

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA STREMEL

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO QuEChERS
PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

PONTA GROSSA

2018

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA STREMEL

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO QuEChERS
PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Química na
Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de
Campos

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S915 Stremel, Tatiana Roselena de Oliveira
Desenvolvimento, validação e aplicação
de um método QuEChERS para a determinação
de pesticidas organoclorados/ Tatiana
Roselena de Oliveira Stremel. Ponta
Grossa, 2018.
124f.

Tese (Doutorado em Química - Área de
Concentração: Química Analítica),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de
Campos.

1.Peixe. 2.Pesticidas organoclorados.
3.Contaminantes. 4.Extração. 5.QuEChERS.
I.Campos, Sandro Xavier de. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Doutorado em Química. III. T.

CDD: 543

TERMO DE APROVAÇÃO

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA STREMEL

“DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS”.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos
UEPG/PR

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
UEL/PR

Prof.^a Dr.^a Sueli Percio Quinaia
UNICENTRO/PR

Prof.^a Dr.^a Luciana de Boer Pinheiro de Souza
UEPG/PR

Prof. Dr. Marcos Pileggi
UEPG/PR

Ponta Grossa, 12 de abril de 2018.

Dedico ao meu irmão Marcos.
Conheci-te (de verdade), como poucos.
E por isso, amei-te absurdamente.
Eternas saudades!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre foi extremamente generoso comigo.

Ao Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos, por aceitar-me como orientada e ter exercido a tarefa de orientador de forma brilhante. Obrigada pela confiança, ensinamentos e amizade, serei eternamente grata.

À minha colega de laboratório e grande amiga Cinthia, que compartilhou comigo vários momentos durante o desenvolvimento desta tese, momentos de euforia e de desespero. Sem você, minha amiga, não seria a mesma coisa. Seu auxílio intelectual e espiritual ajudou-me a seguir até aqui. Do doutorado para a vida!

À minha colega de laboratório e amiga Rose. Obrigada pelas longas conversas, pelo companheirismo durante esta caminhada, os dias ficaram mais leves quando estávamos juntas.

Aos colegas e amigos do grupo QAAS, que sempre me auxiliaram em todos os momentos de necessidade. Melhor grupo!

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela disponibilidade do GC-MS.

Ao laboratório de Análise de Biodiesel (LAC-BIO), pela disponibilidade do GC-ECD.

A colega e amiga Franciele, pela disponibilidade de seu tempo e amizade.

Ao professor Carlos Vidal e doutorando Carlos Pedroso do laboratório de Engenharia Ambiental (UNICENTRO), pela disponibilidade e auxílio no GC-ECD.

A professora Patricia L. Weinert pelo auxílio na otimização dos experimentos.

A colega e amiga Carmen Voigt e seu marido Ronaldo pelo auxílio na coleta de peixes na represa de Alagados.

Ao técnico da empresa Perkin Elmer Rodrigo Favoretto, pelo auxílio em tantos momentos, inclusive finais de semana, sempre buscando resolver vários problemas.

Aos meus pais, Marcos e Zoli que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu e meus irmãos tivéssemos as melhores oportunidades, deixando por muitas vezes seus objetivos pessoais de lado. Espero um dia ser para meus filhos o que vocês são para nós, o amor.

À minha irmã Talita, que dividiu comigo a infância, as alegrias, as tristezas e sempre teve um sorriso no rosto, um abraço para dar. Por ser essa calma no meio do furacão.

Ao meu esposo Protasio, que desde o início estimulou meu ingresso no doutorado, segurando as “pontas” por alguns anos e demonstrando uma paciência fenomenal comigo, especialmente nos últimos tempos. Me levanta quando preciso, mas sem tirar meus pés do chão. Obrigada por ser essa pessoa em minha vida, Te amo!

À todos que direta e indiretamente participaram da elaboração desta tese, meu muito OBRIGADA!

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma.
O sonho é o que temos de realmente nosso,
de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A maior parte dos pesticidas organoclorados (OCPs) possuem comercialização controlada ou proibida a décadas, no entanto são ainda encontrados em todos os locais do planeta. A determinação destes compostos em matrizes complexas como tecido de peixe é alvo constante de pesquisas, especialmente com o objetivo de minimizar consumo de reagentes e tempo. Este estudo objetivou desenvolver e validar um método QuEChERS com ultrassom e d-SPE para determinação por CG/ECD/MS de p,p'-DDE, p,p'-DDT, α -endossulfan, β -endossulfan, Aldrin e Dieldrin em tecidos de peixe, aplicar em amostras de tecidos de peixe comercializadas e em tecidos coletados em ambiente natural e realizar uma avaliação de risco das concentrações de OCPs detectadas nos tecidos. Três planejamentos fatoriais foram empregados para otimizar a etapa de preparo da amostra. O método desenvolvido foi validado para verificar seu desempenho e um possível efeito matriz, sendo posteriormente aplicado na extração de OCPs de músculo de Tilápia e Lambari comercializados em supermercados de Ponta Grossa e em músculo, ovas e vísceras de Lambari coletado da represa de Alagados, em Ponta Grossa. Ao final realizou-se uma avaliação de risco relacionando o consumo diário local, com massa corporal média da população e contaminação por OCPs nos tecidos analisados. Na validação o método apresentou recuperações entre 77,3% e 110,8%, com RSD inferior a 13% e os limites de detecção estiveram entre 0,24 μgkg^{-1} e 2,88 μgkg^{-1} , mostrando boa sensibilidade e precisão. Resíduos dos OCPs estudados foram detectados nos tecidos analisados em concentrações que variaram entre 3,4 μgkg^{-1} e 417,6 μgkg^{-1} , verificando-se que os poluentes possuem uma tendência a bioacumular em maior proporção nas vísceras, do que em ovas e no músculo, a presença destes compostos nas ovas, demonstra que indivíduos da espécie analisada entram em contato com os OCPs desde a fase de embrião. Na avaliação de risco verificou-se que ao se consumir esses peixes, esses OCPs podem ao longo do tempo gerar efeitos adversos para a saúde dos consumidores. O método proposto mostrou-se efetivo na determinação de baixas concentrações de OCPs em tecidos de peixe, utilizando pequena massa de amostra (0,5 gramas), viabilizando a análise sem a necessidade de agrupamento (*pool*), ao mesmo tempo possibilitou a análise de tecidos, de peixe de pequena massa corporal total (Lambari), avaliando ainda a bioacumulação dos OCPs em diferentes tecidos. O método é aplicável para análise de OCPs aplicado à área toxicológica.

