FURG

Tese de Doutorado

Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

Lenise Guimarães de Oliveira

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

por

LENISE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Defesa de Tese de Doutorado

Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

elaborada por

LENISE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Química Tecnológica e Ambiental
Área de concentração Química Analítica

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)
(Presidente – Orientador)

Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)

Prof. Drª. Liziara da Costa Cabrera (UFFS)

Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (FURG)

Drª. Louise Jank (MAPA)

Rio Grande, 13 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, que sempre acreditou em mim e aceitou todas as minhas idéias para a execução deste trabalho, além de permitir que eu me ausentasse por mais de um ano para realizar o doutorado sanduíche na Irlanda. Serei eternamente grata pelo que fizeste e faz por mim e pela tua amizade!

Ao Prof. Dr. Osmar D. Prestes que fez o contato com o Dr. Martin Danaher para que eu pudesse relizar o Doutorado Sanduíche. Muito obrigada!

Ao Dr. Martin Danaher por me aceitar em seu laboratório e por prover toda a estrutura e conhecimento para o desenvolvimento de parte deste trabalho. Muito obrigada pela atenção e por permitir que meu sonho se tornasse realidade!

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pelas excelentes contribuições e comentários realizados para enriquecer este trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande, instituição na qual sou colaboradora e aluna, agradeço pela oportunidade e pela flexibilidade que permitiu a realização do doutorado.

Às minhas colegas de trabalho, Márcia H. S. Kurz, Marcia V. Silveira e Clarissa H. Rosa, por me apoiarem no período que estava fazendo as disciplinas e principalmente no período que me afastei da FURG como servidora. Obrigada pelo companheirismo, pelo espírito de equipe e pela amizade!

Gostaria de agradecer especialmente à Márcia H. S. Kurz, que além de uma colega de trabalho, é minha comadre e amiga. Muito obrigada Marcinha por estar sempre ao meu lado, participando das minhas atividades, me incentivando, e me auxiliando. Mas saiba que jamais deixará de ser minha revisora oficial!

À minha família, que está ao meu lado em todos os momentos e que me apoia incondicionalmente. Pai e mãe, vocês são a razão de tudo! E se hoje sentem orgulho de me ver conquistando mais este título, saibam que estão sentindo o que sinto todos os dias por ser filha de vocês! Vocês são especiais! Amo vocês!

Aos meus afilhados, Eduardo, Luca, Miguel e Júlia, vocês são os presentes mais especiais que já recebi. E foi a parte mais difícil de estar longe por tanto tempo. A dinda ama vocês!

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Moisés, meu noivo, meu amigo e meu parceiro. Tu foste essencial para que eu conseguisse superar todas as dificuldades e desafios que encontramos durante o intercâmbio e durante meu doutorado. Mais uma vez crescemos juntos! Muito obrigada por tudo!

Aos amigos que conheci nesta caminhada e que foram muitos. Aos amigos do LARCO, que me acompanharam durante esta caminhada de laboratório, tornando meus dias mais leves. Agradeço especialmente ao IC Marlon Guimarães que me auxiliou nos experimentos e que sempre esteve pronto para ajudar no desenvolvimento deste trabalho. E também ao Prof. Dr. Manoel L. Martins pelo auxílio nas atividades do laboratório, pelos ensinamentos e por todos os "consertos" realizados no GC-MS. Aos meus amigos do TEAGASC, um agradecimento especial pelo carinho, pela atenção e pelo apoio. Pelos cafés, almoços, pela yoga, pelas "*pints*", enfim, pelos momentos em que cada um de vocês me mostrou um pouco de si e da sua cultura. Eu aprendi muito com vocês! À minha família de Dublin: Aline, Cris, Tiago, Steven e a Natália. Sinto saudades da nossa convivência e acredito que isso é sinal do quão especial vocês se tornaram pra mim. Obrigada!

A essa energia maior que eu chamo de Deus, por me dar força e, principalmente, esperança de que este dia chegaria da melhor maneira possível. Por permitir estar aqui, por guiar meus caminhos e por colocar pessoas incríveis na minha vida. Sou grata por tudo que tenho e que conquistei!

Enfim, nunca imaginei que um doutorado poderia me proporcionar experiências tão incríveis quanto as que viví. Foi, sem dúvida, a minha melhor experiência de vida até este dia de hoje. Aprendi muito mais que desenvolver e validar as técnicas que venho estudando desde o mestrado, aprendi sobre a vida e sobre mim mesma. Mas tenho certeza que nada disso teria acontecido se eu não tivesse o apoio e o carinho destas pessoas.

Por isso, mais uma vez, muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **viii**

LISTA DE TABELAS ..... **ix**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **x**

RESUMO ..... **xiv**

ABSTRACT ..... **xv**

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO DA LITERATURA **4**

2.1 Produção e consumo de peixe *4*

2.2 Controle de doenças em aquicultura *4*

2.3 Propriedades físico-químicas, utilização e toxicidade dos compostos em estudo . *5*

2.3.1 Piretróides 5

2.3.2 Organofosforados 8

2.3.3 Benzoiluréias 9

2.4 Transporte e incidência dos resíduos e contaminantes no meio ambiente *10*

2.5 Limites máximos de resíduos para amostras de peixes *13*

2.6 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos *14*

2.6.1 Extração e *clean-up* 14

2.6.2 Características das matrizes em estudo 19

2.6.3 Características e escolha dos sorventes pra remoção de interferentes da matriz 20

2.7 Planejamento de experimentos *22*

2.8 Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos *25*

2.9 Métodos empregados na determinação dos compostos em estudo em tecidos de peixes *27*

2.10 Validação de métodos analíticos *31*

2.10.1 SANTE/11813/2017 32

2.10.2 Decisão 2002/657/CE 34

2.10.3 Extensão de escopo 37

2.10.4 Incerteza das medições 38

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO I 40

4. CAPÍTULO 2 – ARTIGO II 94

5. CONCLUSÕES 130

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica das piretrinas. 6

Figura 2. Estrutura da aletrina (a), deltametrina (b) e fenvalerato (c). 6

Figura 3. Estrutura em triângulo usada para modelamento de misturas para três componentes (x_1, x_2 *e* x_3). 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz experimental codificada para planejamento de misturas para três compostos. 25

Tabela 2. Métodos analíticos descritos para determinação de piretróides, piretrinas, benzoiluréias e organofosforados em tecidos de peixes e alimentos com alto teor de gordura. 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ANOVA, análise de variância, do inglês *analysis of variance*
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária
3. APCI, ionização química em pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*
4. C_{18}, octadecilsilano
5. C_8, octilsilano
6. CCα, limite de decisão
7. CCβ, capacidade de detecção
8. CI, ionização química, do inglês *chemical ionisation*
9. CV%, coeficiente de variação
10. CVMP, Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário, do inglês *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*
11. DAD, detecção por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
12. DDT, diclorodifeniltricloroetano
13. DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*
14. d-SPE, extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*
15. ECD, detecção por captura de elétrons, do inglês *electron capture detection*
16. EI, ionização por impacto de elétrons, do inglês *electron ionization*
17. EPMAR, relatório público europeu de avaliação de LMR, do inglês *european public MRL assessment report*
18. ESI, ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
19. EU, União Européia, do inglês *European Union*

20. FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
21. GC, cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*
22. IDA, ingestão diária aceitável
23. IN, intrução normativa
24. K_{ow}, coeficiente de partição octanol/água, do inglês *octanol/water partition coefficient*
25. LANAGRO-RS, Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul
26. LARCO, Laboratório de Análises de Resíduos e Contaminantes
27. LC, cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatogrphy*
28. $LC_{50,}$ concentração letal, do inglês *lethal concentration*
29. LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*
30. LMR, limite máximo de resíduos
31. LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*
32. LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
33. MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted extraction*
34. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
35. MERCOSUL, Mercado Comum do Sul
36. MRM, monitoramento de reações múltiplas, do inglês *multiple reaction monitoring*
37. MS, espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
38. MS/MS, espectromeria de massas em série, do inglês *tandem mass spectrometry*
39. MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*
40. OIE, Organização Mundial da Saúde Animal, do inglês *World Organisation for Animal Health*
41. OMC, Organização Mundial do Comércio

42. PARA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
43. PCA, 4-cloroanilina
44. PLE, extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized-liquid extraction*
45. PNCRC, Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
46. PSA, amina primária secundária, do inglês p*rimary secondary amine*
47. QuEChERS, rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*
48. RL, limite de quantificação prático, do inglês *reporting limit*
49. RSD%, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
50. RSD_r, desvio padrão relativo da repetibilidade, do inglês *relative standard deviation of repeatability*
51. RSD_{wR}, desvio padrão relativo da reprodutibilidade intralaboratorial, do inglês *relative standard deviation of within-lab-reproducibility*
52. SEM, erro padrão da média, do inglês *standard error of the mean*
53. SFE, extração com fluído supercrítico, do inglês *supercritical fluid extraction*
54. SIM, monitoramento seletivo de íons, do inglês *selected ion monitoring*
55. SiTi 4% C_{18}, sílica de alta pureza dopada com Titânio com 4% de C_{18} na formulação
56. SiTi, sílica de alta pureza dopada com Titânio
57. SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*
58. SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*
59. SRM, monitoramento seletivo de reações, do inglês *selected reacton monitoring*
60. Teagasc, Instituto responsável pelo desenvolvimento de alimentos e agricultura na Irlanda, do inglês *Agriculture and Food Development Authority*
61. UPLC, cromatografia líquida de ultra performance, do inglês *ultra performance liquid chromatography*

62. US EPA, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*
63. WHO, Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*
64. WL_r, repetibilidade intralaboratorial, do ingles *within-laboratory repeatability*
65. WL_R, reprodutibilidade intralaboratorial, do inglês *within-laboratory reproducibility*
66. Z-Sep, mistura de dois sorventes: sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO_2) e C_{18}, na proporção de 2:5.
67. Z-Sep+, consiste em C_{18} e sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO_2) conectados na mesma partícula de sílica

RESUMO

Título: Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes

Autor: Lenise Guimarães de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

Este trabalho consiste no desenvolvimento de dois métodos para a determinação de resíduos em tecidos de peixes usando QuEChERS modificado e métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. O capítulo 1 refere-se ao método de extração usando sistema de vibração para a determinação de antiparasitários por LC-MS/MS. O método cromatográfico foi otimizado e foram investigados os efeitos de diferentes sorventes para a remoção de interferentes presentes nos extratos das matrizes de salmão, truta e *seabass* na etapa de *clean-up*. Três métodos foram comparados e o melhor foi usado para a etapa de validação em tecido de salmão. A veracidade e a precisão variaram entre 87 - 121% e 4,1 - 23,7%, respectivamente, para a maioria dos compostos. O método permite a extração e análise de 36 amostras em 9 horas por um único analista. O capítulo 2 refere-se ao método para determinação de resíduos de piretróides em tecidos de peixes comumente consumidos na região Sul do Brasil usando GC-MS. O efeito da precipitação à baixa temperatura e de diferentes sorventes na remoção de interferentes da matriz foram avaliados na etapa de *clean-up*. A proporção dos sorventes C_{18}, PSA e Z-Sep+ foi otimizada usando planejamento experimental. O método foi validado em tecidos de traíra e a ampliação de escopo da matriz foi executada para tecidos de tilápia e tainha. As recuperações variaram entre 71 – 107%, 67 – 110% e 63 – 129% para traíra, tilápia e tainha, respectivamente, com RSD% ≤ 21,5%. Os métodos apresentaram limites de quantificação na faixa de 2 a 10 $\mu g\ kg^{-1}$ para todos os compostos. Esses limites são inferiores ao limite máximo de resíduo estabelecido para cada composto, podendo ser utilizados pelos órgãos regulatórios para o monitoramento da presença de resíduos em amostras de pescado. A aplicabilidade do método foi avaliada através de análises de amostras reais, onde resíduos de alguns compostos foram encontrados.

ABSTRACT

Title: Development and Validation of a Chromatographic Method coupled with Mass Spectrometry for Residues Determination in Fish Samples

Author: Lenise Guimarães de Oliveira

Advisor: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

The development of two methods for residues determination in fish tissues using modified QuEChERS technique and chromatography coupled with mass spectrometry was described. The chapter 1 refers to a method using vibration extraction for determination of antiparasitics by LC-MS/MS. The chromatographic method was optimized. The effect of different sorbents was investigated regarding co-extractives removal from extracts of salmon, trout and seabass matrices in clean-up step. Three methods were compared and the best was used for validation step in salmon tissue. The trueness and precision ranged from 87 – 121% and 4.1 – 23.7%, respectively, for the major part of the compounds. The developed method allows the extraction and analysis of 36 samples in 9 hours by one analyst.The chapter 2 refers to a method for determination of pyrethroids residues in fish tissues commonly consumed in Southern of Brazil using GC-MS. The effect of precipitation at low temperature and different sorbents was evaluated for co-extractives removal in clean-up step. The proportion of the sorbents C_{18}, PSA and Z-Sep+ was optimized through experimental design. The method was validated in trahira tissue and a scope extension was performed for tilapia and tainha tissues. The recoveries ranged from 71 – 107%, 67 – 110% and 63 – 129% for trahira, tilapia and tainha, respectively, and RSD% ≤ 21.5%. The methods demonstrated limits of quan tification ranging from 2 a 10 $\mu g\ kg^{-1}$ for all compounds. These limits were below the established maximum residue limit for each compound. Therefore, they could be used by regulatory agencies for monitoring the presence of these residues in fish samples. The applicability of these methods was assessed by analysis of real samples where residues were detected.

1. INTRODUÇÃO

Piretróides são compostos sintéticos derivados das piretrinas muito utilizados no combate a insetos em diversas culturas. Além disso, são empregados no controle de ectoparasitas na produção de alimentos de origem animal e no controle de pragas (mosquitos). Também são usados em produtos de *Pet Shop*, jardinagem e de cuidado pessoal (no combate a piolhos e como repelente). Estes compostos são muito utilizados no controle de doenças ocasionados pelos ectoparasitas conhecidos como piolhos do mar em aquicultura. Azametifós (organofosforado) e diflubenzurom (benzoiluréia) também são indicados para este fim na produção de pescado.

