da parte do analista, e em alguns trabalhos, este torna-se um pré-requisito dentro do método, como na extração de OCPs de músculo de carpas douradas (*Cryprinus carpiod*) adquiridas em supermercados, às quais, quantidades de NaOH e HCl foram adicionadas para atingir dois níveis diferentes de pH (2,5 na etapa pré-filtração e após filtrado o pH foi reajustado para 5,5). Foi obtida uma faixa de recuperações para esta aplicação de 65,9-80,4%. (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

A quantidade de solvente é outra característica muito explorada por pesquisadores, visando a diminuição de custos durante o método de extração e diminuição de resíduos descartados. Quando se trata do MAE, alguns estudos, como na extração de OCPs de músculo de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), 25 mL de uma mistura de solventes, são utilizados para completa extração. Em outro estudo 30 mL da mistura n-hexano/acetona foram utilizados em 2,0 g de músculo de peixe adquiridos em um lago de Beijing na China para extração de OCPs através do método MAE. Estas quantidades de solventes encarecem o

procedimento de extração tornando-o menos acessível. A massa da amostra utilizada também é grande se comparada a outros métodos que chegam a utilizar 0,5 g de músculo de peixe para 9,2 mL de uma mistura de solventes (HE et al., 2017; STREMEEL et al., 2017; WANG et al., 2010).

2.3.2 EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE

A Extração Acelerada por Solvente (do inglês Accelerated Solvent Extraction - ASE) é um procedimento de extração onde a fase extratora geralmente é composta por acetonitrila, etanol, acetato de etila, ou ainda misturas de acetona/hexano ou hexano/acetonitrila (SUN et al., 2012).

Neste tipo de extração, a amostra é submetida a uma agitação para homogeneização da mesma e em seguida é condicionada a uma célula selada por teflon, que pode ser de material de aço inoxidável. No processo de extração, a esta célula é adicionada o solvente e ajustado a temperatura ideal para o tipo de matriz, seguida da aplicação de pressão a esta amostra. Esta amostra é então transferida a um balão de fundo chato e evaporada para ressuspensão no solvente (ZHAO, 2014).

Para extração de organoclorados em músculo de peixes, é comumente utilizada uma mistura de hexano-acetonitrila neste método. Para eliminação de interferentes da matriz, geralmente é adicionado a mistura, uma solução 40% de H₂SO₄ (ácido sulfúrico). Sun e colaboradores (2012) extraíram um total de 56 tipos de pesticidas utilizando o método ASE.

Assim como no MAE, as quantidades de matriz utilizada são altas. Isto pode ser verificado em um estudo realizado para avaliação das condições cromatográficas, onde os extratos para determinação provem de tecido de peixe, através do método de extração ASE, chegando a uma quantidade da matriz de 5,0 g. (ZHAO, 2014). No mesmo estudo, o controle do pH também é importante, sendo mantido abaixo de 4, exigindo um cuidado maior da parte do analista (ZHAO, 2014).

2.3.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A Extração em Fase Sólida (do inglês Solid Phase Extraction - SPE) é uma das técnicas de extração mais utilizadas. Nesta, os analitos contidos numa matriz são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro

solvente é usado para lavar os analitos de interesse. Alguns trabalhos realizados com este método de extração trazem volumes de solventes elevados. Como na detecção compostos como DDT, DDE, DDD, aldrin, entre outros, extraídos de músculo de peixe, o qual foi submetido a 70 mL de uma mistura de solventes de acetonitrila/n-hexano (5:2), seguida de uma rotaevaporação e ressuspensão do sobrenadante em 50 mL de acetonitrila. Apesar dos altos volumes, os resultados de recuperação dos pesticidas para este método apresentam bons valores, em uma faixa de 78,95% para o DDT a 90,15% para o aldrin (HONG et al., 2004).

Ao analisar a influência da concentração de 21 pesticidas em tecido de peixes que eram exportados da China, em três diferentes níveis, 0,02, 0,05 e 0,1 mg kg⁻¹, observou-se que em concentrações mais baixas, foram obtidos os maiores níveis de recuperação dos pesticidas. As porcentagens de recuperação encontradas, após o processo de extração, foram de 80,5 – 101,5%, 81,3 – 113,7% e 85,7 – 97,3% para as concentrações de 0,02, 0,05 e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente, demonstrando a eficácia do método em baixas concentrações de analito (CHEN et al., 2009).

A extração em fase sólida modificada, como uma etapa *clean-up* de suporte para o método QuEChERS (Queek, Easy, Cheep, Effective, Robust, Safe) é uma proposta discutida na literatura, onde a etapa a baixa temperatura, proveniente da SPE, é adaptada ao método para eliminação dos interferentes da amostra (MOLINA-RUIZ et al., 2015; QUINETE et al., 2013).

Estes métodos de extração precisam atender alguns requisitos para que sejam aplicados de forma *Rápida, Fácil, Barata, Eficaz, Robusta e Segura*, visando uma melhor extração, juntamente a otimização de tempo para realização, uma aparelhagem que seja simples e acessível e diminuição de resíduos.

2.3.4 QuEChERS

A proposta do método QuEChERS, cuja sigla deriva das palavras Quick, Easy, Cheep, Efetive, Robust e Safe, foi desenvolvida com o intuito de extrair OCPs de matrizes como frutas e vegetais (ANASTASSIADES et al., 2003). No método original, 10 g da matriz são adicionados em 10 mL do solvente acetonitrila, juntamente a uma quantidade de sorventes como MgSO₄, NaCl, PSA (Amina Primária Secundária) e C₁₈ (ANASTASSIADES et al., 2003). Estes sais são utilizados para remoção de água da amostra, aumento da força iônica da solução, eliminação de quaisquer tipos de corantes e eliminação de gordura da mesma (ANASTASSIADES et al., 2003).

A aplicação deste método de extração com detecção por GC-MS (cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa), gerou recuperações de 85 – 101% dos padrões de pesticidas utilizados nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando que o método é eficaz para a extração destes compostos em matrizes com baixos teores de água e gordura (ANASTASSIADES et al., 2003).

Desde sua menção na literatura, o método QuEChERS passa a ser utilizado por muitos pesquisadores por se tratar de um método de extração constituído de etapas simples e rápidas. Porém, algumas matrizes complexas necessitam de um cuidado maior durante o processo de extração. Matrizes com altos teores de água, corantes e gordura, fazem com que o método QuEChERS tradicional, torna-se ineficaz na extração de OCPs (PERESTRELO et al., 2019). Sendo assim, houve a necessidade de adaptações ao método QuEChERS original, para que o mesmo pudesse atender uma quantidade maior de matrizes.

A adição de carvão ativado como um sorvente durante o processo de *clean up*, foi avaliada na análise de matrizes com altos teores de gordura, como tecido de peixe do Rio Júca na Espanha. No mesmo estudo foi utilizada água ultrapura durante o processo de extração com acetonitrila. Os procedimentos adotados geraram recuperações de 50 – 150% para 40 pesticidas, na faixa de concentração de 0,18 – 518,9 ngg^{-1} (BELENGUER et al., 2014).

Alterações na quantidade de amostra, de 10 g do método original para 5 g, foi uma proposta realizada em um estudo com tecido de tilápia (*Tilapia cf. rendalli*), tetra (*Astyanax sp.*) e traira (*Hoplias malabaricus*). Durante a etapa de extração a acidificação com ácido acético do solvente acetonitrila para aumento da força iônica do meio, também foi avaliada. A partir das alterações realizadas, os autores obtiveram recuperações de 72 – 95% para 14 pesticidas na concentração de 100 mg L^{-1} (ROCHA et al., 2015).

Uma mistura de zircônia e óxido de ferro III ($\text{m-ZrO}_2@Fe_3O_4$), foi utilizada como co-adsorvente alternativo na etapa de *clean up* na extração de 60 pesticidas de músculo de peixes. Como resultado da adição de $\text{m-ZrO}_2@Fe_3O_4$, foram obtidos índices de recuperação de 69,8 – 117,1% para os pesticidas em concentrações de 10 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PENG et al., 2015). Morrison e colaboradores (2016) realizaram a etapa de *clean up* padrão do método QuEChERS original duas vezes para eficácia da limpeza da amostra, com isto, alcançaram, recuperações 33 de pesticidas entre 60 – 107%, na extração realizada em tecido de Esturjão-branco (*Huso Huso*).

Estudos realizados em alimentos de origem animal como ovo e leite, desenvolvidos a partir de um planejamento fatorial, para redução da quantidade de amostra e utilização de

alguns sais na etapa *clean up*, obtiveram recuperações de 61- 120,21% para pesticidas em concentração de 2 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. (ZHENG et al., 2017).

Dentre as diversas matrizes existentes, o tecido de peixe é muito utilizado para análise de pesticidas organoclorados através método QhEChERS. Porém a alta lipofilicidade destes compostos, faz com que os OCPs tenham uma interação forte com a gordura presente neste tipo de matriz. Pensando nestas características foram realizadas modificações recentes ao método QuEChERS, propostas por Stremel e colaboradores (2017), na determinação dos OCPs DDT, DDE, aldrin, dieldrin, endosulfan, endosulfan sulfato em tecido de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os autores adaptaram uma etapa de sonicação por ultrassom para maior interação do solvente juntamente, aumentando a remoção do analito da matriz. Por consequência desta maior interação, foi possível também reduzir a quantidade de amostra, de 10g do método original para 0,5g, assim como a quantidade de solvente de 10 mL para 9,2 mL. Stremel e colaboradores (2017) obtiveram níveis de recuperação de 77,3 – 110,8% para os pesticidas na faixa de concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando que a metodologia é eficaz para a extração destes analitos em matrizes complexas e com pouca disponibilidade de tecidos para análise.

Vários estudos demonstram a eficiência na alteração e implementação de etapas que compõem o método QuEChERS, gerando altas recuperações, diminuindo custo e tempo, em comparação com os demais métodos de extração encontrados na literatura, tornando o método QuEChERS um dos mais utilizados (PERESTRELO et al., 2019).

Com o intuito de diminuir custo, assim como gerar menos resíduos, o presente estudo, propõem a utilização de uma etapa de partição a baixa temperatura durante o processo de *clean up* para a extração por QuEChERS, como substituição ou diminuição das quantidades do sorvente C_{18} , assim como a eliminação da etapa rotaevaporação das amostras e diminuição de quantidades de sais de extração e solventes.

2.4 BAIXA TEMPERATURA

A Baixa temperatura é uma etapa utilizada na extração e no processo o *clean up*, baseado no congelamento da amostra. Tem sido um referencial em metodologias de extração que envolvem matrizes com altos teores de gordura, isso porque, com o congelamento, a gordura e lipídeos sedimentam, fazendo com que os analitos fiquem imersos na fase extratora orgânica contendo o solvente, porém, ainda é muito pouco utilizada e explorada (NÁCHER-

MESTRE et al., 2014). Esta separação é possível por conta da diferença entre o ponto de fusão dos ácidos graxos que compõem a gordura e o ponto de fusão dos analitos.

De modo geral, neste processo, a fase extratora juntamente aos analitos é submetida a uma determinada temperatura, por um tempo pré-estipulado, para que haja o completo congelamento da gordura contida na matriz, e a suspensão do analito na fase extratora (HE et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

A adaptação da partição a baixa temperatura, pode variar dependendo da matriz, dos sais de *clean up* ou do método ao qual está sendo empregado. Na literatura encontram-se testes em dois tipos diferentes de métodos de extração, baseados no método QuEChERS, para análise dos pesticidas como DDT e DDE em tecido de carpa (*Cyprinus carpio*) e esturjão (*Acipenseridae*). Um dos métodos continha uma etapa de congelamento e adição de C₁₈ e a outra contava com a ausência do C₁₈. Os índices de recuperação obtidos a partir destes dois métodos encontram-se na faixa de 42 – 90% para o método sem adição de C₁₈, e de 61 – 122% para o método com adição de C₁₈. Os autores concluem que a retirada do C₁₈ pode ser aplicada ao método sem que o mesmo perca eficácia de extração, uma vez que as faixas de recuperação não estão tão discrepantes entre os dois métodos testados (MOLINA-RUIZ et al., 2015).

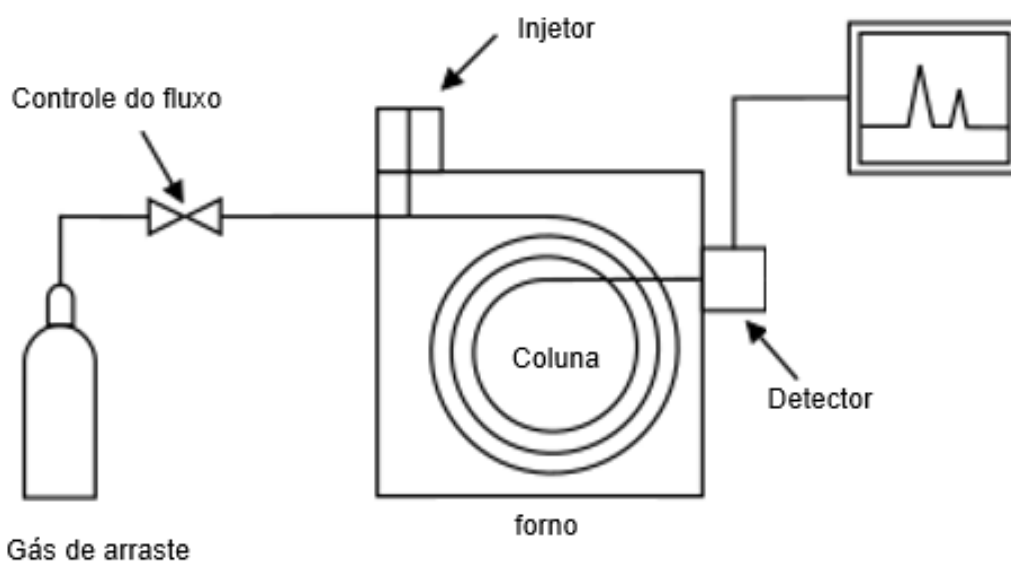
Outros trabalhos trazem a combinação do método QuEChERS ao método de micro extração Líquido-Líquido como proposta para o planejamento e adaptação de uma partição a baixa temperatura, na extração de OCPs. Os autores mantiveram as proporções originais de solventes e sorventes, mas por consequência da quantidade de gordura da amostra, uma sonicação em ultrassom foi utilizada para que houvesse melhor interação do solvente com a matriz. A fase orgânica foi congelada, para separação dos analitos de quaisquer quantidades de água e gordura. Após determinação, os níveis de recuperação obtidos foram de 81,1 - 121,2% demonstrando a eficácia do método de extração utilizando a adaptação do método QuEChERS a outros método associados a baixa temperatura (WANG et al., 2017).

Outro método adaptado é a separação de fase aquosa em acetonitrila com indução ao frio, onde é utilizada a baixa temperatura para separação de fases durante o processo de extração. A temperatura escolhida neste caso foi de -16°C por 3 horas. As amostras, de tecido de salmão foram submetidas ao mesmo procedimento de análise QuEChERS tradicional, mas com a partição a baixa temperatura para que houvesse uma melhor extração dos pesticidas da gordura contida na matriz (SHAO; AGAR; GIESE, 2017).

