Universidade Federal do Rio Grande

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ÁGUA E PEIXE

Juliane Bühler

Santo Antônio da Patrulha

2015

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ÁGUA E PEIXE

Juliane Bühler

Projeto de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos necessários à Graduação em Engenharia Agroindustrial Agroquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves
Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins

Santo Antônio da Patrulha
Novembro de 2015

RESUMO

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários e agrotóxicos em águas e em peixes é importante devido ao dano que estes compostos podem causar à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente. Por causa da complexidade das matrizes e das baixas concentrações destas substâncias há uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação dos resíduos. Neste estudo foi desenvolvido um método para a determinação de 7 agrotóxicos e 2 medicamentos veterinários usando microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) em água e também foi aplicado QuEChERS para avaliação dos mesmos compostos em filés de traíra (*Hoplias malabaricus*) com análise em GC/MS. Parâmetros experimentais, tais como solvente orgânico, massa de NaCl, volume de acetonitrila, tempo e velocidade de agitação foram otimizados para HF-LPME. O método foi validado para água de Milli-Q, sendo que a técnica requer pequeno consumo de solventes. Usando as condições otimizadas obteve-se LOD (1 - 2,5 µg L^{-1}) e LOQ (2,5 e 5 µg L^{-1}) e boa linearidade com $r > 0,99$ para a maioria dos compostos. A precisão e a exatidão do método atingiu valores de 74 e 114% e entre 1 e 27,6 % de RSD. Os resultados indicaram que o método pode ser testado para aplicação em outras matrizes ambientais. A validação do método QuEChERS apresentou resultados de recuperação entre 70 e 120% e RSD < 20%, para a maioria dos compostos, com LOD (1 - 10 µg L^{-1}) e LOQ (2,5 – 12,5 µg L^{-1}). Com este trabalho foi possível o desenvolvimento de processos de extração capazes de detectar a presença de multiresíduo em águas superficiais e em peixes, adquirindo proficiência na realização deste tipo de ensaio.

Palavras-chave: poluentes orgânicos emergentes, cromatografia, QuEChERS, HF-LPME.

ABSTRACT

The determination of veterinary drugs and pesticides residues in water and in fish is important because of the damage that these compounds can cause to human health, as well as, its persistence in the environment. Because of the complexity of the matrices and low concentrations of these substances, it is necessary to develop efficient and reliable analytical methods to identify and quantify residues. This study aimed to develop and validate a method for the determination of 7 pesticides and 2 veterinary drugs in water using Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME). Also validate a method for the determination of the same compounds in *Hoplias malabaricus* fillet using QuEChERS followed by GC/MS. Experimental parameters related to technique, such as, type of organic solvent, mass of NaCl added, volume of acetonitrile, extraction time and agitation speed have been optimized to HF-LPME. The method validation for Milli-Q water required minimal solvent comsumption. Using optimal conditions, low detection limits of detection (1 - 2,50 µg L^{-1}) and quantification (2,5 e 5 µg L^{-1}), as well as, good linearity r > 0,99 were obtained. Accuracy and precision from 74 e 114% and RSD% between 1 and 27,6%. The results indicate that this method can be tested for application in other environmental samples. Method validation of QuEChERS presented recoveries from70 e 120% e RSD < 20%, for most of the compounds, with LOD (1 - 10 µg L^{-1}) and LOQ (2,5 – 12,5 µg L^{-1}). In the end of this study, the development of extraction processes that can detect the presence of multiresidue in surface waters and in fish was possible, acquiring proficiency in carrying out this type of methods.

Keywords: Emerging Organic Pollutants, chromatography, QuEChERS, HF-LPME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica. 12
Figura 2 - Princípio básico da HF-LPME. 20
Figura 3 - Fluxograma do método QuEChERS proposto por Anastassiades de et al. (2003). 21
Figura 4 - Sequência do procedimento experimental para HF-LPME. 32
Figura 5 - Fluxograma do método QuEChERS proposto por Munaretto et al. (2013). 34
Figura 6 - Cromatograma dos compostos azoxistrobina, difenoconazol, bifentrin, bioaltrin e tebuconazol extraídos por HF-LPME. 37
Figura 7 - Cromatograma dos compostos trifuralina, aldrin. dieldrin e ametrim extraídos por HF-LPME. 37
Figura 8 - Área dos picos de cada composto para testes HF- LPME com 1-octanol, 2 fases, 3 fases e TOPO. 39
Figura 9 - Diagrama de Pareto para recuperação de trifuralina. 41
Figura 10 - Diagrama de Pareto para recuperação de difenoconazol. 41
Figura 11 - Efeito do volume de acetonitrila (ACN) e tempo de extração na recuperação de trifuralina. 42
Figura 12 - Efeito do volume de ACN e velocidade de extração na recuperação de trifuralina. 42
Figura 13- Resultados obtidos nos experimentos de otimização do HF-LPME. 43
Figura 14 - Efeito do tempo e velocidade de extração na recuperação de trifuralina. 44
Figura 15 - Cromatograma dos compostos trifuralina, aldrin, bioaletrin e ametrin pelo método QuEChERS. 51
Figura 16- Cromatograma dos compostos dieldrin, tebuconazol, difenoconazol, azoxistrobina e bifentrin pelo método QuEChERS. 51
Figura 17 - Comparação dos cromatogramas obtidos com extrato da matriz fortificado com os compostos na concentração de 200 µg kg^{-1} e com a amostra branco. 52
Figura 18 - Efeito matriz através das curvas em extrato em solvente para QuEChERS em peixe, onde o triângulo representa a curva no extrato e o quadrado a curva no solvente. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos analisados e seus grupos químicos, classificação, Kow e pKa. 17
Tabela 2 - Potencial de bioacumulação em espécies de peixe, LMR's conforme a legislação brasileira e da União Européia e o VMP dos compostos analisados.....17
Tabela 3 - Parâmetros avaliados no planejamento 2^4 com ponto central. 33
Tabela 4 - Compostos analisados por GC/MS no modo de ionização EI positivo por aquisição no modo SIR, íons monitorados e tempo de retenção (t_r). 36
Tabela 5 - Variáveis e níveis analisados no planejamento experimental 40
Tabela 6 - Experimentos para avaliar as parâmetros otimizados na extração dos analitos. 43
Tabela 7 - Parâmetros otimizados para determinação dos compostos usando HF-LPME. 45
Tabela 8 - Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada composto em estudo. 46
Tabela 9 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para cada analito para HF-LPME. .48
Tabela 10 - Média dos percentuais de recuperação e RSD de cada analito para HF-LPME. ..49
Tabela 11 - Limites de detecção e quantificação do método. 50
Tabela 12 - Efeito matriz dos compostos na concentração de 25 µg Kg^{-1} 53
Tabela 13 - Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada composto em estudo no QuEChERS. 56
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação do método. 56
Tabela 15 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para 200, 50 e 25 µg kg^{-1} de cada analito. 57
Tabela 16 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para 20 µg kg^{-1} de cada analito. ...58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
2 OBJETIVOS 10
2.1 Objetivo Geral 10
2.2 Objetivos Específicos 10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 10
3.1 Água 10
3.2 Peixes 11
3.3 Contaminantes orgânicos emergentes 12
3.3.1 Agrotóxicos 13
3.3.2 Medicamentos Veterinários 14
3.4 Resíduos e Contaminantes em Alimentos 15
3.4.1 Monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil 16
3.5 Seleção dos Analitos de Estudo 16
3.6 Preparo de Amostras 18
3.6.1 Técnicas de Preparo de Amostra 18
3.7 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) 22
3.8 Validação 24
3.8.1 Seletividade 24
3.8.2 Linearidade e Curva Analítica 25
3.8.3 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) 25
3.8.4 Exatidão 26
3.8.5 Precisão 26
3.8.6 Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa 27
3.9 Planejamento Experimental 27
4 METODOLOGIA 28
4.1 Instrumentação 28
4.2 Materiais, solventes, reagentes e adsorventes utilizados 29
4.3 Preparo das soluções analíticas 30
4.4 Processamento das amostras 30

4.5 Condições para determinação dos analitos por GC-MS 31
4.6 Utilização de Padrão Interno 31
4.7 Métodos de Extração 32
4.7.1 Desenvolvimento do método HF-LPME para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em água. 32
4.7.2 Método QuEChERS 34
4.8 Validação 35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
5.1 Determinação por GC-MS 36
5.2 Desenvolvimento do método HF-LPME 38
5.2.1 Seleção do solvente orgânico, solução receptora e uso de líquido iônico 38
5.2.2 Planejamento Experimental 39
5.2.3 Procedimento HF-LPME otimizado 45
5.3 Validação da HF-LPME 46
5.3.1 Seletividade e efeito matriz 46
5.3.2 Curva analítica e linearidade 46
5.3.3 Exatidão e Precisão 47
5.3.4 Precisão Intermediária 48
5.3.5 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) 49
5.4 Validação do QuEChERS 50
5.4.1 Seletividade 52
5.4.2 Efeito matriz 53
5.4.3 Curva analítica e Lineridade 55
5.4.4 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) 56
5.4.5 Exatidão e Precisão 57
5.4.6 Precisão intermediária 58
6 CONCLUSÃO 58
7 REFERÊNCIAS 59

1 INTRODUÇÃO

Em virtude do crescimento populacional e do incremento na demanda de alimentos, os agrotóxicos desempenham um papel fundamental para o aumento na produção e na qualidade dos produtos agrícolas. As primeiras substâncias usadas como agrotóxicos tinham origem natural, como o piretro e a nicotina, em seguida passou-se a usar outros compostos, como os organofosforados e organoclorados, abrangendo uma ampla variedade de substâncias químicas e grupos funcionais e, por consequência, distintos modos de ação e degradação (COUTINHO *et al*., 2005; GALLI *et al.*, 2006).

Segundo Ribeiro *et al*. (2007), para algumas condições de aplicação, cerca de apenas 0,1% do total de agrotóxicos aplicados chega ao alvo, ou seja, 99,9% do agrotóxico acaba sendo desperdiçado no ambiente. Estes resíduos passam a causar efeitos desfavoráveis ao meio ambiente e ao homem, sendo acumulados no solo, ou carreados para as águas subterrâneas e/ou superficiais, podendo ainda sofrer fotólise ou serem carregados para outras áreas por ação dos ventos.

Uma forma encontrada de expandir a produção de alimentos foi o uso de medicamentos veterinários. Os agentes antimicrobianos, por exemplo, administrados em bovinos em doses terapêuticas para prevenir doenças ou em doses muito baixas como aditivos alimentares aumentam a taxa de crescimento e melhoram a eficiência da alimentação. Porém, independentemente da dosagem, estima-se que 75% dos medicamentos administrados em bovinos e aves acabam sendo excretados de volta para o ambiente (CAMPAGNOLO *et al*., 2002). Desta forma, a contaminação ambiental por medicamentos veterinários pode ocorrer pela aplicação de estrume como fertilizante ou por descarte direto ou inadequado.

Quando estas substâncias chegam aos rios e lagos mesmo que em pequenas quantidades, efeitos tóxicos são observados, principalmente nos processos de bioacumulação (MADUREIRA *et al*., 2012) e biomagnificação (BAIRD, 2002). Em virtude disso, para Dórea (2008) os peixes acabam sendo os principais meios de transferência de resíduos das águas superficiais para o homem.

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários e agrotóxicos em águas e em peixes é importante devido ao dano que estes compostos podem causar à saúde humana, tais como alterações hepáticas e digestivas, doenças cardíacas e reações alérgicas, além da sua persistência no meio ambiente (PRESTES *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, muitos métodos de preparo de amostra foram desenvolvidos para a determinação destes compostos em diferentes matrizes. Entre eles, a microextração em fase

líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*) e método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) vem sendo amplamente utilizados. Para determinação destes compostos, técnicas cromatográficas bem estabelecidas, como a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography)* pode ser usada acoplada a diversos sistemas de detecção, como por exemplo, a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (ANDRASCIKOVA *et al*., 2013).

Dessa forma, faz-se necessário o estudo de métodos de determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em águas superficiais e em peixes, contribuindo para o monitoramento ambiental de resíduos e na ampliação de estudos que determinem estes compostos em peixes, uma vez que, são espécies de importância econômica, nutricional e para a saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar dois métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em águas superficiais e em peixes.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver a técnica de HF-LPME para extração dos analitos de interesse em amostras de água.
- Utilizar as ferramentas de planejamento experimental para estabelecer as condições de extração e determinação dos resíduos.
- Aplicar a extração por QuEChERS nas amostras de peixe.
- Verificar a eficiência dos métodos e validá-los, utilizando GC/MS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Água

A água é de suma relevância para a manutenção da vida, do ambiente e de diversas atividades que sustentam a economia de um país, como a pecuária e a agricultura (MACHADO *et al*., 2003). Somente a agricultura responde por 70% da quantidade total de água utilizada e

o crescimento acentuado da demanda por produtos pecuários está provocando um aumento de seu uso (UNESCO, 2012).

O crescimento populacional observado nas últimas décadas aumentou a demanda por alimentos, o implica numa crescente utilização de agrotóxicos e fertilizantes nas lavouras agrícolas e no uso intensivo de um grande número de medicamentos veterinários capazes de promover o crescimento intensivo da produção. Devido a este fato, resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários tem sido frequentemente encontrados em águas superficiais constituindo-se agentes poluidores de grande magnitude (BRASIL, 2006; ROMÁN *et al.*, 2012; LEONG; HUANG, 2009; GILART *et al*., 2014; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015).

3.2 Peixes

Os peixes têm grande importância na cadeia alimentar principalmente para o homem, pois fornecem diferentes nutrientes funcionais, proporcionando a melhoria da saúde e qualidade de vida (DÓREA, 2008). Para Lichtenstein (2006) um dos principais nutrientes fornecidos pelos peixes são os ácidos graxos Ômega 3, os quais auxiliam nas funções do sistema circulatório humano.

Os peixes são filtradores de resíduos e contaminantes presentes no meio aquático, sendo então considerados bioacumuladores (MADUREIRA *et al*., 2012), e apresentam característica de biomagnificação, ou seja, eles realizam o transporte destes compostos acumulados ao longo da cadeia trófica (Figura 1) (GHISELLI; JARDIM, 2007).

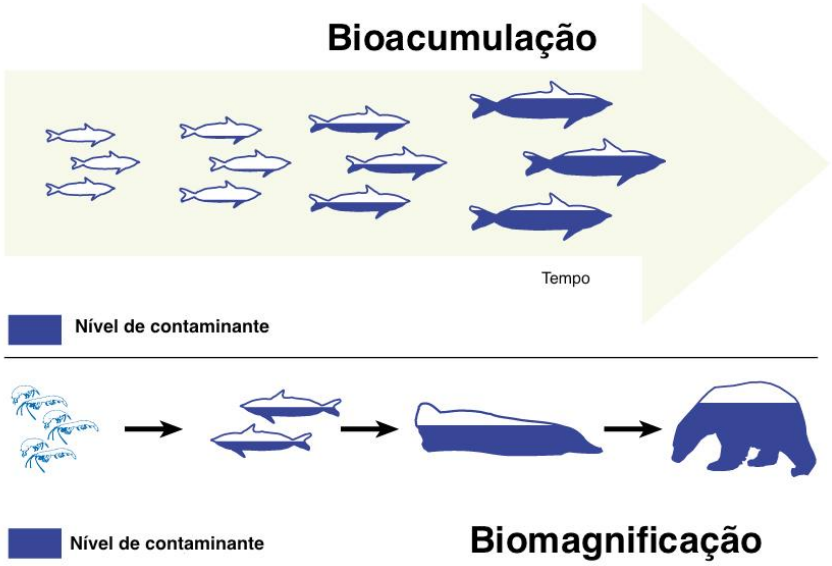
Estudos voltados para a determinação de contaminantes e resíduos em peixes são extremamente relevantes, pois devido à bioacumulação e biomagnificação os malefícios que o consumo de peixes contaminados podem trazer ao homem devem ser considerados e, ao mesmo tempo, por serem importantes nutricionalmente, o consumo de pescado livre de resíduos deve ser incentivado (DÓREA, 2008).

Espécies de peixe como a traíra (*Hoplias malabaricus)* são animais predadores, ou seja, estão localizados no topo da cadeia alimentar. Este aspecto à torna mais suscetível à bioacumulação e biomagnificação de poluentes. Além disso, a traíra está amplamente distribuída no território brasileiro, e não apresenta sazonalidade em sua captura. É um peixe muito resistente, podendo apresentar baixo metabolismo e controle da função cardiorrespiratória quando exposta a condições adversas, como longos períodos de privação de alimento (RIOS *et al*., 2002).

Estudo realizado por Miranda (2006) detectou concentrações de até 80 ng g^{-1} de aldrin em tecido seco extraído de lipídeos do fígado de traíras encontradas no lago de Ponta Grossa –

PR. Outros compostos também foram encontrados, entre eles: dieldrin (5 ng g^{-1}), fipronil (15 ng g^{-1}), endrin (20 ng g^{-1}), alachlor (240 ng g^{-1}), entre outros. Estas substâncias podem causar diversos efeitos nocivos à saúde, uma vez que, a presença destes em peixes destinados a dieta humana pode aumentar o risco de contaminação. Deste modo, as traíras podem constituir uma fonte de exposição humana a um potencial contaminante, e confirmam a importância das mesmas como bioindicadores de áreas poluídas.