Devido ao uso extensivo, resíduos destes compostos vem sendo encontrados em diversas amostras, sejam elas amostras ambientais (água e sedimento), amostras de alimentos (chás e pescado), ou amostras biológicas diversas (leite materno e tecidos de golfinhos).

Os ambientes aquáticos estão sujeitos a descargas diretas ou indiretas destes compostos, tanto em regiões urbanas e industriais, quanto em regiões agrícolas. No ambiente aquático estes contaminantes podem se acumular nas partículas em suspensão, no sedimento e nos organismos vivos. Os peixes podem acumular os compostos através das guelras, pela alimentação ou através de teias alimentares (biomagnificação). Por este motivo, também podem ser utilizados como indicador de contaminação ambiental. Estes compostos apresentam elevada toxicidade aos organismos aquáticos não-alvo, como por exemplo, os crustáceos.

A exposição dos seres humanos pode se dar através de contato indireto ou através da alimentação. Para proteger a saúde dos consumidores, limites máximos de resíduos são estabelecidos através de órgãos nacionais e internacionais. Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias de determinação de resíduos é crucial para o controle e monitoramento destes compostos nos alimentos disponíveis ao consumidor. O desenvolvimento de um método de preparo de amostra com base nas características dos compostos e da matriz em estudo, a escolha do método de detecção e a etapa de validação do método analítico são muito importantes para a obtenção de resultados confiáveis.

Desta forma, este trabalho visa desenvolver e validar métodos analíticos capazes de quantificar resíduos de diferentes classes (piretróides, benzoiluréia e organofosforado) em tecidos de diferentes peixes usando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Durante o desenvolvimento destes métodos foram investigados os melhores procedimentos e condições a serem utilizados a fim de permitir: 1) a extração eficiente dos compostos presentes na matriz, 2) a remoção dos componentes da matriz (gordura, proteína e corantes) que podem interferir nos resultados das análises, 3) a quantificação inequívoca dos resíduos em baixas concentrações considerando os valores de LMR (limite máximo de resíduo) para cada analito de interesse, 4) preparo de amostra simultâneo para um grande número de amostras e 5) a utilização dos métodos em rotina.

Após a revisão da literatura, este trabalho foi dividido em dois capítulos, que correspondem aos artigos científicos produzidos. O capítulo 1 refere-se ao artigo que descreve os estudos desenvolvidos durante o doutorado sanduíche no exterior junto ao laboratório de resíduos do Teagasc e que foi submetido à revista *Journal of Chromatography A*. O capítulo 2 corresponde ao artigo que descreve os estudos desenvolvidos junto ao Laboratório de Análise de Resíduos e Contaminantes – LARCO da FURG e que foi submetido à revista *Food Chemistry*. As normas adotadas para organização e formatação dos artigos são aquelas estabelecidas pelas revistas às quais foram submetidas.

Capítulo 1 – Artigo I

Título: Vibration extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Palavras-chave: *antiparasitic, fish, LC-MS/MS, dispersive-SPE, vibration extraction*

Autores: Lenise Guimarães de Oliveira, Mary Moloney, Abilasha Ramkumar, Márcia Helena Scherer Kurz, Fábio Ferreira Gonçalves, Osmar Damian Prestes, Martin Danaher

Capítulo 2 – Artigo II

Título: Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS

Palavras Chave: *pyrethroids; fish; GC-MS; dispersive-SPE; mixture design*

Autores: Lenise Guimarães de OLIVEIRA, Márcia Helena Scherer KURZ, Marlon Cezar Maciel GUIMARÃES, Manoel Leonardo MARTINS, Osmar Damian PRESTES, Renato ZANELLA, Joaquim Neves da Silva RIBEIRO and Fábio Ferreira GONÇALVES

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção e consumo de peixe

A produção global de pescado no ano de 2016 foi de aproximadamente 171 milhões de toneladas, movimentando cerca de 362 bilhões de dólares. A aquicultura corresponde a 47% do total produzido, movimentando 232 bilhões de dólares. Nos últimos seis anos a produção de peixe por captura vem se mantendo em torno de 90 milhões de toneladas/ano. No ano de 2016, cerca de 90% da produção global de pescado foi destinada ao consumo humano. O consumo, per capita, de pescado era de 9,0 kg em 1961, passando a 20,2 kg em 2015, o que representa um crescimento de 1,5% ao ano. Em 2016, este setor gerou cerca de 60 milhões de empregos, sendo 85% destes na Ásia, 10% na África e 4% na América Latina e Caribe (FAO, 2018a).

Segundo dados de 2012, a produção brasileira de pescado foi de aproximadamente um milhão de toneladas, 62% oriunda da pesca por captura e 38% da aquicultura. As regiões Nordeste (29%) e Sul (22%) foram responsáveis por cerca de metade da produção nacional. As principais espécies cultivadas na região Sul, Sudeste e Nordeste são carpa, tilápia, truta, camarão marinho e moluscos bivalves. Segundo o plano de desenvolvimento da aquicultura brasileira, a meta para 2020 é de atingir a produção de dois milhões de toneladas via aquicultura, sendo 87,5% correspondente a produção de peixes (MPA, 2015).

A aquicultura é um dos setores da produção de alimentos que mais cresce no mundo. Entretanto, o surto de doenças é considerado uma restrição para o desenvolvimento deste setor, causando grandes perdas econômicas por ano no mundo todo (KUMAR; ROY, 2017).

2.2 Controle de doenças em aquicultura

A fim de garantir a elevada produtividade, o uso de diversas substâncias tais como antimicrobianos, agrotóxicos, hormônios, anestésicos, vitaminas e minerais vem

sendo adotado em aquicultura para prevenir ou combater a ocorrência de doenças (KUMAR; ROY, 2017).

Na Europa, uma grande variedade de produtos químicos é utilizada na aquicultura marinha, sendo estes classificados como desinfetantes, agentes antivegetativos e medicamentos veterinários. Dentre os medicamentos veterinários utilizados na produção de peixes (incluindo truta, salmão e *sea bass*) estão os antibióticos, anestésicos, ectoparasiticidas e endoparasiticidas (COSTELLO, 2001).

O piolho do mar (*sea lice*) é o ectoparasita mais comum em aquicultura (COSTELLO, 2001). Estes ectoparasitas podem ocasionar lesões na pele do peixe, deixando-os vulneráveis a infecções. A suscetibilidade a ectoparasitas e a ocorrência de doenças na produção intensiva de salmão, por exemplo, ocasiona diminuição da produção e consequentes perdas econômicas (TUCCA *et al*., 2014). A incidência pode ser maior em locais de criação de peixes em que a qualidade da água é baixa e o espaço físico é limitado (LANGFORD, 2014). Para evitar e combater surtos de doenças, ocasionados por piolhos do mar, um grande número de medicamentos veterinários é utilizado. Dentre elas estão: azametifós, peróxido de hidrogênio, ivermectina, emamectina, cipermetrina, deltametrina, teflubenzurom e diflubenzurom (COSTELLO, 2001).

Estes compostos diferem significamente entre si no que diz respeito as suas propriedades físico-químicas, toxicidade e comportamento no meio ambiente. Além disso, a maioria destes compostos é indicada para uso em diferentes setores da produção de alimentos, além da aquicultura, como é o caso dos piretróides.

2.3 Propriedades físico-químicas, utilização e toxicidade dos compostos em estudo

2.3.1 Piretróides

Os primeiros piretróides usados para o controle de insetos foram as piretrinas naturais chamadas piretrina I e II, cinerina I e II e jasmolina I e II, produzidas naturalmente por espécies de crisântemos como a *Chrysanthemum cinerariaefolium*. As piretrinas não eram efetivas para uso em cultivo devido à rápida degradação pela ação da luz (ELLIOTT *et al*., 1978). Em 1949, a aletrina foi o primeiro piretróide

sintético produzido. Este composto apresentou melhor ação quando comparado aos compostos naturais existentes e ao DDT (diclorodifeniltricloroetano). Os compostos resmetrina, bioresmetrina, tetrametrina e fenotrina, apesar de mais efetivos, ainda apresentavam instabilidade à luz. Permetrina e fenvalerato foram produzidos entre 1972 e 1973 e apresentaram melhor estabilidade à luz, sendo efetivas de 4 até 7 dias após aplicação. A partir de 1980, os piretróides bifentrina, cialotrina, ciflutrina, cipermetrina e deltametrina foram sintetizados. Estes são menos voláteis que os anteriores, são menos instáveis à luz e efetivos por mais de 10 dias após aplicação (BBSRC, 2018).

A estrutura básica das piretrinas é composta por um ciclopropano carboxílico ligado a um álcool aromático através de uma ligação éster, conforme demonstrado na Figura 1. A aletrina foi sintetizada com base nesta estrutura, entretanto a cadeia lateral de pentadienil foi substituída por uma porção isostérica para melhorar a estabilidade fotoquímica (piretróides do tipo I). Para melhorar a atividade inseticida, um grupo ciano foi adicionado à estrutura dos piretróides, como é possível observar na ciflutrina, acrinatrina, deltametrina, ʎ-cialotrina, entre outros (piretróides do tipo II). Fenvalerato e esfenvalerato não apresentam o ciclopropano em sua estrutura, entretanto o grupo ciano garante a atividade inseticida (ELLIOTT *et al*., 1978). Desta forma, os piretróides foram sintetizados através de sucessivas substituições dentro da estrutura das piretrinas para conservar as propriedades estereoquímicas e físicas (SODERLUND *et al*., 2002; SCHLEIER *et al*., 2011).

Figura 1. Estrutura básica das piretrinas.

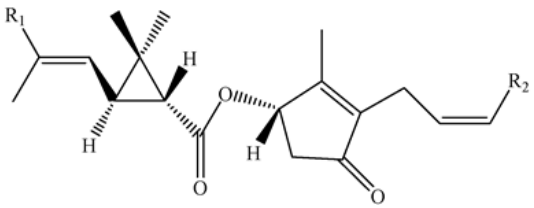
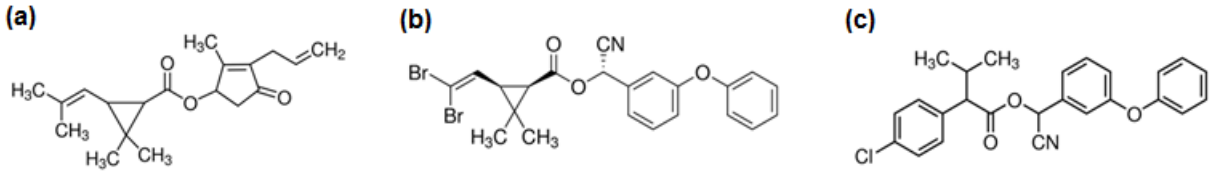


Figura 2. Estrutura da aletrina (a), deltametrina (b) e fenvalerato (c).



Os piretróides apresentam diversos grupos estruturais apresentando centros quirais em sua estrutura (de 2 a 3), e por isso, podem apresentar de 2 a 4 diastereoisômeros e 4 a 8 enantiômeros (BARR *et al*., 2010). São voláteis e apresentam coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}) que varia de 5 a 8, portanto, são contaminantes orgânicos hidrofóbicos com baixa solubilidade em água (TUCK *et al*., 2018; TUCCA *et al*., 2014; ALONSO *et al*., 2012; CORCELLAS *et al.*, 2012; FEO *et al*., 2010). O mecanismo de ação das piretrinas e piretróides é complexo e torna-se ainda mais complicado quando utilizado associado aos organofosforados, já que estes inibem o metabolismo dos piretróides. Os maiores efeitos são observados pela inibição dos canais de sódio causando desordem nas células nervosas e musculares (BRADBERRY *et al*., 2005).

Esses compostos são, provavelmente, o maior e mais amplo grupo de agrotóxicos utilizados atualmente (KAY; MACNEIL; WANG, 2016). Devido sua eficiência e versatilidade, são usados tanto como agrotóxicos quanto como medicamentos veterinários. No Brasil são autorizados para controle de insetos no cultivo de cebola, feijão, milho, laranja, mandioca, tomate, alface, arroz, batata, repolho, mamão, uva, banana, pepino, maçã e abobrinha (ANVISA, 2018). Também são autorizados para uso como antiparasitários na produção de bovinos, equinos, suínos, e peixes (PNCRC, 2018). São também usados como inseticidas no controle de doenças transmitidas por insetos, como malária, dengue, leishmaniose e tifo (ALONSO *et al.*, 2012), empregados em produtos de uso doméstico, produtos de jardinagem, produtos de cuidado pessoal (controle de piolhos), produtos de *Pet Shop* (shampoo anti-pulga, controle da sarna), entre outras aplicações (ANADÓN *et al*., 2009; CORCELLAS *et al*., 2015; CORCELLAS *et al*., 2012).

Inicialmente considerava-se que os piretróides apresentavam uma baixa toxicidade porque seriam facilmente convertidos por hidrólise (em mamíferos) ou por metabolismo oxidativo (em peixes), em metabólitos não tóxicos, tais como ácido fenoxibenzóico (ALONSO *et al.*, 2012; CORCELLAS *et al.*, 2012). Entretanto, estudos indicam que piretróides são tóxicos aos peixes, tanto de água salgada quanto de água doce (ALONSO *et al*., 2012; FEO *et al*., 2010), e ocasionam efeitos adversos ao ambiente aquático em longo prazo (ZHAO, 2014). Organismos não-alvo como

crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta) também são afetados (LANGFORD *et al.*, 2014; CORCELLAS *et al.*, 2012).