Palavras-chave: Peixe, Pesticidas organoclorados, contaminantes, extração, QuEChERS.

ABSTRACT

Most organochlorine pesticides (OCPs) are controlled or banned for decades, but they are still found everywhere in the world. The determination of these compounds in complex matrices such as fish tissue is a constant goal of research, especially with the aim of minimizing reagent consumption and time. The aim of this study was to develop and validate a Quechers method with ultrasound and d-SPE for determination of p, p'-DDE, p, p'-DDT, α -endosulfan, β -endosulfan, Aldrin and Dieldrin in fish tissues, apply on samples of commercially available fish tissues and on tissues collected in the natural environment and carry out a risk assessment of the concentrations of OCPs detected in the tissues. Three factorial designs were used to optimize the preparation stage of the sample. The method developed was validated through figures of merit and matrix effect, and it was later applied in the extraction of OCPs from Tilapia and Lambari muscle marketed in supermarkets in Ponta Grossa and Lambari muscle, eggs and viscera collected from the Alagados dam in Ponta Grossa. At the end of the study, a risk assessment was performed relating local daily consumption, mean body mass of the population and OCP contamination in the tissues analyzed. In the validation, the method presented recoveries between 77.3% and 110.8%, with RSD lower than 13% and detection limits between 0.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 2.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$, showing good sensitivity and precision. Residues of the OCPs studied were detected in the tissues analyzed at concentrations ranging from 3.4 μgkg^{-1} to 417.6 μgkg^{-1} , with pollutants having a tendency to bioaccumulate more in the viscera than in roe and in muscle, the presence of these compounds in the eggs, demonstrates that individuals of the analyzed species come into contact with OCPs from the embryo stage. In the risk assessment it was found that there is a risk when consuming these fish, these OCPs may over time generate adverse effects on the health of consumers. The proposed method was effective in the determination of low concentrations of OCPs in fish tissues, using a small sample mass (0.5 grams), making the analysis possible without the necessity of pooling, at the same time making possible the analysis of tissues, of fish of small total body mass (Lambari), also evaluating the bioaccumulation of OCPs in different tissues. The method is promising for OCP analysis applied to the toxicological area.

Key-words: Fish, Organochlorine pesticides, Contaminants, Quechers extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos POPs banidos ou restringidos pela Convenção de Estocolmo.....	18
Figura 2 - Ciclo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs).....	19
Figura 3 - Quantidade de pesticidas utilizada por região do Brasil no período 2012-2015.....	21
Figura 4 - Quantidade de pesticidas utilizada por estado da região Sul no período 2012-2015.....	22
Figura 5 - Percentagem de venda de pesticidas no Brasil por cultura.....	23
Figura 6 - Casos de intoxicação por pesticidas de uso agrícola por unidade da federação no período 2007-2014.....	23
Figura 7 - Óbitos causados por intoxicação por pesticidas por unidade da federação no período 2007-2014.....	24
Figura 8 - Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou a ausência de resíduos de pesticidas e o tipo de irregularidade.....	26
Figura 9 - Perfil de detecções de pesticidas em uma mesma amostra, considerando os resíduos detectados como regulares e irregulares.....	26
Figura 10 - Reação de epoxidação do Aldrin à Dieldrin.....	27
Figura 11 - Reação de metabolização do DDT em DDD e DDE.....	30
Figura 12 - Isômeros de endosulfan.....	31
Figura 13 - Espécime de <i>Oreochromis niloticus</i>	36
Figura 14 - <i>Astianax</i> sp.....	37
Figura 15 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central.....	51
Figura 16 - Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas.....	52
Figura 17 - Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do insertor e da lâ de vidro. A. Analitos em solvente. B. Analitos adicionados ao extrato da matriz.....	59
Figura 18 - Cromatogramas do extrato da matriz “branco”, adicionado de padrões analíticos (A) e sem a adição de padrões (B).....	62
Figura 19 - Método otimizado.....	67

Figura 20 - Mapa da represa de Alagados com o destaque ao local de coleta das amostras (P) e sua localização no estado do Paraná, Brasil, com as coordenadas geográficas 24° 52' to 25° 05' S e 49° 46' to 50° 06' W.....	72
Figura 21 – Efeitos estimados obtidos na primeira etapa de otimização (23).....	76
Figura 22 – Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do primeiro planejamento 2 ³ , relacionando as variáveis tipo de solvente e tipo de sorvente.....	77
Figura 23 - Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do primeiro planejamento 2 ³ , relacionando as variáveis tipo de solvente e quantidade de amostra.....	79
Figura 24 – Efeitos estimados obtidos na segunda etapa de otimização (23 com ponto central).....	80
Figura 25 - Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do segundo planejamento 2 ³ , relacionando as variáveis quantidade de solvente e quantidade de etapas de extração.	81
Figura 26 Cromatogramas de extratos de amostra obtidos utilizando C18.....	82
Figura 27 – Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do terceiro planejamento 2 ² , em estrela com ponto central relacionando as variáveis quantidade de solvente e quantidade de C18.....	83
Figura 28 – Cromatogramas do extrato da matriz “branco”, adicionado de padrões analíticos (A) e sem a adição de padrões (B)	86
Figura 29 Espectro de massas do composto Aldrin.....	87
Figura 30 - Espectro de massas do composto Endosulfan.....	87
Figura 31 - Espectro de massas do composto p,p'-DDT.....	88
Figura 32- Espectro de massas do composto p,p'-DDE.....	88
Figura 33 Curvas analíticas em matriz e em solvente do analito p,p'-DDT.....	90
Figura 34 - Porcentagem de aumento da resposta cromatográfica quando o analito é adicionado ao extrato da matriz para obtenção da curva analítica.....	91
Figura 35 – Cromatograma representativo de uma das amostras analisadas durante a aplicação do método desenvolvido.....	92
Figura 36 - Concentrações médias dos OCPs determinados em músculo, ovas e vísceras de <i>Astianax altiparanae</i>	98
Figura 37 - Gráfico de scores (a) e loadings (b) das amostras de peixe analisadas por PCA, uma correlação entre a contaminação e o tecido.....	100