Figura 1 - Bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica.



Fonte: Google imagens, adaptado pelo autor.

3.3 Contaminantes orgânicos emergentes

Os contaminantes orgânicos emergentes constituem um extenso grupo de substâncias de diferentes classes, principalmente agrotóxicos, produtos de uso veterinário, produtos químicos industriais, aditivos de alimentos, fármacos, produtos de cuidado pessoal, drogas ilícitas e todos os metabólitos ou produtos da degradação destas substâncias (ESPLUGAS *et al.*, 2007; LAPWORTH *et al.*, 2012; PETROVIC *et al.*, 2010).

A dependência da sociedade ao uso destes compostos é clara, uma vez que estes fazem parte do cotidiano e estão relacionados com a alimentação, higiene, bem-estar e saúde dos seres humanos (CLARKE; SMITH, 2011). Devido ao crescimento do uso destes produtos existe a possibilidade de contaminação do meio ambiente por descarte inadequado. A preocupação com a contaminação, durante os últimos anos, contribuiu para avanços em pesquisas. Os contaminantes orgânicos emergentes tem sido objeto de discussão em diversos grupos de proteção ambiental (WILLE *et al.*, 2012).

Estes compostos acabam atingindo as águas superficiais a partir de diferentes fontes e vias: águas residuais, efluentes industriais e de estações de tratamento de água e esgotos, fossas sépticas, efluentes de hospitais, chorume de resíduos domésticos e hospitalares, aplicação de estrume no solo e lixiviação de solos contento estas substâncias (WATANABE *et al*., 2010).

3.3.1 Agrotóxicos

A legislação brasileira, segundo o Decreto nº 4.074 de 2002, define que os defensivos agrícolas são os produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, designados ao uso nos setores de produção, estocagem e processamento de produtos agrícolas, nos pastos, na prevenção à degradação de florestas, e de outros ecossistemas cuja intenção seja alterar a composição da flora ou da fauna, para a proteção contra seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias empregadas como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

O uso de agrotóxicos no setor agrícola possui vantagens econômicas, uma vez que assegura o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade e aumentando a produção. Por outro lado, os consumidores destes produtos agrícolas podem estar expostos aos agrotóxicos, devido a presença de resíduos nos alimentos. O aparecimento de resíduos destes compostos em alimentos é, na atualidade, uma preocupação de saúde pública. Devido a este fato, programas internacionais para o controle legal de agrotóxicos estão estabelecidos para prevenir a contaminação de alimentos. Sendo assim, o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um aspecto importante da segurança alimentar (FAO, 2013).

Os agrotóxicos são amplamente utilizados desde a metade do século XX e estão divididos em classes, sendo organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides os grupos mais conhecidos. A nomenclatura destes grupos está associada as características estruturais dos compostos, isto é, a natureza dos elementos químicos da sua composição, e também a maneira como tais elementos estão ligados na molécula (BARBOSA, 2004).

O termo agrotóxico inclui inseticidas (controle de insetos), fungicidas (fungos), herbicidas (plantas invasoras), fumigantes (bactérias do solo), algicida (algas), avicidas (aves), nematicidas (nematoides), moluscicidas (moluscos), acaricidas (ácaros), além de reguladores de crescimento, desfolhantes (folhas indesejadas) e dessecantes (SILVA; FAY, 2004).

As características físico-químicas dos agrotóxicos variam, podendo ter caráter ácido, básico, neutro ou anfótero. Além do carbono e hidrogênio, podem conter um ou mais átomos

de: halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, estes são chamados de heteroátomos e contribuem para a detecção e toxicidade destes compostos. Alguns compostos são voláteis, enquanto outros não. Esta diversidade dificulta o desenvolvimento de métodos para análise de vários resíduos simultaneamente (PRESTES, 2011).

Há uma crescente preocupação com os efeitos adversos dos agrotóxicos no meio ambiente, tais como a poluição dos recursos hídricos, contaminação em organismos não alvos e na saúde humana. A pulverização de agrotóxicos pode fazer com que estes sejam transportados através do vento para locais distantes e se aplicados diretamente no solo, podem ser conduzidos pela chuva ou irrigação e atingir os mananciais de águas superficiais ou lixiviados até as reservas de água subterrâneas (SPADOTTO, 2004).

3.3.2 Medicamentos Veterinários

Os medicamentos veterinários são toda e qualquer substância aplicada, em qualquer animal destinado à produção alimentar, para fins medicinais, preventivos ou de diagnóstico, ou para alterar funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (BRASIL, 2004).

Na pecuária atual, os medicamentos veterinários estão sendo utilizados para prevenção de doenças e administrados como aditivos em água ou na ração de animais produtores de alimentos que serão posteriormente consumidos por seres humanos. Agentes capazes de promover o crescimento são aplicados para estimular o desenvolvimento dos animais, o que é considerado uma prática abusiva (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Os antibióticos atuam como promotores do crescimento e também tem sido utilizados de forma abusiva. Animais tratados com antibióticos ganham peso mais rapidamente, sofrem menos com infecções e apresentam maior eficiência alimentar. A maioria dos antibióticos utilizados em ruminantes não afetam o metabolismo do animal diretamente, e os efeitos estão geralmente relacionados com ação indireta do medicamento veterinário, melhorando as condições de higiene do animal ou influenciando a digestão dos alimentos (DIBNER; RICHARDS, 2004).

Independentemente da dosagem, cerca de 75% dos agentes antimicrobianos administrados em bovinos e aves confinadas acabam sendo excretados. No entanto, o esterco animal pode também conter outros componentes químicos, metais pesados, hormônios e variados princípios ativos de medicamentos veterinários. O esterco animal é comumente aplicado à agricultura como fonte de adubo orgânico para aumentar o rendimento das lavouras.

Porém, quando aplicado em terras agrícolas, o estrume e seus constituintes podem ser transportados para águas de superfície e subterrâneas através de escoamento e infiltração, respectivamente. O efeito destes agentes sobre a biota, particularmente organismos aquáticos, é motivo de preocupação e do interesse em pesquisas para entender seus efeitos (CAMPAGNOLO, 2002).

Os piretróides são antiparasitários usados tanto para fins domésticos quanto agrícolas (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA; MARTÍNEZ, 2009). São categorizados também como medicamento veterinário para bovinos e animais de estimação (CORCELLAS; ELJARRAT; BARCELÓ, 2015; CORCELLAS *et al*., 2012).

Corcellas *et al.* (2015) apresentaram estudos de bioacumulação de piretróides em peixes. Foram detectados piretróides em todas as amostras coletadas em concentrações que variaram de 12 a 4938 ng g^{-1}. Nos peixes, a exposição aos piretróides pode ser dar de duas maneiras, através de absorção, devido ao seu caráter lipofílico, ou ao longo da cadeia trófica (ALONSO, 2012).

3.4 Resíduos e Contaminantes em Alimentos

A norma NBR ISO 22000 relaciona a segurança alimentar com aspectos ligados à inocuidade de alimentos, definindo que nenhum produto alimentar pode estabelecer-se como uma fonte de exposição a perigos que possam causar riscos à saúde, na forma de agentes biológicos, físicos ou químicos. Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos e contaminantes oriundos de agrotóxicos ou medicamentos veterinários (ABNT, 2006).

Resíduo, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), é a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (FAO, 2013).

Contaminante é definido como todo e qualquer composto que não seja propositalmente acrescido aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, processamento, estocagem, embalagem, transporte e acondicionamento do alimento (FAO, 2013).

A falta de boas práticas para a utilização e aplicação de agrotóxicos e/ou medicamentos de uso veterinário acarretam no aparecimento de resíduos e que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem apresentar risco à saúde humana. Organizações internacionais tais como o Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Químicos (JECFA

– do inglês *Joint Expert Committee on Food Additives*), órgão da FAO, e o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) dos EUA, estabelecem os limites máximos de resíduos (DENOBILI, 2004). No Brasil, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2014).

O conhecimento da exposição da população a estes compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle e monitoramento visando à saúde humana.

3.4.1 Monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), é um programa do MAPA, que tem por objetivo garantir a saúde do consumidor através do monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado e mel) (BRASIL, 2014) e vegetal. O PNCRC visa agregar os esforços na melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos destinados à população brasileira, e ao mesmo tempo, proporcionar ao país, a adequação às normas estabelecidas por agências internacionais como a Organização Mundial do Comércio (OMC) e outros órgãos, como FAO e Organização Mundial da Saúde (OMS).

3.5 Seleção dos Analitos de Estudo

Dos compostos compreendidos neste estudo, três estão incluídos na Instrução Normativa nº 11, de 07 de Maio de 2014, no Subprograma de Monitoramento em Carnes, Leite, Pescado, Mel e Ovos (BRASIL, 2014), são eles aldrin e dieldrin, escolhidos por terem uso proibido no Brasil. Além destes, foram utilizados trifuralina, tebuconazol, bifentrin, difenoconazol e azoxistrobina que não fazem parte da Instrução Normativa, mas podem ser utilizados em lavouras de arroz ou em seu armazenamento e ametrin que possui uso agrícola autorizado para diversas culturas como cana-de-açúcar, milho e mandioca. Os dois piretródes incluídos neste estudo também são considerados medicamentos veterinários (bioaletrin e bifentrin). (GONÇALVES, 2013; ANVISA, 2015).

Os compostos selecionados estão listados na Tabela 1, a qual apresenta também suas classificações, grupos químicos, log K_{ow} e pKa.

Tabela 1 - Compostos analisados e seus grupos químicos, classificação, Kow e pKa.

Composto	Classe	Grupo químico	log K_{ow}	pKa
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	2,50	-0,67
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	4,36	-
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	3,7	-
Trifuralina	Herbicida	Dinitroanilina	5,27	-
Bifentrin	Inseticida	Piretróide	6,0	-
Aldrin	Inseticida	Organoclorado	6,5	-
Bioaletrin	Inseticida	Piretróide	4,68	-
Dieldrin	Inseticida	Organoclorado	5,37	-
Ametrin	Herbicida	Triazina	2,63	4,1

Fonte: valores de log Kow e Pka disponíveis em AERU (2015).

A Tabela 2 mostra o limite máximo de resíduo (LMR) de cada composto segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2014) e da União Européia (2015) em peixes, assim como o potencial de bioacumulação (AERU, 2015). No caso da água a Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde estabelece o valore máximo permitido (VMP) que define o padrão de potabilidade para substâncias que representem risco à saúde (BRASIL, 2011).

Tabela 2 - Potencial de bioacumulação em espécies de peixe, LMR's conforme a legislação brasileira e da União Européia e o VMP dos compostos analisados.

Composto	Potencial de Bioacumulação	LMR (µg kg^{-1})		VMP (µg L^{-1})
		Brasil	UE	
Azoxistrobina	Moderado	-	10	-
Difenoconazol	Moderado	-	50	-
Tebuconazol	Baixo	-	20	180
Trifuralina	Alto	-	-	-
Bifentrin	Alto	-	10	-
Aldrin	Alto	15	10	0,03
Bioaletrin	Alto	-	-	-
Dieldrin	Alto	-	10	0,03
Ametrin	Moderado	-	-	-

3.6 Preparo de Amostras

Um procedimento analítico envolve cinco fases e suas subdivisões. Estas etapas são: a amostragem, o preparo da amostra, a separação/extração, a detecção/determinação e a análise dos dados (CHEN *et al.*, 2008).

O preparo da amostra é considerado uma etapa crítica em um procedimento analítico. Esta etapa consiste em separar os analitos de interesse de substâncias que podem causar interferência na análise (RIDGWAY *et al*., 2007). Quando necessário é possível pré-concentrar os analitos ou os alterar para que sejam compatíveis com o método de detecção ou de separação escolhido para a análise (PAN *et al*., 2014). O enfoque das técnicas atuais de preparo de amostras tem sido voltado para redução de volume de solvente orgânico, menor massa ou volume de amostra, na seletividade da extração e possível automação do processo (WEN *et al*., 2014).

3.6.1 Técnicas de Preparo de Amostra

Estudos envolvendo a preparação de amostras foram feitos desde o início da Química Analítica. No entanto, com o rápido desenvolvimento no período pós Segunda Guerra Mundial, e devido ao aumento das exigências sobre a qualidade das amostras que passaram a ser coletadas de ambientes naturais, corpos vivos e muitos outras fontes que tinham matrizes muito complexas, a análise destas foi, sem dúvida difícil ou mesmo impossível, sem qualquer pré-tratamento (CHEN *et al.*, 2008).

Técnicas novas com a habilidade de extração de diversos compostos, de diferentes classes e de forma simultânea foram introduzidas, tais como: Disperção da Matriz em Fase Sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*) (BARKER; LONG; SHORT, 1989), Micro Extração em Fase Sólida (SPME, *Solid Phase Micro Extraction*) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990), HF-LPME (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999), a Extração Sortiva com Barra de Agitação (SBSE, *Stir Bar Sortive Extraction*) (BALTUSSEN *et al*., 1999), QuEChERS (ANASTASSIADES *et al*., 2003), a Extração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (REZAEE *et al.*, 2006), entre outras.

3.6.1.1 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

A HF-LPME foi uma técnica desenvolvida em 1999 e entre as suas principais vantagens estão a redução no consumo de solventes, a miniaturização do experimento, a diminuição da razão volumétrica entre a fase aquosa (amostra) e orgânica com alto fator de enriquecimento, baixo custo e simplicidade (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MERIBE; CARASEK, 2013).

A HF-LPME baseia-se no uso de um solvente orgânico imiscível em água que fica impregnado e imobilizado na membrana oca e porosa da fibra, formando uma fina camada líquida conhecida como *suported liquid membrane* ou SLM. O tamanho da membrana pode variar entre 1,5 e 10 cm de acordo com o tipo de aplicação a que esta é destinada. A membrana utilizada mais frequentemente é constituída por polipropileno, e apresenta uma porosidade em torno de 70%, com espessura de parede de 200 µm, diâmetro interno de 600 µm e 0,2 µm de tamanho de poros (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015). A parte interna e oca da membrana pode ser preenchida com um solvente, constituindo a solução receptora. Na HF-LPME os analitos são extraídos da amostra aquosa para o solvente orgânico na SLM e para dentro da fase receptora que se encontra no interior oco da fibra (ZHAO; LEE; MAJORS, 2010).

A HF-LPME pode ser realizada de duas maneiras distintas com duas ou três fases. Quando a HF-LPME apresenta duas fases utiliza o mesmo solvente na superfície e no interior da fibra. E quando apresenta três fases, uma solução receptora aquosa é inserida no interior da fibra enquanto o solvente se localiza na superfície. Conforme demostra a Figura 2.

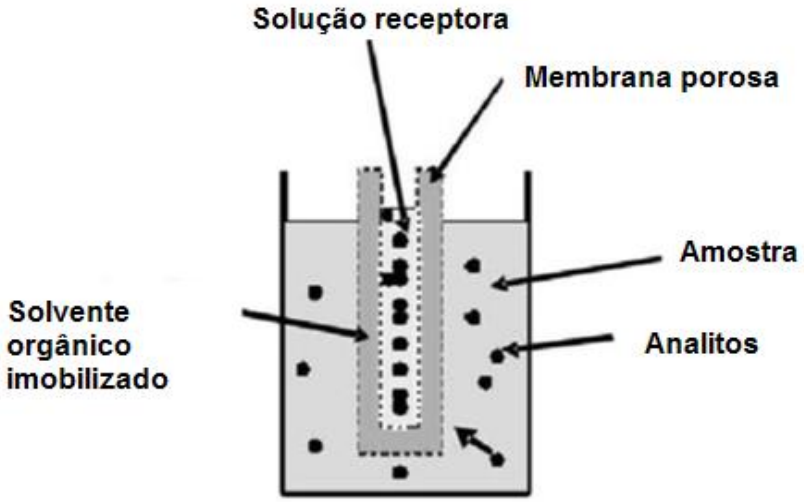
O processo de extração por HF-LPME é influenciado por alguns parâmetros, entre os quais os mais importantes são: agitação da amostra, escolha do solvente orgânico, o tempo de extração, a força iônica e o pH.

O tempo de extração é de extrema importância para a otimização do método, uma vez que o processo de transferência de massa dos analitos entre as fases aquosas e orgânica é dependente do tempo, pois este é o período necessário para que ocorra o equilíbrio do sistema. Este tempo depende, principalmente, da massa molecular e volatilidade dos compostos (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

O solvente orgânico selecionado deve apresentar algumas características tais como: alta eficiência e boa seletividade, ser imiscível em água e ser compatível com a técnica

cromatográfica adotada. Dentre os principais solventes aplicados nesta técnica estão o 1-octanol, ciclohexano e tolueno (KOLOSA; PRZYJAZNY; JEANOOT, 2009).

Figura 2 - Princípio básico da HF-LPME.



Fonte: RASMUSSEN, K.E., PEDERSEN-BJERGAARD, 2004.

Como em outros processos de extração, a agitação da amostra influencia a eficiência da extração, sendo esta capaz de aumentar a velocidade cinética da extração, uma vez que acelera a difusão dos analitos da camada superficial para o lúmen da fibra (ZHU *et al*., 2002).

A força iônica também deve ser considerada, uma vez que afeta a solubilidade dos analitos e pode aumentar a eficiência da extração pelo efeito *salting out*. Por exemplo: o aumento na concentração de cloreto de sódio (NaCl), pode diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa afetando os resultados obtidos com a microextração (MERIBE; CARASEK, 2013).