Estudos apontam que a baixa exposição de seres humanos e mamíferos a estes compostos pode ocasionar sintomas neurotóxicos, como tremores (ALBERT; POMBO-VILLAR, 1997). A exposição crônica pode desenvolver sintomas como dor de cabeça, náusea e tontura. A exposição em longo prazo também pode ocasionar danos no baço e gânglios linfáticos aumentando o risco de desenvolvimento de câncer. Alguns destes compostos podem apresentar toxicidade ao sistema imunológico (WU; MIAO, FAN, 2011) e endócrino (MNIF *et al.*, 2011). Segundo Koureas *et al.* (2012) a exposição à piretróides está associada com efeitos adversos ao sistema reprodutivo (KOUREAS *et al.*, 2012). Radwan *et al.* (2015) relacionou a presença de metabólitos de piretróides na urina de pacientes com a ocorrência de alteração cromossômica em espermatozóides (aneuploidia). A presença de metabólitos de piretróides também está associada ao aumento do risco de tumor no cérebro (CHEN *et al.*, 2016) e leucemia em crianças (DING *et al.*, 2012), além de problema cardíaco (HAN *et al.*, 2017).

2.3.2 Organofosforados

Os organofosforados são compostos sintéticos amplamente usados na produção agrícola, principalmente após a proibição dos organoclorados (SUN *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2009). Azametifós é um organotiofosfato heterocíclico que age como inseticida com ação neurotóxica através da inibição da acetilcolinesterase (CANTY *et al.*, 2007). Apresenta log K_{ow} de 1,5 e baixa volatilidade (PPDB, 2018; PUBCHEM, 2018). Na agricultura, é usado no controle de pragas, e em medicina veterinária para o controle de doenças que ocorrem na piscicultura (piolhos do mar) (HE *et al.*, 2009; RAJENDRAN, 1994; NAYLOR *et al.*, 2000).

Azametifós apresenta risco baixo ou moderado devido à baixa persistência no ambiente aquático que é de 8,9 dias (tempo de meia vida) (SEPA, 1997; ERNST *et al.*, 2001). Segundo a Agência Européia de Medicamentos, através do relatório EPMAR (do inglês, *European Public MRL Assessment Report*) (2012), foram observadas baixas concentrações dos resíduos de azametifós em músculo e pele de peixe após 1h da aplicação do tratamento. Segundo o relatório, este nível de contaminação não

apresenta risco à saúde humana. Apesar de não apresentar toxicidade aguda para organismos bivalves, foi letal para crustáceos (lagostas e camarão) quando estes foram expostos na concentração recomendada de 100 μg L^{-1} (BURRIDGE et al., 1999). A toxicidade de azametifós é dependente do estágio de vida dos organismos não-alvo (BURRIDGE et al., 2000).

2.3.3 Benzoiluréias

Diflubenzurom é um derivado da benzoilfenilureia e age como um potente inseticida interferindo na síntese da quitina e controlando insetos e crustáceos em estágios imaturos. Possui log K_{ow} de 3,6 e baixa solubilidade em água (PPDB, 2018; PubChem, 2018). Este composto é eficiente no controle dos ectoparasitas *Lernaea cyprinacea* e *Dolops carvalhoi* em peixes (MARTINS *et al*., 2004; SCHALCH *et al*. 2005). Por este motivo é usado na produção de pescado, inclusive no Brasil (LAGFORD *et al*., 2014; MABILIA; DE SOUZA, 2006; MADUENHO *et al*., 2008). Também é usado para o cultivo de cítricos, algodão, cogumelos, plantas ornamentais, árvores, bovinos e no controle de larvas de mosquitos em água parada (EPA, 1997). No Brasil, diflubenzurom é recomendado para o cultivo de laranja, tomate, milho, mandioca e arroz (PARA, 2018).

Estudos indicam que o diflubenzurom apresenta concentração letal (LC_{50}) para peixes de 127 mg L^{-1} considerando 96 h de exposição, o que caracteriza baixa toxicidade (EPA, 2009). Entretanto, o peixe pode acumular o diflubenzurom presente na água mais de 160 vezes (EISLER *et al.*, 1992). Além disso, é degradado por hidrólise e por fotodegradação produzindo metabólitos tóxicos. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2009) (US EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) o metabólito 4-cloroanilina (PCA) apresenta maior toxicidade aos peixes, com LC_{50} variando de 2 a 23 mg L^{-1}. Os metabólitos 2,6-ácido diflubenzóico e 4-clorofenilurea apresentam toxicidade similar ao diflubenzurom (LC_{50} entre 70 e 100 mg L^{-1}). Conforme a EPA, não existem evidências de efeitos tóxicos por diflubenzurom em humanos, entretanto o metabólito PCA apresenta potencial efeito carcinogênico (EPA, 1997).

Em 2008, a Comissão Européia incluiu o diflubenzurom na lista de produtos fitofarmacêuticos disponíveis no mercado. Segundo o Regulamento de Execução (UE) Nº 855 (2017), desde a inclusão, foi iniciado um estudo quanto à relevância toxicológica do metabólito PCA. Conforme o regulamento, devido às propriedades genotóxicas e cancerígenas da PCA e a ausência de um limite de exposição aceitável, a partir de 2017, o uso de diflubenzurom está autorizado apenas em culturas não comestíveis, evitando a exposição dos consumidores à PCA. Até o dado momento, não são monitorados resíduos de metabólitos de diflubenzurom.

2.4 Transporte e incidência dos resíduos e contaminantes no meio ambiente

Devido à administração variada e ao uso decorrente em diferentes setores o transporte global dos resíduos e contaminantes no meio ambiente é impossível de ser determinado e é dependente de diversos fatores, podendo ocorrer através de diversas formas (geralmente associadas). É um processo complexo em que resíduos são encontrados em regiões em que jamais foram aplicados (TANG *et al*., 2018). Os ambientes aquáticos, por exemplo, podem ser contaminados por diversas vias, seja ela por deposição atmosférica, escoamento de rios, descargas de tratamento de águas, entre outros (ALONSO *et al*., 2012; TANG *et al*., 2018). Também pode ocorrer contaminação pela lixiviação dos compostos pela chuva e transporte através do solo atingindo águas subterrâneas além dos ambientes aquáticos (GONG, 2013).

A exposição dos peixes pode ocorrer devido à contaminação do ambiente aquático ou através de aplicação direta dos compostos, como no caso dos locais de cultivo de peixes (LANGFORD *et al*., 2014). A absorção se dá através das guelras, devido ao caráter lipofílico dos compostos, pela alimentação ou através da cadeia alimentar (LANGFORD *et al*., 2014; ALONSO *et al*., 2012). Os piretróides deltametrina e cipermetrina são usados como tratamento tópico e são aplicados diretamente nos tanques de cultivo. Devido à forma de aplicação, os organismos não-alvo (na maioria crustáceos) também podem ser afetados (LANGFORD *et al*., 2014). Mesmo sendo diluídos no ambiente aquático os mesmos tendem a ser absorvidos por partículas em suspensão ou a se depositar nos sedimentos. Devido suas características hidrofóbicas, pode ocorrer o aumento do tempo de meia vida de 5 dias para mais de 80 dias

(TUCCA *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010; HAYA *et al.*, 2005; LANGFORD *et al.*, 2014).

Azametifós também é indicado para uso tópico em peixes apesar de apresentar potencial toxicidade aos ecossistemas aquáticos e aos organismos não-alvo (DAVIES *et al.*, 2001). Diflubenzurom é administrado via ração sendo aplicado diretamente nos tanques de cultivo de peixes. Estima-se que cerca de 10% da dose administrada é absorvida pelo peixe e os 90% restantes são excretados. Além disso, cerca de 5 a 15% da ração administrada não é consumida, permanecendo no ambiente e contribuindo, inclusive, com a carga orgânica (CHEN; BEVERIDGE; TELFER, 1999; LANGFORD *et al.*, 2014).

A exposição dos seres humanos aos resíduos também pode se dar de diferentes formas sendo influenciada por diversos fatores. Esses fatores são inicialmente a idade do indivíduo e a sua localização, ou seja, se está próximo de regiões agrícolas ou de regiões urbanas onde estes produtos são aplicados para controle de pragas. Ela pode ocorrer através do consumo de alimentos contaminados, uso de inseticidas domésticos, entre outros (YE, *et al.*, 2015; DING, *et al.*, 2012).

O sucesso quanto ao uso de piretróides se dá devido à sua alta eficiência, fácil degradação e, portanto, baixa persistência no meio ambiente, que se estima ser entre 12 e 197 dias (HOU *et al.*, 2014; CORCELLAS *et al.*, 2012; FEO *et al.*, 2010). Entretanto, resíduos destes compostos estão sendo encontrados em amostras ambientais, tais como a água e sedimentos (FEO *et al.*, 2010), algas marinhas (GARCÍA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012), alimentos de origem animal como carne bovina, carne de frango, ovos, peixe e leite (DALLEGRAVE, *et al.* 2016; CORCELLAS *et al.*, 2015), chás (HOU *et al.*, 2014), mamíferos (golfinhos) (ALONSO *et al.*, 2012) e em leite materno (CORCELLAS *et al.*, 2012).

Resíduos de piretróides foram encontrados em amostras de fígado, leite e placenta de mamíferos marinhos (golfinhos) da costa brasileira, próximo aos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Permetrina foi o composto mais encontrado dentre os piretróides analisados, contribuindo com 55% dos resultados. A concentração total de piretróides em amostras de fígado de golfinhos adultos e jovens foi de 7,05 e 68,4 ng g^{-1}, respectivamente. Nas amostras de leite e placenta foram encontradas

concentrações que variaram de 2,53 a 4,77 ng g^{-1} e de 331 a 1812 ng g^{-1}, respectivamente (ALONSO *et al*., 2012).

Corcellas *et al*. (2015) apresentaram estudos de bioacumulação de piretróides em peixes. As amostras foram coletadas em 4 bacias de rios, na Espanha, sendo que um dos pontos de coleta corresponde à água para abastecimento. Foram detectados piretróides em todas as amostras coletadas, em concentrações que variaram de 12 a 4938 ng g^{-1}, sendo as maiores concentrações observadas em amostra de truta coletada no reservatório (4938 ng g^{-1}) e de carpa (1508 ng g^{-1}).

Dallegrave *et al*. (2016) desenvolveu método para determinação de resíduos de 17 piretróides em gordura de alimentos de origem animal, sendo eles carne bovina, carne de frango, ovos, peixe e leite. As amostras foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) e foram coletadas randomicamente por fiscais federais em empresas registradas no Ministério da Agricultura e controladas pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Todas as amostras foram positivas para ao menos um dos piretróides analisados com fração mássica variando entre 0,03 e 74,2 ng g^{-1} de gordura animal. Nas amostras de peixes foram encontrados resíduos de bifentrina, cialotrina e cipermetrina com concentrações variando de 0,4 a 26,1 ng g^{-1}.

Conforme estudo descrito por Langford *et al.* (2014), amostras ambientais de peixes e de crustáceos foram coletadas em regiões próximas a cinco aquiculturas localizadas na Costa da Noruega. O objetivo deste estudo foi verificar o impacto ocasionado no ambiente marinho e no cultivo de camarão e bacalhau devido ao tratamento para piolhos do mar. A concentração de diflubenzurom em amostras de sedimento e água oriundas de dois pontos de coleta variou de 5,9 a 136,6 ng g^{-1} e de 13,1 a 295,2 ng L^{-1}, respectivamente. As amostras de camarão e mexilhão azul oriundas de um dos pontos de coleta apresentaram concentrações que variaram de 0,5 a 10 ng g^{-1} e 2,7 a 22 ng g^{-1}, respectivamente. As maiores concentrações foram observadas nas amostras de caranguejo variando entre 180,9 a 537,9 ng g^{-1}. Não foram encontrados resíduos de diflubenzurom em amostras de bacalhau (LANGFORD et al., 2014).

A presença destes resíduos em amostras de peixes confirma a necessidade de estabelecer e monitorar os LMR através de programas de monitoramento, a fim de garantir a segurança alimentar e proteger a saúde do consumidor.

2.5 Limites máximos de resíduos para amostras de peixes

Limite máximo de resíduo é definido como a concentração máxima de resíduo que não causaria risco à saúde humana, considerando a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto (PASCHOAL et al., 2008).

Atualmente, no Brasil, existem dois programas atuando no monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos: o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MAPA, 2018; ANVISA, 2018).

O PNCRC monitora a presença e os níveis de resíduos e contaminantes de produtos de uso veterinário, agrotóxicos ou afins e de contaminantes químicos (aflatoxinas, metais pesados, contaminantes inorgânicos, entre outros), potencialmente nocivos à saúde do consumidor em alimentos de origem animal e vegetal (MAPA, 2018). O programa PARA tem como objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal disponíveis ao consumidor (ANVISA, 2018). O principal objetivo destes programas consiste em verificar a qualidade, segurança e inocuidade dos alimentos, tanto de origem vegetal quanto de origem animal, disponíveis ao consumidor, para que sejam, inclusive, equivalentes aos requisitos sanitários estabelecidos internacionalmente pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), CODEX Alimentarius, Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgão auxiliares como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) e Organização Mundial da Saúde (WHO) (ANVISA, 2018; MAPA, 2018).

Os programas de monitoramento brasileiros publicam a programação de análises que serão realizadas e os LMR dos diversos compostos que serão monitorados bem como os resultados das análises realizadas no ano anterior (ANVISA, 2018; MAPA, 2018). Conforme o PNCRC através da Instrução Normativa nº 20 (2018),

quarenta e cinco amostras de pescado de cultivo (músculo) foram analisadas para monitoramento dos resíduos de aletrina, bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, diflubenzurom, fempropatrina, fentoato, fenvalerato, lambda cialotrina, permetrina e prometrina considerando um LMR de 10 μg kg^{-1}, exceto para deltametrina (30 μg kg^{-1}), no ano de 2018.

A Comunidade Européia possui limites estabelecidos conforme o Regulamento nº 37 (2010) e monitora os resíduos de cipermetrina (50 μg kg^{-1}) para peixes da família *salmonidae,* e deltametrina (10 μg kg^{-1}) em músculo e pele de peixes em proporção natural. Diflubenzurom apresentava limite estabelecido de 1000 μg kg^{-1} para peixes da família *salmonidae* (REGULAMENTO, 2010). Porém, conforme Regulamento de Execução (UE) Nº 855 (2017), não é mais permitido o uso deste composto em produtos para consumo devido ao metabólito tóxico 4-cloroanilina. Por este motivo, o Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário (CVMP, do inglês *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*) (2018) sugeriu a alteração do LMR de diflubenzurom do Regulamento nº 37 (2010) para 10 μg kg^{-1}.