Figura 38 - Gráfico de scores (a) e loadings (b) de amostras de peixe analisadas por PCA, uma correlação entre largura corporal e contaminação.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de produtos comerciais registrados para uso no Brasil, por classe, no ano de 2016.....	20
Tabela 2 - Características físico químicas de alguns OCP.....	32
Tabela 3 – Características dos compostos utilizados neste estudo.....	63
Tabela 4 - Parâmetros iniciais utilizados para a otimização do método de extração.....	64
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3	64
Tabela 6 Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com a adição de ponto central.....	65
Tabela 7 – Matriz do planejamento 2^2 com com ponto central em estrela.....	66
Tabela 8 - Valores críticos obtidos na otimização do método de extração em estudo.	83
Tabela 9 - Valores de r^2 , coeficiente angular, coeficiente linear para as curvas analíticas preparadas em solvente e faixa linear para cada OCP estudado.....	84
Tabela 10 - Valores de r^2 , coeficiente angular, coeficiente linear para as curvas analíticas preparadas em extrato de matriz e faixa linear para cada OCP estudado.	85
Tabela 11 - LOD e LOQ dos analitos estudados.....	85
Tabela 12 - Precisão (CV%) e Exatidão (Rec %) dos analitos em estudo nas concentrações $10 \mu\text{gKg}^{-1}$, $25 \mu\text{gKg}^{-1}$ e $50 \mu\text{gKg}^{-1}$	89
Tabela 13 - Efeito matriz observado para os analitos em estudo.....	90
Tabela 14- Concentração dos POCs em estudo em amostras de musculo de Tilápia e Lambari comercializados em Ponta Grossa, Paraná.....	93
Tabela 15 - Dimensões (cm) e massa corpórea dos indivíduos (<i>Astianax altiparanae</i>) coletados na represa de Alagados.....	94
Tabela 16 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em músculo de Lambari.....	95
Tabela 17 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em ovas de Lambari.....	96

Tabela 18 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em vísceras de Lambari.....	97
---	----

Tabela 19 - Ingestão diária estimada (EDI) ($\text{ng kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) e quociente de risco (HQs) calculado baseado nos percentis 50 e 95 da media das concentrações dos OCPs ($\text{ng g}^{-1}\text{ww}$) detectadas em músculo de Lambari e Tilápia comercializados em Ponta Grossa.	103
--	-----

Tabela 20 - Ingestão diária estimada (EDI) ($\text{ng kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) e quociente de risco (HQs) calculado baseado nos percentis 50 e 95 da media das concentrações dos OCPs ($\text{ng g}^{-1}\text{ww}$) detectadas em músculo, ovas e vísceras de <i>Astianax altiparanae</i>	104
---	-----

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 Revisão de literatura	16
3.1 Poluentes orgânicos persistentes	16
3.2 Pesticidas.....	19
3.2.1 Pesticidas organoclorados (OCPs)	27
3.3 Peixe	35
3.3.1 Tilápia e Lambari	35
3.4 Contaminação POR OCPs em peixes	37
3.5 Extração de OCPs em peixe	40
3.6. análise cromatográfica	45
3.6.1 Cromatografia gasosa (CG)	45
3.6.2 Detectores	47
3.7 Planejamento Fatorial	49
3.8 Validação de metodologia analítica.....	52
3.8.1 Seletividade	53
3.8.2 Linearidade	54
3.8.3 Precisão	55
3.8.4 Exatidão e Recuperação.....	55
3.8.5 Limites de detecção e quantificação	56
3.8.6 Efeito matriz	57
3.9 Avaliação de risco para saúde	59
4 Materiais e Métodos	61
4.1 Seleção e preparo da amostra “branco”	61
4.2 Padrões de substituição (<i>surrogate</i>)	61
4.3 Preparo das soluções analíticas	62
4.4 otimização de metodologia de extração de OCPs	63
4.5 Método proposto	65
4.6 Validação do método desenvolvido.....	67

4.7 aplicação do método otimizado em amostras reais	70
4.7.1 Extração dos OCPs	71
4.8 Determinação cromatográfica dos OCPs	72
4.9 Avaliação de risco	73
4.10 Análise dos dados	73
5. Resultados e Discussões	75
5.1 Otimização e desenvolvimento de método de extração de OCPs em músculo de peixe	75
5.1.1 Otimização da quantidade de amostra, tipo de solvente extrator e sorvente	75
5.1.2 Otimização da quantidade de etapas de extração, de solvente extrator e C18	79
5.2 Validação do método de extração	83
5.2.1 Linearidade	83
5.2.2 Limites de detecção e quantificação	84
5.2.3 Seletividade	85
5.2.4 Exatidão (Recuperação) e Precisão (Repetitividade)	88
5.2.5 Avaliação do efeito matriz (EM)	88
5.3 Aplicação do método otimizado em amostras reais	91
5.4 Avaliação de risco para a saúde humana	102
6. Conclusões	105
7. Referências	107

1. INTRODUÇÃO

A história da humanidade possui diversos episódios em que países tiveram sua produção agrícola afetada por pragas como insetos, fungos entre outros, causando prejuízos inestimáveis. Para evitar esses acontecimentos, alguns produtos químicos, foram desenvolvidos, recebendo o nome de pesticidas.

Os pesticidas tiveram um expressivo crescimento de produção e utilização ao longo dos anos, singularmente devido a sua eficácia e baixo custo. Quando os cientistas obtiveram evidências da toxicidade de alguns pesticidas para animais e especialmente para a espécie humana, alguns destes foram banidos ou sua produção e comercialização controladas para fins específicos.

Dentre os pesticidas, destacam-se os pesticidas organoclorados (OCPs), devido sua toxicidade e persistência no ambiente. Alguns OCPs como o Aldrin, Dieldrin, p,p' – DDE, p,p'- DDT e mais recentemente o endosulfan e seus isômeros tiveram seu uso restrito ou proibido pela Convenção de Estocolmo.

Embora a produção da maioria OCPs tenha cessado a décadas, alguns estudos demonstram que ainda é possível encontrar níveis consideráveis destes compostos no meio ambiente. Isso ocorre devido ao uso ilegal, a facilidade de transporte destes a longas distancias por via aérea e sua alta persistência no solo com matéria orgânica, além de tecidos gordurosos, devido a sua lipofilicidade.

Os peixes, de maneira geral, são os organismos mais afetados nos ambientes aquáticos, sendo que poluentes como os OCPs potencialmente se acumulam em seus tecidos gordurosos, podendo biomagnificar através dos níveis tróficos, permeando inclusive a placenta e contaminando os descendentes.

Os tecidos analisados para verificar a contaminação por OCPs em peixes são normalmente músculo, fígado e brânquias. Poucos estudos avaliam a presença dos OCPs nas ovas de peixes, devido a massa dessas presente nos animais não ser suficiente para realizar a maioria dos procedimentos de extração.