E por fim, outro aspecto que deve ser considerado é o pH, que é utilizado em função da acidez ou basicidade dos compostos. Geralmente, para compostos ácidos, o pH deve ser ajustado entre 0,1 e 3,5. Já para analitos básicos este varia entre 10 e 14. Em um sistema com três fases as fases receptoras básicas devem ser usadas para analitos ácidos e as fases receptoras ácidas para analitos básicos (ZHANG *et al*., 2005).

Aplicações recentes da HF-LPME incluem: determinação de piretróides e sulfonamidas em amostras de água (ROMÁN *et al*., 2012; PAYÁN, *et al.*, 2011), análise de tramadol e varfarina em urina e plasma humano (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2011; HADJMOHAMMADI; GHAMBARIAN, 2012), avaliação de pesticidas organosfosforados em

tecidos de peixes (SUN *et al*., 2011), estrogênios em amostras biológicas e ambientais (CHEN *et al.*, 2013), entre outros.

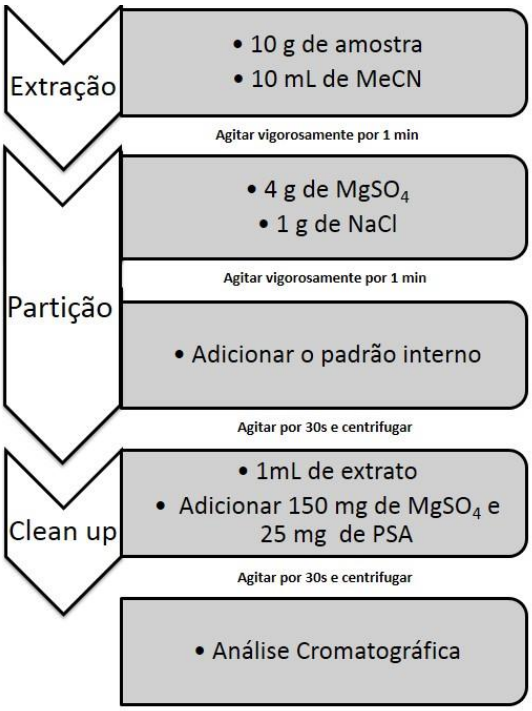
3.6.1.2 QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* (2003) na intenção de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, introduziram um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS. Esse método, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (PRESTES *et al.*, 2009).

Este método foi idealizado para produzir extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O Método QuEChERS originalmente proposto baseava-se nas seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição, promovida pela adição de sais. Um novo método de *clean-up* denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS conforme a Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do método QuEChERS proposto por Anastassiades de *et al*. (2003).



Fonte: adaptado de PRESTES *et al.*, 2009.

Os parâmetros que devem ser considerados na escolha do solvente de extração são a capacidade de extração de um largo espectro de contaminantes e resíduos com diferentes polaridades, demonstrar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, aplicabilidade nas diversas técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, e estar em concordância com aspectos ambientais (MASTOVSKA *et al*., 2010).

Neste método a menor alíquota de amostra é utilizada, para que exista a representatividade estatística no resultado final. A quantidade de amostra escolhida no desenvolvimento do método QuEChERS foi de 10 g (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

A adição de sais e a consequente mudança da força iônica da amostra podem afetar os resultados obtidos com a microextração. Os sais são capazes de diminuir a solubilidade dos analitos, e assim, aumentar a eficiência da extração pelo efeito *salting out* (MERIBE; CARASEK, 2013). Dependendo do tipo do solvente utilizado são obtidos melhores resultados na recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais além de diminuir a solubilidade destes compostos na fase aquosa, diminui também a quantidade de água na fase orgânica. No desenvolvimento do método QuEChERS foi empregada uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A etapa de *clean-up* é primordial para promover robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que interferentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insersor e também na coluna cromatográfica, influenciando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias (SAITO *et al*., 2004)

Um procedimento baseado no método QuEChERS proposto por Munaretto *et al.* (2013) para extração de desreguladores endócrinos em filé de peixe foi utilizado neste estudo. Este método foi aplicado com sucesso na análise de filé de peixe a partir de diferentes espécies e resíduos dos analitos de interesse foram recuperados em concentração de 10, 25 e 50 µg kg^{-1}.

3.7 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Na década de setenta iniciou o uso de técnicas de cromatografia gasosa acoplada a sistemas clássicos de detecção, tais como, captura de elétrons (ECD, *Electron Capture Detection*), nitrogênio e fósforo (NPD, *Nitrogen and Phosphorus Detection*) e fotometria de chama (FPD, *Flame Photometric Detection*) para a determinação de resíduos de agrotóxicos (ROMERO-GONZALEZ *et al*., 2006).

Atualmente, a técnica GC-MS é utilizada com frequência para determinação de multirresíduos em alimentos e água. A facilidade do acoplamento GC-MS, além do acesso ao banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons (EI, *Electron Ionization*) contribuíram para difusão da técnica GC-MS (CHIARADIA *et al*., 2008).

O acoplamento do GC-MS é relativamente simples, porque as necessidades de funcionamento do cromatógrafo a gás são compatíveis com o alto vácuo do espectrômetro de massas e, também, com a utilização de colunas capilares em GC é possível conectar a sua saída diretamente à fonte de ionização do espectrômetro de massas (CHIARADIA *et al*., 2008).

Por esta facilidade, o acoplamento GC-MS e o uso de fontes de ionização apropriadas, vem sendo utilizada com frequência para determinação multirresíduo em água e alimentos por permitir a determinação de um grande número de compostos simultaneamente (MERCER, 2005).

A ionização por impacto de elétrons e a ionização química (CI, *Chemical Ionization*) são as formas de ionização mais utilizadas no acoplamento GC-MS (LANÇAS, 2004). Sendo a ionização por elétrons a mais difundida, porque apresenta uma grande variedade de íons proporcionando a determinação dos compostos de interesse em estudo O monitoramento seletivo de íons (SIR, *Selected Ion Recording*) permite que o MS faça a detecção específica dos fragmentos, ou seja, o equipamento é configurado para armazenar dados dos íons de interesse de cada analito e estes fragmentos são então monitorados no tempo de retenção (eluição) do analito (ALDER *et al.*, 2006).

Interferentes provenientes da matriz podem afetar a seletividade do equipamento e influenciar o resultado, comprometendo a identificação dos analitos. Avanços em Espectroscopia de Massas aumentam a especificidade, com a exclusão dos íons dos interferentes da amostra. Uma maior seletividade também é observada quando se utiliza ionização química, entretanto, a informação relacionada à estrutura dos compostos que estão sendo analisados também é diminuída (BEGUIN *et al.*, 2006).

No desenvolvimento de métodos multirresíduos, o principal desafio é obtenção de percentuais satisfatórios de recuperação dos analitos, assim como, a diminuição de ruídos e interferentes pela otimização de processos de preparo e limpeza das amostras.

3.8 Validação

A validação de um método analítico envolve um procedimento que comprove que este método é capaz de fornecer os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequados (LANÇAS, 2004). Objetivando assegurar a confiabilidade dos resultados, a validação de procedimentos do processo analítico empregado serve como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua rastreabilidade e confiabilidade (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os parâmetros mais empregados para a validação de métodos de análise de medicamentos veterinários e agrotóxicos por cromatografia são a seletividade, a curva analítica e a linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a exatidão, a repetitividade e reprodutibilidade.

3.8.1 Seletividade

Está relacionada com a habilidade do método em determinar o analito, de forma inequívoca na presença de substâncias interferentes oriundas da matriz da amostra. A seletividade é um importante parâmetro especialmente na análise de amostras complexas, como na determinação de resíduos em alimentos e água (LANÇAS, 2004). Assim, a seletividade demonstra a capacidade do método de extração, de purificação, do sistema de separação e detecção, em determinar o analito de interesse, entre outros compostos da matriz (SANCO, 2013).

A seletividade certifica que o sinal analítico é unicamente do composto de interesse. Se este critério não for assegurado, a linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004). Uma forma simples de determinar a seletividade de um método cromatográfico é observar a ocorrência de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando-se um branco da mesma matriz a ser avaliada. Deve-se repetir este procedimento com várias amostras branco a fim de verificar a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito deve ser observado (LANÇAS, 2004).

3.8.2 Linearidade e Curva Analítica

A linearidade de um método analítico é a habilidade deste em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2010; RIBANI *et al.*, 2004).

Na prática, a linearidade é determinada pelas curvas analíticas, que são gráficos de calibração, os quais relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004).

Para grande parte das técnicas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é estabelecida entre a resposta instrumental medida (eixo y - variável dependente) e a concentração do analito (eixo x - variável independente), produzindo uma equação de regressão linear onde $y = ax + b$, a qual relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a e b.

Por meio desta curva pode-se calcular o coeficiente de correlação (r), que estima a qualidade da curva analítica, pois demonstra uma menor oscilação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for seu valor (RIBANI *et al.*, 2004). Valores de coeficiente de correlação iguais ou superiores a 0,90 e 0,99, são recomendados, respectivamente, pelo INMETRO (2010) e pela ANVISA (ANVISA, 2012). Para o coeficiente de determinação (r^2) valores a partir de 0,98 são satisfatórios (CHASIN *et al.*, 1998).

3.8.3 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

O Limite de Detecção expressa a menor concentração do analito que pode ser detectada, enquanto que o Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser quantificada, para procedimento experimental empregado (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo Lanças (2004) o LOD é determinado com a menor concentração do analito que produz um sinal (S, do inglês Signal) do sistema. Geralmente considera-se comum aceitar como LOD a concentração do analito que gera um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema. Da mesma forma, a razão sinal/ruído com valores em torno de 10 é aceitável para determinar LOQ (CASSIANO *et al.*, 2009).

3.8.4 Exatidão

Mede a concordância existente entre os dados encontrados em uma determinada medida e o valor de referência escolhido como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão percebe a existência de erros sistemáticos, sendo um dos parâmetros mais relevantes para a análise do desempenho de um método analítico. Caso não haja um material de referência certificado, esta pode ser medida por ensaios de fortificação e recuperação, sendo calculada pela Equação 1 (FAO, 2001):

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \qquad \text{Equação 1}$$

Nesta fórmula temos que C_1 representa a concentração determinada na amostra fortificada, enquanto que C_2 é a concentração determinada na amostra não fortificada e C_3 representa a Concentração usada para fortificação.

Valores de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% são aceitos para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários (SANCO, 2013).

3.8.5 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados de experimentos independentes, repetidos em uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2010).

Numericamente, a precisão é calculada em termos de estimativa do desvio padrão relativo (RSD) conforme a Equação 2. Onde s representa a estimativa do desvio padrão absoluto calculada $\{\sum(x_i-x_m)^2/N-1\}^{1/2}$, x_i são os valores individuais, x_m representa a média das medidas em replicatas e N é o número de medidas.

$$RSD\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

Segundo Huber (1998) para métodos de determinações a nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis.

A precisão é determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (LANÇAS, 2004).

A repetitividade corresponde a análises consecutivas sob as mesmas condições, por outro lado a precisão intermediária diz respeito às medições que ocorrem quando método foi submetido a alterações de condições, tais como diferentes dias de análises, distintos analistas ou equipamentos, entre outros (ANVISA, 2012).

3.8.6 Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa

O efeito matriz pode causar interferêcias na análise cromatográfica, tais como: o mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo, equívocos na identificação do analito e ampliação do sinal no detector, levando à superestimação do resultado (PINHO *et al.*, 2009).

Uma das formas de se avaliar o efeito matriz é através de uma curva analítica preparada pela fortificação dos padrões na matriz e no solvente (PIZZUTI *et al.*, 2009). Outra maneira é pala comparação das inclinações das curvas analíticas em solvente e na matriz, o efeito matriz é então avaliado na comparação das áreas obtidas das soluções analíticas no solvente e na matriz preparadas em uma determinada concentração, segundo a Equação 3:

$$Efeito\ Matriz\ (\%) = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Para esta equação x_1 representa a média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado na matriz, em uma dada concentração, enquanto que x_2 é igual a média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado em solvente, em uma concentração especificada (FRENICH *et al.*,2009).

3.9 Planejamento Experimental

Quando se deseja estudar o efeito de qualquer variável sobre a resposta é preciso alterá-la e observar o resultado dessa variação. Com a combinação de K fatores em dois níveis, um

planejamento experimental consistirá de 2^K experimentos. Os níveis dos fatores são dados pelos sinais menos (-) para o nível inferior e mais (+) para o nível superior, podendo ter nível zero (0), ou ainda uma variação entre + α e – α.

Em alguns casos, podem também ser abrangidas replicatas como um ponto central no qual todos os fatores estão em seu valor médio, esse ponto possibilita identificar relações não lineares no intervalo estudado, estimar o erro experimental sem a necessidade de replicatas de todo o planejamento (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O uso de planejamento experimental é de grande interesse para o desenvolvimento de um novo método uma vez que minimiza o período de otimização dos processos, diminui o número de experimentos e permite a avaliação de uma série de variáveis simultaneamente (MUNARETTO *et al.*, 2013)

4 METODOLOGIA

O desenvolvimento experimental consistiu no estudo e aplicação de método para determinação multiresíduo de agrotóxicos (azoxistrobina, difenoconazol, tebuconazol, trifuralina, aldrin, dieldrin e ametrin) e medicamentos veterinários (bifentrin e bioaletrin) em amostras de água e de carne de peixe. As técnicas utilizadas foram HF-LPME e QuEChERS, respectivamente, e para a determinação dos compostos de interesse utilizou-se o CG/MS. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos e Contaminantes (LARCO), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande – FURG, no Campus Santo Antônio da Patrulha.

4.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos a seguir:

- Sistema GC/MS equipado com: cromatógrafo a gás Perkin Elmer modelo Clarus 680; com amostrador automático, Turbo Mass versão 5.4.2, com coluna VF 5 ms (30,0 m x 0,25 mm, 0,25 μm) Agilent, detector de massas quadrupolo 600 T, operando no modo SIR (Perkin Elmer, Brasil), sistema de aquisição de dados através do software Turbo Mass versão 5.4.2.1617;
- Agitador vórtex – Biomixer modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);

- Agitador vórtex –Warmnest modelo VX-28 (Ionlab, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q direct Q3® (Millipore, França).
- Balança analítica de precisão AUY- 220 (Shimadzu, Japão);
- Centrifuga refrigerada NT 825 (Novatécnica, Brasil);
- Centrifuga digital microprocessada refrigerada CT-5000 R (Cientec, Brasil);
- Freezer – frezeer vertical (Electrolux, Brasil).
- Mixer 400 Watt (Philips Walita®, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (BRAND, Alemanha; Labmate, Polônia e PZ HTL S.A., Polônia);
- Seringa 10 µL (Hamilton Co., EUA)
- Incubadora refrigerada com agitação MA-832 (Marconi, Brasil)

4.2 Materiais, solventes, reagentes e adsorventes utilizados

Os materiais utilizados estão listados abaixo:

- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct Q3® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Amina Primária e Secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro P.A. (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio P.A. (J.T. Baker, EUA);
- Ácido Acético (Sigma Aldrich, EUA);
- 1-Octanol (Sigma Aldrich, EUA);
- Tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) (Sigma Aldrich, EUA);
- Q3/2 Accurel PP hollow fiber (Wuppertal, Alemanha)
- Gás de arraste: Hélio 99,9997% de pureza (White Martins, Brasil);

- Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Vials de vidro com capacidade de 1,5 mL (SUN SRI, EUA);
- Frascos de vidro âmbar com tampa contendo batoque e com capacidade de 10 mL;
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Tecno Plastic, Suiça);
- Septos de 8 mm para tampas de vial (SUN SRI, EUA);
- Vidraria comum de laboratório (balão volumétrico, béquer, bastão de vidro, espátula);
- Padrões sólidos dos analitos estudados: Trifluralina 99,29% (Dr. Ehrenstorfer), Tebuconazol 99,5%, Difenoconazol 97,2%, Dieldrin 98,8% e Azoxistrobina 99,4% (Sigma Aldrich), Ametrin 98,8 %, Aldrin 95,8% ,Bifentrin 98,8%, Bioaltrin 98,8% (Pestanal).

4.3 Preparo das soluções analíticas

Para este trabalho, as soluções analíticas estoque, com concentração de aproximadamente 1000 mg L^{-1}, foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em metanol e/ou acetonitrila. As soluções foram acondicionadas em recipientes âmbar e estocadas a temperatura adequada. A partir de diluições, foram preparadas as soluções trabalho contendo a mistura dos agrotóxicos e medicamentos veterinários deste estudo, com uma concentração conhecida. Esta solução foi utilizada para verificar a resposta do equipamento perante o método desenvolvido, na otimização do procedimento, para a construção da curva analítica e nos ensaios de recuperação.

4.4 Processamento das amostras

Os filés de traíra (*Hoplias malabaricus*) foram comprados em supermercado local. Estes foram processados até homogeneização com auxílio de processador de amostra. A amostra foi embalada e mantida a -20 °C, em tubos de plástico, até o momento das análises.

As amostras de água não necessitaram de pré-processamento, pois foi usado água Milli-Q. O uso da água Milli-Q fez-se necessário para o desenvolvimento inicial da técnica HF-LPME, evitando-se a introdução de mais variáveis ou interferentes no processo.