Para que os limites estabelecidos sejam monitorados pelos programas de monitoramento é necessário que estejam disponíveis metodologias analíticas capazes de: detectar baixas concentrações (considerando o LMR de cada composto) em matrizes complexas, analisar um grande número de amostras de rotina simultaneamente e ser compatível com os equipamentos disponíveis a um custo adequado. Neste sentido, um grande número de métodos vem sendo desenvolvidos para suprir esta demanda crescente (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

2.6 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos

2.6.1 Extração e *clean-up*

O desenvolvimento do procedimento de preparo de amostra é etapa crucial em um processo de desenvolvimento de um método analítico (KINSELLA et al., 2009; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Segundo Kinsella *et al*. (2009), o preparo da amostra corresponde ao processo de extração dos resíduos químicos presentes em uma amostra e a subsequente purificação do extrato, a fim de isolar os resíduos de interesse e remover os interferentes da matriz que podem afetar os sistemas de

detecção. Portanto, os objetivos de um método de preparo de amostra são: isolar os compostos de interesse (na etapa de extração) e remover os interferentes presentes na matriz (na etapa de *clean-up*) (PRESTES *et al*., 2013).

Os diferentes processos realizados durante a extração dos resíduos podem afetar a estabilidade dos analitos e a eficiência do procedimento de extração. A escolha do melhor procedimento de *clean-up* é etapa crucial no desenvolvimento de um método de preparo de amostras, pois, além de reduzir interferentes da matriz, evita a contaminação dos equipamentos de detecção tornando o método mais sensível e robusto (SANTE, 2017).

Inúmeros métodos de preparo de amostras para determinação de resíduos em diversas matrizes usando sistemas de detecção por espectrometria de massas estão disponíveis na literatura. Dentre eles estão: extração líquido-líquido, QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), MSPD (do inglês, *matrix solid-phase dispersion*), SPE (do inglês, *solid phase extraction*), SPME (do inglês, *solid-phase microextraction*), PLE (do inglês, *pressurized-liquid extraction*), MAE (do inglês, *microwave-assisted extraction*), DLLME (do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*), SFE (do inglês, *supercritical fluid extraction*), dentre outros (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; KINSELLA *et al*., 2009; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) pode ser vantajoso para determinação de resíduos, pois permite a extração dos analitos e a execução do *clean-up* em uma única etapa (KINSELLA *et al*., 2009). Esta técnica consiste, basicamente, em misturar a amostra com um suporte sólido até completa homogeinização, transferir a mistura para uma coluna e eluir os analitos com solvente orgânico (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Na etapa de extração por MSPD a mistura amostra-suporte é homogeneizada com auxílio de pistilo e almofariz de vidro (KINSELLA *et al*., 2009). A mistura é então empacotada em coluna de vidro ou de polietileno contendo lã de vidro ou papel-filtro. Caso seja necessário realizar uma maior limpeza do extrato, um sorvente pode ser adicionado à coluna MSPD (co-coluna). O eluente (solvente orgânico) é adicionado com o objetivo de solubilizar os analitos retirando-os da coluna. Após eluição, o extrato

pode ser submetido à etapa de concentração e injetado no sistema cromatográfico. O tempo total para o preparo de uma amostra é de aproximadamente 40 min (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Para garantir a eficiência da MSPD alguns parâmetros devem ser definidos, dentre eles: a) escolha e quantidade de suporte sólido dispersante, b) homogeinização, c) escolha e quantidade de adsorvente para co-coluna, d) escolha e volume do solvente de eluição (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A escolha do suporte sólido e do solvente de eluição adequados é fundamental para que a técnica seja eficiente e seletiva. Dentre os suportes mais utilizados estão: C_{18}, sílica, alumina, cianopropil e florisil. A quantidade do suporte varia de acordo com a quantidade e característica física da amostra (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Geralmente a proporção amostra-suporte varia de 1:1 a 1:4 (KINSELLA *et al*., 2009). Para amostras que contêm alto teor de água também é recomendado o uso de sais secantes, como sulfato de sódio anidro ou sílica (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Para a homogeinização da amostra deve ser estabelecido o tempo de contato da mistura amostra-suporte e a intensidade de homogeinização. No caso de existir a necessidade da adição de um adsorvente (co-coluna), o mesmo pode ser escolhido com base nas análises cromatográficas ou optando por um adsorvente com polaridade diferente daquele utilizado como suporte sólido (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A escolha do solvente de eluição deve estar baseada nas características dos analitos presentes na amostra, principalmente com relação à polaridade, além de serem compatíveis com o sistema de detecção. N-hexano, acetato de etila, acetonitrila, metanol, diclorometano e acetona são alguns dos solventes utilizados. Esta técnica permite que dois ou mais solventes possam ser eluídos em sequencia. O volume de eluição é dependente de vários fatores, como solubilidade e concentração do analito, da amostra e do dispersante, forças de interação entre analito e a matriz-suporte, presença de co-coluna, dentre outros. Entretanto, a utilização de menores quantidades de solvente é preferida (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Apesar de apresentar importantes vantagens como, por exemplo: realizar extração e *clean-up* em uma única etapa, ser aplicável para diversos tipos de resíduos, não necessitar de etapa de precipitação de proteínas e de centrifugação, esta técnica não é muito aplicada em análises de rotina em programas de monitoramento de resíduos (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; KINSELLA et al., 2009).

Outro método muito utilizado para determinação de diferentes resíduos em diferentes matrizes é o método QuEChERS. Por definição, QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) é um método rápido, fácil de ser executado, barato, efetivo, robusto e seguro. É um método versátil e que possibilita a determinação de várias amostras em um mesmo lote de análises, bem como o uso subsequente de diferentes técnicas de detecção (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) e consiste basicamente em três etapas: extração, partição e *clean-up*.

Na etapa de extração do método QuEChERS original são usados 10 g de amostra e 10 mL de acetonitrila (ANASTASSIADES *et al*., 2003). A acetonitrila é um solvente que apresenta como principais vantagens a extração de compostos com diferentes polaridades e a extração de menor quantidade de coextrativos presentes naturalmente nas amostras como, gorduras e pigmentos (LEHOTAY et al., 2001).

A etapa de partição do método QuEChERS original é realizada através de adição de sais (1 g de NaCl e 4 g de $MgSO_4$). Estes promovem o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. O sal secante ($MgSO_4$) promove, ainda, a remoção de água através de processo exotérmico (40 a 45 °C). O aumento da temperatura auxilia na extração, principalmente de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al*., 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

O *clean-up* das amostras é realizado através da extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*). A d-SPE consiste basicamente em: 1) adição de sorvente (ou sorventes) e sal secante ($MgSO_4$) ao extrato obtido após os procedimentos de extração e partição, 2) agitação da amostra para completa homogeinização e 3) centrifugação para separação do extrato. A proporção entre o sorvente e o sal secante com relação ao volume de extrato usado no

método QuEChERS original foi de 25 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$ para cada 1 mL de extrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A d-SPE apresenta como principais vantagens o baixo custo, quando comparado às técnicas tradicionais disponíveis, e versatilidade, permitindo a utilização de diferentes sorventes em diferentes combinações e quantidades (PRESTES *et al.*, 2013; CABRERA *et al.*, 2012), além de ser um procedimento rápido e fácil de ser aplicado em métodos de rotina.

Uma alternativa interessante e viável de *clean-up* admitida pelo método QuEChERS consiste na limpeza do extrato através do congelamento da amostra à baixa temperatura. O congelamento do extrato reduz consideravelmente a presença de coextrativos lipídicos e outros compostos que apresentam baixa solubilidade em acetonitrila através de precipitação (QuEChERS, 2018a).

A agitação das amostras no método QuEChERS pode ser realizada manualmente ou usando disruptor, turrax, blender, entre outros. As separações matriz/extrato ou sorvente/extrato são realizadas através de centrifugação. O uso de medidores auxilia no preparo das porções de sais e sorventes utilizados na execução do método (QuEChERS, 2018b). A utilização dos recursos acima citados permite que o método QuEChERS seja facilmente executado na maioria dos laboratórios, inclusive aqueles com poucos recursos.

Nos casos em que se faz necessário atingir baixos limites de detecção dos compostos, a etapa de concentração da amostra através de evaporação do extrato também pode ser aplicada (PRESTES *et al.*, 2013), consistindo um dos métodos mais comuns descritos na literatura. A evaporação dos extratos pode ocasionar precipitação dos componentes da matriz e, em alguns casos, dos próprios compostos. Por este motivo, as temperaturas utilizadas devem ser as mais baixas possíveis. O uso de gás nitrogênio deve ser preferido ao uso de ar comprimido para evitar mecanismos oxidativos e introdução de água ou contaminantes no sistema (SANTE, 2017).

Para determinação de piretróides em alimentos de origem animal, a escolha do método de preparo de amostras geralmente está baseada nas características da matriz (LEDOUX, 2011). Os métodos de preparo de amostras em gordura animal geralmente envolvem extração líquido-líquido, extração por soxhlet, através do derretimento da

amostra para coleta e análise da gordura líquida (TUCK *et al*., 2018), além de dispersão da matriz em fase sólida (MOLONEY *et al*., 2018). As amostras de tecidos (rim, fígado e músculo) geralmente são extraídas usando solvente orgânico e dispersão por vortex, blender ou agitação manual. Para leite a utilização de extração líquido-líquido é a mais comum, entretanto outras técnicas como a dispersão da matriz sólida e QuEChERS também são utilizadas com o objetivo de facilitar a precipitação de proteínas presentes na matriz. Novos métodos, como por exemplo, microextração magnética por líquido iônico duplamente ligado (IL-DMME, do inglês, *ionic liquid-linked dual magnetic micro-extraction*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*), também foram empregados para determinação destes compostos em diferentes matrizes (TUCK *et al*., 2018). Portanto, conhecer a matriz de estudo também é um parâmetro importante a ser observado, pois determinará o melhor método de preparo de amostras a ser empregado.

2.6.2 Características das matrizes em estudo

Efeitos de matriz causados por constituintes naturais presentes nas amostras são muito frequentes e podem ocasionar supressão ou ganho de sinal nas respostas dos sistemas de detecção. A técnica de *clean-up*, por exemplo, deve ser desenvolvida considerando as características físico-químicas dos analitos (polaridade, solubilidade, entre outros) e dos componentes da matriz (teor de água, gordura, proteínas, pigmentos, entre outros) (SANTE, 2017).

A composição da matriz de diferentes espécies de peixes pode variar significativamente e é dependente de fatores como: espécie, idade, peso, habitat, tipo de alimentação, época da captura, entre outros. De uma forma geral, a composição dos peixes apresenta cerca de 60 a 90% de água, 8 a 23% de proteína e 0,5 a 25% de lipídios (ANDRADE; BISPO; DRUZIAN *et al.*, 2009).

A traíra (*Hoplias malabaricus*) é um peixe carnívoro de água doce. Habita águas paradas e se reproduz em água quente. Sua composição centesimal varia consideravelmente de acordo com o tipo de alimentação e idade. A traíra adulta apresenta aproximadamente 79% de água, 15% de proteína e 5% de lipídios (TORRES *et al.,* 2012).

A tilápia é um dos peixes mais cultivados no mundo e inclusive no Brasil, onde se adaptou facilmente em águas doces (açudes) (VILA NOVA; GODOY; ALDRIGUE, 2005). A composição centesimal de filés de tilápia é de cerca de 78% de água, 20% de proteína e 1,7% de lipídios (USDA, 2018a).

A tainha é encontrada em ambiente marinho, estuários e lagunas. Alimenta-se de detritos e de matéria orgânica, pois são herbívoras (OKAMOTO; SAMPAIO; MAÇADA, 2006). A tainha apresenta teor de água de aproximadamente 76%, 20% de proteína e 4% de lipídios (ANDRADE; BISPO; DRUZIAN, 2009).

O *seabass* (*Dicentrarchus labrax*) foi a primeira espécie marinha não pertencente à espécie *Salmonidae* a ser cultivada e comercializada na Europa. Atualmente tem relevante importância comercial na região Mediterrânea, sendo produzida na Grécia, Turquia, Itália, Espanha, Croácia e Egito (FAO, 2018b). Esta espécie de peixe apresenta na sua composição centesimal aproximadamente 78% de água, 18% de proteína e apenas 2% de lipídios (USDA, 2018b).

Salmão e truta são peixes da família *Salmonidae*. A produção de truta tem crescido exponencialmente desde 1950, especialmente na Europa e recentemente no Chile (FAO, 2018c). Mais de 90% do salmão disponível no mercado atualmente é cultivado. Dentre os maiores produtores encontram-se o Chile e alguns países da Europa (FAO, 2018d). Apesar de apresentarem teores semelhantes de água (70%) e de proteínas (20%), o salmão apresenta teor de lipídios (6%) superior à truta (3%) (USDA, 2018c; USDA, 2018d). Além disso, ambos apresentam os corantes astaxantina e cantaxantina adicionados nas rações para garantir o critério de qualidade referente à cor exigido pelo consumidor (FOLKESTAD *et al*., 2008; BUTTLE *et al*., 2001).

Esses interferentes presentes naturalmente na matriz podem ser removidos, total ou parcialmente, na etapa de *clean up*. Atualmente, um grande número de sorventes está disponível comercialmente para esse fim.

2.6.3 Características e escolha dos sorventes pra remoção de interferentes da matriz

A escolha do sorvente usado para o *clean-up* das amostras está diretamente relacionada com as características da matriz e dos compostos a serem analisados (CABRERA *et al*., 2012).