2.5 DETERMINAÇÃO DE ORGACLORADOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS

A cromatografia a gás (CG) é composta por três etapas: injeção, separação e detecção (Figura 16). Na injeção a amostra é sugada por uma agulha e levada ao equipamento, sendo assim injetada ao cromatógrafo seguindo para uma coluna. As colunas variam de comprimento, diâmetro e composição, sendo desenvolvidas para componentes diferentes. Na coluna ocorre a segunda etapa, que é a volatilização e separação da amostra. Esta coluna fica localizada dentro de um forno, o qual auxilia nos processos que ocorrem no interior da mesma, este forno é controlado por uma rampa de aquecimento. A terceira e última etapa, ocorre assim que a amostra sai da coluna e chega ao detector. O tempo que leva para a finalização deste processo, varia conforme as características da coluna e da interação da mesma com os analítos presentes; este tempo é denominado de tempo de retenção (R). Quando adentram ao detector os analítos são tratados de diferentes formas, dependendo de qual detector está acoplado ao cromatógrafo (TECHNOLOGIES, 2010). A GC é comumente utilizada em várias pesquisas envolvendo a extração de OCPs de matrizes complexas. O CG pode ter diferentes detectores, mas o espectrômetro de massa (Mass Spectrometer - MS) e o detector de captura de elétrons (Electron Capture Detector - ECD) são os mais utilizados na análise de OCPs (PENG et al., 2015; SHAO; AGAR; GIESE, 2017; STREMEL et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Figura 16 – Sistema cromatográfico.



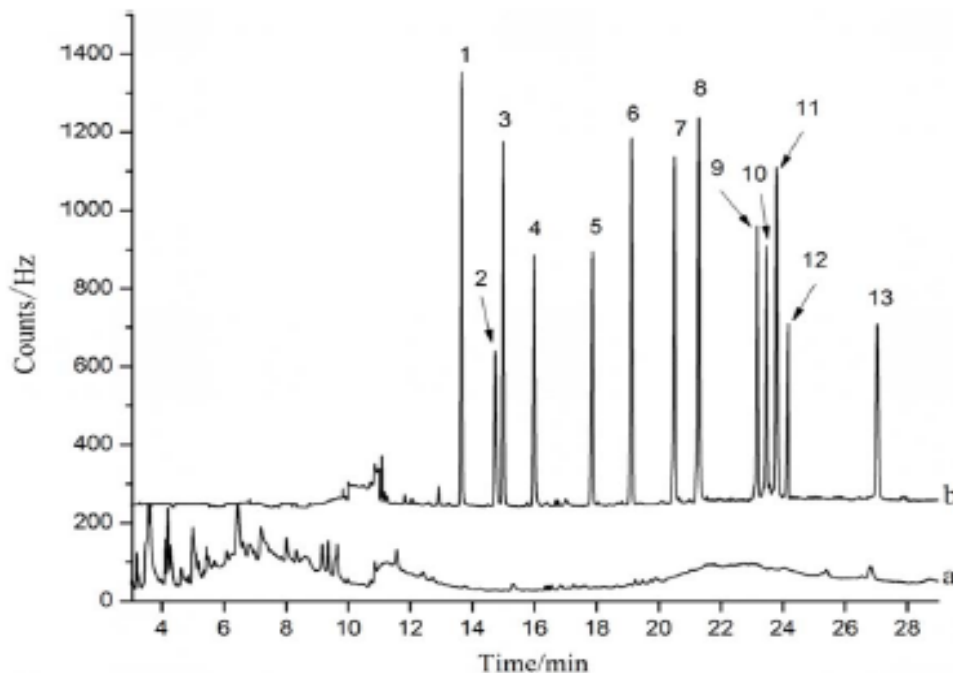
Fonte: (THOMAS; HAIDER 2013).

Em vários estudos utilizando a extração de OCPs pelo método QuEChERS, é empregada a detecção por GC-ECD (Cromatógrafo à gás acoplado ao detector de captura de elétrons) (PAZ et al., 2017; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2017; WILKOWSKA; BIZIUK, 2010; ZHAO, 2014). No detector de captura de elétron (ECD), tem-se um fluxo contínuo de elétrons que é estabelecido entre um ânodo e um cátodo de uma fonte radioativa β . Este fluxo faz com que os elétrons mais lentos sejam absorvidos na presença de uma corrente, resultando em uma supressão da mesma. O decréscimo de elétrons que é fluído é proporcional a concentração da espécie no gás de arraste, gerando então uma resposta do aparelho para aquela medida realizada (SKOOG, 1998).

A utilização destes equipamentos para determinação de OCPs se deve a algumas características dos compostos a serem analisados, assim como do equipamento que é utilizado. A cromatografia a gás, possui um sistema operacional robusto gerando resultados seguros acima do objeto de trabalho e com alta sensibilidade e seletividade (CHORMEY; FIRAT; BAKIRDERE, 2020; MORRISON et al., 2016; PENG et al., 2015; SHAO; AGAR; GIESE, 2017; STREMEL et al., 2017; WANG et al., 2017). A faixa de detecção de um detector é de 10^{-9} g (para o MS) e 10^{-12} g (para o ECD) aproximadamente, podendo assim trabalhar com elementos a nível traço em parte por milhão (ppm) e parte por bilhão (ppb) respectivamente (CHORMEY; FIRAT; BAKIRDERE, 2020; MAO et al., 2018). Essa característica é de extrema importância quando se trabalha com matrizes complexas e ambientais como o tecido de peixe, visto que os níveis de contaminação nesses casos são baixos tornando difícil a detecção por outros equipamentos com níveis de detecção elevados (NÁCHER-MESTRE et al., 2014; NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE, 2011; STREMEL et al., 2017).

A sensibilidade e seletividade deste tipo de equipamento pode ser observada na Figura 17, na qual encontra-se dois cromatogramas obtidos a partir da extração, com e sem a adição de padrões de pesticidas, de uma amostra de peixe gato. A metodologia utilizada foi a QuEChERS associada à micro extração dispersiva líquido-líquido (WANG et al., 2017). Esta sensibilidade e seletividade garantem a não sobreposição de picos de dois ou mais padrões, facilitando a análise dos resultados obtidos nos cromatogramas, isto ocorre por consequência de cada analito possuir um tempo de retenção específico com a fase estacionária.

Figura 17 – Cromatograma de amostra de peixe-gato (a) e corrida de amostra de peixe-gato (b) 1: α -BHC, 2: IC, 3: γ -BHC, 4: δ -BHC, 5: heptacloro, 6: aldrin, 7: heptacloro epoxido, 8: α -cloridano, 9: endrin, 10: β -endosulfan, 11: p, p' -DDD, 12: aldeído endrina, 13: endima cetona.



Fonte: (WANG et al., 2017).

2.6 QUIMIOMETRIA

Diversos fatores como, temperatura externa, condições cromatográficas, quantidade de solvente, quantidade de sorvente, características intrínsecas do analito, entre outras, podem interferir durante uma análise. Em muitos casos há necessidade da adaptação destes fatores, para que permeiem a idealidade da metodologia proposta, gerando resultados válidos e seguros. Desta forma, o controle dessas variáveis é imprescindível para o bom desempenho de um método (GOULART, 2017).

A avaliação dos fatores que podem interferir nos resultados da metodologia é realizada através do desenvolvimento de experimentos contendo combinações destas variáveis. Existem tipos de análises que levam em consideração apenas a variação de um fator e a fixação dos demais a serem analisados, a estas análises dá-se o nome de univariadas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Análises univariadas são encontradas na literatura associadas a modificações ao método QuEChERS, como na avaliação do tempo de adsorção, e quantidades dos adsorventes m-ZrO₂@Fe₃O₄ e Fe₃O₄-OPA (PENG et al., 2015); na avaliação da utilização do sorvente C₁₈, juntamente a quantidades de sorventes (PSA+SAX+NH₂), adição de uma etapa a baixa temperatura (MOLINA-RUIZ et al., 2015) e condições cromatográficas (NARDELLI et al., 2010), por exemplo.

Oliveira et. al 2019 desenvolveu 3 procedimentos (A, B e C), para avaliar a possível inserção da baixa temperatura ao método QuEChERS. No procedimento A os autores modificam fatores como adição de água e aumentam a quantidade de $MgSO_4$ (4 g final) na etapa de extração, já na etapa de limpeza, os mesmos adicionam a baixa temperatura e aumentam a quantidade de $MgSO_4$ (1.5 g final). No procedimento B os autores adicionaram 5 g de florissil, eliminaram a água e diminuíram a quantidade de $MgSO_4$ (1 g final) na extração, na limpeza da amostra, os mesmos eliminaram a etapa de congelamento e diminuíram a quantidade de $MgSO_4$ (0,75 g final). O procedimento C segue semelhante ao B porém com a diminuição da quantidade de amostra. Os autores discutem os resultados acima das análises univariadas desenvolvidas, chegando a recuperações dos analitos entre 88 – 135% para o procedimento A, 95 – 113% para o procedimento B e 84 – 112% para o procedimento C (OLIVEIRA et al., 2019).

A análise de duas ou mais variáveis fornece um planejamento fatorial de matriz 2^k , onde k diz respeito ao número de variáveis analisadas, a estas denominam-se análises multivariadas. Para a variação de 2 fatores, têm-se uma matriz 2^2 com 4 experimentos, enquanto uma matriz contendo 3 fatores gera um planejamento 2^3 com 8 experimentos, e assim consecutivamente. Estes planejamentos geram resultados acerca de cada fator trabalhado assim como das interações entre os mesmos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). A utilização de análises multivariadas associadas ao método QuEChERS, é encontrada na literatura para avaliação da alteração da quantidade de solvente, tempo da etapa de ultrassom associada ao método, e quantidades de NaOH (hidróxido de sódio) utilizadas junto ao ultrassom para desprotonação (CHORMEY; FIRAT; BAKIRDERE, 2020), assim como para avaliação do tipo de solvente utilizado e quantidade dos mesmos, quantidade de amostra, e quantidades de sais de limpeza como C_{18} (STREMEL et al., 2017). Também é encontrada em estudos que avaliam a inserção da baixa temperatura ao método (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Para avaliação das modificações testadas ao método QuEChERS, neste trabalho foram desenvolvidos planejamentos do tipo univariados e multivariados, para avaliação da eliminação ou redução das quantidades do sorvente C_{18} , diminuição do volume do solvente e sais de extração e eliminação da etapa de rotaevaporação do método. Os resultados de recuperações dos experimentos de cada planejamento foram levados em consideração na avaliação dos planejamentos gerados, para identificação dos fatores que mais contribuem a metodologia QuEChERS, para extração de organoclorados em tecido muscular de peixe.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Propor modificações ao método QuEChERS para extração de pesticidas organoclorados em amostras de músculo de peixes, com quantificação por GC-ECD.

3.2 ESPECÍFICOS

-Reduzir as quantidades de sorvente Na_2SO_4 , MgSO_4 , NaCl e C_{18} , na extração por QuEChERS modificado;

-Inserir uma etapa de extração a baixa temperatura ao método QuEChERS modificado;

-Diminuir o volume da mistura de solvente acetona/hexano na extração por QuEChERS;

-Estudar a retirada da etapa de rotaevaporação do método QuEChERS modificado proposto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA BRANCO

Em todas as etapas da otimização e validação utilizou-se como matriz, tecido de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Figura 18), coletada em local preservado. O animal foi congelado até o momento de análise. O músculo do indivíduo foi separado das vísceras e descamado, logo em seguida foi triturado em processador para obtenção de uma mistura homogênea (Figura 19), e armazenado até o momento da análise sob temperatura de -17°C em um recipiente de polipropileno.

Figura 18 – Animal utilizado como branco para fortificação e extração de surrogate.



Fonte: (O autor).

Figura 19 – Tecido muscular de peixe



Fonte: (O autor).

4.2 PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO

Para otimização do método, utilizou-se surrogate, que é composto por um padrão de substituição decaclorobifenil dos analítos. A utilização de padrões surrogate para etapas de otimização e validação, é indicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

(EPA), uma vez que estes padrões são similares aos analítos de interesse, mas não são encontrados ambientalmente, e sim sintetizados (USEPA, 2007).

O padrão surrogate obtido da SUPELCO, foi preparado a partir de 2 mL de uma solução de 200 mgL⁻¹ em acetona. Destes 2 mL, foram preparados 10 mL de uma solução padrão de concentração 40.10⁻³ µgL⁻¹, em acetona grau HPLC. Esta solução foi mantida em estoque e a partir dela, foi preparada 10 mL de uma solução de concentração 4.10⁻³ µgL⁻¹ também em acetona grau HPLC. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar vedados em temperatura de -17°C.

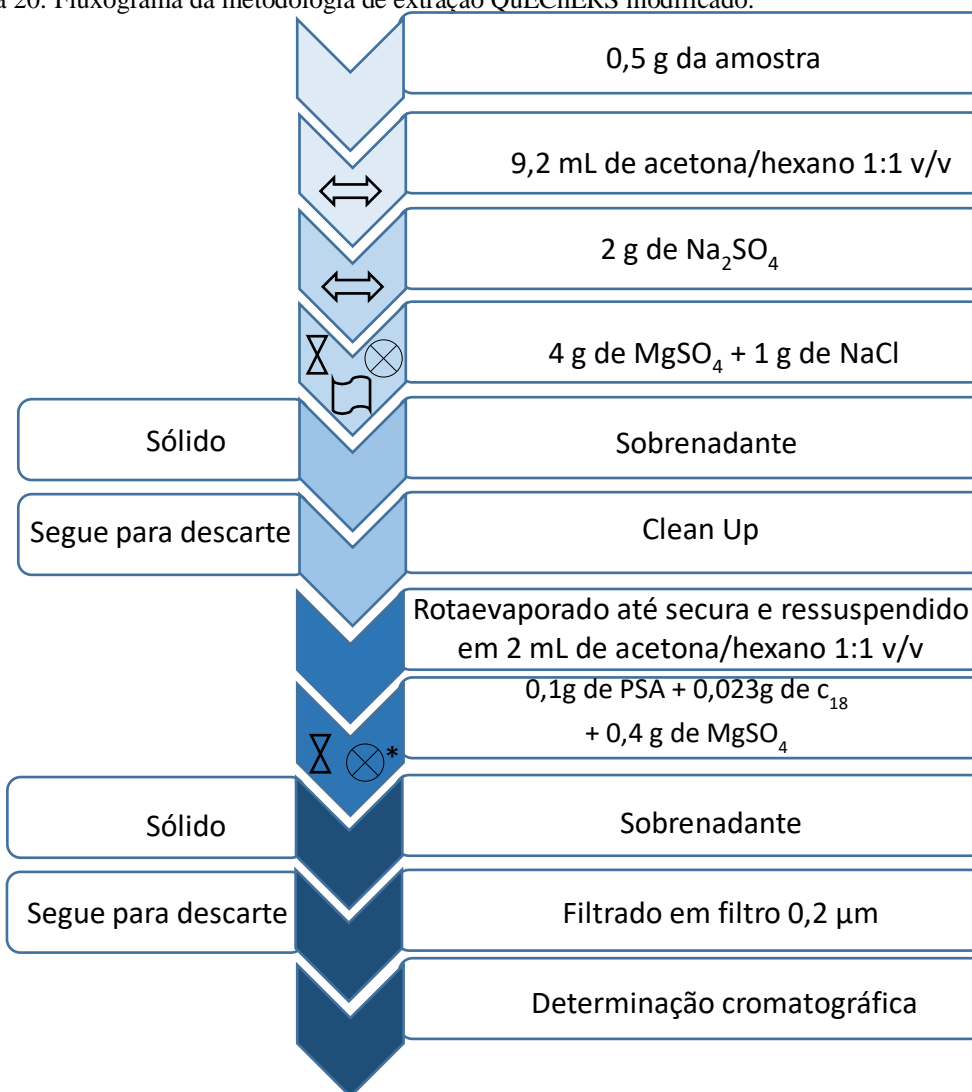
4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO PROPOSTO






Para o estudo de extração foi empregado o método QuEChERS modificado por Stremel e colaboradores (2017), onde 0,5 g de tecido de peixe, previamente triturado, foi adicionado em tubos falcon de 15 mL. A estes tubos foram adicionados 9,2 mL de uma mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v) seguido de agitação manual por 1 minuto.