4.5 Condições para determinação dos analitos por GC-MS

Dentre os parâmetros do GC-MS definidos para a detecção e quantificação dos compostos deste estudo estão: o uso de uma coluna analítica VF 5 ms (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Agilent, o gás de arraste sendo He 6,0 com vazão de 1,0 mL min^{-1} e volume de injeção de 1µL. O modo de injeção é *splitless*, com temperatura inicial de 100 °C por 1 minuto, aquecimento de 200 °C min^{-1} até 280 °C mantidos até 20 minutos. Com relação ao forno do GC, a temperatura inicial de 100 °C por 1 min, seguido de aquecimento de 8,3 °C min^{-1} até 150 °C e 20°C min^{-1} até 280 °C mantidos até completar 20 min. A fonte de ionização usada opera impacto de elétrons e o detector foi um Espectrômetro de Massas do tipo Quadrupolo, operando no modo SIR (monitoramento seletivo de íons) com 2 ou 3 íons por analito.

Para o Espectrômetro de Massas, modo EI positivo a temperatura do *transfer line* utilizada foi de 300 ºC, com temperatura da fonte de ionização de 250 ºC. Utilizou-se o modo de aquisição SIR, com 70 eV de energia para o impacto dos elétrons, de 0 à 6 minutos de Solvente Delay e multiplier de 418 V.

Com os parâmetros acima já estabelecidos, o íon de maior intensidade foi utilizado na quantificação, sendo que todos os íons selecionados foram confirmados através de consulta na literatura e biblioteca do equipamento Nist MS search 2.0, ou confirmados pela injeção de solução analítica padrão de cada analito.

4.6 Utilização de Padrão Interno

O trifenilfosfato (TFF) foi utilizado por ANASTASSIADES *et al.* (2003) no desenvolvimento do método QuEChERS, enquanto que PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN (1999) utilizaram cloridrato de difenidramina como padrão interno para HF-LPME. Devido ao seu comportamento estável nas análises por GC/MC o trifenilfosfato foi escolhido como padrão interno para ambas as técnicas abordadas neste estudo.

Obteve-se uma concentração final de 100 µgL^{-1}, para os ensaios com HF-LPME e 200 µg L^{-1} para as análises com QuEChERS. Nos experimentos com água 10µL (1 mg L^{-1}) de TFF foram adicionados em cada insert, já para as análises de peixe 20 µL (10 mg L^{-1}) do padrão interno foram adicionados em cada vial.

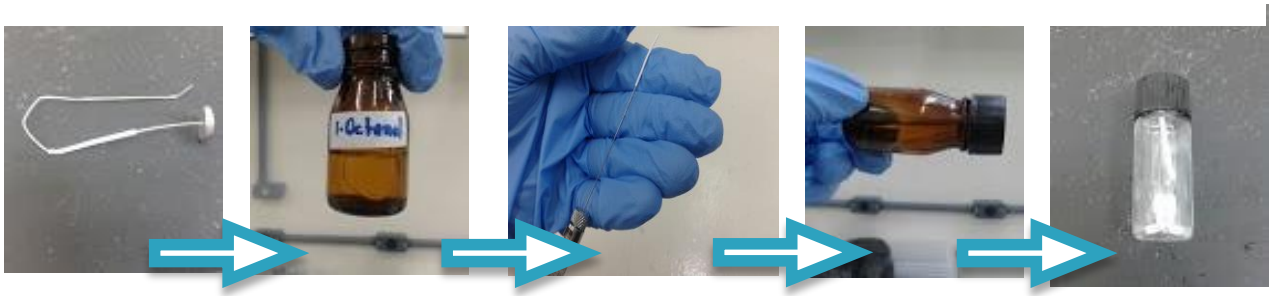
4.7 Métodos de Extração

4.7.1 Desenvolvimento do método HF-LPME para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em água.

Para a otimização do método o solvente orgânico deve possuir alguns algumas características: boa afinidade com os compostos, baixa solubilidade em água e ser compatível para injeção em GC/MS (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003) sendo o 1-octanol um dos solventes mais utilizados segundo Figueiredo *et al.* (2015). Além disso, estudos demonstram que para alguns compostos o uso de líquidos iônicos como TOPO (óxido de trioctil fosfina) pode aumentar a eficiência da extração. Por isso, foram executados testes para verificar a eficiência de 1-octanol e uso de TOPO para a escolha de um método em duas ou três fases.

Nos primeiros ensaios foi estabelecida a seguinte metodologia: à uma amostra de 5 mL de água foi adicionada de 300 mg de NaCl e 300 µL de acetonitrila. Esta amostra aquosa recebeu então 2 cm de fibra em suporte metálico embebida em um solvente (1-octanol) ou líquido iônico (TOPO) por 30 segundos, contendo ou não líquido em seu interior (sistema com duas ou três fases). O frasco com a amostra e a fibra foi agitado por 30 minutos a 90 rpm. Terminado este tempo, a fibra dobrada foi adicionada ao inserte e recebeu 100 µL de acetonitrila e 10 µL de TFF (1 mg L^{-1}). Cada fibra foi utilizada apenas uma vez para evitar contaminação entre as amostras. As etapas envolvidas na etapa de extração podem ser vistas na Figura 4.

Figura 4 - Sequência do procedimento experimental para HF-LPME.



Fonte: fotos do autor.

Foram realizados quatro experimentos diferentes para determinação dos compostos por HF-LPME, para avaliar qual método fornecia as melhores recuperações. Assim, fortificações foram realizadas obtendo-se e uma concentração final igual para todos os experimentos. As

recuperações foram calculadas comparando-se as áreas obtidas em cada método e a área dos compostos em solvente com a mesma concentração.

No experimento 1 os poros da membrana foram impregnados com 1-octanol e sem preenchimento de seu interior. No experimento 2 a fibra foi impregnada com 1-octanol e com o auxílio de uma seringa preencheu-se o lúmen da fibra com acetonitrila. No terceiro experimento o TOPO impregnou a fibra enquanto que esta continha acetonitrila em seu interior. No último experimento a fibra continha 1-octanol na sua superfície interna e no lúmem da membrana. Após a análise dos resultados iniciou-se a etapa de planejamento experimental para otimizar o processo de extração.

4.7.1.1 Planejamento Experimental

Na otimização da HF-LPME foi realizado um planejamento 2^4 com ponto central, utilizando as condições estabelecidas e avaliadas no item anterior para uma maior recuperação dos compostos. As variáveis estudadas, que interferem no rendimento da extração, foram massa de NaCl, volume de acetonitrila, tempo e velocidade de agitação, conforme descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados no planejamento 2^4 com ponto central.

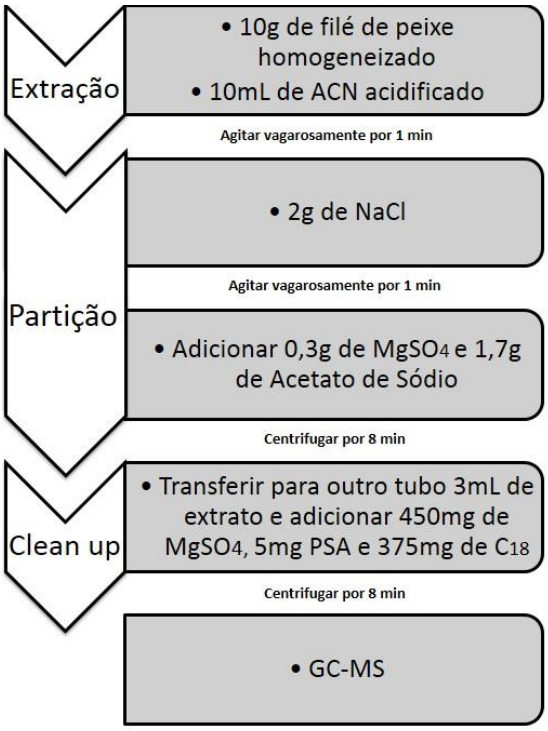
Variáveis	**Níveis**				
	- α	**-1**	**0**	**1**	**α**
Massa de Nacl (g)	0	0,3	0,5	0,8	1
Volume de ACN (µL)	0	200	500	800	1000
Tempo de agitação (min)	6	20	40	60	75
Velocidade de agitação (rpm)	50	90	150	210	250

As recuperações obtidas em cada experimento foram analisados utilizando o Software Statistica, através da análise dos gráficos de pareto e das superfícies de resposta. Os efeitos de cada variável foram avaliados e os resultados determinaram o desenvolvimento final do método.

4.7.2 Método QuEChERS

O método QuEChERS foi utilizado para a determinação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne de peixe. O método de extração utilizou 10 g da amostra extraída com 10 mL de acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético, seguido por agitação manual por 1 minuto. Na etapa seguinte ocorreu a adição de 2 g cloreto de sódio e agitação por mais 1 minuto. Depois disso, 0,3 g de $MgSO_4$ anidro e 1,7 g acetato de sódio anidro foram adicionados, seguidos por mais 1 minuto de agitação. A amostra foi centrifugada por 8 minutos a 1500 g. A subsequente etapa de limpeza foi realizada com uma alíquota de 3 mL do sobrenadante na qual adicionou-se 75 mg de PSA (Amina Primária Secundária), 450 mg de $MgSO_4$ e 375 mg de C_{18} a fim de eliminar as gorduras presentes na matriz, seguido novamente de agitação por 8 minutos a 1500 g. O extrato final foi analisado no sistema GC-MS (Figura 5) (MUNARETTO *et al*., 2013).

Figura 5 - Fluxograma do método QuEChERS proposto por Munaretto *et al*. (2013).



Fonte: adaptado de MUNARETTO *et al*., 2013.

4.8 Validação

Os procedimentos adotados para a validação de métodos de análise de medicamentos veterinários e agrotóxicos por cromatografia comumente avaliados são linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

A linearidade avaliou a capacidade da metodologia analítica em gerar resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa especificada. Foi observada pelos gráficos dos resultados em função da concentração do analito ou pela equação da regressão linear, onde as curvas foram feitas em solvente e em extratos da matriz fortificados.

A sensibilidade estava relacionada com a inclinação da curva de regressão linear de calibração e foi determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) referiram-se a menor concentração de um analito contido na amostra que podia ser detectado e quantificado em condições aceitáveis de exatidão e precisão. Foram verificados através da análise de amostras branco fortificadas em baixas concentrações (1;2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5µg L^{-1} para água e µg kg^{-1} para peixe) e submetidas ao procedimento de extração. As concentrações que produziram 3 e 10 vezes o sinal ruído do equipamento correspondem ao LOD e LOQ, respectivamente.

A exatidão do método foi determinada após a análise da linearidade. Foi verificado no intervalo linear do procedimento, ou seja, próximo ao limite de quantificação. Foi expressa pela relação entre a concentração teórica e a concentração média determinada experimentalmente. Foram verificados através da análise de amostras branco fortificadas em baixas concentrações (200, 100, 80, 75, 40, 30, 20 e 15 µg L^{-1} para água e 200, 50 e 25 µg kg^{-1} para peixe) e submetidas ao procedimento de extração (ANVISA, 2012)

Precisão é a medida da proximidade entre os resultados, isto é, o nível de concordância entre os resultados dos testes aplicados repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra. A precisão foi expressa como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas (VALENTINI et al., 2007).

A repetitividade expressa a exatidão nas mesmas condições de operação em um curto período de tempo. Segundo exigência da ANVISA (2012), foram realizadas triplicatas, repetindo mais uma triplicata em outro dia, contemplando o intervalo linear do método, para uma única concentração-teste.

A precisão intermediária revelou o efeito das variações no mesmo laboratório. Para a determinação da precisão intermediária foram avaliados os resultados do método em dois dias diferentes. (BRITO, *et al.*, 2003).

A análise do efeito matriz no método QuEChERS foi realizada através da construção de curva analítica preparada pela fortificação dos padrões na matriz e no solvente. Também foi estimado através da análise das áreas obtidas numa dada concentração através de fortificação na matriz e no solvente, segundo a Equação 3 descrita no item 3.8. (PIZZUTI, *et al.*, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação por GC-MS

Os íons de cada agrotóxico selecionado para a análise por GC-MS no modo EI de ionização e modo SIR de aquisição, estão listados na Tabela 4, com seus íons monitorados e tempos de retenção.

As Figuras 6 e 7 apresentam os cromatogramas individuais dos analitos monitorado por segmento, obtidos após a injeção das amostras fortificadas, com uma concentração de 80 µg L^{-1} na matriz.

Os cromatogramas exibidos nas Figuras 6 e 7 demonstram como os compostos foram divididos em segmentos ao longo da corrida de 20 minutos, em seu respectivo tempo de retenção. Os picos apresentaram um sinal adequado, estão bem resolvidos e bem separados.

Tabela 4 - Compostos analisados por GC/MS no modo de ionização EI positivo por aquisição no modo SIR, íons monitorados e tempo de retenção (t_r).

Composto	**Íons Monitorados**	**t_r (min)**
Trifuralina	264, 290 e 306	10,02
Ametrin	170, 212 e 227	11,60
Aldrin	66, 263 e 293	12,04
Bioaletrin	79, 107 e 123	12,48
Dieldrin	79, 263, 277	13,09
Trifenilfoafato	325 e 326	13,90
Tebuconazol	70, 125 e 250	13,85
Bifentrin	165, 166 e 181	14,20
Difenoconazol	265, 323 e 326	18,2 e 18,22
Azoxistrobina	344 e 388	19,37

Figura 7 - Cromatograma dos compostos trifuralina, aldrin. dieldrin e ametrim extraídos por HF-LPME.

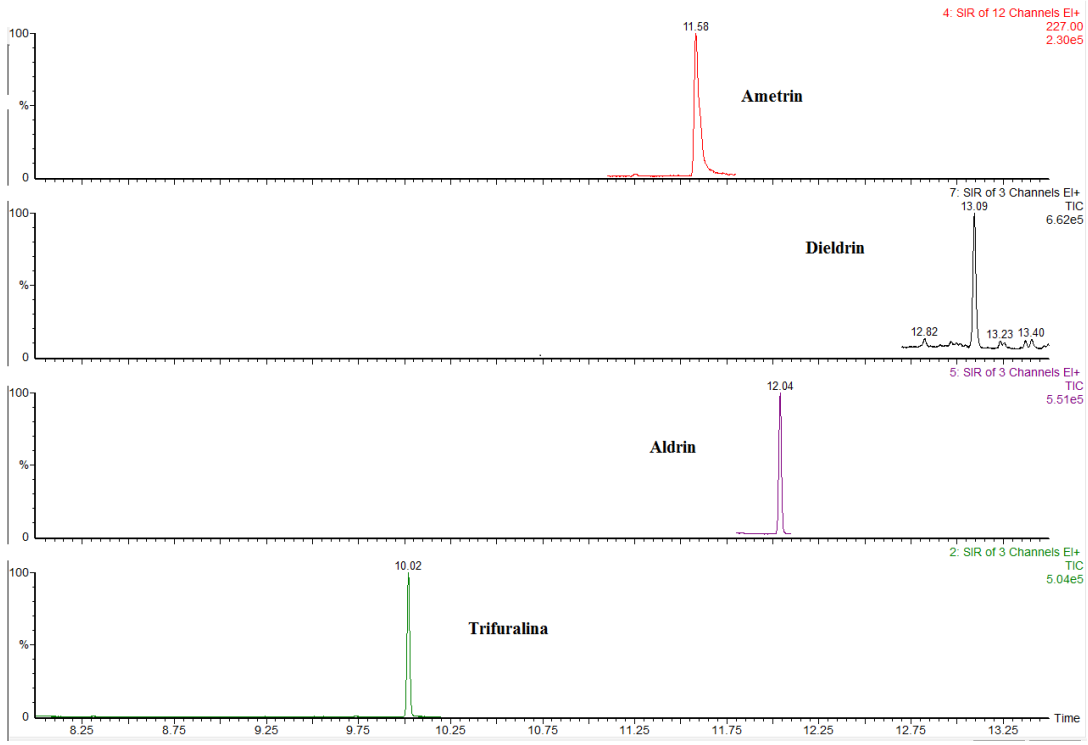
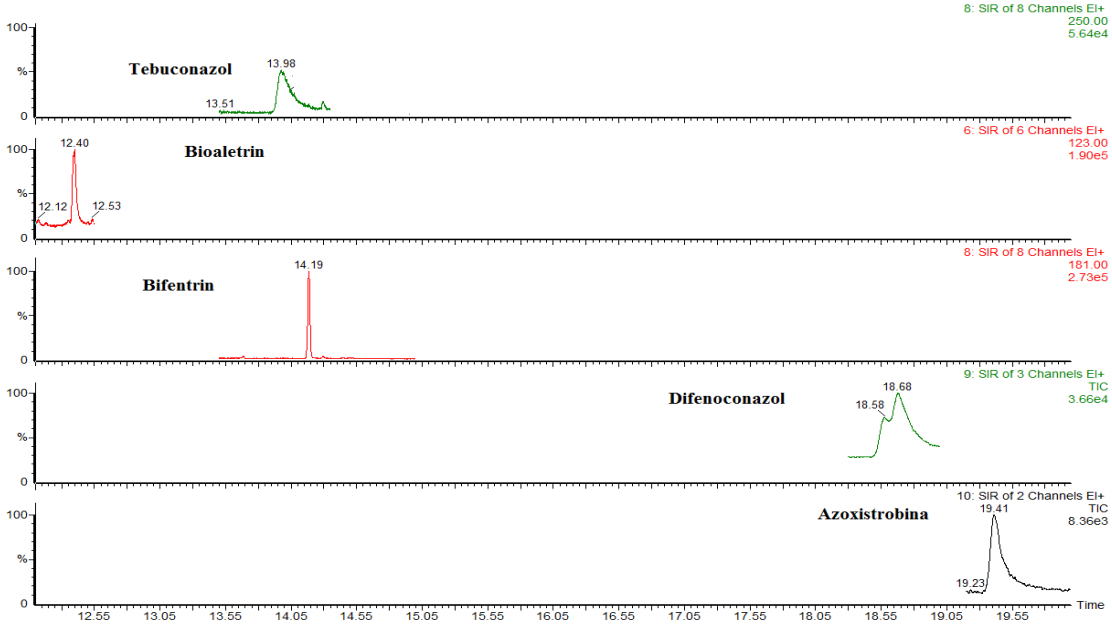


Figura 6 - Cromatograma dos compostos azoxistrobina, difenoconazol, bifentrin, bioaltrin e tebuconazol extraídos por HF-LPME.