Neste sentido é imperioso o desenvolvimento de métodos de extração que propiciem a utilização de diferentes tecidos, mesmo aqueles que possuem uma pequena massa. Além disso, métodos de extração que reúnam simplicidade, baixo custo e uma alta extractabilidade dos analitos alvo, são desafios a serem superados.

Em busca disso, novos métodos são desenvolvidos constantemente. O método QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro) foi desenvolvido por Anastassiades e colaboradores em 2003 e tornou-se importante na análise de resíduos químicos não-polares como os OCPs em frutas e vegetais. Dentre suas várias vantagens incluem simplicidade, baixo custo e rapidez na aplicação.

A modificação do método QuEChERS utilizando-se técnicas como a sonicação, assegura rapidez e facilidade, propiciando um maior contato entre a amostra e o solvente durante a extração, busca garantir que mesmo em uma pequena quantidade de amostra, todos os OCPs ali presentes serão extraídos.

Em amostras com altos teores de lipídios, como tecidos de peixes, após a extração, faz-se necessária uma etapa de limpeza como a d-SPE (extração em fase sólida dispersiva). A otimização da utilização destes sorventes é também promissora nas modificações de métodos de extração de OCPs em tecidos de peixe.

Após a modificação de métodos analíticos, são necessárias etapas de validação, assegurando o desempenho do método e demonstrando que ele é adequado para a finalidade a que se destina.

Outra maneira de avaliar se o método é adequado à sua finalidade é a aplicação do mesmo em amostras reais, promovendo uma avaliação dos tecidos analisados quanto à contaminação pelos compostos em estudo.

A presença de OCPs em tecidos de peixes pode gerar rapidamente ou de maneira cumulativa alterações nos organismos de níveis tróficos superiores, sendo necessária uma avaliação para se diagnosticar a dimensão dos riscos à que os consumidores estão expostos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método QuEChERS modificado para extração de pesticidas organoclorados de amostras de tecidos de peixe, com determinação por cromatografia a gás acoplada aos detectores de captura de elétrons e espectrômetro de massas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a otimização de um método QuEChERS objetivando minimizar o consumo de amostra.

Avaliar o método otimizado quanto às figuras de mérito e efeito matriz.

Testar a eficiência do método desenvolvido em amostras de músculo de Tilápia comercializadas na cidade de Ponta Grossa e em diferentes tecidos de Lambari coletados no Reservatório de Alagados em Ponta Grossa, Paraná.

Realizar uma avaliação de risco com base nas concentrações de OCPs detectadas nas amostras de músculo de Tilápia e Lambari coletadas em supermercados de Ponta Grossa e nas amostras de ovas, músculo e vísceras coletadas no reservatório de Alagados, Ponta Grossa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES

Muitos Poluentes orgânicos persistentes (POPs) foram amplamente utilizados durante o grande avanço na produção industrial, após a Segunda Guerra Mundial, quando milhares de produtos químicos sintéticos foram introduzidos para o uso comercial. Muitos destes produtos químicos provaram seu benefício no controle de pragas e doenças, produção vegetal, e na indústria. No entanto com o passar dos anos foi constatado que esses mesmos produtos químicos trazem malefícios para a saúde humana e o ambiente (USEPA, 2009).

Os POPs incluem uma série de substâncias, classificadas como:

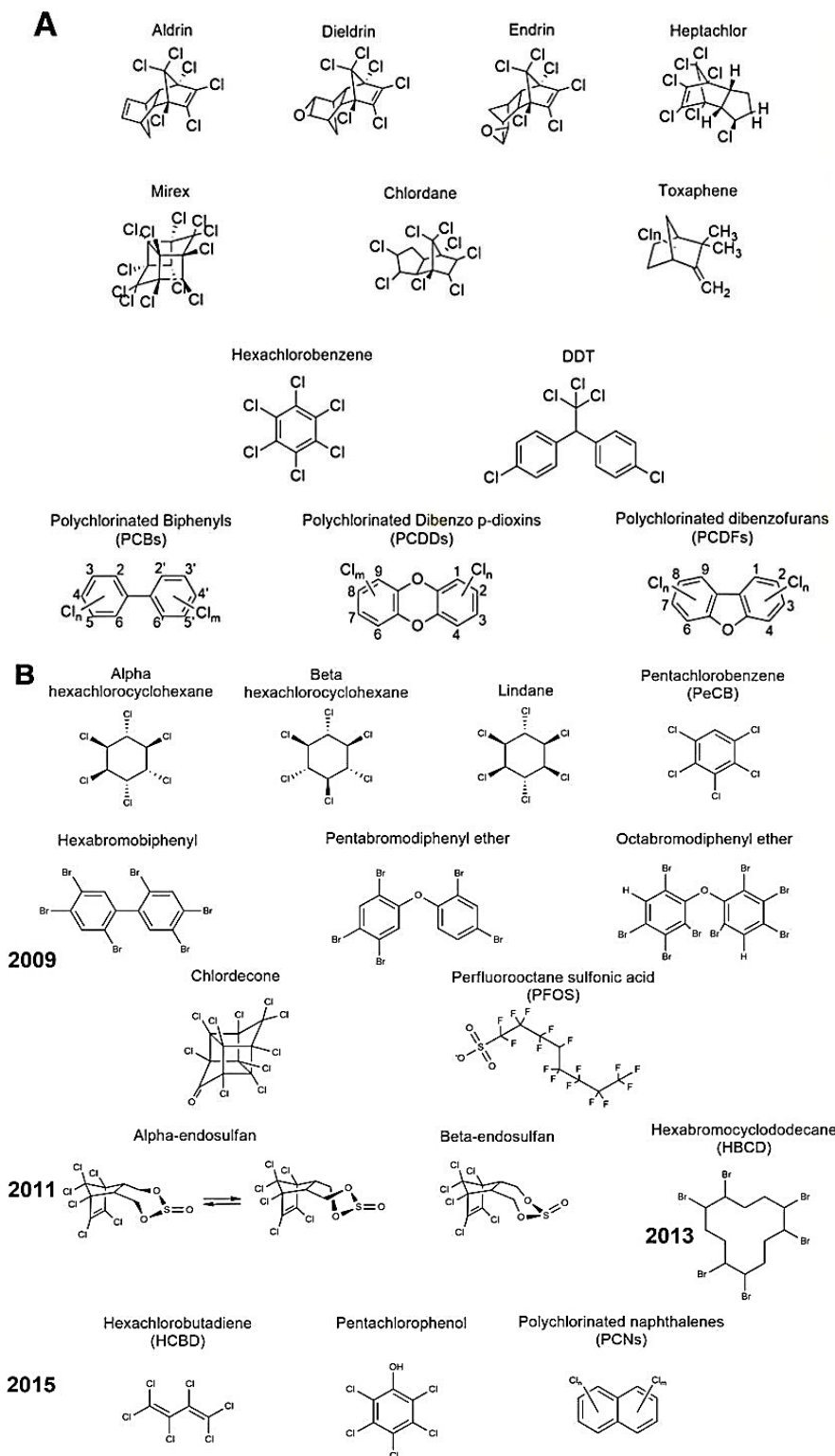
1. Substâncias químicas intencionalmente produzidas atualmente ou já utilizadas na agricultura, controle de doenças, fabricação ou processos industriais. Exemplos incluem os PCB, os quais têm sido úteis em uma variedade de aplicações industriais (por exemplo, em grandes transformadores elétricos e condensadores, como fluidos hidráulicos e de troca de calor, e como aditivos para tintas e lubrificantes) e o DDT que ainda é utilizado para controlar vetores causadores da malária em algumas partes do mundo (USEPA, 2009).
2. Substâncias químicas não intencionalmente produzidas, como as dioxinas, que resultam de alguns processos industriais e de combustão (por exemplo, a incineração de resíduos urbanos e hospitalares) (USEPA, 2009).