A extração seguiu-se com a adição de 2g de Na₂SO₄ (sulfato de sódio) e agitação manual por 1 minuto, finalizando com a adição de 4 g de MgSO₄ (sulfato de magnésio) e 1 g de NaCl (cloreto de sódio). Após adição dos sais, a mistura foi submetida a outro processo de agitação por vórtex durante um minuto, seguida de sonicação em ultrassom por 10 minutos e centrifugação em ultra centrífuga por 10 min a 4000 rpm a uma temperatura de -4°C.

A etapa de limpeza da amostra foi realizada através de um *clean up*, onde o sobrenadante foi previamente retirado da mistura inicial, rotaevaporado a secura e ressuspendido em 2 mL da mesma mistura acetona/hexano (1:1 v/v) em um tubo falcon de 15 mL. A esta mistura, foram adicionados os sais PSA (amina primária secundária), C₁₈ e MgSO₄, que compõem a etapa *clean up*, seguido de agitação por vórtex por um minuto, e centrifugação em ultra centrífuga a -4°C por 10 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi então retirado e filtrado em filtro de nylon 0,02 µm, após filtração, o filtrado foi condicionado em um vial de 2 mL para determinação cromatográfica. A figura 20 mostra um fluxograma das etapas do método.

Figura 20: Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado.



-  Agitação manual 1 min
-  Ultrassom 10 min
-  Agitação em Vortéx 1min
-  Centrifugação 10 min/ 4000 RPM/ 4°C
-  Centrifugação 10 min/ 5000 RPM/ 4°C

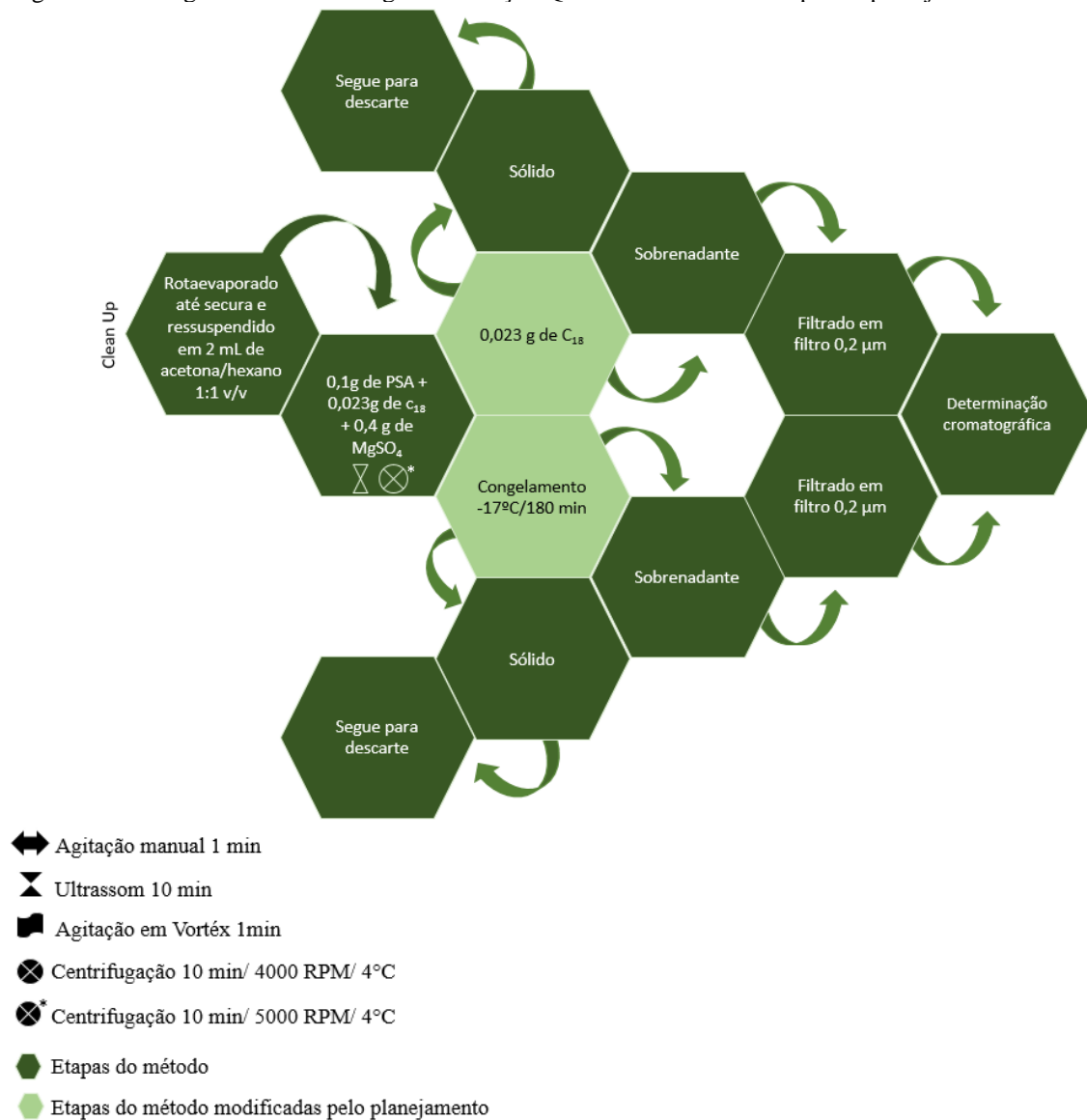
Fonte: (STREMEL et al., 2017).

Para o desenvolvimento das etapas da otimização foram preparadas soluções a partir do padrão surrogate decaclorobifenil, nas concentrações de 5 a 400 µg L⁻¹, para construção de uma curva analítica e avaliação da linearidade.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP UTILIZANDO A PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA

O objetivo inicial da otimização foi a eliminação do sorvente C_{18} , utilizado na etapa de *clean up*. Para isso, uma etapa de partição a baixa temperatura foi avaliada como possível substituição a este sorvente (figura 21), uma vez que estudos apontam como viável esta substituição, apresentando níveis de recuperações aceitáveis e por consequência a diminuição de custos do método pela eliminação do sorvente (MOLINA-RUIZ et al., 2015; WANG et al., 2017). Para isto, um planejamento 2^2 foi desenvolvido para avaliação destes dois fatores (tabela 4).

Figura 21: Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para o planejamento 2^2



Fonte: (O autor)

Tabela 4 – Planejamento fatorial 2² fatores codificados em C₁₈ (1 presença de C₁₈ / -1 ausência de C₁₈) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura).

Experimento	C ₁₈	Temperatura
1	1	1
2	-1	1
3	1	-1
4	-1	-1

Fonte: (O autor).

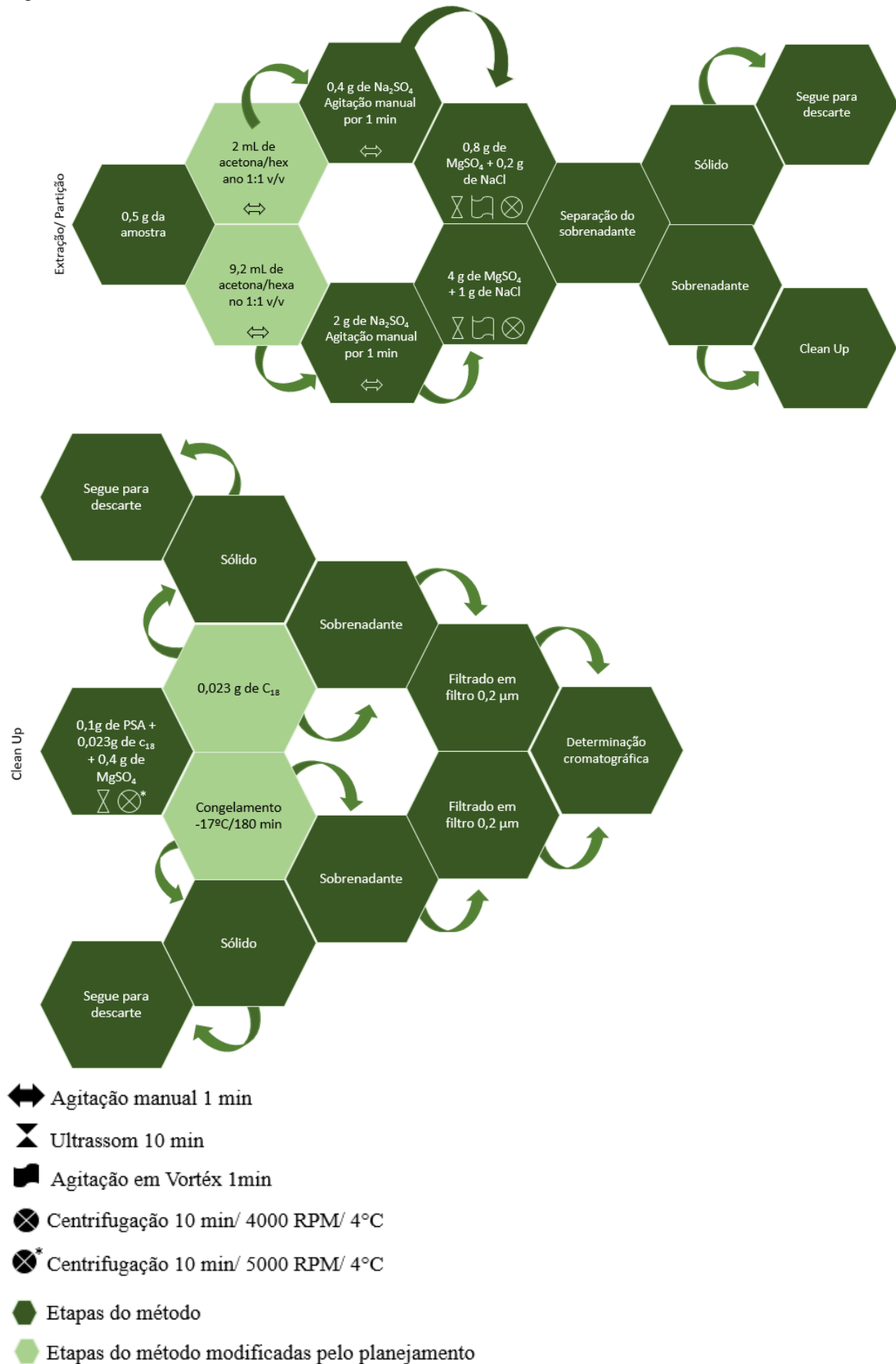
Neste primeiro planejamento, a metodologia foi alterada apenas na etapa de limpeza da amostra, onde no experimento 1 foi adicionada a etapa de congelamento da amostra; no experimento 2 foi substituído a utilização do C₁₈ pelo congelamento da amostra; o experimento 3 manteve-se nos padrões de extração do método proposto por Stremel e colaboradores 2017; e no experimento 4, tanto o C₁₈ quanto a baixa temperatura foram retirados da etapa de limpeza da amostra.

A temperatura de congelamento adotada nos experimentos que continham o fator baixa temperatura presente, foi de -17°C, esta temperatura foi obtida através de um refrigerador, previamente checado, sobre um tempo de congelamento de 180 minutos, uma média do que se encontra na literatura (PERESTRELO et al., 2019; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2017; WANG et al., 2017).

4.5 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR E ELIMINAÇÃO DA ROTA-EVAPORAÇÃO

Um segundo planejamento fatorial, mostrado na Tabela 5 abaixo, foi empregada a ausência da rotaevaporação, para avaliação da diminuição da quantidade de tempo de extração, aumentando a eficiência do processo. A rotaevaporação utilizada, tem por finalidade a reconcentração da amostra em um volume menor de solvente. Para que isso pudesse ser viável, foi realizada a diminuição do volume do solvente (figura 22). Baseado no método de Stremel e colaboradores (2017), foi adotado como volume máximo, o volume utilizado na etapa inicial da extração (9,2 mL), e como volume mínimo, foi escolhido o volume de ressuspensão (2 mL), após a etapa de rotaevaporação do método proposto por Stremel e colaboradores (2017), porém, neste planejamento, a rotaevaporação foi retirada. Frente a modificação do volume, foi avaliada o comportamento da baixa temperatura, e do C₁₈.

Figura 22 - Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para o planejamento²³.



Fonte: (O autor)

Tabela 5 – Planejamento fatorial 2^3 fatores codificados em Temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura), C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e Volume do solvente (1 maior volume 9,2 mL e -1 menor volume 2 mL).

Experimento	Temperatura	C_{18}	Volume do solvente
1	-1	1	1
2	1	1	1
3	-1	-1	1
4	1	-1	1
5	-1	1	-1
6	1	1	-1
7	-1	-1	-1
8	1	-1	-1

Fonte: (O autor).

Com a diminuição do volume do solvente, os sais de extração Na_2SO_4 , $MgSO_4$ e $NaCl$, tiveram suas quantidades proporcionalmente reduzidas. Esta redução foi possível nos experimentos que continham o fator volume codificados como -1, onde o volume do solvente era equivalente a 2 mL. As quantidades dos sais Na_2SO_4 , $MgSO_4$ e $NaCl$, adotados a estes experimentos, foram respectivamente 0,4 g, 0,8 g e 0,2 g.

4.6 OTIMIZAÇÃO DA BAIXA TEMPERATURA FRENTE AOS FATORES C_{18} , VOLUME E ROTA-EVAPORAÇÃO FIXADOS

Um terceiro planejamento univariado, foi desenvolvido, fixando o volume do solvente no ponto médio entre os volumes máximo (9,2 mL) e mínimo (2 mL) do planejamento anterior, chegando a uma quantidade de 5,6 mL da mistura dos solventes acetona/hexano (1:1 v/v). Como consequência da diminuição da quantidade de solvente, os sais de extração Na_2SO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$ tiveram suas quantidades reduzidas proporcionalmente, para 1,2 g, 2,4 g, 0,6 g respectivamente. Neste planejamento, também foi fixada a etapa de rotaevaporação como ausente e a quantidade do sorvente C_{18} reduzida para 0,0115 g. A aplicação da partição à baixa temperatura foi avaliada como presente e ausente, para verificação da eficiência da etapa com a diminuição do volume do solvente, da quantidade do sorvente e ausência da rotaevaporação (figura 23). A Tabela 6 traz os dados da matriz dos experimentos da análise.

Figura 23 - Fluxograma da metodologia de extração QuEChERS modificado para o planejamento univariado.



- ↔ Agitação manual 1 min
- ⚡ Ultrassom 10 min
- 🌀 Agitação em Vortéx 1min
- ⊗ Centrifugação 10 min/ 4000 RPM/ 4°C
- ⊗* Centrifugação 10 min/ 5000 RPM/ 4°C
- 🟢 Etapas do método
- 🟡 Etapas do método modificadas pelo planejamento

Fonte: (O autor)

Tabela 6 – Análise univariada.

Experimento	Baixa temperatura	C18 (g)	Volume (mL)
1	Sem	0,0115	5,6
2	Sem	0,0115	5,6
3	Sem	0,0115	5,6
4	Com	0,0115	5,6
5	Com	0,0115	5,6
6	Com	0,0115	5,6

Fonte: (O autor).

Os resultados de recuperação dos experimentos foram analisados pelo software STATISTICA.