5.2 Desenvolvimento do método HF-LPME

No desenvolvimento do método de microextração em fase líquida por fibra oca alguns parâmetros foram avaliados com o objetivo de obter uma maior resposta do método (área do pico) dos compostos estudados. As variáveis analisadas foram: solvente orgânico, solução receptora, tempo de extração, força iônica, velocidade de extração e volume de acetonitrila, utilização de líquido iônico (TOPO).

5.2.1 Seleção do solvente orgânico, solução receptora e uso de líquido iônico

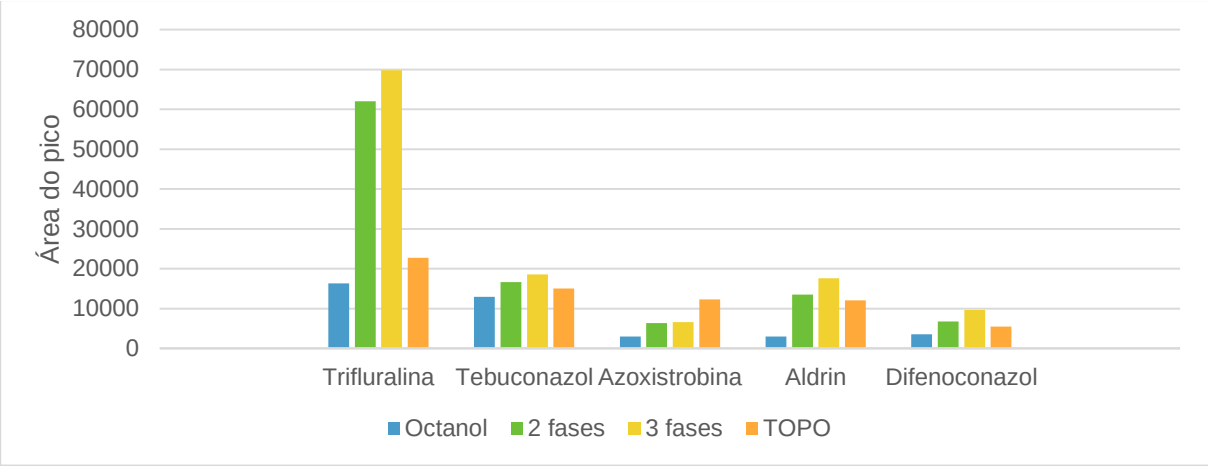
Na realização deste testes as extrações foram efetuadas com fortificações de 0,5 mg L^{-1} dos analitos. No experimento denominado Octanol, os poros da membrana foram impregnados com 1-octanol e sem preenchimento de seu interior. No experimento chamado de 3 fases, a fibra foi impregnada com 1-octanol e com o auxílio de uma seringa preencheu-se o lúmen da fibra com acetonitrila. No terceiro experimento, o TOPO impregnou a fibra enquanto que esta continha acetonitrila em seu interior. No último experimento, a fibra continha 1-octanol na sua superfície interna e no lúmem da membrana o que caracteriza HF-LPME em 2 fases.

Conforme pode ser visto no Figura 8, que demostra as áreas dos picos para cada analito nas diferentes configurações do método, quando se usa 3 fases (1-octanol e ACN) a área dos picos foi maior em comparação com os outros experimentos, o que representa uma maior extração dos analitos. Para Figueiredo *et al.* (2015) os elevados valores de coeficiente de partição dos compostos fazem com que estes sejam favoráveis a uma maior transferência de massa dos analitos da fase doadora para a fase receptora em 3 fases.

Pode-se perceber também que, quando o composto é mais polar, como é o caso da azoxistrobina, sua recuperação melhora com uso do TOPO já que este possui alta afinidade com compostos polares (TAO *et al*., 2009).

Como a extração com 3 fases demonstrou melhores resultados os experimentos posteriores para desenvolvimento do método foram conduzidos com essa metodologia (Figura 8).

Figura 8 - Área dos picos de cada composto para testes HF- LPME com 1-octanol, 2 fases, 3 fases e TOPO.



5.2.2 Planejamento Experimental

A análise das amostras de água com resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários exige um eficiente método de extração. Para otimizar este método foi necessário realizar uma etapa de planejamento experimental capaz de avaliar a influência de algumas variáveis para atingir as recuperações entre 70 e 120%. As variáveis investigadas e os níveis utilizados estão dispostos na Tabela 5.

As Figuras 9 e 10 mostram o diagrama de Pareto com o resultado da análise das variáveis para trifuralina e difenoconazol, respectivamente. A linha vertical mostra se os efeitos são significativos ou não, sendo que as barras que se estendem além da linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com um nível de confiança de 95%. Como demonstrado nas figuras as variáveis que possuem maior influência na recuperação destes compostos são tempo de agitação, velocidade, massa de NaCl e a interação entre tempo e velocidade. Sendo que o tempo de agitação, a velocidade e interação entre tempo e velocidade tem valores positivos, ou seja, a resposta aumenta quando uma variável passa de um nível menor para maior. Com relação a massa de NaCl a influência é negativa, isto é, a resposta diminui quando a variável passa de um nível menor para maior.

A adição de NaCl à amostra aumenta a força iônica, este efeito é chamado de *salting out*, geralmente resultando em uma maior extração líquido-líquido dos analitos. Este princípio determina que com uma elevada força iônica, menor deveria ser a solubilidade dos compostos na fase aquosa, o que levaria a uma maior migração dos analitos para o solvente orgânico presente na fibra (ROMÁN *et al.*, 2012). Porém, em alguns casos, como evidenciado neste

estudo, o aumento da força iônica tem um efeito negativo, bloqueando a migração dos analitos para a fibra e apresentando um fator adverso na recuperação. Para Zorita *et al*.(2008) com uma elevada força iônica outros processos podem tornar-se relevantes tais como a adsorção dos analitos às paredes do recipiente, fato este, importante quando se trabalha com análise de traços. De acordo com Polo *et al*. (2004) outro efeito causado pela adição de sal, que pode prejudicar a extração dos compostos, é o aumento da viscosidade e densidade da amostra que apresentam efeito negativo na cinética do processo e consequentemente na eficiência da extração. Os autores consideram que estes efeitos ocorrem principalmente quando os compostos apresentam elevados valores de log K_{ow}, ou seja, quando estes são mais apolares.

Tabela 5 - Variáveis e níveis analisados no planejamento experimental

Experimento	**NaCl (mg)**	**ACN (µL)**	**Tempo (min)**	**Velocidade (rpm)**
1	0,8	800	60	90
2	0,8	800	20	90
3	0,8	200	60	210
4	0,2	800	20	210
5	0,8	200	20	210
6	0,2	200	60	90
7	0,2	800	60	210
8	0,2	200	20	90
9	0,0	500	40	150
10	1,0	500	40	150
11	0,5	0	40	150
12	0,5	1000	40	150
13	0,5	500	6	150
14	0,5	500	75	150
15	0,5	500	40	50
16	0,5	500	40	250
17 C	0,5	500	40	150
18 C	0,5	500	40	150
19 C	0,5	500	40	150

Quanto à adição de acetonitrila na amostra percebeu-se que, quanto maior o volume adicionado, maior foi a recuperação, isto porque um elevado volume de acetonitrila adicionada à água deve diminuir a tensão superficial do meio e faciliar a interação com o 1-octanol da fibra. Fato este que fica evidente nos valores positivos observados nos gráficos das Figuras 9 e 10, onde o volume de acetonitrila aparece como uma variável que exerce uma influência significativa na recuperação dos compostos. As interações entre o volume de acetonitrila e

tempo de extração e a velocidade de extração podem ser observados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 9 - Diagrama de Pareto para recuperação de trifuralina.

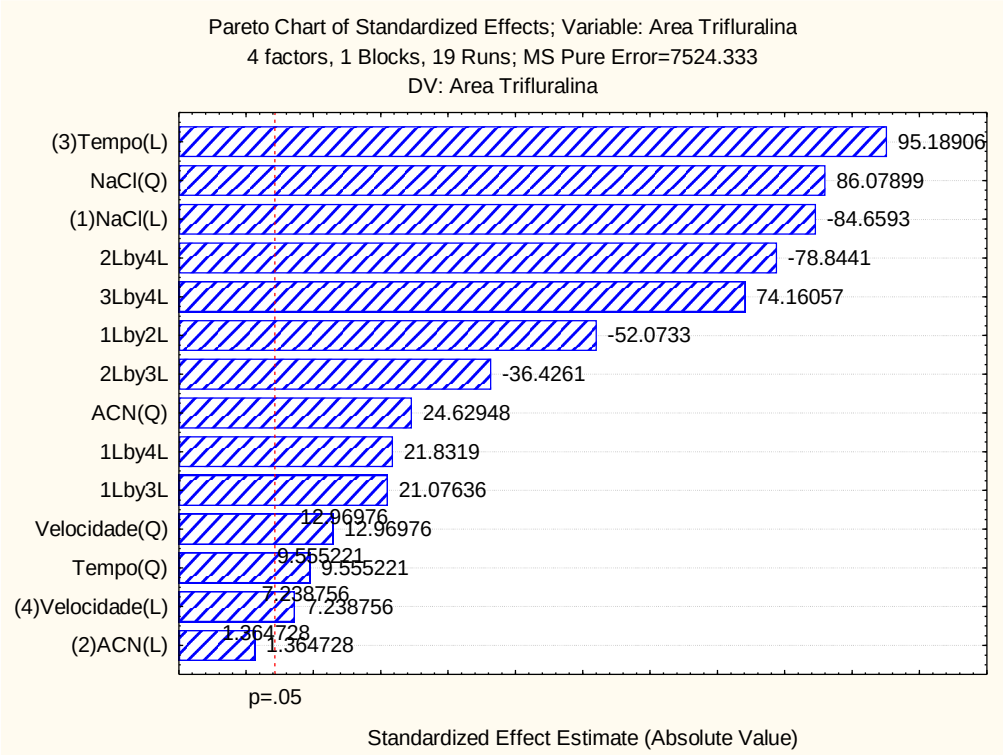


Figura 10 - Diagrama de Pareto para recuperação de difenoconazol.

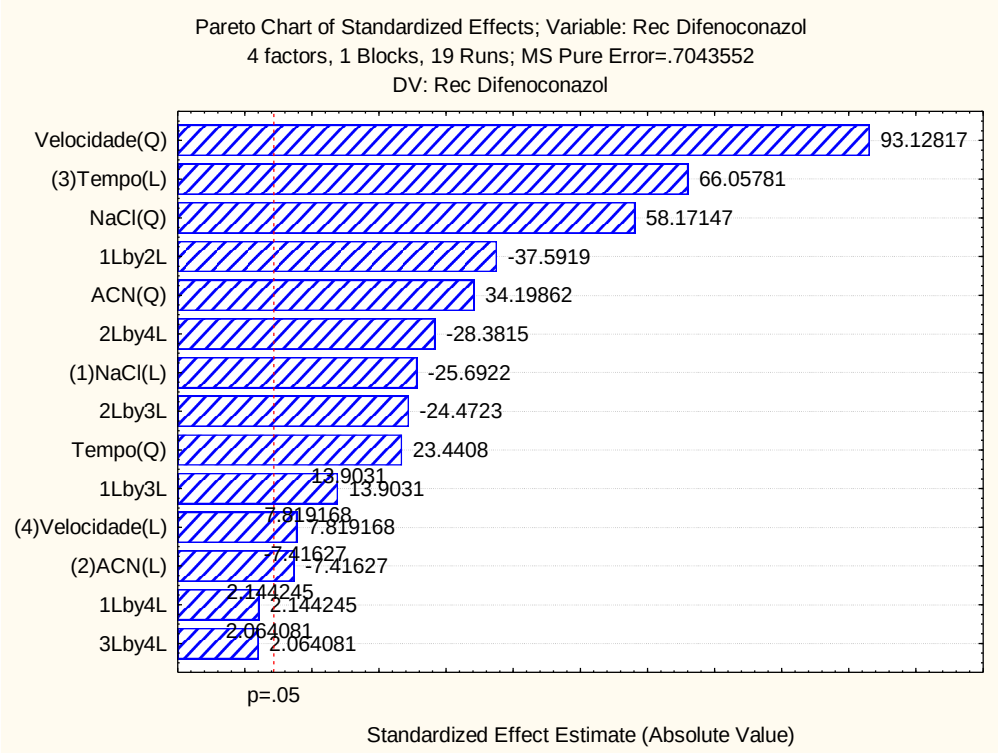


Figura 11 - Efeito do volume de acetonitrila (ACN) e tempo de extração na recuperação de trifuralina.

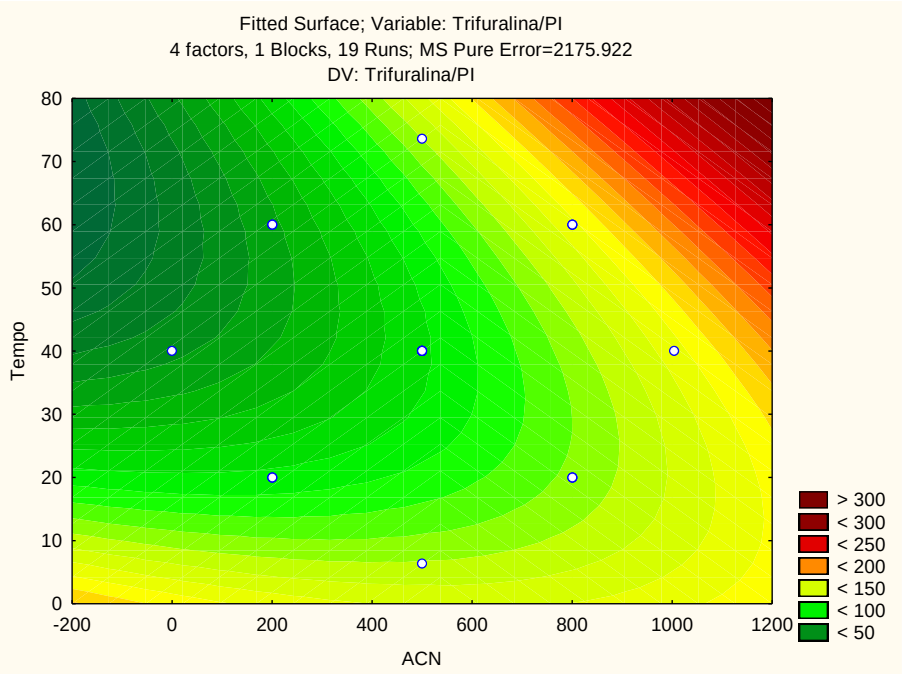
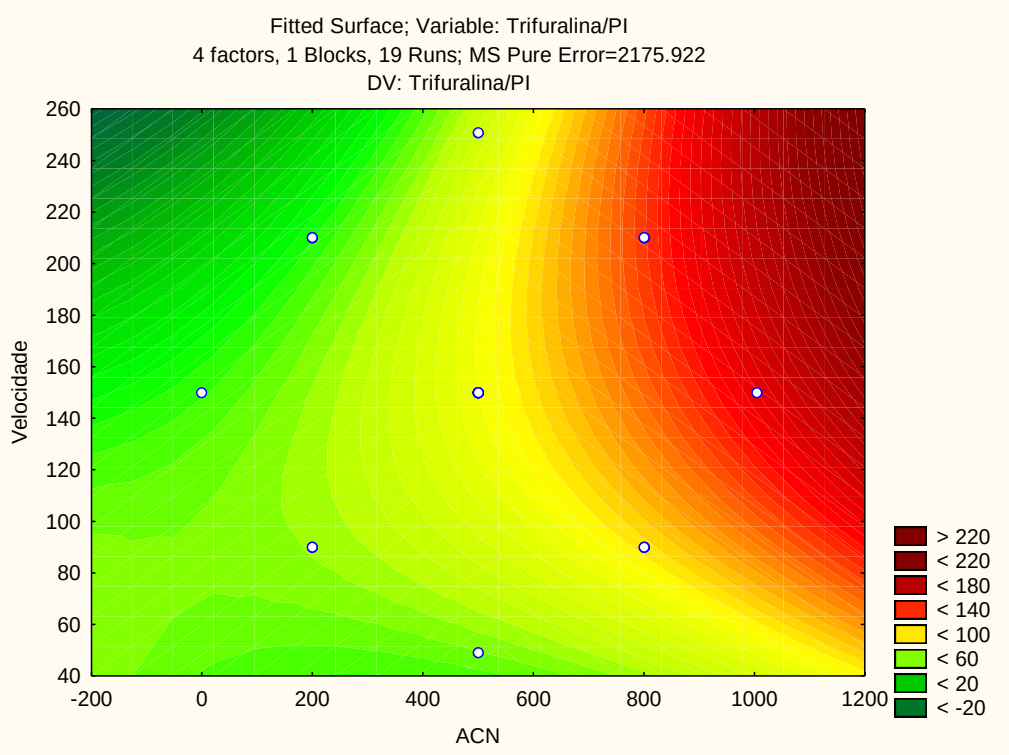


Figura 12 - Efeito do volume de ACN e velocidade de extração na recuperação de trifuralina.