A amina primária e secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) possui uma estrutura bidentada composta por grupos amino primário e secundário. Esses grupos agem através de troca iônica, pontes de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo. Desta forma o sorvente PSA apresenta elevado efeito quelante, capaz de reter ácidos graxos livres, ácidos orgânicos, açúcares, e outros compostos polares como pigmentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; KURZ *et al*., 2018). O PSA foi o sorvente usado no método QuEChERS original e a associação do mesmo com outros sorventes também foi sugerida através das modificações do método (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

O octadecilsilano (C_{18}) remove com elevada eficiência compostos apolares, como substâncias graxas e lipídios, sendo recomendado para matrizes que apresentam teor de gordura superior a 2% (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; KINSELA *et al*., 2009). A interação entre os compostos apolares e o sorvente se dá através de forças de Van der Waals (CHROMACADEMY, 2018). A utilização de C_{18} ou a combinação C_{18}/PSA pode ser usada para tornar o método mais efetivo na remoção de gordura (KINSELA *et al*., 2009).

O Celite 545 é um sorvente de baixo custo, quando comparado ao C_{18} e PSA. É indicado para remoção de gordura, proteínas e fosfolipídios (OLIVEIRA *et al*., 2017). O celite é um produto obtido de diatomáceas (terra diatomácea) composto por dióxido de silício (cerca de 87 a 91%), alumina e óxido férrico. Apresenta grande área superficial, elevada porosidade e baixa densidade. Possui fraca capacidade de adsorção apesar de excelente poder de absorção, devido sua estrutura macro porosa (AL-DEGS *et al*., 2001; TSAI *et al*., 2006).

O sorvente florisil (silicato de magnésio ativado) é capaz de reter lipídios não polares, corantes, aminas, hidroxilas e carbonilas através de mecanismos polares de interação como pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações não covalentes envolvendo sistemas pi (KURZ et al., 2018; CARRO et al., 2017).

O sorvente SiTi consiste em sílica de alta pureza dopada com titânio e apresenta retenção seletiva de fosfolipídios. A sílica dopada apresenta melhor estabilidade química e robustez quando comparada a sílicas convencionais ou materiais híbridos de sílica (onde o metal é ligado à sílica pura). Por este motivo, tem sido usada para o

preparo de amostras biológicas em etapa anterior à análise por cromatografia líquida. Já o sorvente SiTi 4% C_{18} apresenta 4% de C_{18} em sua formulação e demonstrou melhores resultados na remoção de interferentes presentes em fígado de ovinos na análise de anti-helmínticos quando comparado ao C_{18} (GLANTREO, 2018).

O sorvente Z-Sep consiste em uma mistura entre dois sorventes: sílica revestida com dióxido de zircônio (ZrO_2) e C_{18}, na proporção de 2:5. Por outro lado, o Z-Sep Plus (Z-Sep+) consiste em C_{18} e ZrO_2 conectados na mesma partícula de sílica. O C_{18} retêm lipídios através de interação hidrofílica enquanto que a zircônia age como um ácido de Lewis, atraindo compostos com grupos doadores de elétrons. Ambos são recomendados para remoção de lipídios, fosfolipídios, pigmentos e proteínas (MORENO-GONZÁLEZ *et al*., 2014; RAJSKI *et al*., 2013).

A escolha e a quantidade de um sorvente ou de uma mistura de sorventes a serem usados em um procedimento de preparo de amostras devem ser definidas durante o desenvolvimento e otimização do método. Na d-SPE, por exemplo, é possível combinar diferentes sorventes para suprir as necessidades exigidas pelo tipo de matriz, de analitos e de equipamento utilizado. Neste contexto, o uso de planejamento de experimentos é uma ferramenta que pode auxiliar no processo de otimização do método (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

2.7 Planejamento de experimentos

A otimização do procedimento de preparo de amostras é etapa crucial no desenvolvimento de um método analítico para a obtenção de resultados confiáveis e ótimos. O resultado ótimo é a resposta que se deseja atingir usando o planejamento de experimentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). No caso de um procedimento de extração, por exemplo, um resultado ótimo poderia ser a faixa de recuperação desejável (70 – 120%), quantidade de interferentes removidos, intensidade do sinal do equipamento para um dado composto, entre outros.

A otimização de um método ou procedimento geralmente é realizada por tentativa e erro ou por otimização univariada. No método de tentativa e erro as diferentes condições são testadas aleatoriamente até que se obtenha o resultado ótimo. Na otimização univariada, uma variável é testada enquanto que as demais são mantidas constantes. Estes tipos de otimização geralmente exigem um grande número

de experimentos e não fornece informações quanto à interação entre as diferentes variáveis otimizadas (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A otimização multivariada permite a realização de um conjunto de experimentos considerando mais de uma variável e diferentes combinações de níveis. Desta forma é possível conhecer o sistema de forma mais abrangente, pois as variáveis são alteradas simultaneamente e em um menor número de experimentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Esta ferramenta estatística pode servir como método de triagem, ou seja, para selecionar quais variáveis são significativas ou relevantes para a obtenção do resultado ótimo. Também pode ser usada para uma otimização mais aprofundada, neste caso compreenderia a escolha dos níveis ou limites usados considerando as possibilidades experimentais (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O modelamento de misturas é um planejamento experimental que pode ser usado para misturas com vários componentes, mas é muito eficiente para sistemas compostos por três componentes (FERREIRA *et al*., 2007). Este modelo é importante uma vez que permite a validação de modelo linear, quadrático e especial cúbico. O modelo especial cúbico apresenta 7 termos, conforme demonstrado na Equação 1 abaixo:

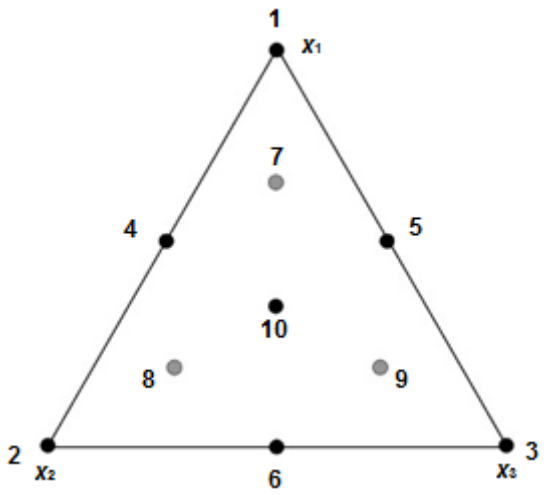
Equação 1 $\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$

Onde *x* representa o componente e *b* é a resposta obtida pelo componente puro, ou pela interação de dois ou dos três componentes.

Os primeiros três termos representam o modelo linear, que demonstra a interação de cada componente sem observar os efeitos de interação entre os mesmos. Os três termos seguintes correspondem aos efeitos de interações entre dois componentes (sinergismo ou antagonismo) que somados aos termos lineares correspondem ao modelo quadrático. O último termo da equação é correspondente aos efeitos de interações dos três componentes da mistura (FERREIRA *et al*., 2007).

Este modelo é explicado considerando a estrutura de um triângulo composto por 10 pontos (equivalente a 10 experimentos), conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Estrutura em triângulo usada para modelamento de misturas para três componentes (x_1, x_2 e x_3).



Adaptado de: FERREIRA *et al*., 2007

Cada vértice do triângulo corresponde ao componente puro ou a uma mistura de componentes. Em alguns casos, não é interessante ou é impossível investigar o componente puro, ou seja, investigar o efeito de um componente na ausência de outros dois (em casos de mistura ternária). Nestes casos é preciso determinar, por exemplo, a quantidade mínima e máxima a ser utilizada para cada componente estudado. A quantidade mínima será codificada na matriz de planejamento como 0 e a quantidade máxima como 1, conforme observado na Tabela 1. Os experimentos 1, 2 e 3 (apresentados na Tabela 1), correspondem aos três pontos localizados em cada vértice do triângulo (conforme demonstrado na Figura 3), e, portanto, à utilização de quantidade máxima de um dos componentes e as quantidades mínimas dos outros dois (FERREIRA *et al*., 2007).

Já os experimentos 4, 5 e 6 correspondem aos pontos localizados entre cada vértice do triângulo. Nestes experimentos é utilizada a combinação de dois componentes em quantidades correspondentes à metade da quantidade de sorvente, codificadas na matriz experimental como 1/2, e a quantidade mínima do terceiro componente, codificada como 0 (FERREIRA *et al*., 2007).

Tabela 1. Matriz experimental codificada para planejamento de misturas para três compostos.

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	2/3	1/6	1/6
8	1/6	2/3	1/6
9	1/6	1/6	2/3
10	1/3	1/3	1/3

Os experimentos 7, 8 e 9 são realizados através da combinação de 2/3 de um componente e 1/6 de outros dois, e correspondem aos pontos axiais do triângulo (ilustrados em cinza). Já o ponto central do triângulo consiste na combinação de 1/3 de cada componente e corresponde ao experimento 10 da matriz de planejamento (FERREIRA *et al*., 2007).

A significância de um modelo, seja ele qual for, deve ser avaliada através da análise de variância (ANOVA). O coeficiente de determinação (R^2) e a análise por teste-F, considerando um dado nível de confiança, devem ser avaliados. Os componentes e os efeitos de interações entre os mesmos só são considerados significativos quando os valores de p forem inferiores a 0,05, no caso do nível de significância ser 95% (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.8 Análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos

A cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), acopladas a sistemas de detecção como

o arranjo de diodos (DAD, *diode array detector*) ou por captura de elétrons (ECD, *electron capture detection*), são menos utilizadas para análises de resíduos devido as suas limitações. Estas técnicas não permitem a identificação inequívoca dos analitos e por este motivo devem ser usadas em conjunto com sistemas de detecção mais específicos (SANTE, 2017).

Os sistemas de LC e GC acoplados à espectrometria de massas permitem a determinação de inúmeros compostos concomitantemente, com incremento na seletividade e sensibilidade quando comparados aos demais sistemas de detecção. A eficiência analítica, elevada robustez e menor tempo para desenvolvimento de métodos tornam estes sistemas vantajosos apesar do alto custo de aquisição e manutenção (PRESTES *et al.*, 2009).

Os analitos altamente polares, de alto ponto de ebulição e com vários substituintes em sua estrutura, tendem a responder melhor na LC com fase reversa devido a sua solubilidade em fases móveis aquosas assim como por sua interação com as fases estacionárias mais utilizadas, tais como C_{18} e C_8, levando a maior eficiência e resoluções cromatográficas. Por outro lado, analitos com menor ponto de ebulição e apolares, são facilmente transferidos para coluna cromatográfica após volatilização no injetor de um cromatógrafo a gás. Com isso, o emprego de aquecimento controlado levará a alta eficiência e resolução cromatográfica, permitindo a separação de centenas de analitos em única corrida (CHIARADIA *et al*., 2008).

A identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos geralmente são realizadas usando a GC e LC, acopladas a espectrômetros de massas (SANTE, 2017). Entretanto, a GC exige procedimentos de preparo de amostra mais complexos para proteger a vida útil das colunas cromatográficas, bem como a manutenção da fonte (TUCK, *et al*., 2018).

Diferentes sistemas de detecção por espectrometria de massas podem ser utilizados, como os sistemas com um quadrupolo (MS, do inglês *mass spectrometer*), triplo quadrupolo (MS/MS), *ion trap*, por tempo de voo ou *orbitrap*. Diferentes tipos de técnicas de ionização também são admitidos como a ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *electron ionization*), ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), APCI (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*) ou ESI (do inglês,

electrospray ionization). Diferentes sistemas de aquisição como o modo *full scan,* monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *selected ion monitoring*) e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *selected reacton monitoring*) também podem ser usados (SANTE, 2017). A escolha do melhor procedimento para preparo das amostras e do sistema de detecção para análise de resíduos em matrizes complexas determinará a eficiência do método analítico.

2.9 Métodos empregados na determinação dos compostos em estudo em tecidos de peixes

A separação dos resíduos presentes nos alimentos de origem animal é dificultada devido à complexidade de matrizes biológicas, e particularmente, devido à presença de lipídios (WANG *et al.,* 2011; LEDOUX, 2011). Diferentes técnicas de preparo de amostra são utilizadas com o objetivo de obter elevada recuperação para a maioria dos compostos e serem compatíveis aos sistemas de detecção escolhidos, proporcionando bons resultados de validação dos métodos. A Tabela 2 apresenta alguns dos métodos disponíveis na literatura considerando as técnicas de preparo de amostras, os sistemas de detecção utilizados e os resultados de validação para determinação de piretrinas, piretróides, benzoiluréias e organofosforados em tecidos de peixes.

A GC é a técnica mais usada para análise de piretrinas e piretróides, pois estas substâncias são facilmente volatilizadas permitindo a análise direta, sem a necessidade de derivatização (TUCK, *et al*., 2018). Os piretróides que apresentam grupos nitrila ou halogênios na sua estrutura podem ser analisados pela técnica de detecção ECD, proporcionando sensibilidade ao método. Entretanto, baixa sensibilidade é observada para aqueles compostos como a fenotrina, resmetrina e tetrametrina, pois não apresentam grupo nitrila ou o halogênio em suas estruturas (TUCK, *et al*., 2018).

A utilização de GC acoplado a detectores por espectrometria de massas é o sistema mais utilizado para a análise de piretróides em diversas matrizes, pois permite a detecção dos resíduos em matrizes complexas e em baixas concentrações. A ionização por impacto de elétrons (EI) é a técnica de ionização geralmente usada nestes casos, devido a sua ampla aplicação em diversas classes de resíduos (TUCK, *et al*., 2018).

Tabela 2. Métodos analíticos descritos para determinação de piretróides, piretrinas, benzoiluréias e organofosforados em tecidos de peixes e alimentos com alto teor de gordura.