4.7 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS OCPs

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental e Qualidade da Água - (UNICENTRO). Para a realização da otimização e validação do método proposto foi utilizado um cromatografo a gás, contendo um detector de captura de elétrons (GC-ECD - Shimadzu GC-2014). A temperatura do injetor foi mantida a 300°C e do detector a 320°C. Foi utilizado Hélio como gás de arraste, a um fluxo de 2 mL min⁻¹ (STREMEL et al., 2017).

O volume de injeção no equipamento foi de 1 µL em modo *splitless*, com temperatura de injeção programada. Foi utilizada uma coluna capilar DB-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano) com dimensões 30 m x 0,25 mm com 0,25 µm de espessura de filme. O programa de temperatura do forno iniciou em 150°C, aumentando para 310°C a 10 °C min⁻¹ mantendo-se nessa temperatura durante 10 min (STREMEL et al., 2017).

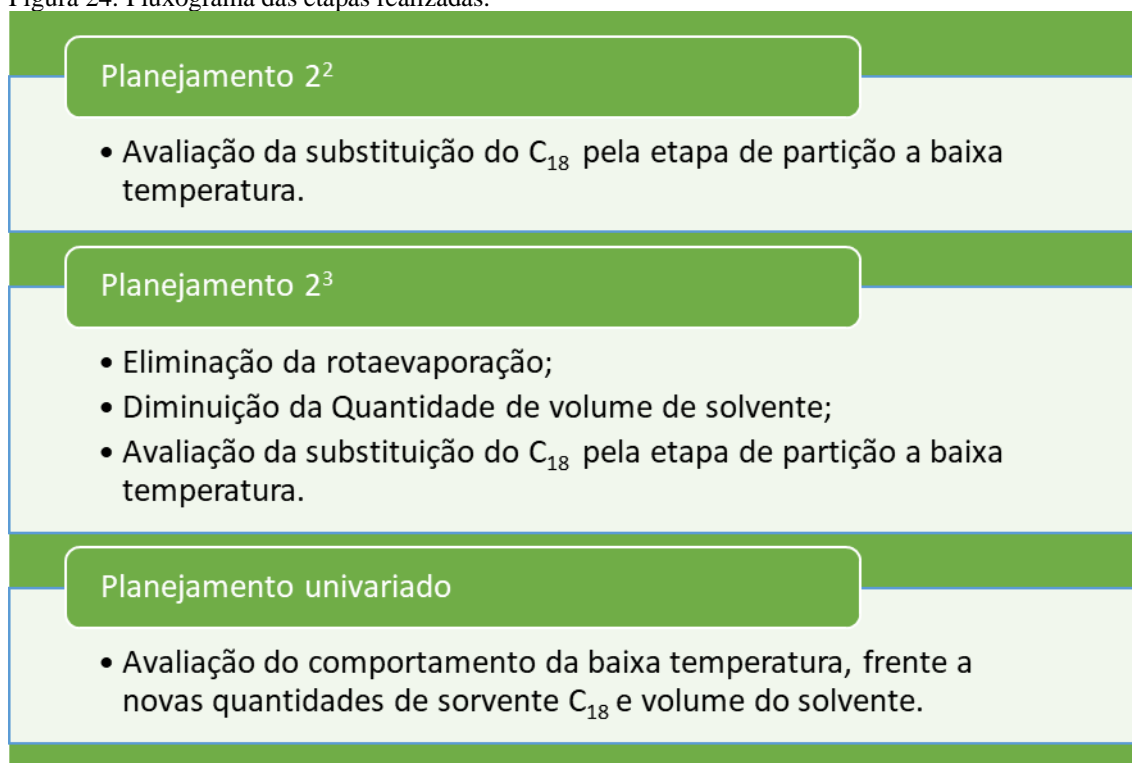
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPAS DA OTIMIZAÇÃO

Em todas as etapas foram utilizados planejamentos experimentais, e a avaliação da contribuição dos fatores avaliados em cada planejamento foi desenvolvido acima das recuperações obtidas nos experimentos. Uma curva analítica foi utilizada para que pudesse ser calculada a recuperação em cada caso, através da projeção da área do pico do cromatograma obtido no experimento, na equação da reta gerada a partir da construção da curva analítica.

As etapas que foram realizadas são mostradas no fluxograma a seguir (figura 24), em ordem de realização, as mesmas são discutidas no texto na ordem que aparecem no fluxograma.

Figura 24: Fluxograma das etapas realizadas.

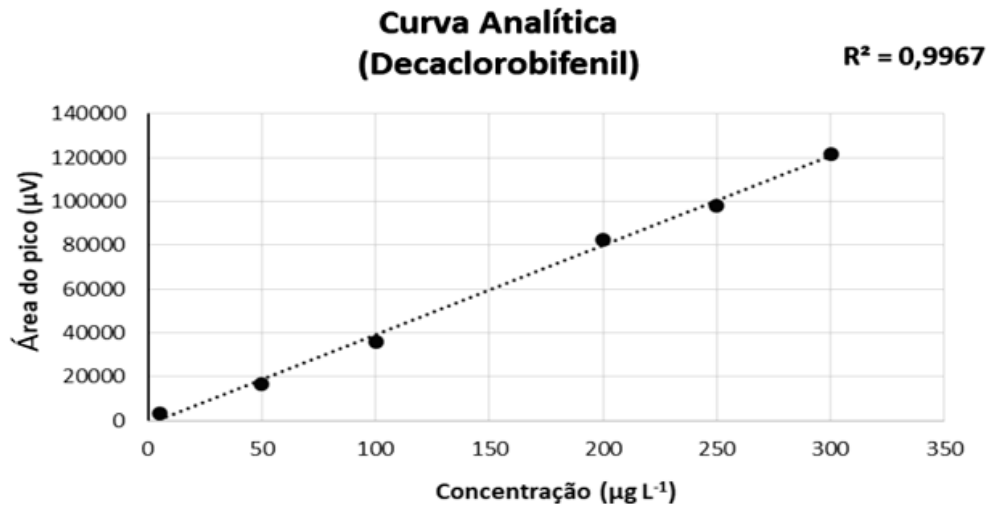


Fonte: (O autor)

5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

A partir das soluções do padrão surrogate (decaclorobifenil), foi construída uma curva analítica de padrão externo (Figura 25).

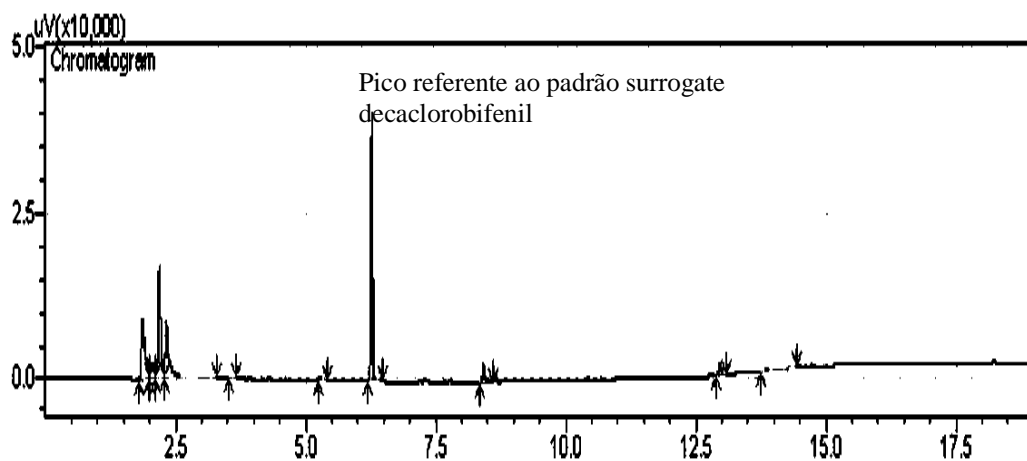
Figura 25 – Curva analítica do padrão decaclorobifenil



Fonte: (O autor).

A linearidade entre os pontos, na construção da curva analítica, gerou um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9967, o que condiz com um valor aceitável, uma vez que valores $>96\%$ garantem uma correlação entre os valores experimentais e os valores previstos (CHORMEY; FIRAT; BAKIRDERE, 2020; DE OLIVEIRA et al., 2019).

A Figura 26 apresenta um dos cromatogramas obtidos na determinação das soluções analisadas para construção da curva.

Figura 26 – Cromatograma do surrogate decaclorobifenil de 300 ugL⁻¹.

Fonte: (O autor).

O pico referente ao tempo de retenção aproximado de 6,9 min, observado no cromatograma 22, refere-se ao padrão surrogate decaclorobifenil utilizado em todas os planejamentos. Os pontos observados anteriormente ao tempo de retenção de 2,5 min, são referentes a mistura de solvente acetona/hexano 1:1 (v/v) utilizado.

A faixa de trabalho escolhidas para a construção da curva analítica ($5 - 400 \mu\text{g L}^{-1}$) foi estabelecida com base no método proposto por Stremel e colaboradores (2017). Esta faixa foi utilizada para construção da curva e também para o desenvolvimento dos planejamentos para avaliação das adaptações ao método, os quais contaram com a fortificação no ponto médio da faixa, referente a $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP UTILIZANDO A PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA

Como o objetivo inicial do estudo era a substituição do sorvente C_{18} , pela partição a baixa temperatura, o primeiro planejamento foi desenvolvido acima da etapa de *clean up* da amostra. A Tabela 7 traz os resultados obtidos após a realização da extração e determinação cromatográfica de cada experimento que compõem o planejamento. As recuperações obtidas, foram calculadas, a partir da projeção das áreas dos picos apresentados nos cromatogramas de cada experimento, utilizando a equação da reta obtida a partir da curva analítica.

Tabela 7 – Planejamento fatorial 2^3 fatores codificados em Temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura), C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}).

Experimento	C_{18}	Temperatura	Recuperação	Média $\pm S$
1	1	1	62,14	57,52 \pm 16,18
2	1	1	70,89	
3	1	1	39,52	
4	1	-1	73,25	72,01 \pm 1,07
5	1	-1	71,39	
6	1	-1	71,39	
7	-1	1	75,20	85,85 \pm 10,64
8	-1	1	96,50	
9	-1	1	85,85	
10	-1	-1	30,84	63,57 \pm 29,12
11	-1	-1	86,65	
12	-1	-1	73,22	

Fonte: (O autor).

Como observado na Tabela 7, o grupo de dados com maior recuperação (faixa de 75,20 – 96,50%) representa os experimentos 7, 8, 9, que contém a presença da baixa temperatura no método proposto, evidenciando que a temperatura é eficiente na remoção de OCPs de tecidos gordurosos. Porém, a segunda série de dados que gerou maior recuperação (faixa de 71,39 – 73,25), mostra que o C_{18} não pode ser simplesmente descartado da extração, ou seja, o C_{18} também é importante para a extração destes compostos de matrizes com lipídeos. Segundo as Diretrizes e Requisitos para Padronização de Método, disponibilizado pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), os níveis de recuperação aceitáveis para elementos

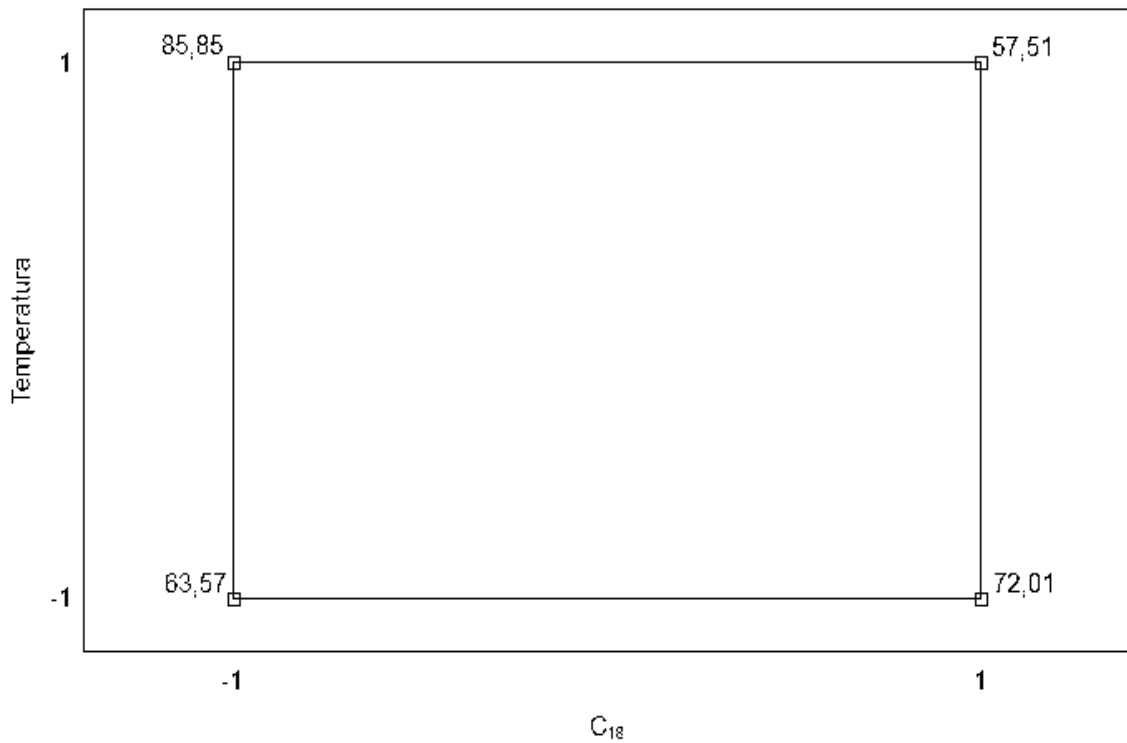
traço, na ordem de ppb, vão de 70 – 120%, evidenciando que os valores de recuperação estão dentro da média proposta para a faixa de concentração (PAEZ, 2016).

Em alguns estudos são encontrados resultados da adaptação da baixa temperatura ao método QuEChERS, com recuperações de 87,2 – 108,1% para tecido de carpa (WANG et al., 2017). Em outro estudo, o qual também foi avaliada a retirada do sorvente C₁₈ pela adição da baixa temperatura, obteve-se recuperação de 50 – 115% (NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE, 2011). A diferença entre os dois estudos é que Wang e colaboradores (2017), utilizou um banho de gelo para congelar a amostra, sem definição da quantidade de tempo a qual foi submetida este procedimento, enquanto Norli e colaboradores (2011), congelaram as amostras em uma temperatura específica de -24°C por 2 horas. Os dois estudos trazem a presença da baixa temperatura, porém demandando de um controle de temperatura muito maior em um dos casos e no outro não teve controle de temperatura específico. No método proposto nesse estudo, foi utilizado um refrigerador com capacidade de alcance de temperatura de -17°C, diminuindo a complexidade do método e certificando-se da temperatura de congelamento das amostras.

Essa eficácia da limpeza da amostra pela baixa temperatura, está relacionada com a diferença de ponto de fusão dos OCPs em relação a gordura presente na amostra (CHEN et al., 2009; FLORES et al., 2004). A uma temperatura, de -17°C, os OCPs, não atingem seus pontos de fusão, ficando suspensos em solução orgânica. Entretanto, apesar da eficiência, a remoção dos lipídeos não é completa, fazendo com que haja uma etapa extra a ser adicionada ao método para total remoção do analito da gordura (CHEN et al., 2009), esta etapa geralmente é composta pela mistura dos sorventes PSA e C₁₈ em quantidades diferentes.

Na Figura 27, são apresentados os valores de recuperação em um gráfico da média das porcentagens, em relação ao nível (-1 ou 1) de cada fator, mais influente. Obtêm-se, a partir deste, uma resposta sobre a região que possui maior representatividade ao método e que deve ser avaliada para seu aprimoramento.