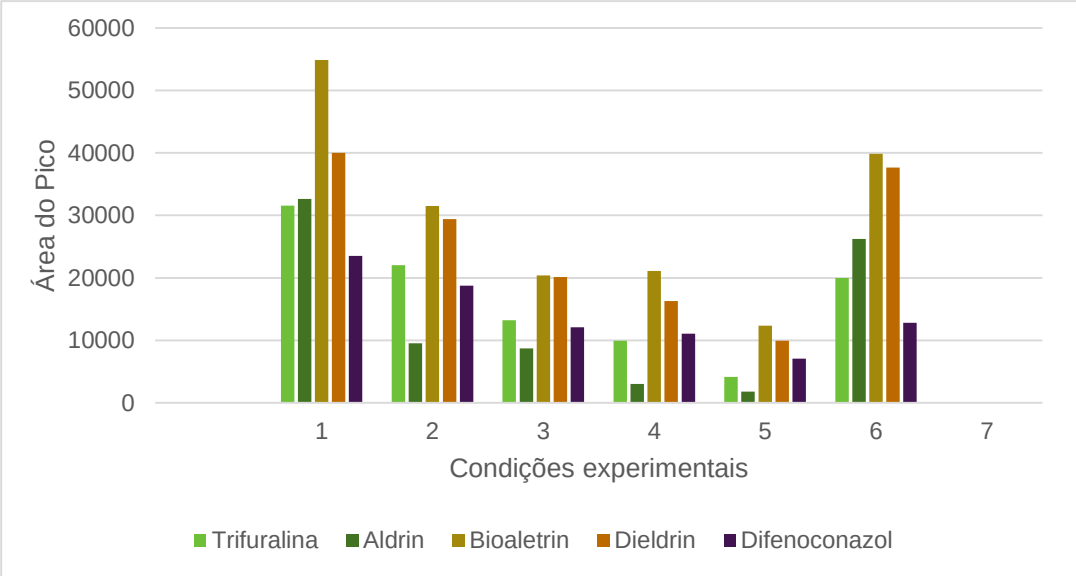
Após a análise destes gráficos o volume de ACN foi definido de forma a atender a maior recuperação dos analitos com a otimização do tempo e velocidades de extração. Novos testes foram realizados para analisar e confirmar a interação destas variáveis conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Experimentos para avaliar as parâmetros otimizados na extração dos analitos.

Condição	ACN (µL)	NaCl (g)	Tempo (min)	Rotação (rpm)
1	800	0	75	200
2	0	0	75	200
3	200	0	75	200
4	0	0,5	75	200
5	0	1	75	200
6	800	0	75	300
7	200	1	75	300

A Figura 13 demonstra os resultados obtidos na comparação entre os experimentos citados na Tabela 6.

Figura 13- Resultados obtidos nos experimentos de otimização do HF-LPME.



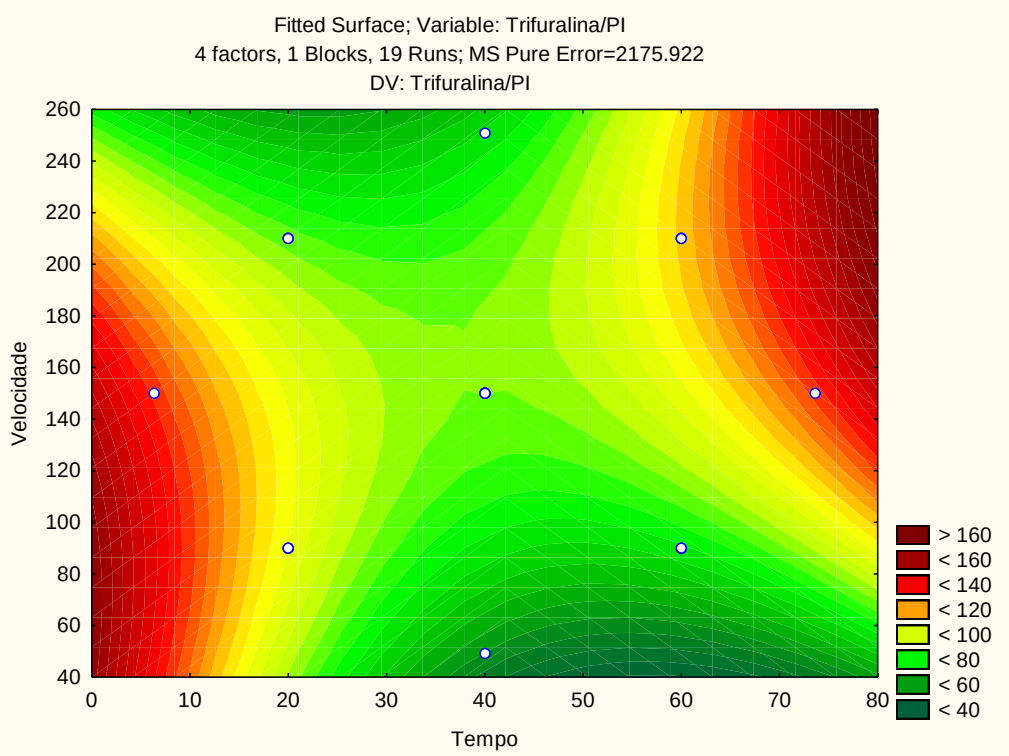
A Figura 13 demonstra que para os analitos trifuralina, aldrin, bioaletrin, dieldrin e difenoconazol a condição 1, na qual adicionou-se 800 µL de ACN à amostra, e esta foi agitada por 75 minutos à 200 rpm e sem adição de sal a área dos picos foi maior em comparação com as outras condições. Cabe destacar que quando o sistema foi colocado em condições extremas,

como na condição 7, com adição de 200 µL de ACN, 1g de sal, 75 minutos e 300 rpm de agitação nenhum analito foi recuperado.

Com estes resultados percebe-se que com uma agitação maior do que 200 rpm não houve recuperação dos compostos, conforme observado por Bolaños *et al*. (2008) altas velocidades podem causar bolhas de ar na superfície da fibra e uma perda de solvente orgânico causando efeito negativo na recuperação dos compostos.

O tempo de extração é extremamente importante uma vez que o processo de transferência de massa é dependente do tempo. Conforme avaliado na Figura 14, o tempo de 75 minutos é suficiente para a extração dos analitos com uma velocidade de agitação de 200 rpm. Para Tao *et al.* (2009) na maioria dos estudos envolvendo HF-LPME, o tempo de extração tipicamente varia entre 30 e 90 minutos.

Figura 14 - Efeito do tempo e velocidade de extração na recuperação de trifuralina.



Cabe salientar que embora a análise tenha sido feita principalmente para trifuralina e difenoconazeol, a resposta dos outros analitos aos parâmetros avaliados foi semelhante. Sendo assim, após a análise do planejamento experimental, a Tabela 7 demonstra as condições

estabelecidas para a determinação de agrotóxicos e medicamento veterinário em água para as variáveis otimizadas neste estudo.

Tabela 7 - Parâmetros otimizados para determinação dos compostos usando HF-LPME.

Parâmetros	Condições otimizadas
Solvente orgânico	1-octanol
Solvente no lúmen da fibra	Acetonitrila
Adição de Nacl (g)	0
Tempo de extração (min)	75
Velocidade de extração (rpm)	200
Volume de ACN na amostra (µL)	800

5.2.3 Procedimento HF-LPME otimizado

O procedimento final desenvolvido, descrito a seguir, foi utilizado durante o processo de validação do método.

Primeiramente um frasco âmbar contendo 5 mL da amostra (água de Milli-Q) recebeu 800 µL de acetonitrila e foi fortificada com os compostos em estudo, segundo as concentrações necessárias.

A fibra foi recortada em tamanhos de 2 cm e esta foi imersa em 1-octanol por 30 segundos. Depois, com o auxílio de uma seringa, seu lúmen foi preenchido com acetonitrila. A fibra foi disposta dentro da amostra com suas extremidades fechadas por um dispositivo de metal. O frasco contendo a amostra e a fibra foi levado para agitação por 75 minutos e 200 rpm.

Após agitação, a fibra foi retirada do frasco, com o auxílio de uma pinça, e esta foi dobrada ao meio e colocada no inserte dentro de um vial. Neste inserte foram acrescentados 100 µL de acetonitrila e 10µL de padrão interno com concentração de $1 mgL^{-1}$. Por fim, este foi analisado no GC/MS.

5.3 Validação da HF-LPME

5.3.1 Seletividade e efeito matriz

A seletividade foi avaliada pela injeção dos extratos para verificar que estes não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção e com os mesmos íons que os compostos de interesse.

Dado o método de calibração utilizado, ou seja, calibração externa com padrão interno, que é calculado a partir das áreas dos picos cromatográficos obtidos dos cromatogramas da injeção nos extratos de amostras fortificadas no sistema GC/MS, o efeito de matriz é compensado na determinação da concentração da amostra ou fortificação. Portanto, o efeito da matriz não foi determinado experimentalmente para o método HF-LPME em água.

5.3.2 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas foram preparadas em triplicata e injetadas também em triplicata (n=9).

Através das curvas construídas, foram obtidas as equações de reta, a faixa linear e os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r), mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada composto em estudo.

Composto	**Equação da reta**	**r^2**	**r**	**Faixa linear ($\mu g\ L^{-1}$)**
Trifuralina	y = 590,44x + 287,34	0,992	0,996	2,5 a 40
Ametrin	y = 278,7x + 1734,4	0,990	0,995	2,5 a 40
Aldrin	y = 1103,6x + 399,59	0,998	0,999	2,5 a 40
Dieldrin	y = 1066,2x + 2331,6	0,990	0,995	2,5 a 40
Tebuconazol	y = 586,11x + 1433,8	0,987	0,994	2,5 a 40
Bifentrin	y = 1729,9x + 59,023	0,993	0,996	2,5 a 40
Difenoconazol	y = 0,0054x - 0,1358	0,995	0,997	5 a 80
Azoxistrobina	y = 0,0005x - 0,0681	0,842	0,918	5 a 80

O método pode ser considerado linear de acordo com o INMETRO (2010), já que todos os coeficientes de correlação (r) obtidos foram maiores que 0,90. Porém a ANVISA (2012) e o SANCO (2013) recomendam que o coeficiente de correlação (r) seja superior a 0,99. Neste caso, apenas a Azoxistrobina não atende ao critério de linearidade. Por ser um composto com baixo valor de log Kow, a Azoxistrobina tem uma maior tendência em permanecer na fase aquosa, podendo este ser o motivo de sua menor linearidade (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

5.3.3 Exatidão e Precisão

As recomendações das agências regulamentadoras brasileiras, como INMETRO (2010), MAPA (2011) e ANVISA (2012) estabelecem uma faixa percentual de recuperação para métodos multirresíduo de agrotóxicos e medicamentos veterinários entre 70 e 120 %, com RSD% menor do que 20%.

As recuperações médias foram calculadas utilizando-se as curvas analíticas obtidas com as amostras fortificadas e preparados de acordo com o método de extração otimizado.

A análise dos resultados dos ensaios de recuperação e de repetitividade expressa em RSD% foram realizados de acordo com a Equação 1 e 2. Foram utilizadas as áreas obtidas nos ensaios de repetitividade nos níveis de fortificação de 15, 20 e 40 μg L^{-1} para trifuralina, ametrin, aldrin, dieldrin, tebuconazol, e bifentrin e 200, 100 e 75 μg L^{-1} para azoxistrobina e 80, 40 e 30 μg L^{-1} para difenoconazol estão apresentadas na Tabela 9. É importante destacar que foram realizadas triplicatas com uma injeção por amostra fortificada.

Dos compostos analisados o difenoconazol apresentou valor de recuperação média em desacordo com a legislação em uma das concentrações avaliadas, mas muito próximo do valor esperado. O ametrin também apresentou um valor de RSD% maior do que o esperado na concentração de 20 μg L^{-1}, porém para as outras concentrações seu resultado foi satisfatório. A azoxistrobina não apresentou valores de RSD% satisfatórias para duas das concentrações analisadas.

Tabela 9 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para cada analito para HF-LPME.

Composto	Exatidão e Precisão					
	40 µg L^{-1}		**20 µg L^{-1}**		**15 µg L^{-1}**	
	Rec%	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**
Trifuralina	119	11,9	103	10,9	81	2,6
Ametrin	103	25,4	74	42,4	114	9,5
Aldrin	110	24,8	108	10,5	90	4,3
Dieldrin	107	27,6	105	17,6	87	1,0
Tebuconazol	108	13,4	110	21,0	82	6,8
Bifentrin	113	17,6	116	21,5	104	15,6
	80 µg L^{-1}		**40 µg L^{-1}**		**30 µg L^{-1}**	
	Rec%	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**
Difenoconazol	113	19,2	70	10,2	68	13,5
	200 µg L^{-1}		**100 µg L^{-1}**		**75 µg L^{-1}**	
	Rec%	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**
Azoxistrobina	123	42,3	77	75,0	84	15,5

5.3.4 Precisão Intermediária

A precisão intermediária do método foi obtida pela análise de amostras branco fortificadas e expressa em RSD% e recuperação em diferentes concentrações e realizadas pelo mesmo analista, porém em dias diferentes, conforme demonstrado na Tabela 10.

Os valores obtidos para o estudo da precisão intermediária dos agrotóxicos e medicamentos veterinários determinados em água foram menores que 20% e a recuperação entre 70 e 120% para quase todos os compostos avaliados, com exceção do difenoconazol e da azoxistrobina que apresentaram valor de RSD% em desacordo com os parâmetros estipulados. Para Román *et al*. (2012) valores de RSD menores do que 28% ainda são aceitáveis quando agrotóxicos são analisados com esta técnica.

Tabela 10 - Média dos percentuais de recuperação e RSD de cada analito para HF-LPME.

Composto	**Precisão Intermediária**	
	750 µg L^{-1}	
	Recuperação Média (%)	**RSD (%)**
Trifuralina	101	10,7
Ametrin	106	19,9
Aldrin	102	9,3
Dieldrin	99	12,5
Tebuconazol	99	14,8
Bifentrin	103	9,0
	1500 µg L^{-1}	
	Recuperação Média (%)	**RSD (%)**
Difenoconazol	94	27,4
	3750 µg L^{-1}	
	Recuperação Média (%)	**RSD (%)**
Azoxistrobina	183	82,9

5.3.5 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação de cada agrotóxico e medicamento veterinário estão relacionado na Tabela 11. O método apresentou LOD entre 1 e 2,5 µg L^{-1} e LOQ entre 2,5 e 5,0 µg L^{-1}.

Tabela 11 - Limites de detecção e quantificação do método.

Composto	LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})
Trifuralina	1,0	2,5
Ametrin	1,0	2,5
Aldrin	1,0	2,5
Dieldrin	1,0	2,5
Tebuconazol	1,0	2,5
Bifentrin	1,0	2,5
Difenoconazol	2,5	5
Azoxistrobina	2,5	5

5.4 Validação do QuEChERS

O método QuEChERS utilizado na determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizado está descrito no ítem 4.7.3 e foi validado através da análise da seletividade, linearidade, LOD e LOQ, exatidão, precisão, efeito matriz, repetitividade e precisão intermediária.

As Figuras 15 e 16 representam os cromatogramas individuais de cada analito monitorado por segmento, obtidos após a injeção da amostra fortificadas, em uma concentração de 50 µg kg^{-1} na matriz.

Os cromatogramas exibidos nas Figuras 15 e 16 demonstram como os compostos foram divididos em segmentos ao longo da corrida de 20 minutos, e seu respectivo tempo de retenção. Os picos apresentaram um sinal adequado, estão bem resolvidos e bem separados.

Figura 15 - Cromatograma dos compostos trifuralina, aldrin, bioaletrin e ametrin pelo método QuEChERS.