Analitos (classe)	Matriz	Extração	*Clean-up* (sorvente)	Detecção	Recuperação	Limites	Referência
14 (PIR) 6 (PIRs) 1 (BENZ)	Alimentos (frutos do mar)	QuEChERS acetato modificado	d-SPE Amostras > 2% gordura – PSA e C_{18} Amostras < 2% de gordura e incolor – PSA Amostras < 2% de gordura e coloridas (carotenóides ou clorofila) – PSA e GCB	UPLC-MS/MS	70 – 120%	LOQ - 10 μg kg^{-1}	(CHUNG; LAM, 2012)
6 (PIR)	Peixe	QuEChERS modificado Isopropanol:Água (80:20, v/v)	d-SPE PSA	GC-ECD	81,1 – 108%	LOD – 8 a 14 μg kg^{-1} LOQ – não foi citado	(JIA *et al.*, 2012)
2 (PIR) 6 (PIRs)	Peixes (12 tipos, incluindo tilápia, truta e salmão)	QuEChERS acetato modificado	d-SPE C_{18} e PSA	GC-MS	70 – 115% (salmão)	LOD – menor que 1 ng g^{-1} (salmão) LOQ – 3,85 a 4,13 ng g^{-1} (salmão)	(RAWN; JUDGE; ROSCOE, 2010)
Multi	Peixes (jundiá,	QuEChERS acetato	d-SPE	GC-MS/MS	73,6 a 98,9%	LOD – 0,3 a 3 μg kg^{-1}	(MUNARETTO *et al.*,

2 (PIR)	tilápia e panga)	modificado	PSA e C_{18}			LOQ – 1 a 10 µg kg^{-1}	2013)
Multi 4 (PIR)	Bagre	QuEChERS modificado	d-SPE Z-Sep	GC-MS/MS	71 a 116%	LOQ – 1 ng g^{-1}	(SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013)
Multi 13 (PIR)	Peixes com alto teor de gordura	Água Acetonitrila (1% ácido acético) Hexano (partição)	Congelamento a baixa temperatura (-20 °C) d-SPE 1ª) $CaCl_2$ 2ª) PSA + C_{18} + florisil	GC-MS/MS	65 a 119%	LOD – 1 a 4 µg kg^{-1} LOQ – 2 a 13 µg kg^{-1}	(CHATTERJEE et al., 2016)
4 (PIR)	Fish (carpa, truta)	Hexano: diclorometano (2:1)	SPE Cartucho (Alumina e C_{18})	GC-MS/MS	Média 79% DELTA - 53%	LOD – 0,03 a 0,46 ng g^{-1} LOQ 0,1 a 1,54 ng g^{-1}	CORCELLAS; ELJARRAT; BARCELÓ, 2015)
17 (PIR)	Gordura de alimentos de origem animal (incluindo peixe)	Hexano: diclorometano (2:1)	SPE Cartucho (Alumina e C_{18})	GC-MS/MS	Média 73 a 85%, exceto para transflutrina (41%).	LOD – 0.002 a 6.43 ng g^{-1} de lipídio LOQ – 0.006 a 21.4 ng g^{-1} de lipídio (As amostras de peixe apresentaram maiores valores de LOD e LOQ)	(DALLEGRAVE *et al.*, 2016)
18 (PIR) 1 (PIRs)	Gordura animal	Acetonitrila	MSPD modificado - florisil d-SPE – Z-Sep + e PSA	LC-MS/MS	Veracidade 84 a 143%	Precisão – 3.9 a 29%	(MOLONEY *et al.*, 2018)

	(bovino, ovino, porcino, de aves)						
Multi AZA	Peixes (incluindo tilápia, truta e salmão) e crustáceos	Acetato de etila Acetonitrila e Hexano (partição)	SPE Cartucho Bond Elut-C_{18}	LC-MS/MS	60 a 74% Média de 84% para salmão	LOD 0,01 a 2 μg kg^{-1}	(RAWN *et al.*, 2009)
DIFLU	Tilápia	Metanol	SPE Cartucho C_{18}	HPLC-DAD LC-MS/MS (confirmação)	96.8 a 101.1%	LOD – 32 μg kg^{-1} LOQ – 110 μg kg^{-1}	(LUVIZOTTO-SANTOS; CORDEIRO; VIEIRA, 2009)
Multi AZA DIFLU	Peixes e crustáceos (incluindo salmão)	Acetonitrila (0,5% ácido acético)	MSPD – sulfato de sódio anidro e C_{18} SPE – sílica gel	LC-MS/MS	83.8 a 97.2%	LOD – 1,5 μg kg^{-1} LOQ – 4,7 a 5,0 μg kg^{-1}	(CARRO *et al.*, 2012)
Multi DIFLU 2 (PIR)	Amostras ambientais, crustáceos e bacalhau	Metanol/acetona (50/50) Extração líquido-líquido com heptano *(DIFLU – bacalhau)*	SPE Oasis HLB e Oasis MAX *(DIFLU – bacalhau)*	LC-MS/MS (*DIFLU – bacalhau)* GC-ECD (PIR)	98 A 131% (*DIFLU - bacalhau)*	LOD – 5 a 15 ng g^{-1} *(DIFLU – bacalhau)*	(LANGFORD et al., 2014)

PIR – piretróides; PIRs – piretrinas; BENZ – benzoiluréia; AZA – azametifós; DIFLU – diflubenzurom; GCB – carbono grafitizado (do inglês, *graphitized carbon black*); Multi – método multiresíduo; DELTA – deltametrina.

A utilização de LC para determinação de piretróides é pouco descrita na literatura. Entretanto, apresenta como vantagens o uso de métodos de preparo de amostras menos complexos e melhor sensibilidade para aqueles compostos menos voláteis, como a flumetrina (TUCK, *et al*., 2018). Estudos indicam que a tralometrina, que é um metabólito da deltametrina, pode ser convertida a deltametrina pela eliminação de brometo no injetor do sistema GC-MS. Entretanto, tralometrina e deltametrina podem ser seletivamente analisadas por LC-MS/MS (VALVERDE *et al*., 2001).

Organofosforados geralmente são analisados por GC acoplado à espectrometria de massas. Porém, azametifós é um organofosforado altamente polar e que apresenta baixa volatilidade. Por isso, a LC acoplada a detectores MS/MS com ionização ESI é o sistema mais utilizado para obtenção de melhor sensibilidade e seletividade (GARCÍA-VALCÁRCEL; TADEO, 2009). Benzoiluréias geralmente são analisadas por LC devido a elevada polaridade e baixa volatilidade. São frequentemente analisadas usando técnicas de detecção por espectrometria de massas e em métodos multiresíduos (BRUTTI; BLASCO; PICÓ, 2010).

Métodos analíticos que utilizam cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas, por exemplo, são notoriamente complexos, não só pelo instrumento em si, mas principalmente porque geralmente são aplicados em matrizes complexas. Quanto maior a complexidade do método, maior a necessidade de validação do mesmo. O método de validação é, portanto, muito importante e indispensável para garantir que os resultados analíticos são confiáveis (KRUVE *et al*., 2015).

2.10 Validação de métodos analíticos

Além da necessidade de validação dos métodos analíticos para garantir a confiabilidade dos resultados, os laboratórios estão sendo submetidos a um maior número de regulações e normas que exigem a realização da validação dos métodos (KRUVE *et al*., 2015). Devido à importância de um procedimento de validação, um grande número de guias de validação vem sendo elaborados. Estes podem ser de natureza universal ou específica, ou seja, para uma determinada área. Os diferentes guias estabelecem parâmetros de validação que podem ser compatíveis entre si, entretanto podem divergir em alguns detalhes, metodologias, terminologias e critérios de aceitação. Estas

divergências podem levar a enganos quanto à interpretação dos parâmetros e até mesmo dos cálculos a serem realizados (KRUVE *et al*., 2015).

Atualmente, os guias de validação mais citados em publicações referentes ao desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para análise de resíduos e contaminantes em matrizes de alimentos são: SANTE/11813/2017 e a Decisão 2002/657/CE, ambas elaboradas pela Comunidade Europeia. No Brasil, a ANVISA através da RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017, o INMETRO através da DOQ-CGCRE-008 – Rev. 07 – Jul/18, e o MAPA através do Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos (MAPA, 2011) também possuem os seus guias de validação para métodos analíticos.

Os parâmetros descritos pela Decisão 2002/657/CE contemplam a maioria daqueles descritos pelos guias citados acima, com excessão do efeito de matriz, limite de quantificação e limite de detecção. Este guia apresenta critérios de desempenho mais rígidos quando comparado aos demais como, por exemplo, o número de repetições dos ensaios em condições de repetibilidade. Além disso, determina os parâmetros CCα e CCβ, que também são descritos no Manual de Garantia da qualidade do MAPA. Cabe salientar que dentre os guias elaborados no Brasil, o guia do MAPA é aquele que contempla o maior número de parâmetros e com critérios muito semelhantes aos descritos pela Decisão 2002/657/CE.

Neste trabalho serão descritos detalhadamente os parâmetros e critérios estabelecidos pelos guias SANTE/11813/2017 e Decisão 2002/657/CE, já que são os mais usados, são reconhecidos internacionalmente e foram utilizados para validação dos métodos desenvolvidos nesse trabalho.

2.10.1 SANTE/11813/2017

A Comunidade Europeia elaborou um guia de validação que é destinado aos laboratórios envolvidos no controle de resíduos de pesticidas nos alimentos e rações em toda a União Europeia. Recentemente foi publicada a atualização deste documento guia para controle de qualidade analítica e procedimentos de validação para resíduos de agrotóxicos e análises em alimentos e ração – SANTE/11813/2017. Através deste guia

pretende-se normalizar os resultados obtidos de diferentes laboratórios, garantir a qualidade, rastreabilidade e precisão dos métodos, evitar falsos positivos e negativos e possibilitar a implementação de sistemas de garantia da qualidade como a ISO/IEC 17025 (SANTE, 2017).

Conforme a SANTE, os parâmetros e critérios a serem observados durante a validação interna de métodos analíticos quantitativos são: a sensibilidade/ linearidade, efeito de matriz, limite de quantificação (LOQ, do inglês, *limite of quantification*), especificidade, veracidade (através da recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), robustez, razão entre os íons monitorados e tempo de retenção (SANTE, 2017).

O número de íons a serem monitorados é dependente do tipo de sistema de espectrometria de massas utilizado. No caso de GC-MS, devem ser monitorados três íons no modo de aquisição *full scan*, ou por monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *select ion monitoring*). O desvio padrão relativo (RSD%) da razão entre os íons obtidos nas análises das amostras não deve exceder ± 30% da média obtida pelos padrões de calibração. A variação do tempo de retenção do composto em extrato não deve exceder ± 0,1 min do tempo de retenção do composto em solvente (SANTE, 2017).

A linearidade/sensibilidade do método deve ser verificada através da curva de calibração que deve, preferencialmente, ser preparada contendo três ou mais níveis de concentração. A concentração mais baixa deve ser igual ou inferior ao limite de quantificação prático (RL, do inglês *reporting limit*). O RL corresponde ao menor nível em que resíduos serão reportados como números absolutos e deve ser igual ou superior ao LOQ do método. O LOQ do método corresponde à menor concentração em que os critérios de precisão e veracidade são atendidos. A concentração calculada em cada nível da curva de calibração não deve exceder 20% da concentração verdadeira (SANTE, 2017).

O estudo de efeito de matriz deve ser realizado através da comparação entre a resposta dos padrões analíticos em solvente e a resposta dos padrões analíticos no extrato da amostra. No caso de supressão ou ganho de sinal maior de 20%, a curva de calibração deve ser realizada considerando o efeito de matriz, como por exemplo, através

do uso de extrato da matriz branco fortificado. A especificidade do método deve ser avaliada considerando a análise do reagente branco e de matriz branco. O reagente branco corresponde à análise sem a presença da matriz (que pode ser substituída por água), apenas com solventes e reagentes. A resposta do composto presente na matriz branco ou no reagente branco não deve exceder 30% do valor do RL (SANTE, 2017).

A recuperação deve ser mensurada, se possível, em todos os lotes de análises. Os resultados de recuperação serão usados para determinar a veracidade do método e a precisão RSD_r (repetibilidade). Um mínimo de cinco amostras brancas devem ser fortificadas em pelo menos dois níveis. Um nível deve corresponder à concentração do LOQ ou RL e o outro nível entre 2 a 10 vezes o LOQ ou LMR. A média da recuperação deve variar entre 70 e 120% (veracidade) e o RSD% deve ser menor que 20% para cada nível testado. Recuperação acima ou abaixo desta faixa só são aceitáveis se os desvios observados forem inferiores a 20%, entretanto, não deve ser inferior a 30% ou superior a 140%. Nestes casos, um método de correção da recuperação deve ser aplicado (SANTE, 2017).

A reprodutibilidade intralaboratorial e a robustez do método devem ser mensuradas no decorrer das análises de rotina, "*on-going validation*", e o RSD_{wR} não deve exceder 20%. Neste caso, amostras podem ser fortificadas nos mesmos níveis selecionados para determinação da recuperação e do RSD_r e mensuradas junto às análises de rotina. Após cinco determinações, o RSD_{wR} e a recuperação média podem ser determinados (SANTE, 2017).

2.10.2 Decisão 2002/657/CE

A Comunidade Européia estabeleceu em 2002 parâmetros de validação, critérios de desempenho e interpretação dos resultados de métodos analíticos através do guia 2002/657/CE. A confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos só podem ser garantidas através de sistemas de qualidade e na utilização de métodos validados que atendem os parâmetros estabelecidos (CD, 2002). Assim como a SANTE (2017), o guia é destinado principalmente aos laboratórios envolvidos com controle oficial de resíduos na União Europeia (CD, 2002) e àqueles envolvidos em controle oficial de resíduos em países dos quais a União Européia importa produtos.

Conforme o guia 2002/657/CE da Comunidade Européia a LC e a GC acopladas à espectrometria de massas são adequadas para métodos de confirmação de resíduos ou contaminantes orgânicos que devem ser quantificados através de três ou quatro pontos de identificação (íons). Além disso, devem ser observadas as tolerâncias máximas permitidas para as intensidades dos íons monitorados de acordo com a técnica de espectrometria de massas selecionada. Os seguintes critérios de desempenho são requeridos para um método quantitativo através de validação interna: seletividade/especificidade, curva de calibração, veracidade/recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), aplicabilidade/robustez, estabilidade, limite de detecção e decisão (CCβ e CCα).