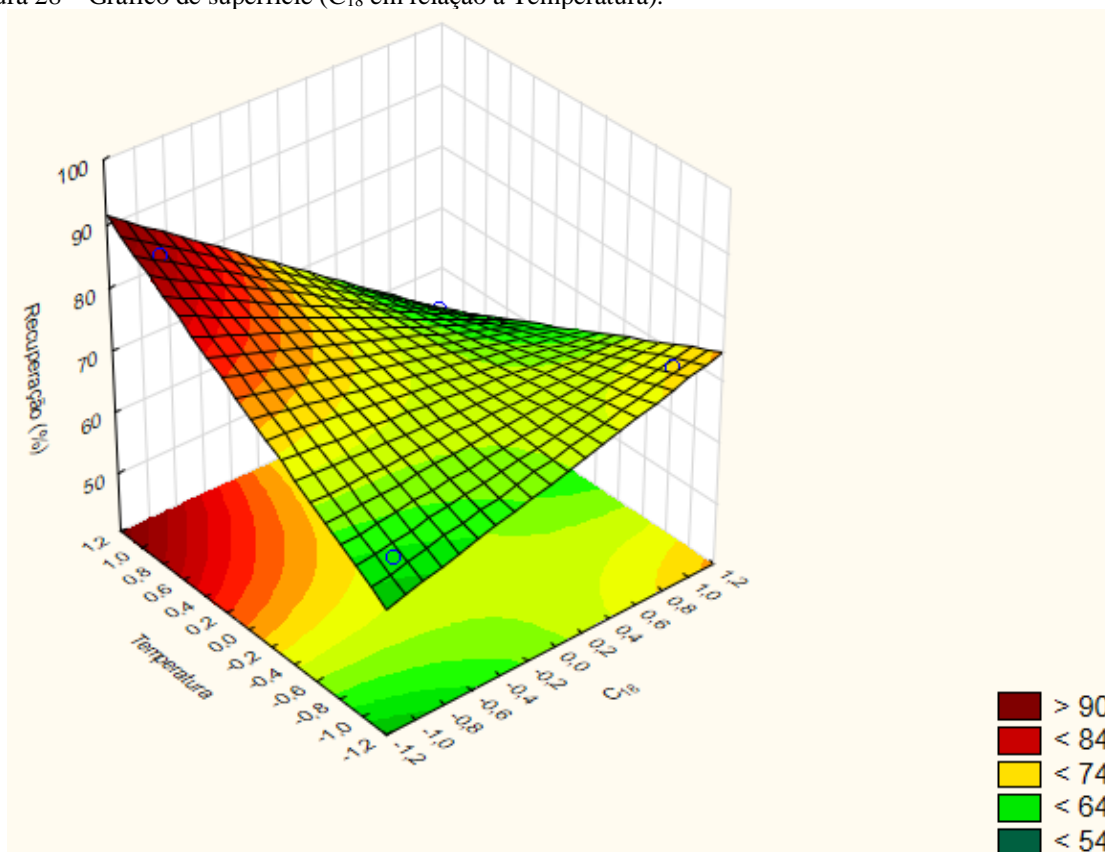
Figura 27 – Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura).



Fonte: (O autor).

Na análise do gráfico das médias, observa-se que o planejamento está direcionado (com maior percentual de recuperações) para a extremidade superior esquerda (85,85%), a qual refere-se aos experimentos que contém a baixa temperatura como parte da etapa de *clean up* da amostra. A segunda maior média das recuperações, está localizada no canto inferior direito (72,01%), representando a parcela de experimentos que contém o C_{18} como parte da etapa de *clean up*. Este efeito pode ser melhor observado através do gráfico de superfície gerado para o planejamento apresentado na Figura 28 abaixo.

Figura 28 – Gráfico de superfície (C_{18} em relação a Temperatura).



Fonte: (O autor).

A partir do gráfico de superfície, observa-se que a região mais significativa (região que contém uma maior intensidade na coloração avermelhada), condiz com a região onde encontra-se a presença da baixa temperatura na extração. Enquanto a região que contém o C_{18} , procede com significância inferior que a apresentada pela baixa temperatura.

Pode-se observar que mesmo a baixa temperatura garantindo uma boa recuperação ao método, o C_{18} se faz presente no auxílio da limpeza da amostra, isto porque o C_{18} possui capacidade de se associar a lipídeos da amostra facilmente, liberando os analítos associados a eles. Por consequência desta característica vários autores trazem a utilização do C_{18} implementado ao método QuEChERS na etapa de limpeza da amostra (PERESTRELO et al., 2019). Shao e colaboradores (2017), estudaram a comparação do método QuEChERS com e sem adição da baixa temperatura, com um total de 47 pesticidas, entre estes pesticidas, as recuperações alcançadas pelos pesquisadores foram de 23 – 97% para o método QuEChERS e 25 – 98% para o método QuEChERS associado a baixa temperatura. Apesar das recuperações possuírem uma faixa semelhante, dos 47 pesticidas 23 foram detectados pelo método QuEChERS e 42 foram detectados pelo método QuEChERS associado a baixa temperatura.

Os autores enfatizam que a baixa temperatura associada ao método QuEChERS é promissora na extração de pesticidas de tecido de peixe.

Molina-Ruiz e colaboradores (2015) compararam a eficiência do método QuEChERS modificado com e sem a adição da baixa temperatura, na extração de 24 pesticidas de tecido de carpa (*Cyprinus carpio*). Os resultados de recuperações obtidos nos dois casos foram de 42 – 80% (com uma média de 64,7% de recuperação entre os 24 pesticidas), para o método que utiliza apenas a baixa temperatura, sem adição do C₁₈, e de 63 – 93% (com uma média de 78,5% de recuperação entre os 24 pesticidas) para o método que utiliza a baixa temperatura associada a quantidades de C₁₈. Estes resultados demonstram que ambos os fatores são de grande importância para o desenvolvimento do método.

Com base nos resultados obtidos, onde tanto a utilização do C₁₈ quanto da baixa temperatura, foram eficazes na limpeza da amostra, tornou-se necessário a exploração de outros fatores para que a eliminação ou diminuição do C₁₈ fosse alcançada levando a uma diminuição do custo do método proposto.

O segundo planejamento foi baseado na eliminação da etapa de rotaevaporação do método, fixando este fator como ausente em todos os experimentos. A eliminação desta etapa foi proposta por consequência da utilização da temperatura, para que as amostras sejam rotaevaporadas, necessita-se de um banho maria, com temperatura superior a temperatura ambiente, esta é usada para aluição total do solvente, porém, esta mesma temperatura, pode fazer com que os analitos sejam também evaporados ou degradem, levando a diminuição da concentração dos mesmos (FLORES et al., 2004; STREMEL et al., 2017).

Para que a eliminação da rotaevaporação fosse possível, o volume do solvente também foi alterado, baseado na proposta de Stremel e colaboradores (2017), onde se tem dois momentos que utilizam quantidades de solvente, um momento inicial de extração, contando com o volume de 9,2 mL e um volume de rotaevaporação de 2 mL. Estes dois volumes foram então fixados como máximo e mínimo no planejamento a seguir.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA DIMINUIÇÃO VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR E ELIMINAÇÃO DA ROTAEVAPORAÇÃO

A rotaevaporação é uma etapa que demanda um tempo de aproximadamente 25 a 30 minutos por amostra, prolongando o tempo de análise (tabela 8) (STREMEL et al., 2017). Uma vez que um dos objetivos iniciais de Anastassides e colaboradores (2003) era o

desenvolvimento de um método que fosse rápido de ser aplicado, a etapa de rotaevaporação, faz com que o mesmo não reflita esse princípio.

Tabela 8 – Comparação do tempo total entre as metodologias.

(Stremel et al., 2018)	Etapa	Tempo	Utilização
Pré-Extração	Fortificação	720 minutos	Todas as amostras
	Agitação	1 minuto (3x)	Por amostra
Extração	Sonicação	10 minutos	Por amostra
	Centrifugação	10 minutos	Todas as amostras
	Rotaevaporação	30 minutos	Por amostra
Clean Up	Agitação	1 minuto	Por amostra
	Centrifugação	10 minutos	Todas as amostras
Determinação	Filtração	1 minuto	Por amostra
	Análise cromatográfica	30 minutos	Por amostra
Para 8 amostras	-	1640 minutos	Todas as amostras
Método proposto	Etapa	Tempo	Utilização
Pré-Extração	Fortificação	720 minutos	Todas as amostras
	Agitação	1 minuto (3x)	Por amostra
Extração	Sonicação	10 minutos	Por amostra
	Centrifugação	10 minutos	Todas as amostras
	Congelamento	180 minutos	Todas as amostras
Clean Up	Agitação	1 minuto	Por amostra
	Centrifugação	10 minutos	Todas as amostras
Determinação	Filtração	1 minuto	Por amostra
	Análise cromatográfica	30 minutos	Por amostra
Para 8 amostras	-	1460 minutos	Todas as amostras

Fonte: (O autor).

O volume de solvente foi reduzido pensando-se no custo do desenvolvimento do método e a diminuição de resíduos tóxicos nos princípios da química verde. Sendo assim, realizou-se um novo planejamento, apresentado na tabela 9, levando em consideração estes fatores, onde a rotaevaporação foi fixado em ausente, variando o volume do solvente, temperatura e quantidade de C₁₈.

Tabela 9 – Planejamento fatorial 2³ fatores codificados em Temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura), C₁₈ (1 presença de C₁₈ / -1 ausência de C₁₈) e Volume do solvente (1 maior volume 9,2 mL e -1 menor volume 2 mL).

Experimento	Temperatura	C18	Volume	Recuperação (%)
1	-1	1	1	83,70
2	1	1	1	71,37
3	-1	-1	1	93,21
4	1	-1	1	112,19
5	-1	1	-1	77,03
6	1	1	-1	87,16
7	-1	-1	-1	85,87
8	1	-1	-1	110,10

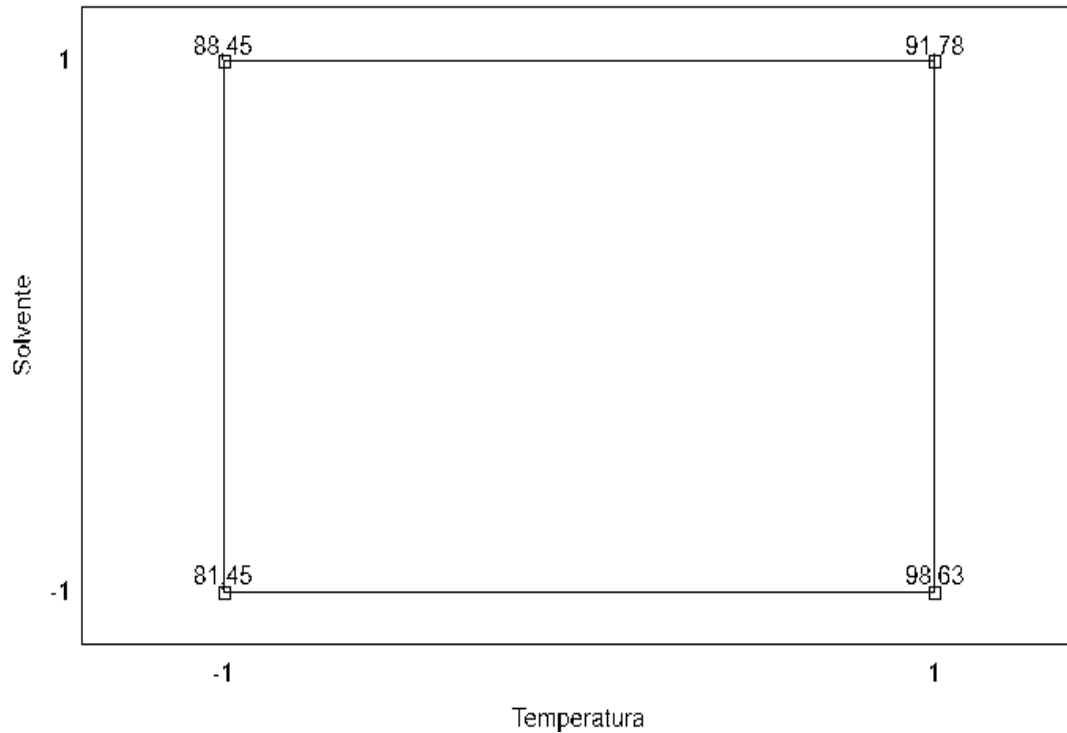
Fonte: (O autor).

Em primeiro momento, pode-se verificar que com a eliminação da etapa de rotaevaporação ao método, não houve redução nas recuperações obtidas nos experimentos. Sendo assim, pode-se adotar que a rotaevaporação é dispensável ao método, trazendo como

consequência a diminuição do tempo total de extração, de aproximadamente 25 a 30 minutos por amostra analisada.

Na Figura 29, observa-se que a relação entre o solvente e a baixa temperatura,

Figura 29 – Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em Solvente (1 maior volume 9,2 mL / -1 menor volume 2 mL) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura).

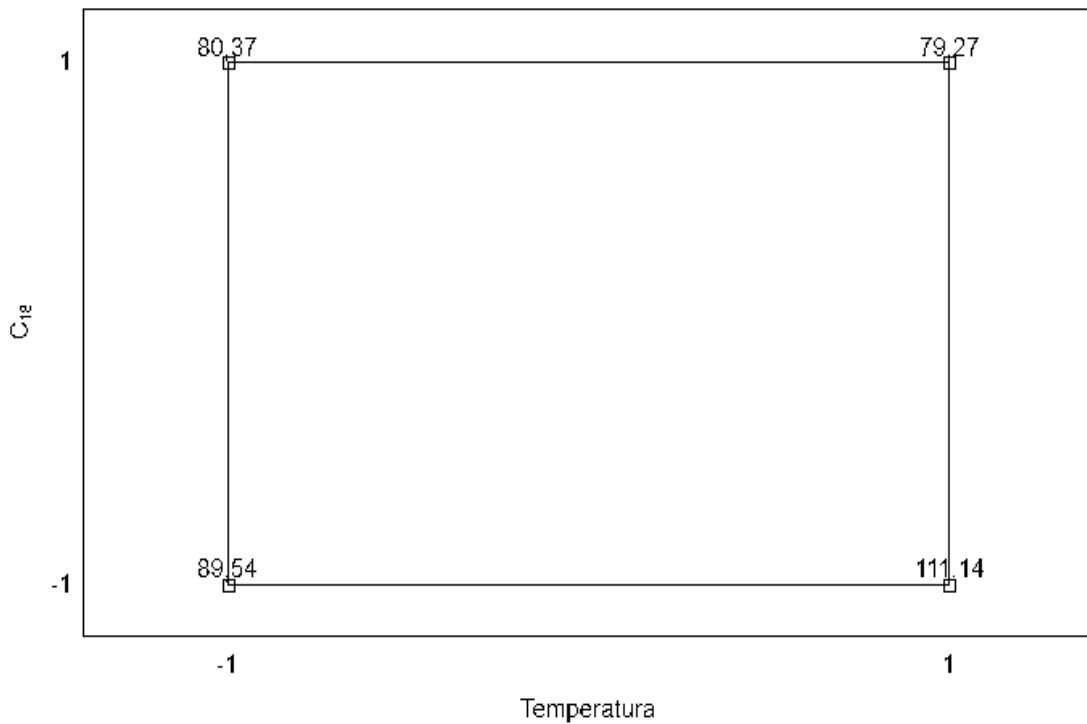


Fonte: (O autor).

Verifica-se na figura 29 que no canto inferior direito, onde encontram-se os fatores baixa temperatura como presente e volume do solvente como 2 mL, corresponde com a região de maior contribuição a metodologia, reforçando novamente a importância da baixa temperatura na etapa de limpeza da amostra, e evidenciando que a em baixos volumes de solvente, obteve-se uma maior contribuição a metodologia.