Em 17 de maio de 2004 entrou em vigor um tratado estabelecido pela Convenção de Estocolmo, visando o controle e eliminação do uso de POPs. O Brasil a ratificou em 16 de junho de 2004, tornando-se membro do tratado em 14 de setembro de 2004.

Este tratado selecionou inicialmente doze substâncias (conhecidas como as doze sujas): aldrin, endrin, dieldrin, clordano, DDT, toxafeno, mirex, heptacloro, hexaclorobenzeno, PCB, dioxinas e furanos. (ALMEIDA et al., 2007).

Além das doze substâncias iniciais, em 2009 foram acrescentadas outras 9 substâncias, em 2011 o endosulfan e em 2013 o composto Hexabromociclododecano (BRASIL, 2017). Na Figura 1 tem-se as estruturas

químicas dos compostos banidos ou restringidos pela Convenção de Estocolmo.



C

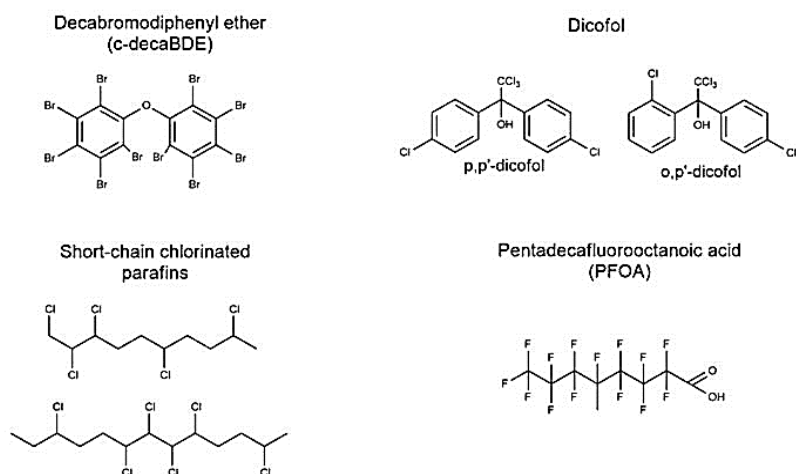


Figura 1 - Estrutura química dos POPs banidos ou restringidos pela Convenção de Estocolmo.

Fonte: Adaptado de NIKOLAIVITS et al., 2017. (A) “Duzia suja” (B) os novos POPs e o ano em que foram listados, e (C) novos propostas em revisão.

Os POPs são substâncias altamente resistentes à degradação, principalmente pela presença de halogênios em uma estrutura normalmente cíclica (Figura 1), (DUARTE, 2002) e bioacumulam facilmente nos tecidos.

Devido a esta capacidade de bioacumular, as espécies dos níveis tróficos mais elevados tornam-se vulneráveis à exposição aos POPs por meio da dieta (BORG et al., 2004). Esta exposição pode causar diversos problemas à saúde, como alguns tipos de câncer, defeitos congênitos, disfunções no sistema imunológico e reprodutivo (PNUMA, 2010).

Além de bioacumular, os POPs são semivoláteis podendo evaporar e condensar sucessivamente, em um processo chamado “destilação global”. Esse mecanismo explica a presença de POPs nas regiões remotas onde nunca foram utilizados, como as ilhas oceânicas e a Antártica (MONTONE, 2018). Esta propriedade dificulta o rastreamento da fonte original do contaminante (UNEP/GEF, 2002). Existem evidências de que consideráveis quantidades de pesticidas atingem o mar. Segundo a Academia de Ciências dos Estados Unidos, cerca de 25% da produção mundial de organoclorados chega a este ecossistema. Sabe-se que a principal rota de entrada dos organoclorados DDT (diclorodifeniltricloroetano) e Aldrin no oceano é a atmosfera. Estudos realizados indicaram que a poeira transportada pelos ventos apresentava até 150 mg g⁻¹ de DDT (TOPOS, 1999). Pode-se visualizar este processo na Figura 2.

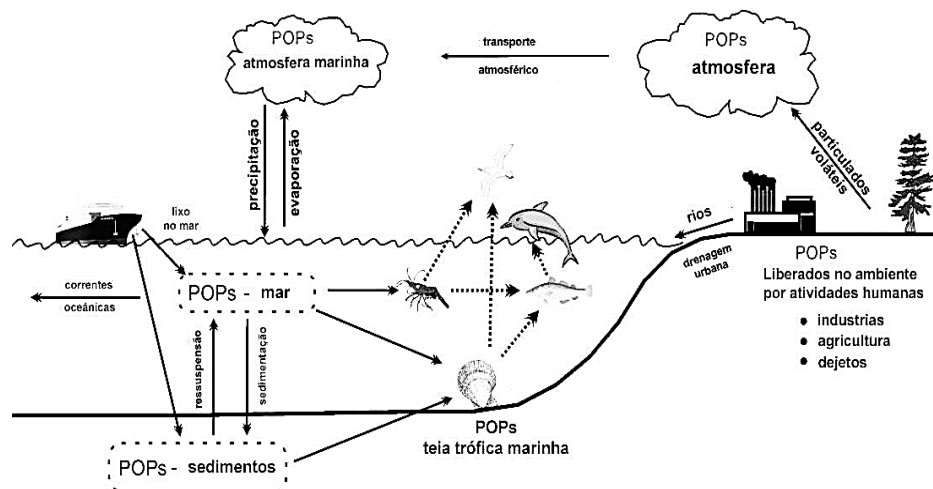


Figura 2 - Ciclo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs)
Fonte: MONTONE, 2018.