A especificidade/seletividade do método deve ser verificada através da análise de no mínimo 20 amostras de matriz branca, nas quais devem ser monitoradas a presença ou ausência de interferências na zona de eluição dos compostos (CD, 2002). A curva de calibração usada para quantificação deve possuir pelo menos 5 níveis (incluindo o zero), e deve conter o intervalo de trabalho, além de indicar a equação da reta obtida bem como o coeficiente de correlação (CD, 2002).

A exatidão do método deve ser verificada através da veracidade e da precisão. A veracidade deve ser mensurada através da análise de materiais de referência ou, na ausência deste, através da recuperação de quantidades conhecidas das substâncias a analisar adicionadas em uma amostra branco da matriz. Os intervalos aceitáveis para materiais de referência não devem ultrapassar o limite de ± 10%. Para amostras fortificadas os intervalos aceitáveis são dependentes da concentração analisada (fração mássica). Para concentrações inferiores ou iguais a 1 $\mu g\ kg^{-1}$ a veracidade deve variar entre 50 e 120%. Para concentrações superiores a 1 $\mu g\ kg^{-1}$ e inferiores a 10 $\mu g\ kg^{-1}$ a veracidade deve variar de 70 a 110%, e, para concentrações iguais ou superiores a 10 $\mu g\ kg^{-1}$ a veracidade deve variar entre 80 e 110% (CD, 2002).

A recuperação deve ser mensurada através da fortificação de pelo menos 18 amostras brancas, divididas em três grupos de seis alíquotas, fortificadas nas concentrações correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR para o dado composto. A concentração de cada amostra, a veracidade (100 vezes o teor medido dividido pelo nível

de fortificação) e o coeficiente de variação (CV%) devem ser determinados considerando os seis resultados de cada nível avaliado (CD, 2002).

A precisão deve ser avaliada através da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. A repetibilidade (WLr, do inglês *within-laboratory repeatability*) deve ser verificada através da análise das 18 amostras divididas em três níveis, conforme descrito anteriormente. A concentração de cada amostra, a concentração média, o desvio padrão e o CV% devem ser mensurados. O procedimento deve ser repetido no mínimo três vezes pelo mesmo analista. A concentração média e o CV% das três análises devem ser calculados (CD, 2002).

Na reprodutibilidade intralaboratorial (WL_R, do inglês *within-laboratory reproducibility*) deve-se analisar as 18 amostras (matrizes idênticas ou diferentes), conforme realizado durante o estudo de repetibilidade, porém por pelo menos mais dois analistas, em condições de variabilidade conhecidas e controladas (lotes diferentes de reagentes, solventes, temperatura ambiente, instrumentação). Deve-se calcular a concentração média, desvio padrão e CV% das amostras analisadas nos três dias (CD, 2002).

O CV% em condições de repetibilidade não deve exceder a metade ou dois terços dos valores obtidos pela equação de Horwitz (Equação 2). Já o CV% da reprodutibilidade intralaboratorial não deve exceder os valores obtidos pela equação. Entretanto, a equação fornece valores inaceitáveis para frações mássicas inferiores a 100 $\mu g\ kg^{-1}$, devendo ser admitido CV% mais baixo possível (CD, 2002).

Equação 2 $$\mathrm{CV} = 2^{(1-0{,}5\log C)}$$

O CCα e CCβ para substâncias com LMR definido podem ser calculados através da curva de calibração, conforme ISO 11843. Neste caso, utiliza-se 20 amostras fortificadas em torno do LMR (em passos equidistantes), podendo ser aquelas analisadas no estudo de reprodutibilidade. O limite de decisão (α= 5%) corresponde à concentração no LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Já a capacidade de detecção corresponde ao teor médio medido no limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial (CD, 2002).

A aplicabilidade/robustez deve ser mensurada através de pequenas variações como, idade dos reagentes, solventes, padrões, diferentes analistas, temperatura, extratos da amostra, entre outros. As variações não devem influenciar significativamente nos resultados das medições. A robustez também pode ser verificada através de grandes alterações como, espécies diferentes, matrizes diferentes, entre outros. A estabilidade dos compostos em determinadas condições de armazenamento e durante a análise, tanto em solvente quanto em matriz, é um importante parâmetro a ser avaliado, pois pode influenciar nos resultados do método (CD, 2002).

2.10.3 Extensão de escopo

A extensão de escopo consiste em incluir novos analitos ou nova matriz no escopo de um método analítico já validado. Entende-se por nova matriz tecidos diferentes de uma mesma espécie (fígado e rim bovino), tecido de diferentes espécies (rim bovino e suíno) ou tecidos diferentes de espécies diferentes (rim bovino e fígado suíno) (MAPA, 2011). Conforme a SANTE/11813/2017, a extensão de escopo de novas matrizes é uma forma pragmática de validação da aplicabilidade do método para matrizes do mesmo grupo como: amostras com alto teor de açúcar e baixo teor de água (mel, uvas passas, damasco e ameixas secas, ompotas de frutas), produtos a base de leite (leite de diferentes espécies, queijo, iogurte, cremes), carnes e frutos do mar (carne bovina, suína, equina, músculo de frango, pato, peru, fígado, rim, bacalhau, salmão, truta), dentre outros.

De acordo com a SANTE/11813/2017, a inclusão de novos analitos ou de novas matrizes deve ser realizada considerando os mesmos parâmetros e critérios descritos pela norma para a validação de um método. Entretanto, uma alternativa a este procedimento seria a validação no decorrer das análises de rotina, "*on-going validation*". Por exemplo, através de análise de amostras fortificadas em duas concentrações, no LOQ do método e um nível mais elevado, para determinação da recuperação e ocorrência de interferências nos tempos de retenção dos analitos. Após cinco determinações, a recuperação e a reprodutibilidade podem ser determinadas seguindo os critérios de aceitação determinados pela norma (SANTE, 2017).

O manual de garantia da qualidade analítica elaborado pelo MAPA (2011) também prevê a utilização da ampliação de escopo para novos analitos e novas matrizes. Neste

caso, devem ser realizados os estudos de linearidade, seletividade/efeito matriz, veracidade/recuperação e precisão. A avaliação da repetibilidade pode ser realizada em apenas um dia, reduzindo significativamente o número de experimentos. Os resultados devem comprovar que a inclusão de um novo analito ou de uma nova matriz não altera o desempenho geral do método.

2.10.4 Incerteza das medições

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (EURACHEM/ CITAC, 2012). A ISO/IEC 17025 preconiza que a incerteza de uma medição analítica seja avaliada ou que pelo menos seus principais componentes sejam estimados (MAPA, 2011).

Várias são as fontes de incerteza na execução de um método analítico e podem ter origem: na amostragem (contaminação, procedimento adotado, diferenças entre amostras), nas condições de estocagem (tempo, temperatura, umidade), na instrumentação (precisão de balanças, pipetas, termômetros), na pureza dos reagentes, nos operadores (interpretação de resultados, erro de leitura de menisco), além de muitos outros (EURACHEM/ CITAC, 2012).

Vários documentos guias são recomendados para estimativa da incerteza dos resultados, dentre eles: Eurachem (2012), Nordtest (2004), Eurolab (2007), e Codex CAC/GI 59-2006 (2006).

Conforme o guia EURACHEM/CITAC (2012), a incerteza da medição pode ser determinada, dentre inúmeras formas, pela incerteza das recuperações. Neste caso, a incerteza é calculada através dos resultados de análises de amostras de controle de qualidade fortificadas em duplicata, em 10 repetições, e que foram submetidas a todo o procedimento analítico, incluindo todos os componentes de incerteza associados ao método.

As 10 médias das duplicatas de recuperação obtidas pelas 10 repetições, devem ser usadas para calcular a média geral das recuperações (%) e o desvio padrão da repetibilidade (RSD%). O erro padrão da média das recuperações (SEM%, do inglês

standard error of the mean), obtido através da Equação 3 descrita abaixo, é a incerteza em recuperação do método (EURACHEM/ CITAC, 2012).

Equação 3 $SEM\% = [\Sigma\ (media\ da\ duplicata - media\ geral\ )^2 \div (n-1)]^{0.5} \div\ n^{0.5}$

A incerteza combinada será determinada pela combinação de dois componentes: o desvio padrão da repetibilidade (RSD%) e o erro padrão da média (SEM%), conforme equação 4 descrita abaixo (EURACHEM/ CITAC, 2012).

Equação 4 $Incerteza\ combinada = [(RSD\%)^2 + (SEM\%)^2]^{0.5}$

A incerteza expandida é equivalente a duas vezes a incerteza combinada, conforme Equação 5 (EURACHEM/ CITAC, 2012).

Equação 5 $Incerteza\ expandida = [(RSD\%)^2 + (SEM\%)^2]^{0.5}\ x2$

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO I

Vibration extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Lenise Guimarães de Oliveira[a,b], Abilasha Ramkumar[a], Mary Moloney[a], Márcia Helena Scherer Kurz[b], Fábio Ferreira Gonçalves[b], Osmar Damian Prestes[c], Martin Danaher[b]

[a] Food Safety Department, Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland

[b] Laboratory for Analysis of Residues and Contaminants (LARCO), Post-graduate Program in Technological and Environmental Chemistry, Chemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, RS, 95500-000, Santo Antônio da Patrulha - RS, Brazil

[c] Laboratory of Pesticides Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria - RS, Brazil

Correspondence:

Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Bairro Cidade Alta, Rua Barão do Caí 125, CEP 95500-000, Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil.

email: leniseoliveira@furg.br; +55 (51) 36627805

4. CAPÍTULO 2 – ARTIGO II

Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS

Lenise Guimarães de OLIVEIRA*[a], Márcia Helena Scherer KURZ[a], Marlon Cezar Maciel GUIMARÃES[a], Manoel Leonardo MARTINS[a], Osmar Damian PRESTES[b], Renato ZANELLA[b], Joaquim Neves da Silva RIBEIRO[c] and Fábio Ferreira GONÇALVES[a]

[a]Laboratory of Analysis of Residues and Contaminants (LARCO), Post-graduate Program in Technological and Environmental Chemistry, Chemistry and Food School, Federal University of Rio Grande, RS, 95500-000, Santo Antônio da Patrulha - RS, Brazil

[b]Laboratory of Pesticides Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria - RS, Brazil

[c]Center for Coastal, Limnological and Marine Studies, Federal University of Rio Grande do Sul, 95625-000, Imbé – RS, Brazil

*email: leniseoliveira@furg.br; +55 (51) 36627805

5. CONCLUSÕES

O principal desafio deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos capazes de quantificar concentrações baixas dos compostos (considerando o LMR de cada compostos) em matrizes de diferentes espécies de peixe. Devido à complexidade das matrizes foi dada relevante atenção aos procedimentos de *clean-up* com o objetivo de proporcionar a remoção de coextrativos, naturalmente presentes nestas matrizes, mantendo elevada recuperação dos compostos.

O efeito de diversos sorventes para a remoção dos coextrativos da matriz (proteínas, gorduras, e corantes) em amostras de tilápia, traíra, tainha, salmão, truta e *seabass* foram avaliados. Os sorventes C_{18}, PSA e principalmente Z-Sep+ apresentaram melhor eficiência na remoção destes interferentes. O congelamento a baixa temperatura foi investigado e também utilizado no procedimento de *clean-up* dos métodos. Este procedimento foi eficiente na precipitação e congelamento de lipídios e de compostos pouco solúveis em acetonitrila sem afetar a estabilidade dos compostos no solvente de extração.

No método desenvolvido junto ao Teagasc para determinação de piretróides, benzoiluréias e organofosforados (artigo I, descrito no capítulo 1), destaca-se a utilização de cerâmica homogeneizadora associada ao sistema de agitação Minimix, a otimização do método cromatográfico e a utilização da cromatografia líquida na determinação de piretróides. O procedimento de extração realizado através do sistema de agitação proposto (cerâmica e minimix) permitiu a extração de 36 amostras simultaneamente, melhorando a reprodutibilidade do método e reduzindo consideravelmente o tempo de análise. A otimização da cromatografia líquida também permitiu reduzir o tempo de análise, comparado ao método proposto inicialmente e que estava em corrente uso no laboratório. O uso da cromatografia líquida foi eficiente para separação e quantificação dos compostos, inclusive piretróides, que usualmente são analisados via cromatografia gasosa. Considerando o tempo necessário para a extração das amostras e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, foi possível analisar 36 amostras em um total de 9 h, tempo interessante

para laboratórios que possuem vários métodos de rotina com poucos equipamentos à disposição.

Os resultados de validação demonstram que o método é robusto, sensível e preciso para os compostos em matriz de salmão, com a exceção de azametifós. Neste caso o método foi sugerido como *screening* considerando que não existe LMR estabelecido para este composto em matrizes de peixes.

Não foi possível analisar tralometrina através do método proposto, devido à conversão deste composto em deltametrina, provavelmente durante o procedimento de extração. Devido à alteração do limite máximo de resíduo para diflubenzurom, seria necessário revalidar o método para este composto considerando o novo limite estabelecido. Quanto às perspectivas futuras, a extensão de escopo da matriz poderia ser realizada para permitir a determinação destes compostos em outras espécies de peixes.

No método desenvolvido no LARCO (artigo II, descrito no capítulo 2), destaca-se o uso de planejamento de misturas como ferramenta para otimização do procedimento de dispersão em fase sólida usando uma mistura de três sorventes (C_{18}, PSA e Z-Sep+). Através do planejamento foi possível escolher a melhor proporção da mistura para garantir adequada recuperação dos compostos e remoção de interferentes. Também se destaca a validação e extensão de escopo para espécies de peixes bastante consumidas e comercializadas no Sul do Brasil (traíra, tilápia e tainha).

O método desenvolvido é de fácil aplicação permitindo a análise de várias amostras em um mesmo dia. Além disso, apresentou sensibilidade suficiente para atingir limites de quantificação iguais ou inferiores ao LMR dos compostos. O procedimento de validação demonstrou que o mesmo é robusto e preciso.

A aplicação do método em amostras reais comprovou a presença de resíduos de piretróides em amostras de traíra e tainha oriundas da Bacia do Rio Tramandaí. Por este motivo o método será utilizado para monitoramento de amostras desta Bacia em parceria com o CECLIMAR – UFRGS (Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) que realizará as coletas das amostras. A parceria LARCO - CECLIMAR foi feita durante o doutorado com o objetivo de avaliar a situação da Bacia através de análises de água, sedimento e peixes.