Na Figura 30, são apresentados os resultados das médias das recuperações em comparação dos fatores solvente e temperatura.

Figura 30 – Gráfico das médias das porcentagens; fatores codificados em C_{18} (1 presença de C_{18} / -1 ausência de C_{18}) e temperatura (1 presença da baixa temperatura / -1 ausência da baixa temperatura).

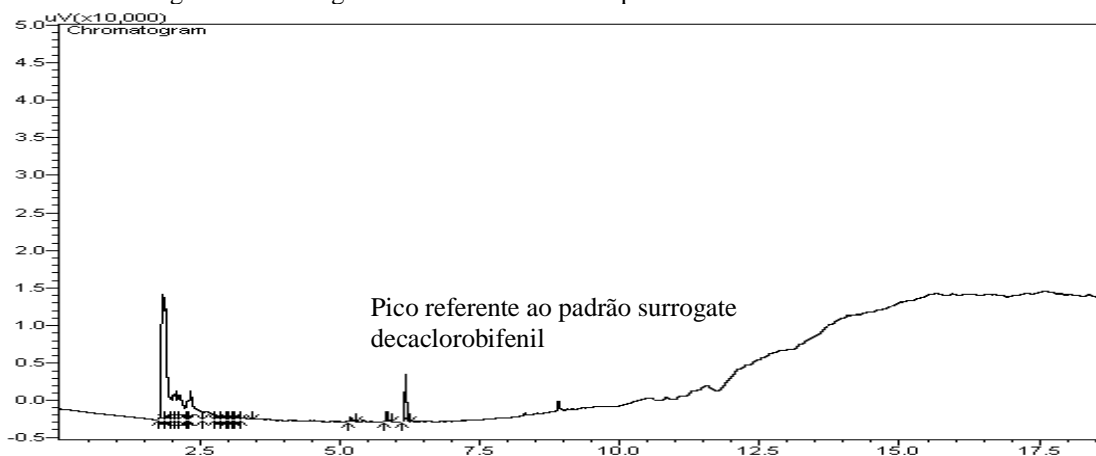


Fonte: (O autor).

Observa-se na Figura 30 que a maior média (canto inferior direito), diz respeito a ausência do sorvente C_{18} e a presença da baixa temperatura ao método. Entretanto, assim como observado no planejamento anterior a segunda maior média (canto inferior esquerdo), demonstra novamente que o C_{18} também é de importância a metodologia na etapa de limpeza da amostra, reforçando que não é possível eliminar completamente o sorvente da etapa de limpeza, sendo assim outras medidas foram tomadas para que o fator C_{18} pudesse ser alterado.

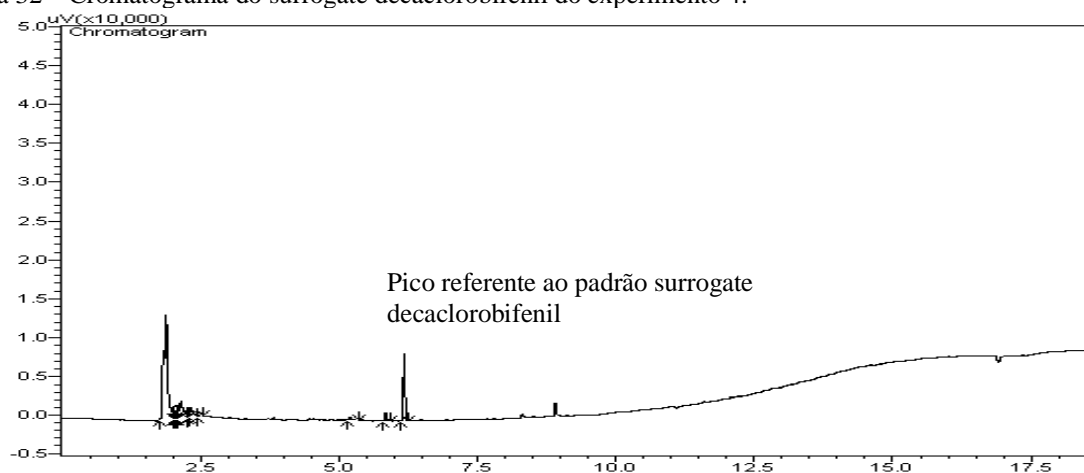
Na figura 31 e 32 são apresentados cromatogramas representativos do experimento 1 e 4, onde encontra-se a ausência da baixa temperatura e presença do C_{18} (experimento 1) e presença da baixa temperatura e ausência do C_{18} (experimento 4) ao método, enquanto o fator volume é semelhante (9,2 mL) em ambos.

Figura 31 – Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 1.



Fonte: (O autor).

Figura 32 – Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 4.



Fonte: (O autor).

Na figura 31, observa-se que o experimento que contém a presença do C_{18} possui diminuição da área do pico do cromatograma do surrogate no tempo de retenção aproximado de 6,2 min, assim como apresenta uma quantidade maior de ruídos em relação ao cromatograma que possui a presença da baixa temperatura (figura 32). Isso demonstra que a utilização da baixa temperatura traz não somente melhores recuperações ao método, assim como cromatogramas com menores quantidades de ruídos.

Este efeito também foi observado por Wang e colaboradores (2017), em que a utilização do sorvente C_{18} na extração de OCPs causa a diminuição dos picos observados, assim como a presença de ruídos em comparação com a utilização da baixa temperatura. Este efeito é observado mesmo em junção do PSA, que em muitos trabalhos é utilizado associado ao C_{18} compondo a etapa de limpeza da amostra, auxiliando na extração do analito da gordura presente na matriz (MOLINA-RUIZ et al., 2015; NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE, 2011; STREMEL et al., 2017).

Entretanto o sorvente C_{18} é o mais utilizados na extração de pesticidas de tecidos de peixe associado ao método de extração QuEChERS (PERESTRELO et al., 2019). Porém as quantidades de sorvente utilizadas muitas vezes são altas, podendo ser encontrados valores na literatura de 0,5 g (NARDELLI et al., 2010), 0,15 g (SAINT-HILAIRE et al., 2018), 0,1 g (MOLINA-RUIZ et al., 2015) e 0,05 g (NÁCHER-MESTRE et al., 2014; SHAO; AGAR; GIESE, 2017). Stremel e colaboradores (2017) propuseram a diminuição da quantidade de C_{18} para 0,023 g garantindo altas recuperações dos pesticidas estudados.

No estudo de Wang e colaboradores (2017), os pesquisadores relatam que a redução dos picos pode ser referente à adsorção de espécies lipofílicas no sorvente C_{18} . Esta adsorção pode estar primordialmente ligada a utilização de grandes quantidades do sorvente na etapa de limpeza e não simplesmente a presença do mesmo. Quando não há uma boa separação entre a água contida na amostra e a fase extratora, pode haver perda do analito lipofílico para o sorvente, causado pelo excesso de C_{18} utilizado na etapa de limpeza (BERENDSEN et al., 2013).

Com base nestas observações, foi proposta a diminuição das quantidades de C_{18} utilizadas nos experimentos, para que não houvesse o excesso dos sorvente que pode levar a associação do mesmo com o analito e conseqüente diminuição da concentração do mesmo nas recuperações a serem obtidas.

O efeito da redução do volume do solvente, assim como a redução da quantidade de C_{18} , também pode ser observado a partir da resolução dos cromatogramas de experimentos semelhantes, gerados no planejamento. A Figura 33 traz a comparação dos experimentos 2 e 6 do planejamento, onde as condições dos fatores temperatura e C_{18} são fixadas, modificando apenas a quantidade de solvente em cada experimento.

Figura 33 – Cromatogramas do surrogate decaclorobifenil:
 Experimento 2 em preto;
 Experimento 6 em rosa.



Fonte: (O autor).

Observa-se que o cromatograma representante do experimento com menor volume de solvente (linha rósea), traz uma resolução com menos ruídos em relação ao cromatograma com maior volume de solvente (linha preta), demonstrando que a redução do volume traz resoluções melhores aos cromatogramas. As recuperações entre estes dois experimentos, possuem uma diferença de 15,79%, sendo que o experimento com menor volume de solvente apresentou recuperação superior ao de maior volume. Stremel de colaboradores (2017), propõem a diminuição da quantidade de solvente, do método QuEChERS original proposto por Anastassiades e colaboradores (2003), de 10 mL para 9,2 mL. No presente planejamento, juntamente a mistura de solvente, foram reduzidas as quantidades dos sais de extração NaCl, MgSO₄ e Na₂SO₄ proporcional ao volume do solvente. Paz e colaboradores (2017) obtiveram recuperações de até 125% dentre 14 pesticidas estudados, utilizando uma quantidade de 7 mL de acetonitrila juntamente a 3 mL de água, porém, para extração em frutas, no presente estudo, foram encontradas recuperações de 77,03 – 110,10%, porém com um volume menor que 7 mL de solvente.

Na literatura é encontrada a utilização do método QuEChERS na extração de pesticidas de tecido de peixe, utilizando variadas quantidades de solvente. Morrison e colaboradores (2016) utilizaram uma quantidade de 30 mL de uma mistura de hexano e isopropanol (3:2 v/v) para extração de 35 pesticidas de tecido de esturjão branco (*Acipenser transmontanus*), obtendo níveis de recuperação de 60,8 – 104%. Lazartigues e colaboradores (2011) testaram duas quantidades de solvente para extração de 15 pesticidas, de tecido de músculo de perca

(*Perca fluviatilis*). As condições dos solventes para os experimentos foram de: 10 mL de acetonitrila e 3 mL de hexano, obtendo níveis de recuperação de 6 – 80%; já na segunda etapa de experimentos a quantidades dos solventes eram de 10 mL de acetonitrila, 3 mL de hexano e 1 mL de água, obtendo níveis de recuperação de 34 – 83%. No planejamento em questão, foi avaliada a quantidade da mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v) em dois níveis. No nível +1, com uma quantidade de 9,2 mL da mistura de solvente, obteve-se uma recuperação de 71,37 – 112,19%, enquanto que, para o nível -1, com uma quantidade de 2 mL da mistura do solvente obtiveram-se níveis de recuperação de 77,03 – 110,10 %, demonstrando que o volume de solvente pode ser reduzido sem desfalque nos valores de recuperação do padrão.

5.4 OTIMIZAÇÃO DA BAIXA TEMPERATURA FRENTE AOS FATORES C₁₈, VOLUME E ROTA EVAPORAÇÃO FIXADOS

Com base no segundo planejamento, onde evidencia-se que a diminuição do volume do solvente é eficiente ao método, assim como a diminuição das quantidades de sorvente C₁₈, foi desenvolvida uma última etapa de experimentos composta por uma análise univariada. No desenvolvimento dos experimentos, o fator volume do solvente foi fixado em 5,6 mL, para que não haja indisponibilidade do solvente no processo de extração, e a quantidade do sorvente C₁₈ foi fixada em 0,0115g. Essa quantidade de C₁₈ é metade da quantidade inicial (0,023 g), utilizada nos demais planejamentos, assim como a quantidade de volume, referente a média entre as quantidades utilizadas no planejamento anterior (9,2 mL e 2 mL). Os resultados da análise univariada são mostrados nas Tabelas 10, 11 e 12 a seguir.

Tabela 10 – Análise univariada.

Experimento	Baixa temperatura	C18 (g)	Volume (mL)	Recuperação	Media ± S
1	Sem	0,0115	5,6	96,01	
2	Sem	0,0115	5,6	100,19	97,20 ± 2,06
3	Sem	0,0115	5,6	95,39	
4	Com	0,0115	5,6	95,89	
5	Com	0,0115	5,6	96,47	96,18 ± 0,29
6	Com	0,0115	5,6	96,18	

Fonte: (O autor).

Tabela 11 – Tabela de média e variância para cada grupo (Grupo 1, experimentos 1, 2 e 3), (Grupo 2, experimentos 4, 5 e 6).

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
1	3	291,59	97,20	6,816133
2	3	288,54	96,18	0,0841

Fonte: (O autor).

Tabela 12 – Tabela de análise de variância (ANOVA).

ANOVA						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,565	1	1,57	0,45	0,54	7,71
Dentro dos grupos	13,783	4	3,45			
Total	15,349	5				

Fonte: (O autor).

Através do fator *F* obtido na Tabela de ANOVA (Tabela 12), verifica-se que o valor experimentalmente alcançado (0,45) é menor do que o valor de *F* crítico (7,71). Assim, com o auxílio dos resultados apresentados na Tabela 10, conclui-se que, analiticamente há semelhança entre as médias dos grupos 1 e 2, sendo o valor de teste *F* um modelo estatístico que prevê a variação entre dois ou mais grupos de dados, a análise deste valor determina a contribuição de um grupo ou um fator, sendo assim, o modelo experimental não conclui a qual grupo de dados se credita maior significância ao método, porém os dois contribuem ao mesmo (ACTION, 2019). Quando isto ocorre, optar pelo experimento, que traz maior praticidade ao método, com diminuição de custo e tempo por exemplo, torna-se uma opção viável ao mesmo.

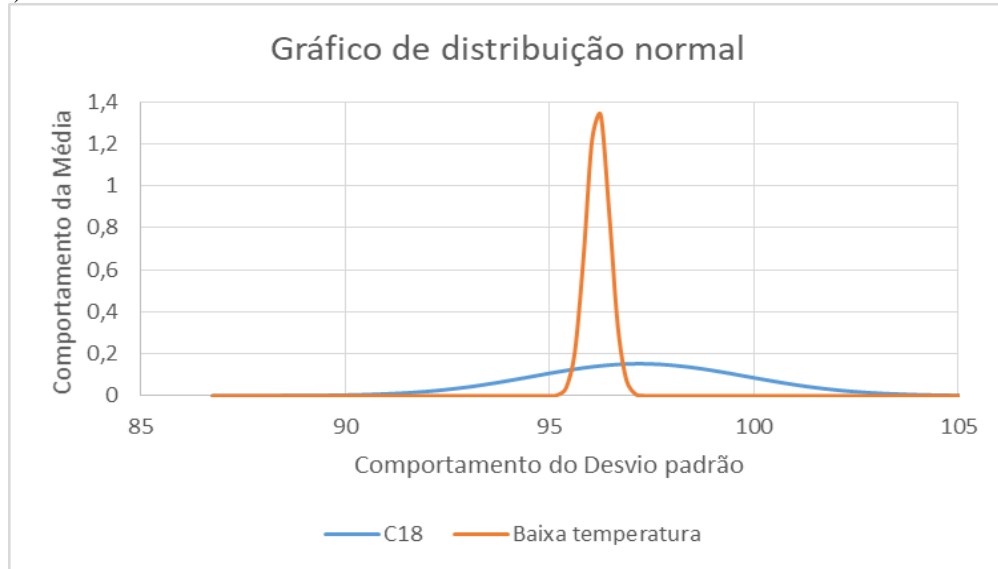
Na análise as médias das recuperações obtidas em cada grupo, observa-se que, há uma diferença entre os experimentos que não contém a presença da baixa temperatura empregada (grupo 1) e os experimentos que contém a presença da baixa temperatura empregada (grupo 2). O grupo 1 apresenta um valor médio de recuperação maior que o segundo grupo, com uma diferença de 1,02%, porém, quando se observa a variância presente entre os grupos (Tabela 11), nota-se que o primeiro grupo apresenta um valor de 6,81 enquanto o segundo apresenta um valor de 0,08. Estes valores demonstram que os valores de recuperação para o primeiro grupo de experimentos diferem-se entre si mais do que os do segundo grupo, esta é uma das causas pelas quais, o planejamento não consegue atribuir um dos grupos como predominante ao método (ACTION, 2019).