Os POPs tornaram-se contaminantes comuns em peixes, laticínios e em outros alimentos, graças a sua propriedade de se acumular em tecidos gordurosos (DUARTE, 2002). Dentro da lista de POPs, estabelecida pela Convenção de Estocolmo, os pesticidas ocupam lugar de destaque, principalmente pela toxicidade.

3.2 PESTICIDAS

Na literatura internacional, o grupo de substâncias/produtos químicos definidos como agrotóxico recebe a denominação de pesticida (*pesticide*). O termo “agroquímico” o mais próximo de agrotóxico encontrado em literatura de língua inglesa (*agrochemicals*) e, em menor escala, também na língua portuguesa engloba um número maior de produtos, como os fertilizantes e adubos inorgânicos. Portanto, não representa o real sentido do termo agrotóxico (PERES et al., 2003).

Pesticidas podem ser definidos como qualquer substância ou uma mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir ou repelir qualquer praga (NOLLET e RATHORE, 2010).

A legislação brasileira através do decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, define pesticidas como:

“Produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinado ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da fauna e flora, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Estas substâncias começaram a ser utilizadas por volta de 1940, gerando grandes benefícios para a produção agrícola. No entanto, os impactos a médio e longo prazo eram ainda desconhecidos. Mesmo sem este conhecimento eles foram lançados no mercado consumidor, doméstico ou industrial, sem restrições. Posteriormente verificou-se que estes compostos demoram anos para se degradar no meio ambiente, permanecendo estáveis por um longo período (AGUERA et al., 2002; DUARTE, 2002).

Os Estados Unidos chegaram a produzir sozinhos no ano de 1963, $8,13 \times 10^7$ kg de DDT, um pesticida da classe dos organoclorados (STERNENSEN, 2004). Entre 2002 e 2012 o mercado mundial de pesticidas cresceu 93%. Em contrapartida o mercado brasileiro de consumo de pesticidas cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de pesticidas (ANVISA, UFPR, 2012).

O Brasil consome cerca de 20% de todo o pesticida produzido mundialmente (PELAEZ et al., 2015). Cerca de 30% dos ingredientes ativos utilizados no Brasil são proibidos na União Europeia (BOMBARDI, 2016).

A classificação dos pesticidas baseia-se principalmente em sua natureza química (organoclorados, organofosfatos, entre outros), requisito de aplicação (agricultura, saúde pública, doméstico) e organismo alvo ou uso direcionado (inseticida, herbicida, fungicida, etc.) (JAYARAJ et al., 2016).

No ano de 2016 o número de produtos comerciais com registro para uso no Brasil era de 1771, como pode-se verificar na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de produtos comerciais registrados para uso no Brasil, por classe, no ano de 2016.

Classes	Nº de produtos comerciais
Inseticidas	459
Herbicidas	611
Fungicidas	449
Outros	252
Total	1771

Fonte: AGROFIT, MAPA, 2016

Na safra de 2016, no Brasil, foram plantados 77 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde a cerca de 860 milhões de litros (produtos

formulados) de pesticidas pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas. Essa quantidade gera uma média de uso de cerca de 12 litros por hectare (IBGE; SIDRA, 2017). Na Figura 3 tem-se um mapa da quantidade de pesticidas utilizada por região do Brasil no período de 2012 a 2015.

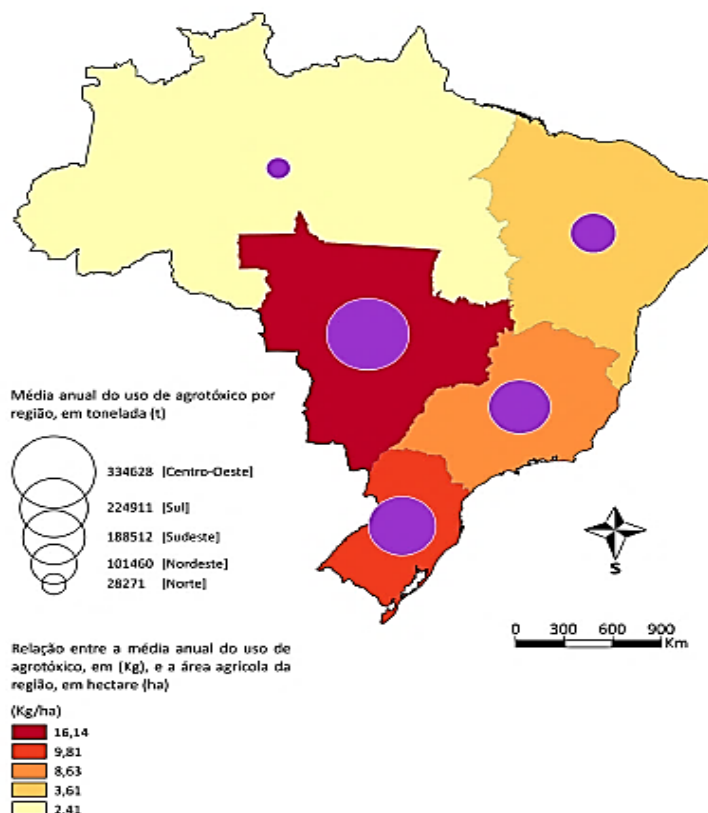


Figura 3 - Quantidade de pesticidas utilizada por região do Brasil no período 2012-2015.
Fonte: BOMBARDI, 2017.

Verifica-se na Figura 3 que a região Sul figura em segundo lugar no consumo de pesticidas, sendo que o Paraná ocupa a primeira posição nesta região como mostra a Figura 4.