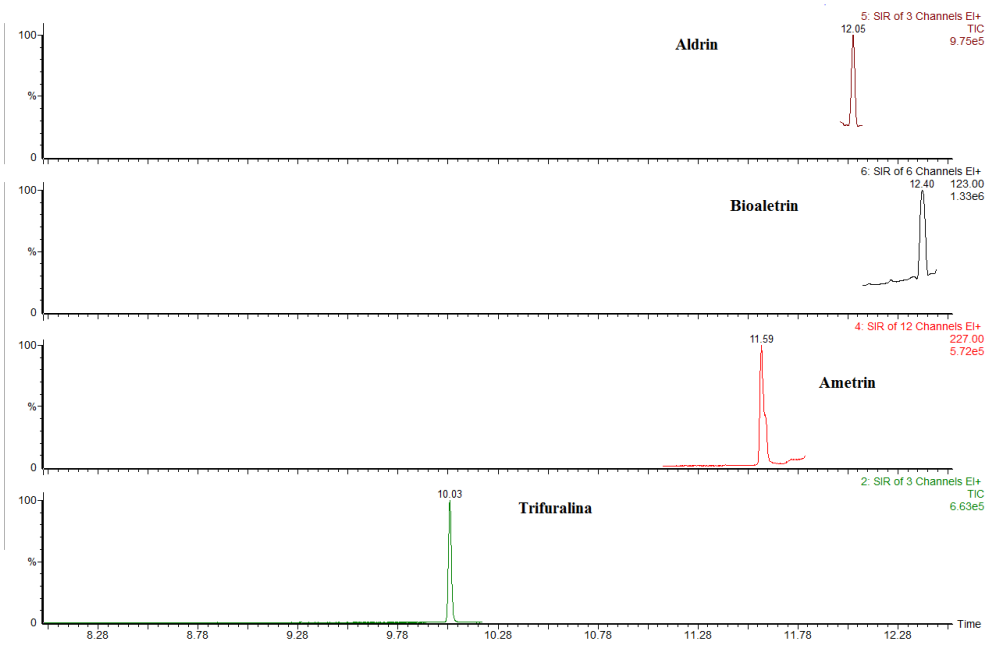
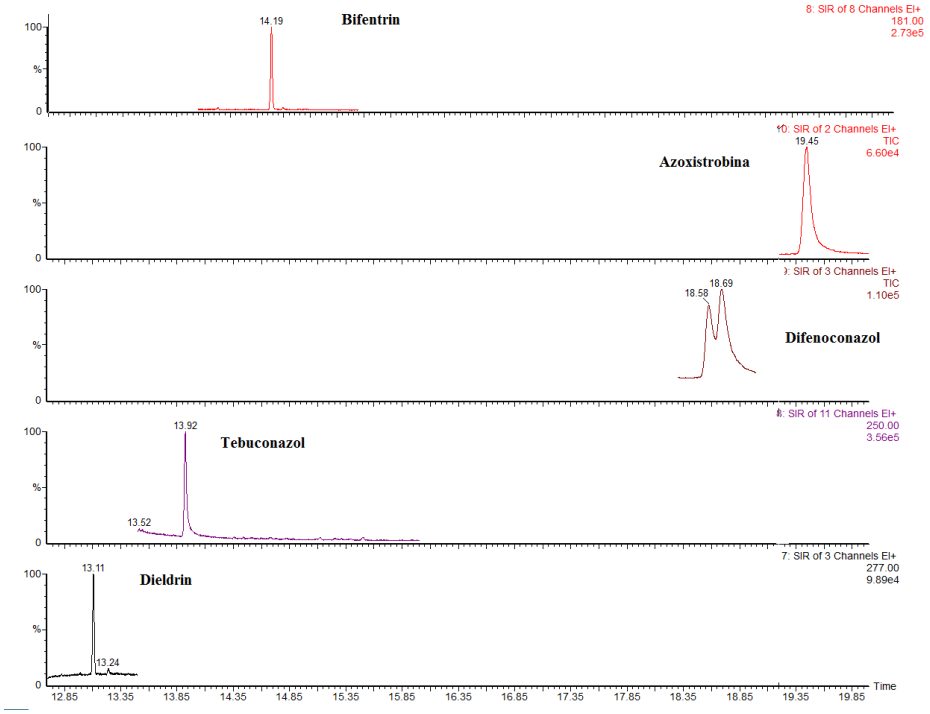


Figura 16- Cromatograma dos compostos dieldrin, tebuconazol, difenoconazol, azoxistrobina e bifentrin pelo método QuEChERS.

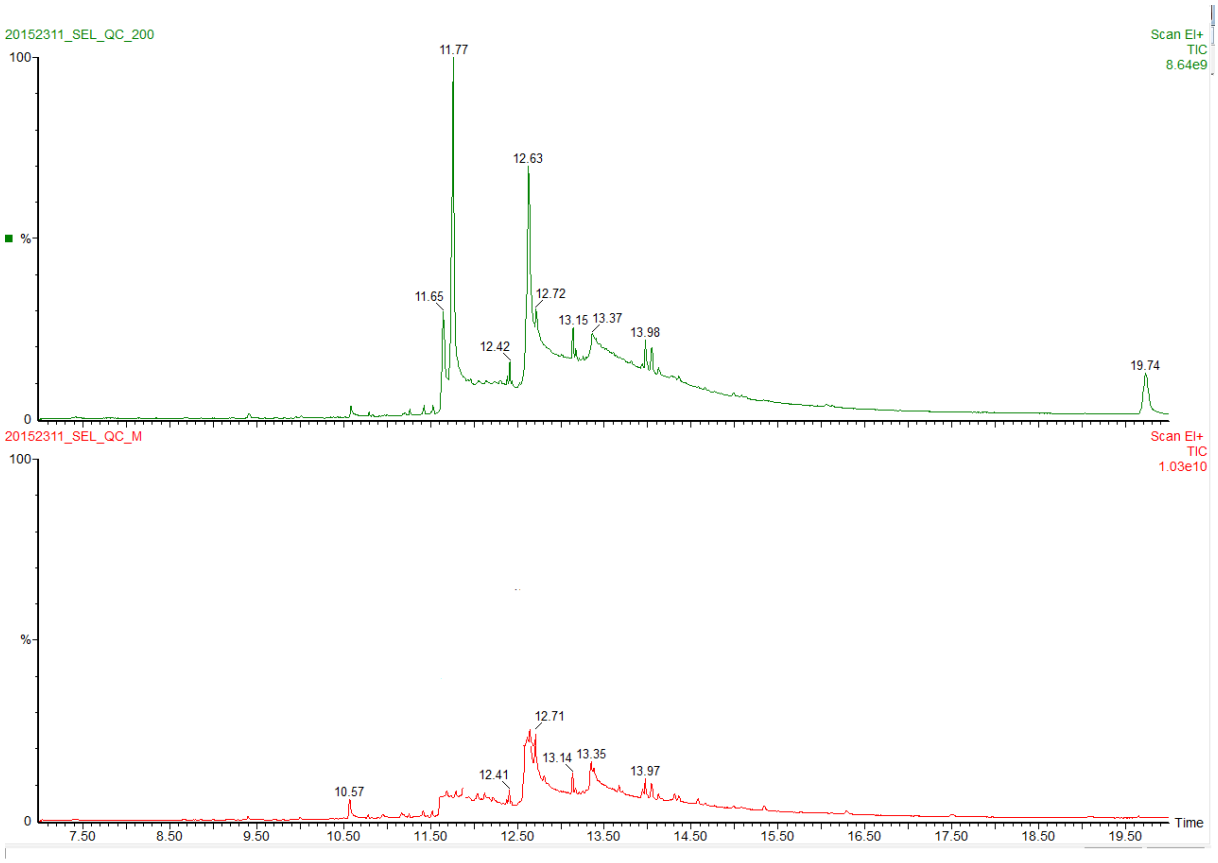


5.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos sinais obtidos nos cromatogramas de amostras branco de peixe com extratos fortificados na matriz, que quando injetados não apresentaram coeluição de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse (Figura 15), desta forma, pode-se concluir que os sinais obtidos foram gerados apenas pelos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados, garantindo a seletividade do método.

O cromatograma da parte superior da figura representa o extrato fortificado e o da parte inferior é extrato branco da matriz.

Figura 17 - Comparação dos cromatogramas obtidos com extrato da matriz fortificado com os compostos na concentração de 200 µg kg^{-1} e com a amostra branco.



5.4.2 Efeito matriz

O efeito matriz foi analisado pela avaliação das curvas analíticas construídas em solvente e no extrato da matriz (Figura 18), e pelo cálculo do efeito matriz conforme a Equação 3.

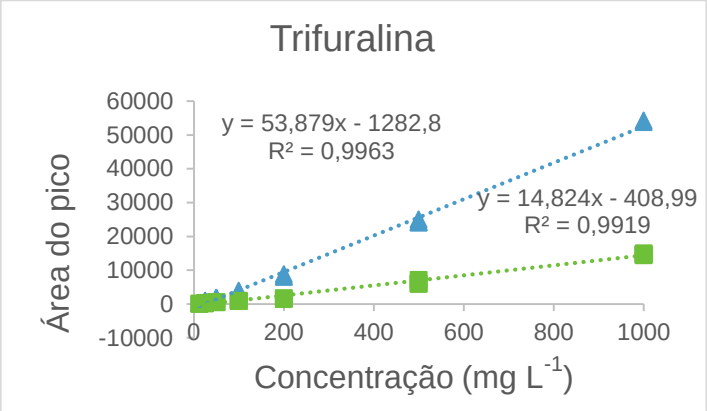
O efeito da matriz pode ser observado através das curvas analíticas, pois a curva em solvente (acetonitrila) obteve um sinal (área do pico) menor do que a curva no extrato. A Figura 14 evidencia também uma diminuição na linearidade com os menores coeficientes de determinação das curvas em solventes quando comparada com a curva na matriz. O efeito matriz calculado pela Equação 3 compõe a Tabela 12.

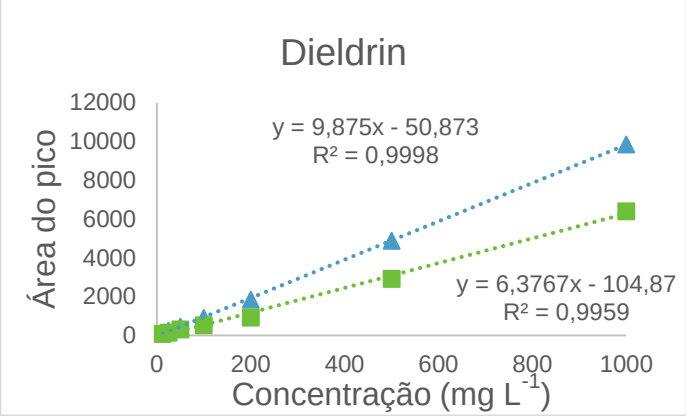
Tabela 12 - Efeito matriz dos compostos na concentração de 25 µg Kg^{-1}

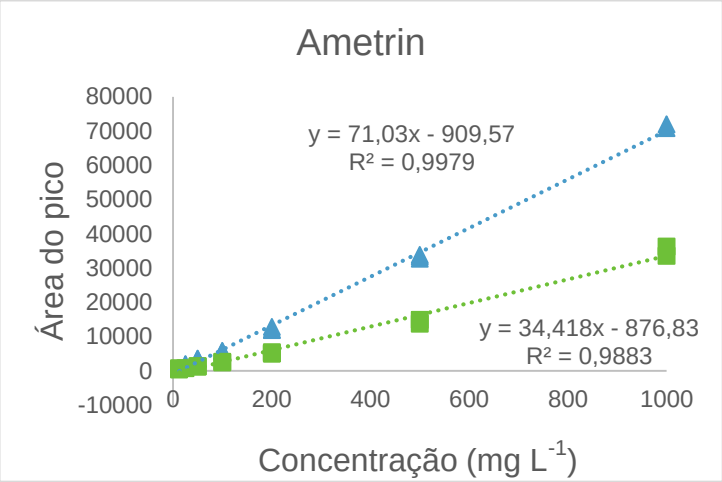
Composto	**Efeito Matriz (%)**
Trifuralina	433
Ametrin	130
Aldrin	122
Bioaletrin	2644
Dieldrin	105
Tebuconazol	532
Bifentrin	103
Difenoconazol	1040
Azoxistrobina	3063

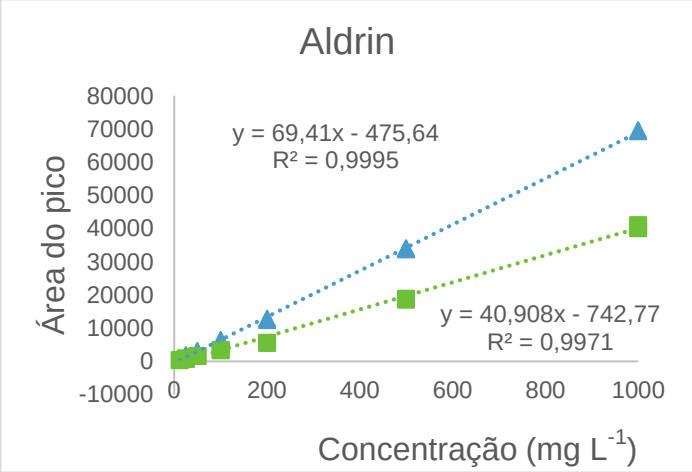
Analisando os valores percebeu-se que para todos os compostos existe um efeito acentuado de ampliação de sinal causado pela matriz. No caso do GC-MS, o efeito de matriz está mais relacionado a transferência dos analitos no *liner* (insersor), uma vez que a matriz causa efeito protetor. Mesmo após as etapas de *clean-up*, algumas substâncias como lipídios e outros compostos com elevado peso molecular podem permanecer solubilizados no extrato (PINHO *et al*., 2009). Sendo assim, as curvas passaram a ser construídas somente no extrato da matriz, com o objetivo de compensar este efeito.

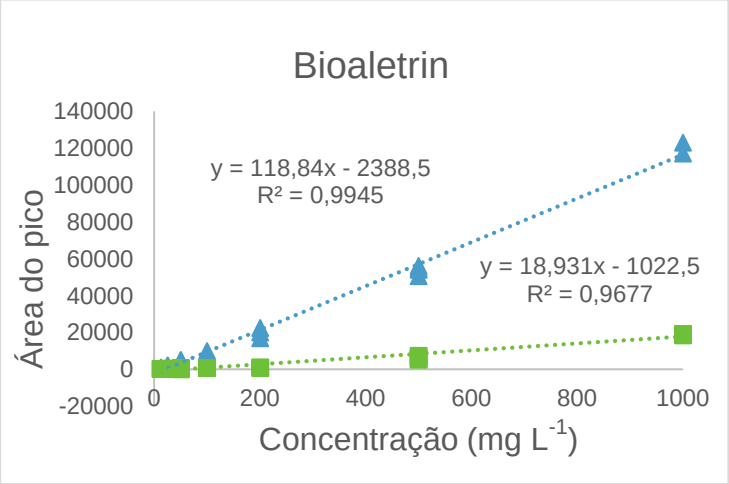
Figura 18 - Efeito matriz através das curvas em extrato em solvente para QuEChERS em peixe, onde o triângulo representa a curva no extrato e o quadrado a curva no solvente.

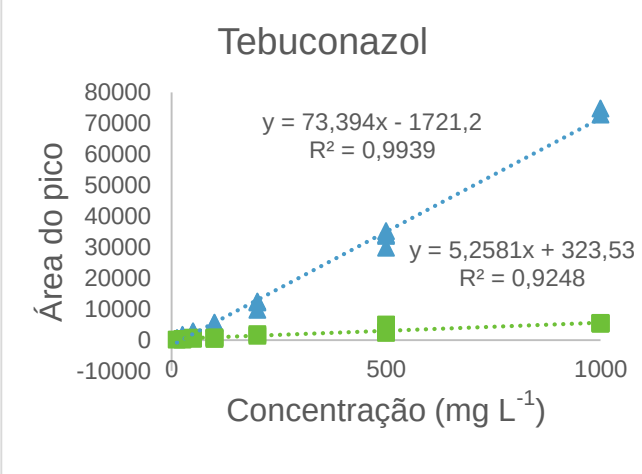


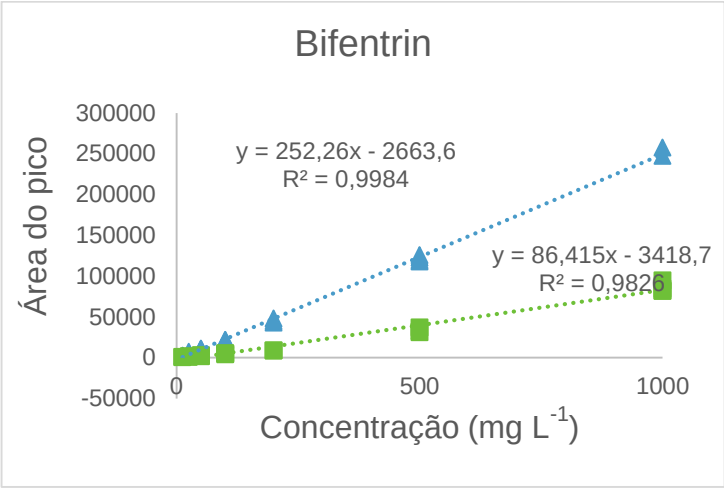


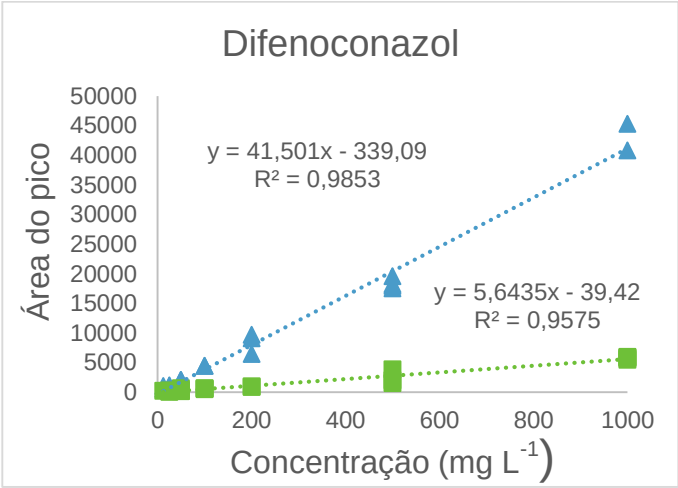


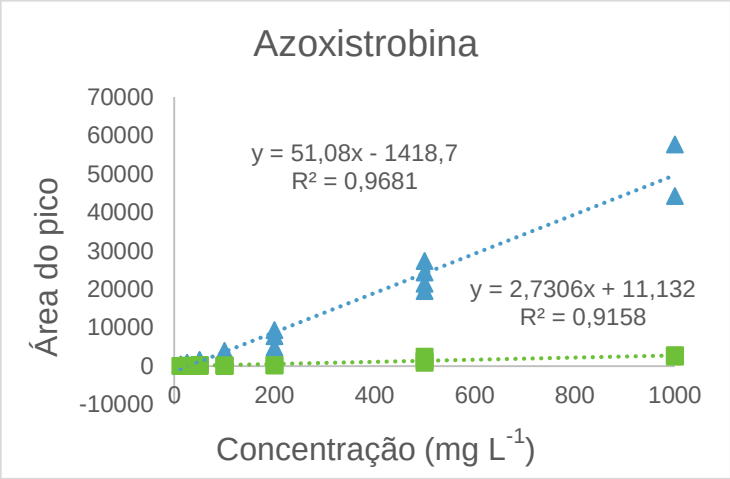












5.4.3 Curva analítica e Lineridade

As curvas analíticas foram preparadas em triplicata (n=3). Com o auxílio das curvas analíticas, foram obtidas as equações de reta, a faixa linear e os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r), mostrados na Tabela 13.