O gráfico da distribuição normal (Figura 34), relaciona a média e o desvio padrão de cada grupo de amostras. Apesar das duas médias diferirem pouco, o espalhamento do desvio padrão é grande do grupo 1 para o grupo 2, sendo assim, há uma maior variabilidade nos valores de recuperação do grupo 1 em relação ao grupo 2. Estatisticamente, atribui-se maior precisão aos valores cujas variações das médias são baixas, ou seja, que possuem semelhantes nos valores de um mesmo grupo; neste caso, os experimentos que contém a baixa temperatura, apresentam valores de recuperação mais próximos entre os experimentos realizados, garantindo uma maior precisão (ACTION, 2019).

Figura 34 – Gráfico de distribuição normal:

Experimentos do grupo 1, que contém a presença do sorvente C₁₈ e a ausência da baixa temperatura (linha azulada);

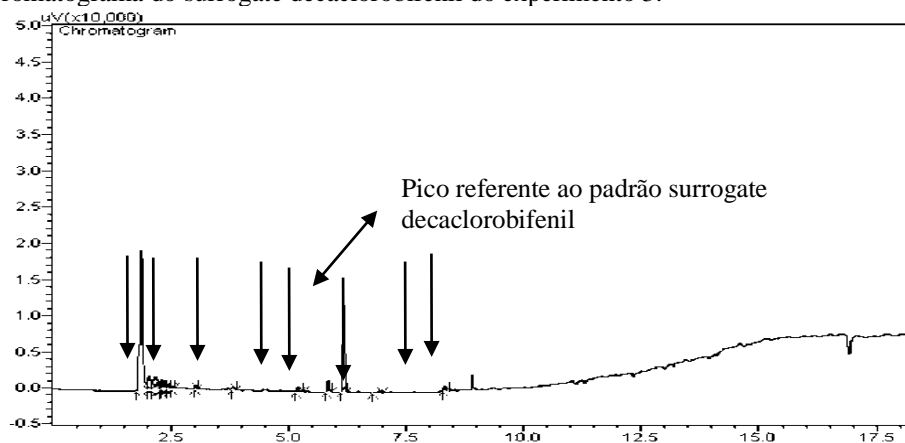
Experimentos do grupo 2, que contém a ausência do sorvente C₁₈ e a presença da baixa temperatura (linha alaranjada).



Fonte: (O autor).

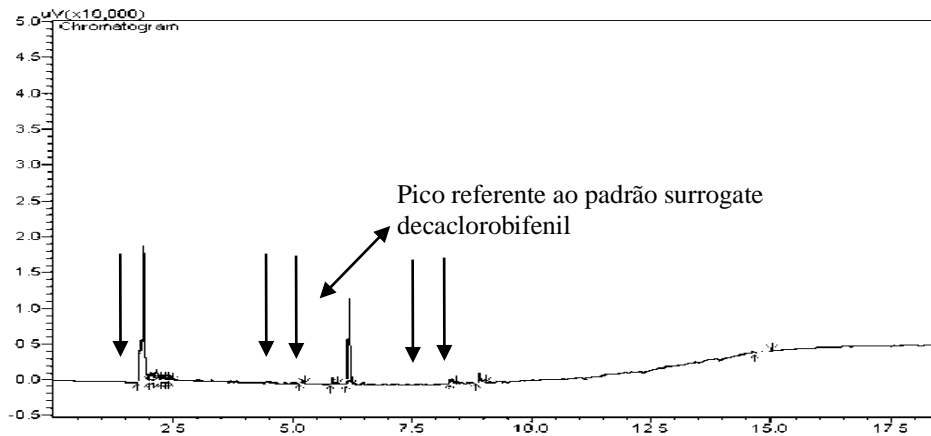
A partir dos cromatogramas obtidos nos experimentos 3 e 4 (Figuras 35 e 36 respectivamente), observa-se novamente a diminuição na área do pico do cromatograma do surrogate no tempo de retenção de aproximadamente 6,2 min, que contém a ausência da baixa temperatura e presença do C₁₈ (Figura 35), em comparação com o cromatograma que possui a presença da baixa temperatura e presença do C₁₈ (Figura 36).

Figura 35 – Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 3.



Fonte: (O autor).

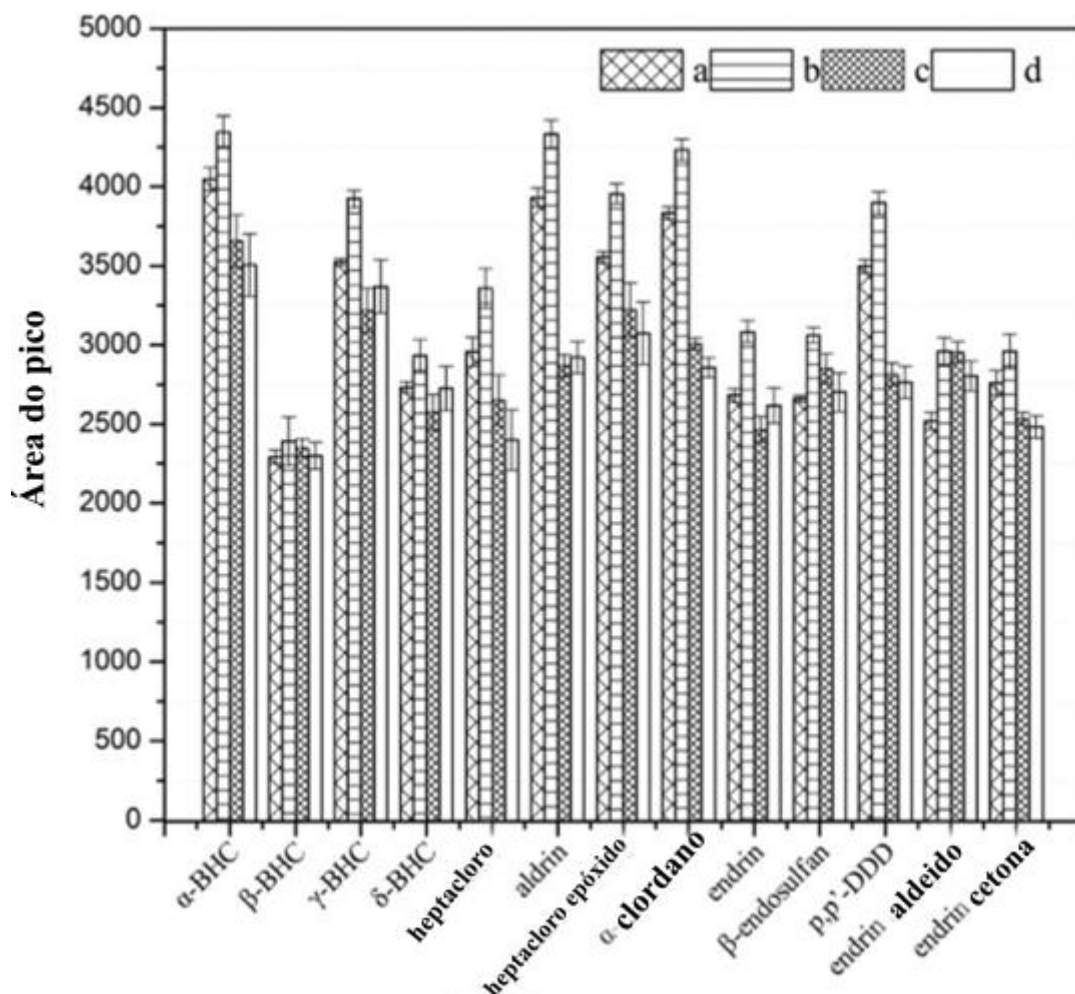
Figura 36 – Cromatograma do surrogate decaclorobifenil do experimento 4.



Fonte: (O autor).

Quando comparados os dois cromatogramas, pode-se verificar a diminuição dos picos, onde o experimento 3 (figura 35), possui uma área de 28345,9 μV , enquanto para o experimento 4 (figura 36) 28494,8 μV , com uma discrepância de 148,9 refletindo em uma diferença de recuperação de 0,5%. A linha base do experimento 4 também possui menos ruídos em relação ao experimento 3 (indicado por setas). Wang e colaboradores (2017) discutem esse efeito em seu estudo, onde utilizam a etapa de congelamento da amostra em comparação com a presença e ausência do C_{18} . A figura 37 abaixo traz os dados apresentados pelos autores.

Figura 37 – Efeito dos sorventes d-SPE na área do pico dos analítos: sem sorvente (a), PSA-50 mg (b), C₁₈ – 50 mg (c), e PSA – 50 mg + C₁₈ – 50 mg (d).



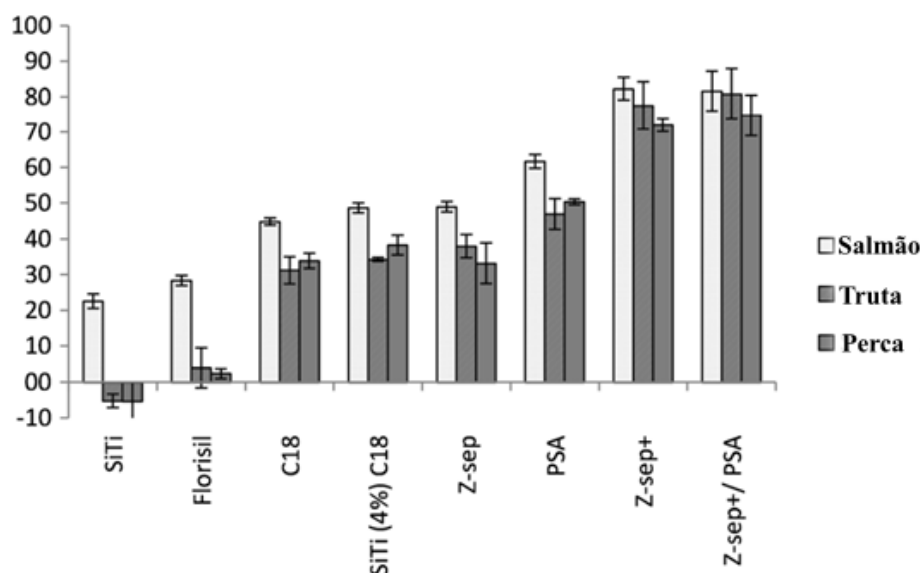
Fonte: (WANG et al., 2017).

Observa-se na figura 37 que as duas barras referentes a presença do sorvente C₁₈ garantiram menores áreas dos picos dos cromatogramas, enquanto a barra referente a presença do PSA, é a que se apresenta maior em todos os casos (Wang et al., 2017).

Em um estudo realizado com tecido de salmão (*Salmo salar*), truta (*Oncorhynchus mykiss*) e perca (*Perca fluviatilis*), foram avaliados três procedimentos metodológicos diferentes para testar a eficiência nas modificações ao método QuEChERS. Dentre os procedimentos, a baixa temperatura foi levada em consideração como parte de *clean up*. Os experimentos que continham a presença da baixa temperatura empregada ao método, obtiveram recuperações de 88 – 135% dentre os 23 pesticidas, os demais procedimentos apresentaram recuperações entre 95 – 113% para 23 pesticidas e 84 – 112% para os mesmos 22 pesticidas. Apesar das recuperações serem semelhantes, nota-se que as maiores recuperações estão presentes entre os experimentos que contém a presença da baixa

temperatura associada ao método de extração QuEChERS. Os autores ainda discutem que para os diferentes tipos de sorventes testados, o C₁₈ é o que apresenta uma ineficácia maior na extração, mostrado na figura 38 abaixo (OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 38 – Eficiência da remoção do co-extrativo (%) para diferentes sorventes em extratos de perca.



Fonte:(OLIVEIRA et al., 2019).

Neste estudo Oliveira e colaboradores (2019) optam pela utilização do sorvente Z-sep+/PSA, juntamente a baixa temperatura para que haja uma melhor remoção dos analitos da amostra, ou seja, demonstrando que apenas a utilização da baixa temperatura não é eficiente nesta remoção. Porém, as quantidades dos sorventes utilizados são de 0,5 g para o Z-sep+ e 0,125 g para o PSA, o Z-sep+ neste caso vem a substituir o C₁₈ pela sua eficiência na remoção. No presente estudo, a quantidade de C₁₈ utilizada é de 0,015 g, ou seja, menor que a quantidade do sorvente Z-sep+ utilizado pelos autores, garantindo também, altas recuperações (95,39 – 100,19%) do padrão surrogate adicionado.

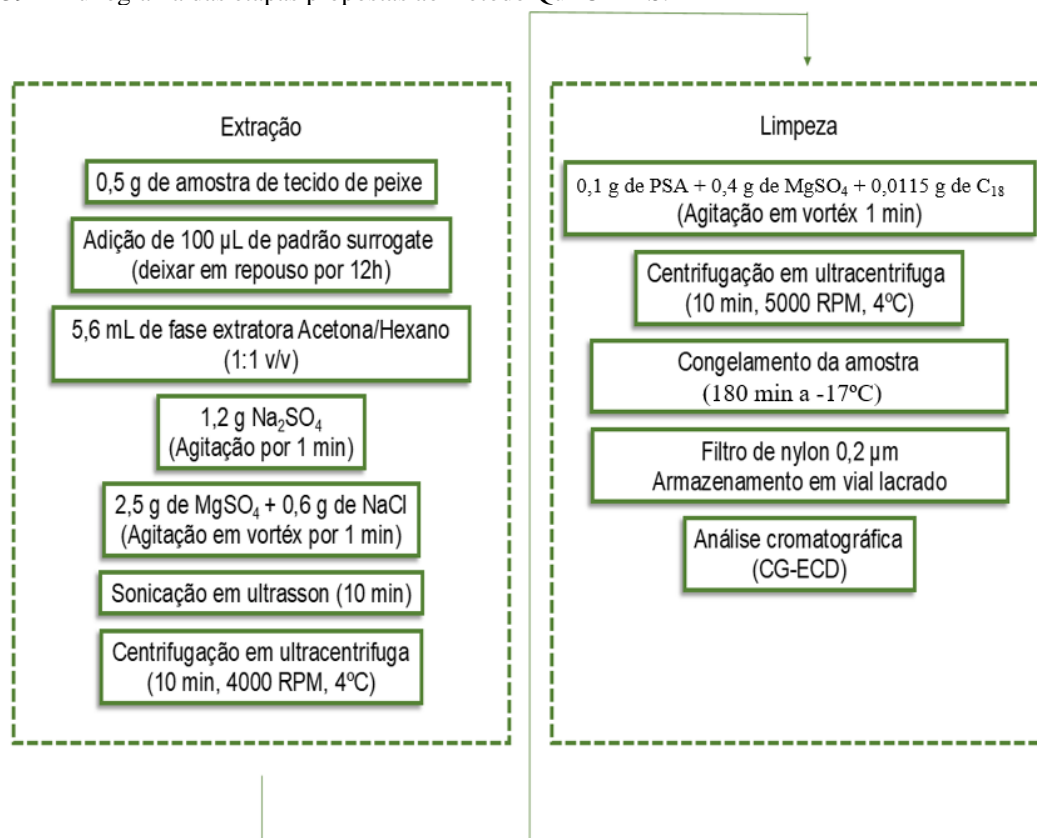
A baixa temperatura é promissora na extração de OCPs de matrizes complexas e com altos teores de gordura e água, a utilização do C₁₈ auxilia neste processo, porem este trabalho traz que as quantidades deste sorvente podem ser reduzidas, levando a uma diminuição de custo do processo, assim como a quantidade da mistura de solventes. A partir dos planejamentos realizados, pode-se afirmar que a etapa de rotaevaporação do método não é necessária, uma vez que a mesma não interferiu nos resultados de recuperação dos planejamentos

5.5 MÉTODO PROPOSTO

A Figura 39 abaixo, traz o fluxograma das etapas propostas o método de extração QuEChERS, com base nas modificações empregadas no desenvolvimento dos planejamentos. Na etapa de extração, têm-se a diminuição do volume da mistura de solventes acetona/hexano (1:1 v/v) de 9,2 mL para 5,6 mL, e diminuição da quantidade dos sorventes MgSO_4 de 4g para 2,5g, NaCl de 1g para 0,6g e Na_2SO_4 de 2g para 1,2g e eliminação da etapa de rotaevaporação.