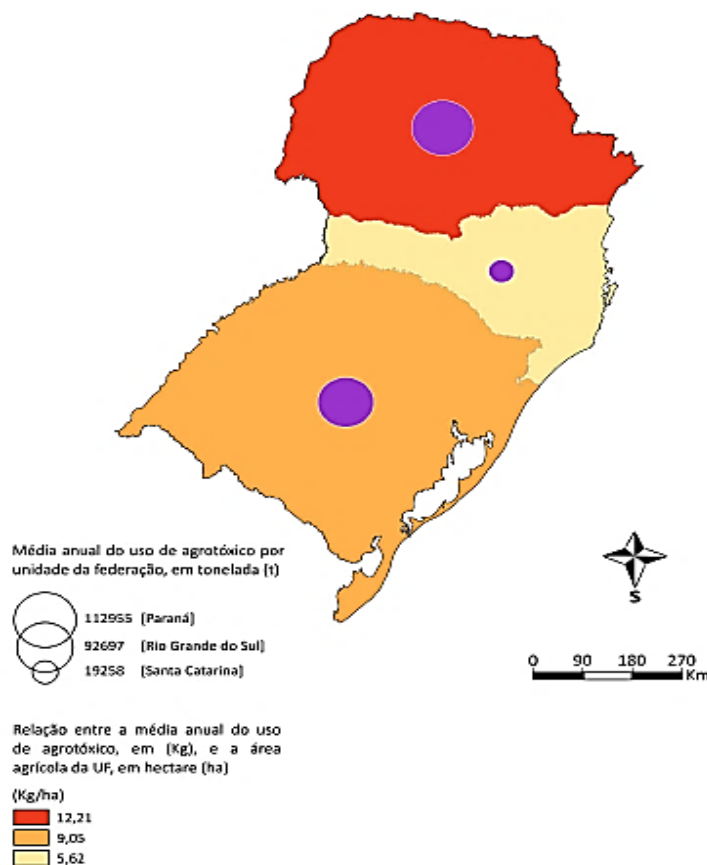


Figura 4 - Quantidade de pesticidas utilizada por estado da região Sul no período 2012-2015.
Fonte: BOMBARDI, 2017.

A utilização dos pesticidas pode trazer três potenciais problemas aos seres humanos, o primeiro é a toxicidade. Estima-se que três milhões de casos de intoxicações por pesticidas aconteçam no mundo a cada ano, destes 220 mil revelam-se fatais. A poluição do solo, da água e ar, os riscos para a saúde dos seres humanos, animais domésticos, e, de fato, a contaminação do meio ambiente constituem o segundo problema. O desenvolvimento de resistência das pragas e ressurgimento das mesmas, favorecendo o uso de maiores doses gerando riscos ambientais, é o terceiro problema (SINGH e VERMA, 2001).

De todo esse volume de pesticida aplicado, mais da metade (52%) é destinado à lavoura de soja, e outros 20% são destinados a milho e cana de açúcar, com 10% cada (Figura 5).

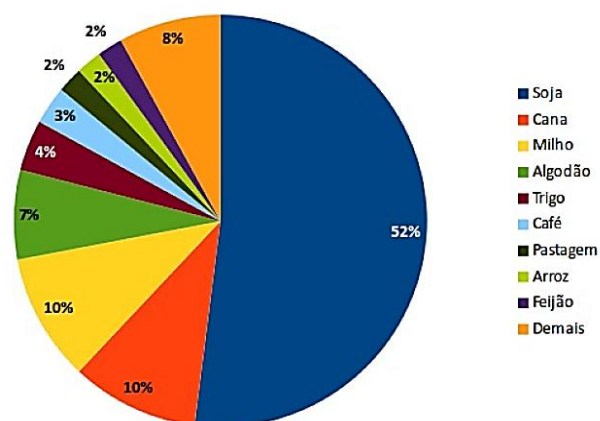


Figura 5 - Percentagem de venda de pesticidas no Brasil por cultura.
Fonte: SINDVEG, 2017.

No Brasil durante o período 2007-2014 foram registrados 25 mil casos de intoxicação por pesticidas. Sendo cerca de 3125 casos por ano, ou 8 intoxicações diárias. No entanto presume-se que para cada caso de intoxicação notificado tenha-se outros 50 não notificados, portanto é possível que nesse período tenham ocorrido 1.250.000 casos de intoxicação por pesticidas de uso agrícola (BOMBARDI, 2017). Na Figura 6 verificam-se a distribuição dos casos de intoxicação por unidade da federação.

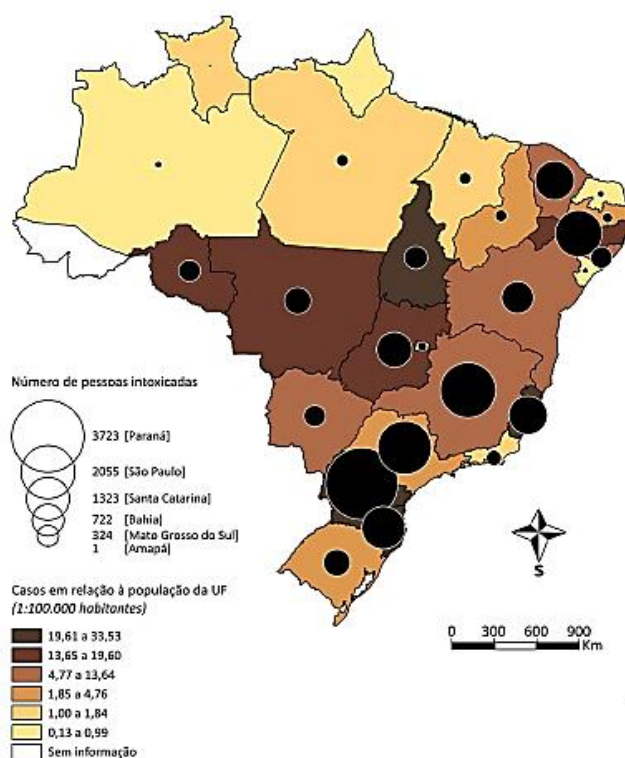


Figura 6 - Casos de intoxicação por pesticidas de uso agrícola por unidade da federação no período 2007-2014.
Fonte: BOMBARDI, 2017.

Verifica-se na Figura 6 que a região Sul ostenta a primeira posição em casos de intoxicação por pesticida, sendo o estado do Paraná o primeiro em número de casos de intoxicação por pesticidas de uso agrícola no período 2007-2014.

O estado do Paraná ocupa também a primeira posição em número de óbitos causados por intoxicação por pesticidas de uso agrícola no período 2007-2014, como pode ser verificado na Figura 7.