Através do desenvolvimento dos métodos foi possível contribuir com informações relevantes à comunidade científica através dos artigos aqui apresentados e daqueles que serão produzidos através da aplicação dos métodos. Também contribuiu para a formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que participaram deste trabalho durante as pesquisas realizadas no LARCO. A realização do projeto junto ao laboratório de resíduos do Teagasc, que é a autoridade Irlandesa para desenvolvimento agrícola e das indústrias alimentícias, a qual está ligada ao Ministério da Agricultura, Alimentos e da Marinha deste País, proporcionou intercâmbio de conhecimento e de informações na área de determinação de resíduos de contaminantes em alimentos para a Universidade Federal do Rio Grande – FURG, para o Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – PPGQTA e seus grupos de pesquisa, para o LARCO e para a aluna de doutorado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) Disponível em: <http://www.abnt.org.br/noticias/5694-publicada-a-versao-abnt-nbr-iso-17025> Acesso em: 10 jan. 2018.

ALBERT, E.; POMBO-VILLAR, E. Class II pyrethroids: noninhibitors calcineurin. **Biochemical pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 321-323, 1997.

AL-DEGS, Y.; KHRAISHEH, M. A.; TUTUNJI, M. F. Sorption of lead ions on diatomite and manganese oxides modified diatomite. **Water Research**, v. 35, n. 15, p. 3724-3728, 2001.

ALONSO, M. B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals?.**Environment International**, v. 47, p. 99-106, 2012.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 7-20, 2009.

ANASTASSIADES, M. 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, p. 412-431, 2003.

ANDRADE, G. Q.; BISPO, E. S.; DRUZIAN, J. I. Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 721 – 726, 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para> Acesso em: 22 out. 2018.

BARR, D. B. et al. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 742-748, 2010.

BBSRC (Bioscience for the future) Disponível em: <https://bbsrc.ukri.org/documents/pyrethroid-timeline-pdf/> Acesso em: 19 set. 2018.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2015. p.19 – 27; 230 - 243.

BRADBERRY, S. M. et al. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2005.

BRUTTI, M.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2010.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan®(Azamethiphos) and Excis®(Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters (Homarus americanus) during repeated short-term exposures. **Aquaculture**, v. 182, n. 1-2, p. 27-35, 2000.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of Salmosan (Azamethiphos) to American lobster (Homarus americanus) larvae, postlarvae, and adults. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 2, p. 165-169, 1999.

BURRIDGE, L. E. et al. The lethality of Salmosan (Azamethiphos) to American lobster (Homarus americanus) larvae, postlarvae, and adults. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 2, p. 165-169, 1999.

BUTTLE, L. G.; CRAMPTON, V. O.; WILLIAMS, P. D. The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, Salmo salar L. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 103-111, 2001.

CABRERA, L. C. et al. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CANTY, M. N. et al. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc Mytilus edulis**. Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 396-402, 2007.

CARRO, N. et al. Optimization of a method based on micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) for the determination of PCBs in mussel samples. **Analytical Chemistry Research**, v. 11, p. 1-8, 2017.

CD, COMISSION DECISION. **Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results - 2002/657/EC**. Official Journal of the European Communities, 2002.

CHATTERJEE, N. S. et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1-8, 2016.

CHEN, S. et al. Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1128 - 1134, 2016.

CHEN, Y. S.; BEVERIDGE, M. C.; TELFER, T. C. Physical characteristics of commercial pelleted Atlantic salmon feeds and consideration of implications for modeling of waste dispersion through sedimentation. **Aquaculture International**, v. 7, n. 2, p. 89-100, 1999.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHROMACADEMY (LC GC's CHROMacademy) Disponível em <https://www.chromacademy.com/chromatography-SPE-Mechanisms.html> Acesso em: 01 out. 2018.

CHUNG, S. W.; LAM, C. H. Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 885-896, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CAC/GL 59-2006. **Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results**. Roma, 2006. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/10692/cxg_059e.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

Comitê para Medicamentos de Uso Veterinário. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Summary_of_opinion/2018/03/WC500245927.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

CORCELLAS, C., et al. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment International**, v. 47, p.17-22, 2012.

CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). **Environment International**, v. 75, p. 110-116, 2015.

COSTELLO, M. J. et al. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 4, p. 173-180, 2001.

DALLEGRAVE, A. et al. Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7689-7697, 2016.

DAVIES, I. M. et al. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. **ICES Journal of Marine Science**, v. 58, n. 2, p. 477-485, 2001.

DING, G.D. et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 13480-13487, 2012.

DOQ-CGCRE-008 – Rev. 07 – Jul/18. **Orientação sobre validação de métodos analítico**s. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, 2017. Disponível em: file: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaios > Acesso em: 10 Jan. 2019.

EISLER, R. **Diflubenzuron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review.** Patuxent Wildlife Research Center Laurel MD, 1992.

ELLIOTT, M. et al. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. **Pesticide Science**, v. 9, n. 2, p. 112-116, 1978.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Pesticide registration: diflubenzuron**, 1997. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-108201_1-Aug-97.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Risks of Diflubenzuron Use to Federally Threatened California Red-legged Frog (Rana aurora draytonii)**, 2009. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/diflubenzuron/analysis.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

EPMAR. **European public MRL assessment report**, 2012. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2012/06/WC500128440.pdf> Acesso em: 19 set. 2018.

ERNST, W. et al. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 432-443, 2001.

EURACHEM / CITAC Guide, **Quantifying Uncertainty in Analitycal Measurement**. 3ª Ed., 2012. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

EUROLAB, Technical Report 1/2007, **Measurement uncertainty revised: alternative approaches to uncertainty evaluation**. Paris, 2007. Disponível em: <http://www.eurolab.org/documents/1-2007.pdf> Acesso em: 14 jan. 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) The State of World Fisheries and Aquiculture. Disponível em:<http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf> Acesso em: 28 nov. 2018a.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programe. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en> Acesso em: 01 out. 2018b.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programe. Disponível

em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en> Acesso em: 01 out. 2018c.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programe. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en> Acesso em: 01 out. 2018d.

FEO, M. L. et al. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. **Journal of Hydrology**, v. 393, n. 3, p. 156-162, 2010.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

FOLKESTAD, A. et al. Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (Salmo salar L.). **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 129-135, 2008.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, D. et al. Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 259-267, 2012.

GLANTREO. End use applications for Mesoporous Silica. Disponível em: <http://www.glantreo.com/application-areas/end-use-applications-mesoporous-silica/> Acesso em: 01 out. 2018

GONG, D.C. **Pyrethroids Pesticides Residues and Their Behavior in a Multimedium Environment of Liangtan River Basin**. Master thesis - Chongqing Univ, Chongqing, 2013.

HAN, J. J. et al. Nonoccupational exposure to pyrethroids and risk of coronary heart disease in the Chinese population. **Environmental Science & Technology**, v. 51, p. 664-670, 2017.

HAYA, K. et al. A review and assessment of environmental risk of chemicals used for the treatment of sea lice infestations of cultured salmon. In: **Environmental effects of marine finfish aquaculture**. Berlin: Springer, 2005. p. 305-340.

HE, L. et al. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, n. 1-2, p. 52-59, 2009.

HOU, X., et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 123-127, 2014.

JIA, F. et al. New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 449-453, 2012.

KAY, J. F.; MACNEIL, J. D.; WANG, J. **Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drug residues in food**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. p. 387.

KINSELLA, B. et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7977-8015, 2009.

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

KRUVE, A., et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

KUMAR V.; ROY. S. Aquaculture drugs: Sources, active Ingredients, Pharmaceutic Preparations and Methods of Administration. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2017.

KURZ, M. H. et al. Clean-up Procedure Development and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Carrots. **Food Analytical Methods**, p. 1-11, 2018.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LANGFORD, K. H. et al. Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment?. **Environmental Science & Technolog**y, v. 48, n. 14, p. 7774-7780, 2014.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J. et al. (2001). Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4589-4596.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P. J. M.; VIEIRA, E. M. Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 785-788, 2009.

MA, X. Research progress on analytical technique of pyrethroid pesticide residue. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, v. 37, n. 28, p. 13775-13777, 2009.

MABILIA, R. G.; DE SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, Rhamdia quelen (Pimelodidae) infestados por Lernaea cyprinacea (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> Acesso em: 19 set. 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos.** Brasília, 1ª Ed., 2011. Disponível em: < file:///C:/Users/Lenise/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf> Acesso em: 10 Jan. 2019.

MARTINS, M. L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aqüicultura brasileira. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, p. 355-368, 2004.

TORRES, L. M. M. et al. Composição em ácidos graxos de traíra (Hoplias malabaricus) e pintadinho (sem classificação) provenientes da Região Sul do Rio Grande do Sul e Índia Morta no Uruguai. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1047-1058, 2012.

MNIF, W. et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265-2303, 2011.

MOLONEY, M. et al. Determination of pyrethrin and pyrethroid residues in animal fat using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1077, p. 60-70, 2018.

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. **Talanta**, v. 128, p. 299-304, 2014.

MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura) Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira – 2015/2020. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf> Acesso em: 28 nov. 2018.

MUNARETTO, J. S. et al. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 827-834, 2013.

NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010. p. 215-251.

NORDTEST Report TR 537, **Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**. Espoo, 2ª ed., 2004.

OKAMOTO, M. H.; de SAMPAIO, L. A. N.; MAÇADA, A. P. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha Mugil platanus Günther, 1880. **Atlântica**, Rio Grande, v. 28, n. 1, p. 61-66, 2006.

OLIVEIRA, L. G. et al. Desenvolvimento de procedimento de extração para análise de sedativos e β-bloqueadores em rim suíno. **Quimica Nova**, v. 37, n. 8, p. 1342-1350, 2014.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de residues de medicamentos veterinaries em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) **Instrução Normativa N° 20 of July 2018 on sampling plan and the reference limits for the National Plan for the Control of Residues in Animal Products – PNCRC**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018INIngles.pdf.> Acesso em: 01 out. 2018.

PPDB (Pesticides Properties DataBase). University of Hertfordshire. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/48.htm> Acesso em 01 out. 2018.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS–um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Qulmica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, Osmar D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

PUBCHEM. (Open Chemistry DataBase) Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 19 set. 2018.

QUECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/cleanup.pdf> Acesso em: 01 out. 2018a.

QUECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf> Acesso em: 01 out. 2018b.

RADWAN, M. et al. The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. **Chemosphere**, v. 128, p. 42-48, 2015.

RAJENDRAN, S. Psocids in stored food commodities and their control. **Pestology**, v. 18, n. 4, p. 14-18, 1994.

RAJSKI, Ł. et al. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109-120, 2013.

RAWN, D. F. et al. Analysis of fin and non- fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 8, p. 1510-1516, 2009.

RAWN, D. F. K.; JUDGE, J.; ROSCOE, V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2525-2531, 2010.

RDC, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf> Acesso em: 10 jan. 2019.

REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) Nº 2017/855. **Altera o Regulamento de Execução (UE) Nº 540/2011 no que se refere às condições de aprovação da substância ativa diflubenzuron.** 2017. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0855&from=EN> Acesso em: 19 set. 2019.

REGULAMENTO. **COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin**. 2010. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&from=EN> Acesso em: 19 set. 2018.

SANTE/11813/2017 2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**. 2017. Disponível em:

<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf> Acesso em: 20 set. 2018.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

SCHALCH, S. H. C. et al. Diflubenzuron effectiveness in Dolops carvalhoi (Crustacea: Branchiura) control in juveniles pacus Piaractus mesopotamicus (Osteichthyes: Characidade) naturally infected. **Acta Scientiarum,** v. 27, p. 297-302, 2005.

SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. In: **Green Trends in Insect Control**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2011. p. 94 - 131.

SEPA, Scottish Environmental Protection Agency. Policy no 17. **Cage Fish Farms: Sea Lice Treatment Chemicals, Risk Assessment of Azamethiphos**. Version 1, 1997. Disponível em: <https://www.sepa.org.uk/media/60020/policy_17-sea-lice-treatment-chemicals-for-cage-fish-farms.pdf> Acesso em: 16 out. 2018.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.

SUN, X. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of organophosphorus pesticides residues in fish tissue by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5-12, p. 102-107, 2011.

TANG, W. et al. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. **Chemosphere**, v. 191, p. 990-1007, 2018.

TSAI, W. T.; LAI, C. W.; HSIEN, K. J. Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, n. 2, p. 749-54, 2006.

TUCCA, F. et al. Toxic effects of antiparasitic pesticides used by the salmon industry in the marine amphipod Monocorophium insidiosum. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 139-148, 2014.

TUCK, S. et al. A review of methodology for the analysis of pyrethrin and pyrethroid residues in food of animal origin. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 5 p. 911-940, 2018.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15261> Acesso em: 01 out. 2018a.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15091> Acesso em: 01 out. 2018b.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15240> Acesso em: 01 out. 2018c.

USDA (United States Department Agriculture) Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/15236> Acesso em: 01 Out. 2018d.

Valverde, A. et al. What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin?. **Journal of Chromatography A**, v. 943, n. 1, p. 101-111, 2002.

VILA NOVA, C. M. V. M.; Godoy, H. T.; ALDRIGUE, M. L. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (Oreochromis niloticus) e pargo (Lutjanus purpureus). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, 2005.

WANG, F. et al. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 5, p. 627-639, 2011.

WU Y.; MIAO H.; FAN S. Separation of chiral pyrethroids pesticide sans application in pharmacokinetics research and human exposure assessment. In: **Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure**. Rijeka: In Tech, 2011. p. 139 – 166. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/separation-of-chiral-pyrethroid-pesticides-and-application-in-pharmacokinetics-research-and-human-ex; Acesso em: 23 out. 2018.

YE, M. et al. Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, p. 616-626, 2015.

ZHAO, L.N. Residue and Risk Assessment of 7 Kinds of Pyrethroids in Water Environment in the Pearl River Delta. Master thesis- Shanghai Ocean University, Shanghai, 2014.