Na etapa de *clean up* da amostra, tem-se a diminuição da quantidade do sorvente C_{18} de 0,023g para 0,015g e adição da etapa de partição a baixa temperatura, onde a amostra é congelada à -17°C por um tempo de 180 min, Estas modificações são feitas em comparação ao método QuEChERS modificado por Stremel e colaboradores (2017).

Figura 39 – Fluxograma das etapas propostas ao método QuEChERS.



Fonte: (O autor).

As próximas etapas para certificação do método são compostas pela validação e aplicação em amostras reais.

6 CONCLUSÕES

Torna-se evidente a redução dos sais, tanto de extração, quanto de limpeza de amostra MgSO_4 , Na_2SO_4 , NaCl e C_{18} , para 1,2 g, 2,5 g, 0,6 g e 0,015g respectivamente, por consequência da implementação da etapa de congelamento da amostra e da redução do volume da mistura de solventes utilizada.

Com base nos resultados obtidos, a implementação da baixa temperatura é viável ao método, como uma etapa de limpeza da amostra, onde a mesma é submetida por um período de 180 min a uma temperatura de -17°C .

A redução do volume da mistura de solventes para 5,6 mL, resultou em bons resultados, acarretando na diminuição de custos envolvidos durante o processo de extração assim como na diminuição de resíduos gerados.

A eliminação da etapa de rotaevaporação do método, faz com que o mesmo tenha uma redução na quantidade total de tempo necessário para a finalização da extração, pois as amostras podem ser congeladas todas ao mesmo tempo, necessitando de uma aparelhagem simples,

Em comparação as demais metodologias citadas, o método proposto possui uma diminuição de tempo de execução, tornando-o rápido e com menos etapas elaboradas para finalização da análise.

A extração mostrou-se eficaz para preparação da amostra à posterior detecção por GC-ECD.

O método mostrou-se com grande potencial para extração de compostos organoclorados em músculo de peixe, matriz qual, contém altos teores de gordura, apresentando recuperações de 95,89% – 96,47% para os compostos em uma concentração de $200 \mu\text{gL}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

ACTION. Ambiente virtual de aprendizado. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/ambiente-virtual-de-aprendizado>. Acessado em 12/11/2019

AFFUM, Andrews Obeng et al. Distribution and risk assessment of banned and other current-use pesticides in surface and groundwaters consumed in an agricultural catchment dominated by cocoa crops in the Ankobra Basin, Ghana. **Science of The Total Environment**, v. 633, p. 630-640, 2018.

ALMEIDA, Nelson Fonseca; PIEDADE, José Renato; DE AGUIAR SOUZA, Décio. **Química dos pesticidas**. Edição do Fundo de Pesquisas do Instituto biológico, 1962.

ANASTASSIADES, Michelangelo et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Consulta Pública nº61, de 3 de setembro de 2009. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B27695-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 19/04/2018.

BAIRD, C., RECIO, M., CARRERA, L., GRASSI, M. **Química ambiental**. 2nd ed. Porto Alegre: Bookman. 2008.

BALMER, Jennifer E. et al. Persistent organic pollutants (POPs) in blood and blubber of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) at three northern Gulf of Mexico sites following the Deepwater Horizon oil spill. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 130-137, 2018.

NETO, Benício Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010.

BELENGUER, Vicent et al. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). **Journal of hazardous materials**, v. 265, p. 271-279, 2014.

BERENDSEN, Bjorn JA et al. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 229-239, 2013.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. 2017.

BARBERA, C. **Pesticidas Agrícolas**. Barcelona. **Omega**, v. 19, p. 569, 1974.

BOFEPE - **Bay of Fundy Ecosystem Partnership** Disponível em: <http://www.bofep.org/pops.htm>. Acessado em 15/11/2019.

BUAH-KWOFIE, Archibold et al. Accumulation of organochlorine pesticides in fat tissue of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) from iSimangaliso Wetland Park, South Africa. **Chemosphere**, v. 195, p. 463-471, 2018.

BUAH-KWOFIE, Archibold; HUMPHRIES, Marc S.; PILLAY, Letitia. Bioaccumulation and risk assessment of organochlorine pesticides in fish from a global biodiversity hotspot: iSimangaliso Wetland Park, South Africa. **Science of the total environment**, v. 621, p. 273-281, 2018.

BUSSOLARO, D. et al. Bioaccumulation and related effects of PCBs and organochlorinated pesticides in freshwater fish *Hypostomus commersoni*. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 8, p. 2154-2163, 2012.

CEMBRANEL, Adir S. et al. Residue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in urban lake sediments. **Engenharia Agrícola**, v. 37, n. 6, p. 1254-1267, 2017.

CHEMSPIDER. Surch and share chemistry. Disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3111.html> Acessado em: 19/04/2018.

CHANG, Geng-Ruei. Persistent organochlorine pesticides in aquatic environments and fishes in Taiwan and their risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 8, p. 7699-7708, 2018.

CHEN, Shubing et al. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1297-1300, 2009.

DURAK, Büşra Yilmaz et al. Validation of ultrasonic-assisted switchable solvent liquid phase microextraction for trace determination of hormones and organochlorine pesticides by GC-MS and combination with QuEChERS. **Food chemistry**, v. 305, p. 125487, 2020.

CLEOFAS, J. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. **Rio de Janeiro**, v. 29, 1952.

COMBI, Tatiane et al. Spatial distribution and historical input of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from a subtropical estuary (Guaratuba Bay, SW Atlantic). **Marine pollution bulletin**, v. 70, n. 1-2, p. 247-252, 2013.

CREA - Conselho Regional de Engenharia e Agronomia do paraná. Produção de peixe no Brasil. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/agronegocio/233785-producao-de-peixes-no-brasil-cresceu-45-em-2018.html#.XNsTAI5KjiU>. Acessado em 12/11/2019.

DANG, Viet D. et al. Activated carbon as a means of limiting bioaccumulation of organochlorine pesticides, triclosan, triclocarban, and fipronil from sediments rich in organic matter. **Chemosphere**, v. 197, p. 627-633, 2018.

DE FIGUEIREDO, Luana; CHIAVELLI, Lucas; COSTA, Willian da. Determination of Concentration Levels of Organochlorine Pesticides in Water from the Mandacaru Stream in Maringá-Paraná-Brazil Employing Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 46, n. 10, p. 1597-1606, 2013.

DE OLIVEIRA, Lenise Guimarães et al. Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC–MS. **Food chemistry**, v. 297, p. 124944, 2019.

DE OLIVEIRA, Lenise Guimarães et al. Vibrational extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 26, p. 6913-6929, 2019.

EL NAHAS, Abeer F. et al. Impaired antioxidant gene expression by pesticide residues and its relation with other cellular biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Burullus. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 137, p. 202-209, 2017.

FLORES, Araceli Verônica et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FRANCO-BARRIOS, Alejandro et al. Development and application of a microwave-assisted extraction and LC/MS/MS methodology to the determination of antifouling booster biocides in sea mullets (*Mugil cephalus*) organisms. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 1, p. 197-204, 2014.

FREIRE, Carmen; KOIFMAN, Rosalina Jorge; KOIFMAN, Sergio. Serum levels of organochlorine pesticides in blood donors: A biomonitoring survey in the North of Brazil, 2010–2011. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 722-732, 2017.

GONZÁLEZ-GÓMEZ, Xiana et al. Screening of organic pollutants in pet hair samples and the significance of environmental factors. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 311-319, 2018.

GOULART, Adilson Correia et al. Otimização e aplicação da extração sólido líquido com partição a baixa temperatura para determinação de carbofurano em solo. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

HE, Wei et al. Optimized Multiresidue Analysis of Organic Contaminants of Priority Concern in a Daily Consumed Fish (Grass Carp). **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2017, 2017.

HONG, Jongki et al. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1-2, p. 27-35, 2004.

KASEMODEL, Mariana Consiglio. **Seleção de bactérias para biodegradação dos pesticidas organoclorados DDD, PCP e dieldrin**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KHALLAF, Elsayed A.; AUTHMAN, Mohammad MN; ALNE-NA-EI, Alaa A. Evaluation of organochlorine and organophosphorus pesticides residues in the sediment and muscles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish from a River Nile Canal, Egypt. **International Journal of Environmental Studies**, v. 75, n. 3, p. 443-465, 2018.

LAILSON-BRITO, J. et al. High organochlorine accumulation in blubber of Guiana dolphin, *Sotalia guianensis*, from Brazilian coast and its use to establish geographical differences among populations. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1800-1808, 2010.

MAGALHÃES, Caio Augusto et al. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralichthys brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v. 16, p. 42-48, 2017.

MAO, Xue J. et al. Simultaneous determination of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in the Chinese patent medicines by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 2, p. 126-134, 2018.

ERVILHA, Iara Campos. Relatório: vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos no estado do Rio Grande do Sul. **Brasília, DF: Ministério da Saúde**, 2015.

MESQUITA, Tayane CR et al. Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 3, p. 199-206, 2018.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. **Pesticidas: metodos de analise & informacoes tecnicas**. Ministerio da Agricultura/LANARV/UFPR-CEPPA, 1987.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/>. Acessado em: 15/11/2019.

MODEL, Kathleen J. et al. Organochlorinated and organophosphorus pesticides in the Pelotas river sediment. **Engenharia Agrícola**, v. 38, n. 1, p. 124-134, 2018.

MOLINA-RUIZ, Juan Manuel et al. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 369-378, 2015.

MORRISON, Shane A. et al. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 16-22, 2016.

MUZYED, Shareef KI; KUCUKSEZGIN, Filiz; TUZMEN, Nalan. Persistent organochlorine residues in fish and sediments collected from Eastern Aegean coast: Levels, occurrence and ecological risk. **Marine pollution bulletin**, v. 119, n. 2, p. 247-252, 2017.

NÁCHER-MESTRE, Jaime et al. Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2165-2174, 2014.

NAKAMURA, Estéfano et al. **Avaliação das concentrações de pesticidas organoclorados em águas superficiais pela otimização da técnica USAEME**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

DO NASCIMENTO, Felipe Parra et al. Organochlorine pesticides levels and associated factors in a group of blood donors in São Paulo, Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 8, p. 380, 2017.

NEVES, Patrícia A. et al. Depositional history of polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides (OCPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an Amazon estuary during the last century. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 1262-1270, 2018.

NORLI, Hans Ragnar; CHRISTIANSEN, Agnethe; DERIBE, Ermias. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7234-7241, 2011.

OLIVEIRA, L. DE. Manual de qualidade de água para aquicultura. 2015.

PAEZ, Vincent et al. AOAC SMPR® 2016.002. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 1122-1124, 2016.

PAZ, Mário et al. Application of the QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in Brazilian fruit pulps by GC-ECD. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 1, p. 48-58, 2017.

PENG, Xi-Tian et al. Preparation of mesoporous ZrO₂-coated magnetic microsphere and its application in the multi-residue analysis of pesticides and PCBs in fish by GC-MS/MS. **Talanta**, v. 132, p. 118-125, 2015.

PERESTRELO, Rosa et al. QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica chimica acta**, 2019.

PHEIFFER, Wihan et al. Fish consumption from urban impoundments: What are the health risks associated with DDTs and other organochlorine pesticides in fish to township residents of a major inland city. **Science of the Total Environment**, v. 628, p. 517-527, 2018.

PUBCHEM. Open chemistry data base. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/endosulfan_sulfate#section=Top. Acessado em 19/04/2018.

QUINETE, Natalia et al. Outcompeting GC for the detection of legacy chlorinated pesticides: online-SPE UPLC APCI/MSMS detection of endosulfans at part per trillion levels. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 18, p. 5887-5899, 2013.

RIZZI, Juliane et al. Characterization of quality of sediments from Paranaguá Bay (Brazil) by combined in vitro bioassays and chemical analyses. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1811-1819, 2017.

ROCHA, Aderbal A. et al. Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface waters, sediments, and fish in center-pivot irrigation areas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2269-2278, 2015.

RODRÍGUEZ, Angel Gabriel Polanco et al. Impact of pesticides in karst groundwater. Review of recent trends in Yucatan, Mexico. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 7, p. 20-29, 2018.

ROSSELAND, Bjørn Olav et al. Trace elements and organochlorine pollutants in selected fish species from Lake Phewa, Nepal. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 390-401, 2017.

SAINT-HILAIRE, Maïlie et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers. **Food chemistry**, v. 252, p. 147-153, 2018.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, Angélica María et al. Organochlorine pesticides in green sea turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomatosis caught at three feeding areas off Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 97, n. 1, p. 215-223, 2017.

SANITÁRIA, A. N. DE V. Consulta Pública nº61, de 3 de setembro de 2009. **Polímeros**, v. 18, n. 3, p. 222–229, set. 2008.

SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Texto para Discussão, 2017.

SHAO, Gang; AGAR, Jeffrey; GIESE, Roger W. Cold-induced aqueous acetonitrile phase separation: A salt-free way to begin quick, easy, cheap, effective, rugged, safe. **Journal of Chromatography A**, v. 1506, p. 128-133, 2017.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, Timothy A. Principles of instrumental analysis. ed. **Brooks/Cole Thompson Learning: Crawfordville, MD**, 1998.

STREMEL, Tatiana R. De O. et al. Development, validation and matrix effect of a QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fish tissue. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 4, p. 246-254, 2018.

SUN, Hanwen et al. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1237, p. 1-23, 2012.

TECHNOLOGIES, A. Cromatógrafo a gás guia de operação. 2010.

WANG, Fang et al. Organochlorine pesticides in soils under different land usage in the Taihu Lake region, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 5, p. 584-590, 2007.

WANG, Hui et al. Analysis of organochlorine pesticides in surface water of the Songhua River using magnetoliposomes as adsorbents coupled with GC-MS/MS detection. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 70-79, 2018.

WANG, Pu et al. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 1, p. 43-48, 2010.

WANG, Xiao-Chen et al. QuEChERS followed by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. **Talanta**, v. 162, p. 90-97, 2017.

WILKOWSKA, Angelika M.; BIZIUK, Marek. Rapid method for the determination of organochlorine pesticides and PCBs in fish muscle samples by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by GC-ECD. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 6, p. 1987-1994, 2010.

WORTHING, Charles R. **The pesticide manual: a world compendium**. 1987.

ZHANG, Yanyan et al. Freeze drying reduces the extractability of organochlorine pesticides in fish muscle tissue by microwave-assisted method. **Environmental pollution**, v. 191, p. 250-252, 2014.

ZHAO, Dongmei. Determination of Pentachlorophenol Residue in Meat and Fish by Gas Chromatography–Electron Capture Detection and Gas Chromatography–Mass Spectrometry with Accelerated Solvent Extraction. **Journal of chromatographic science**, v. 52, n. 5, p. 429-435, 2014.

ZHENG, Weijia et al. Determination of fenobucarb residues in animal and aquatic food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a QuEChERS extraction method. **Journal of Chromatography B**, v. 1058, p. 1-7, 2017.