O método pode ser considerado linear de acordo com o INMETRO (2010), já que todos os coeficientes de correlação (r) obtidos foram maiores que 0,90 e estão também de acordo com a exigência da ANVISA (2012) e do SANCO (2013) que recomendam que o coeficiente de correlação (r) seja superior a 0,99.

Tabela 13 - Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada composto em estudo no QuEChERS.

Composto	Equação da reta	r^2	r	Faixa linear ($\mu g\ kg^{-1}$)
Trifuralina	y = 11,893x - 508,98	0,996	0,998	25 a 500
Ametrin	y = 11,893x - 508,98	0,999	0,999	12,5 a 1000
Aldrin	y = 10,464x - 168,39	0,999	0,999	12,5 a 1000
Bioaletrin	y = 0,0121x + 0,148	0,996	0,998	12,5 a 1000
Dieldrin	y = 1,4944x - 24,395	0,999	0,999	12,5 a 1000
Tebuconazol	y = 0,0097x - 0,0324	0,998	0,999	12,5 a 1000
Bifentrin	y = 1,8286x - 13,783	0,997	0,998	12,5 a 1000
Difenoconazol	y = 0,0066x - 0,3546	0,996	0,998	12,5 a 1000
Azoxistrobina	y = 5,5089x - 253,57	0,989	0,994	12,5 a 1000

5.4.4 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação de cada agrotóxico e medicamento veterinário estão relacionados na Tabela 14.

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação do método.

Composto	LOD ($\mu g\ Kg^{-1}$)	LOQ ($\mu g\ Kg^{-1}$)
Trifuralina	2,5	5,0
Ametrin	1,0	2,5
Aldrin	7,5	10,0
Bioaletrin	1,0	2,5
Dieldrin	5,0	7,5
Tebuconazol	7,5	10,0
Bifentrin	5,0	7,5
Difenoconazol	10,0	12,5
Azoxistrobina	10,0	12,5

Como podemos perceber o limite de detecção e quantificação do método para aldrin é menor do que o LMR deste analito que é de 15 µg Kg^{-1} definido pela legislação brasileira (ANVISA, 2014), ou seja, este método pode ser utilizado para determinação deste composto na matriz peixe.

5.4.5 Exatidão e Precisão

As recuperações médias foram calculadas utilizando-se as curvas analíticas obtidas através de extrato das amostras fortificadas e preparados de acordo com o método de extração otimizado.

Os ensaios de recuperação e valores repetividade expressos em RSD%, foram realizados de acordo com a Equação 1 e 2, nos níveis de fortificação de 200, 50 e 25 µg kg^{-1} (n=3) e estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para 200, 50 e 25 µg kg^{-1} de cada analito.

Composto	**Exatidão e Precisão**					
	200 µg kg^{-1}		**50 µg kg^{-1}**		**25 µg kg^{-1}**	
	Rec%	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**	**Rec%**	**RSD%**
Trifuralina	92	13,3	109	7,7	97	1,3
Ametrin	109	7,0	77	19,1	75	19,5
Aldrin	104	5,6	80	8,2	90	3,5
Dieldrin	110	6,1	116	11,0	115	8,2
Tebuconazol	96	7,2	99	5,1	91	6,5
Bifentrin	103	11,2	100	19,9	116	14,1
Difenoconazol	82	11,2	106	16,8	124	2,1
Azoxistrobina	125	3,1	112	14,3	126	6,1

Os valores de RSD% dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em peixe foram menores que 20% e a recuperação entre 70 e 120% para todos os compostos avaliados em pelo menos um dos níveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Munaretto *et al*. (2012) para trifuralina, aldrin e dieldrin utilizando o mesmo método multiresíduo em filés de peixe.

5.4.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi expressa pelo RSD e pela recuperação no extrato na concentração de 25 µg kg^{-1} realizadas pelo mesmo analista, porém em dias diferentes, estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Média dos percentuais de recuperação e RSD para 20 µg kg^{-1} de cada analito.

Composto	Recuperação Média (%)	RSD (%)
Trifuralina	123	2,4
Ametrin	78	19,1
Aldrin	109	6,1
Bioaletrin	87	0,4
Dieldrin	92	3,7
Tebuconazol	96	5,1
Bifentrin	103	11,2
Difenoconazol	119	5,6
Azoxistrobina	109	6,3

Os valores obtidos para o estudo de precisão intermediária dos agrotóxicos e medicamentos veterinários determinados em peixe foram menores que 20% e a recuperação entre 70 e 120% para quase todos os compostos avaliados, com exceção da Trifuralina que apresentou um valor acima de 120%.

Por fim, o uso de padrão interno em todas as amostras, o qual foi usado para avaliar a variação do equipamento durante as análises, serviu para assegurar a qualidade das análises realizadas no GC/MS tanto para HF-LPME quanto para QuEChERS (MUNARETTO *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

O método proposto para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizando microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) em três fases foi desenvolvido e validado ao longo deste estudo, de maneira que este foi capaz de detectar e

quantificar multiresíduo em amostras fortificadas de água. As principais vantagens deste método são a sua simplicidade, baixo custo e pequeno volume de solvente orgânico utilizado.

Para a otimização do método um planejamento experimental foi aplicado para avaliar a influência de diferentes variáveis na recuperação dos analitos. Através do planejamento quatro variáveis foram analisadas de forma simultânea, diminuindo o número de experimentos necessários para o desenvolvimento do método. Com isto definiu-se parâmetros como o volume de acetonitrila (800 µL), massa de NaCl (sem adição), tempo (75 minutos) e velocidade de agitação (200 rpm) que fornecem a melhor condição para aplicação do método.

O método QuEChERS foi validado para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de peixe (traíra), fornecendo valores de recuperações, repetitividade, precisão intermediária e exatidão dentro dos limites aceitáveis e recomendados pelas agências regulamentadoras.

O peixe se mostrou uma matriz complexa, requerendo o preparo de soluções analíticas em extratos da matriz isento dos analitos para compensar o efeito matriz.

Este trabalho pode contribuir ainda para o monitoramento ambiental de resíduos e na ampliação de estudos que determinem estes compostos em peixes, uma vez que, esses são espécies de importância econômica, nutricional e para a saúde pública.

Os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos de forma que este proporcionou a proficiência na execução de duas técnicas de preparo de amostra e em uma técnica de determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, utilizando GC-MS.

7 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Sistemas de gestão da segurança de alimentos - Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos**: NBR ISO 22000. Brasília, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA**)**. Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de maio de 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA**). Índice Monográfico: Ametrina**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8745950047458891922ad63fbc4c6735/a11.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 ago. 2015.

AGRICULTURE & ENVIRONMENT RESEARCH UNIT (AERU) University of Hertfordshire. **Pesticides Properties Database**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm.> Acesso em: 16 out. 2015.

ALDER, L. *et al*. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 838, dez. 2006.

ALONSO, Mariana B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? **Environment International**, v. 47, n. 36, p. 99-106, abr. 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, n. 2, p. 412-431, mar.-abr. 2003.

ANDRASCIKOVA, M. *et al*. Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticides residues in orange samples. **Food Additives & Contaminants**, v. 30, n.2, p. 286-297, out. 2013.

ARTHUR, C.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemestry**, v. 62, n.19, p. 2145-2149, out. 1990.

BALTUSSEN, E. *et al*. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, nov. 1999.

BAIRD, C. **Química ambiental**. Segunda ed. Porto Alegre, Bookman, 2002. 402p.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215p.

BARKER, S.; LONG, A.; SHORT, C. I solation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatigraphy**, v. 475, p. 353- 361, jan. 1989.

BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria**. Campinas: EDUNICAMP, 2001. 401p.

BEGUIN, S. *et al*. Protocols for optimizing MS/MS parameters with an ion-trap GC-MS instrument. **Journal of Mass Spectrometry**, v.41, n. 10, p.1304-1322, oct. 2006.

BOLAÑOS, P. *et al*. Application of hollow fiber liquid phase microextration for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by UHPLC/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 16–24, jun. 2008.

BRASIL. Decreto n.º 4074, de 04 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a

fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 de janeiro de 2002.

BRASIL. Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004. Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de abril de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília, 2006. 212p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA nº11, de 07 de maio de 2014. Dispõe sobre o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina) Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2014, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e 28 Contaminantes - PNCRC, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de maio de 2014.

BRITO, N. M. *et al*. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, jan. 2003.

CAMPAGNOLO, E. R. *et al.* Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **The Science of the Total Environment**, v. 299, n. 1-3, p. 89–95, nov. 2002.

CASSIANO, M. N. *et al*. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, fev. 2009.

CHASIN, A.M. *et al.* Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, n. 1-6, p.1-19, 1998.

CHEN, B. *et al*. HF-LPME combined with HPLC-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 17-26, mar. 2013.

CHEN, Y. *et al*. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, mar. 2008.

CHIARADIA, M.C. *et al*. 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.623-647, fev. 2008.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environmental International**, v. 37, n. 1, p. 226-47, jan. 2011.

CORCELLAS, C. *et al*. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment international**, v. 47, p.17-22, jan. 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, n. 56, p. 110-116, mar. 2015.

COUTINHO, C. F. B. *et al.* Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, jan. 2005.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103-121, jun. 2015.

DENOBILE, M., NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina e doxitetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-228, abr. 2004.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science Association**, v. 84, n. 4, p. 634-643, abr. 2004.

DÓREA, J. G. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: Human health considerations. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1-3, p. 93-114, ago. 2008.

ESPLUGAS, S. *et al*. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 631-642, nov. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual**. Roma, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Codex Alimentarius Commission - Pesticide Residues in Food and Feed**. Roma, 2013.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E**. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Primeira ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. 263p.

FRENICH, A. G. *et al*. Compensation for matrix effects in gas chromatography – tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4798-4814, jun. 2009.

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

GHAMBARIAN, M; YAMINI, Y; ESRAFILI, A. Three-fase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organis solvents for determnation of tramadol in urine and plasma samples. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 1041-1045, 2011.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, maio 2007.

GILART, N. *et al*. New coating for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 54, p. 11-23, 2014.

GONÇALVES, F. F.; MATOS, F. S; ZANELLA, R. Determinação de resíduos de herbicidas em águas de lavoura de arroz irrigado empregando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 89-100, 2013.

HADJMOHAMMADI, M; GHAMBARIAN, H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from humam plasma and its determination by HPLC. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 44 - 49, 2012.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, v. 11, n. 11, p. 96-109, nov. 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**: DOQ-CGCRE-008. Brasília, 2010.

KOLOSA, J.; PRZYJAZNY, A.; JEANNOT, M. **Solvent Microextraction – Theory and Practice**. New Jersey: Wiley ed., 2009. 323p.

LANÇAS, F.M., **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, Sexta ed. São Carlos: Editora RiMa, 2004. 46p.

LAPWORTH, D. J. *et al*. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287-303, abr. 2012.

LEONG, M.; HUANG, S. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extration of organochlorine pesticides in water samples. **Jornal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7645-7650, set. 2009.

LICHTENSTEIN, A. H. Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations Revision. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 10, p. 2186-2191, jun. 2006.

MACHADO, S. L. O. *et al*. **Persistência de alguns herbicidas em lâmina de água de lavoura de arroz irrigado**. Porto Alegre: IRGA, 2003.

MADUREIRA, T. V. *et al*. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 34-45, jul. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Manual de garantia da qualidade analítica- resíduos e contaminantes em alimentos. Primeira ed. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227p.

MASTOVSKA, K. *et al*. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC- TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n. 10, p. 5959-5976, maio 2010.

MERCER, G. E. Determination of 112 Halogenated Pesticides Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Selected Ion Monitoring. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1452-1465, set. 2005.

MERIBE, J; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249-262, 2013.

MIRANDA, A. L. C. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos *in vitro* em células do sistema imune de carpa (*Cyprinuscarpio*).** 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria**. Segunda ed. Campinas: EDUNICAMP, 2001.

OLIVEIRA, A. *et al.* Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p.637-644, 2008.

PAN, J. *et al.* Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, mar. 2014.

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

PAYÁN, M. *et al*. Hollow fiber-based liquid fase microxtraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 2, p. 197-204, ago. 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, K. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemestry**, v. 71, n. 14, p. 2650- 2656, jul. 1999.

PETROVIC, M. *et al.* Recent trends in the liquid chromatography– mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4004-4017, jun. 2010.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-998, abr. 2009.

PIZZUTI, I. R. *et al.* Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soy grain by LC-MS. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n. 21, p. 4539-4552, jan. 2009.

POLO, M. *et al*. Development of a Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Polybrominated Diphenyl Ethers and Polybrominated Biphenyls in water samples**. Analytical Chemistry**, v.76, n. 4, p. 1054-45521062, jan. 2004.

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. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1620-1634, jul. 2009.

PRESTES, O.D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LCMS/MS.** 2011. 130 f. Tese (Doutorado em Química) - Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

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

PSILLAKIS, E; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextractio. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 565-574, set. 2003.

RASMUSSEN, K., PEDERSEN-BJERGAARD S. Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

REZAEE, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1–9, maio 2006.

RIBANI, M. *et al*. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-789, jun. 2004.

RIBEIRO, M.L. *et al*. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Avaliação Preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688-684, maio 2007.

RIDGWAY, K. *et al*. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, jun. 2007.

RIOS, F. *et al*. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Joural of Fish Biology**, **v.** 61, n. 1, p. 85-95, jul. 2002.

ROMÁN, I. S. *et al.* Hollow fibre-based liquid-phase microextraction technique combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid insecticides in water samples. **Talanta**, v. 100, p. 246-253, maio 2012.

ROMERO-GONZALEZ, R. *et al.* Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2701-2722, 2006.

SAITO, Y. *et al.* Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 6, p.1356-1377, nov. 2004.

SANCO. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**: SANCO/12571/2013. Bélgica, 2013.

SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 423p.

SPADOTTO, C.A. **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos**: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.

STOLKER, A. A.; BRINKMAN, U. A. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and groth-promoting agents in food –producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v.1067, n. 1-2, p. 15-53, mar. 2005.

SUN, X. *et al*. Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of orgasnophosphorus pesticides residues in fish tissue by GC/MS. **Marine Pollution Bulletin**. v. 63, n. 5-12, p. 102-107, 2011.

TAO, Y. *et al*. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by HPLC. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n. 35, p. 6259-6266, ago. 2009.

UNESCO. **The 4th edition of the United Nations World Water Development Report** (WWDR4). Itália, 2012.

UNIÃO EUROPÉIA (EU). **Pesticides Database**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant /pesticides /eu-pesticidesdatabase/public/?event=pesticide .residueselection&language=EN>. Acesso em: 26 set. 2015.

VALENTINI, S. R. *et al*. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

WATANABE, N. *et al.* Use and environmental occurrence of antibiotics in free stall dairy farms with manure forage fields. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 6591-6600, 2010.

WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 26-41, set. 2014.

WILLE, K. *et al*. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 87-108, maio 2012.

ZHANG, W. *et al*. Principle of liquid membrane and hollow fiber renewal liquid membrane. **Modern Chemical Industry**, v. 25, p. 66-68, set. 2005.

ZHAO, L; LEE, H; MAJORS, R. The Use of Hollow Fibers in Liquid-Phase Microextraction. **Chromatography Online**, v. 29, n. 8, ago. 2010.

ZHU, L. et al. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow fiber membrane. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 335-343, 2002.

ZORITA, S. *et al*. Steroid hormone determination in water using in environmentally friendly membrane based extraction technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 1-8, maio 2008.