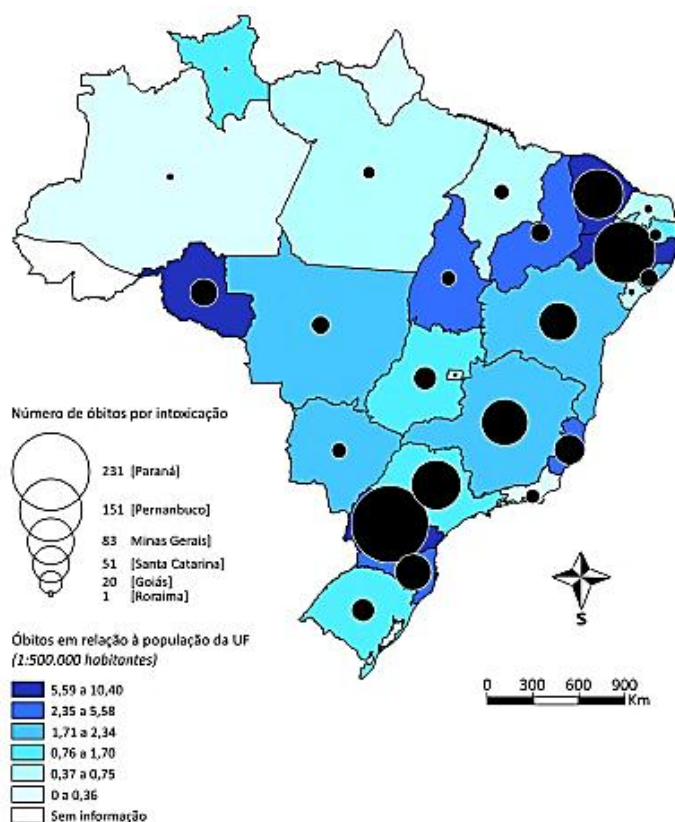


Figura 7 - Óbitos causados por intoxicação por pesticidas por unidade da federação no período 2007-2014.

Fonte: BOMBARDI, 2017.

Sabe-se que apenas 0,1% da quantidade total aplicada de um pesticida utilizado atingirá o sítio alvo, o resto estará disperso em torno deste local (PIMENTEL e LEVITAN, 1986). A quantidade destes compostos que alcança os recursos hídricos varia significativamente entre regiões e depende da dosagem, das características químicas do produto e das condições ambientais durante a aplicação (HUBER et al., 2000).

Devido a isso, antes da liberação de produtos químicos como os pesticidas, é necessário um estudo para avaliar sua persistência e mobilidade no solo e em organismos não alvo. A partir da análise dos resultados obtidos com estes estudos a

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o Limite Máximo de Resíduo (LMR) para este pesticida e o intervalo de segurança (BRASIL, 2016).

O LMR é um parâmetro agrônômico, derivado de estudos de campo supervisionados que simulam o uso correto do pesticida pelo agricultor. Constitui um dos componentes para o cálculo da exposição e avaliação do risco dietético, cálculo esse que antecede o registro de um pesticida (BRASIL, 2016).

Com o objetivo de estabelecer limites em níveis seguros para os consumidores, os valores de LMR são definidos por meio dos estudos mencionados que partem da utilização de quantidades mínimas de pesticidas no campo, a fim de atender a eficiência agrícola necessária. O objetivo é garantir que a quantidade de resíduo no alimento seja a menor possível (BRASIL, 2016).

No entanto, o que se vê no Brasil são pesticidas com LMR superiores aos estabelecidos em outros países. Para o inseticida Malation, seu LMR para feijão na União Européia é $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ já no Brasil esse valor é 8 mg kg^{-1} , cerca de 400 vezes mais (BOMBARDI, 2017), gerando uma permissividade muito maior quanto à aplicação destes compostos nas culturas brasileiras. Isso favorece o acúmulo de resíduos destes compostos no ambiente e na biota.

O programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) da ANVISA tem como função avaliar diferentes tipos de alimentos, periodicamente, quanto à contaminação por pesticidas.

O PARA analisou no período de 2013 a 2015 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira, dentre o total de amostras analisadas, 9.680 amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias, sendo que 5.062 destas amostras (42,0%) não apresentaram resíduos dentre os pesticidas pesquisados e 4.618 (38,3%) apresentaram resíduos de pesticidas dentro do LMR, estabelecido pela ANVISA. Foram consideradas insatisfatórias 2.371 amostras (19,7%), sendo que 362 destas amostras (3,00%) apresentaram concentração de resíduos acima do LMR e 2.211 (18,3%) apresentaram resíduos de pesticidas não autorizados para a cultura, conforme verifica-se na Figura 8 (BRASIL, 2016).

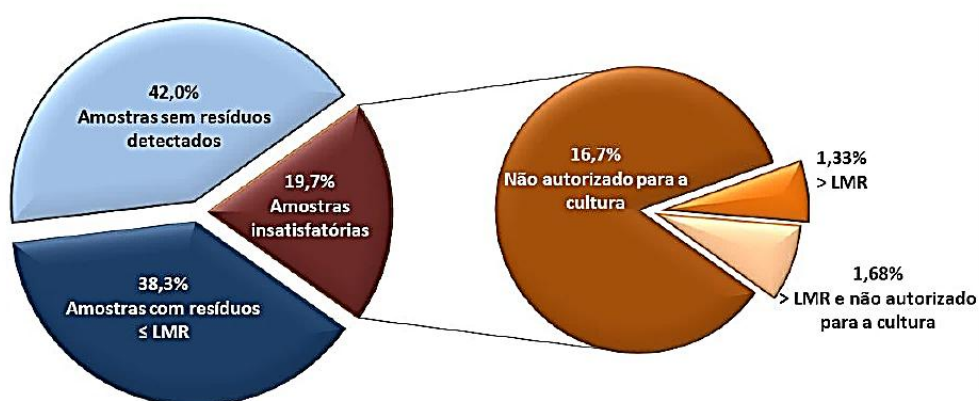


Figura 8 - Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou a ausência de resíduos de pesticidas e o tipo de irregularidade
Fonte: BRASIL, 2016

Neste mesmo estudo o PARA detectou mais de um pesticida no mesmo alimento. Esta detecção concomitante pode potencializar o efeito tóxico dos resíduos de pesticidas que possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica.

A Figura 9 apresenta o perfil do número de resíduos de pesticidas detectados pela ANVISA em uma mesma amostra, considerando os resíduos em situação regular e irregular. A maioria das amostras em que foram detectados resíduos, apresentou entre uma e duas detecções simultaneamente (BRASIL, 2016).

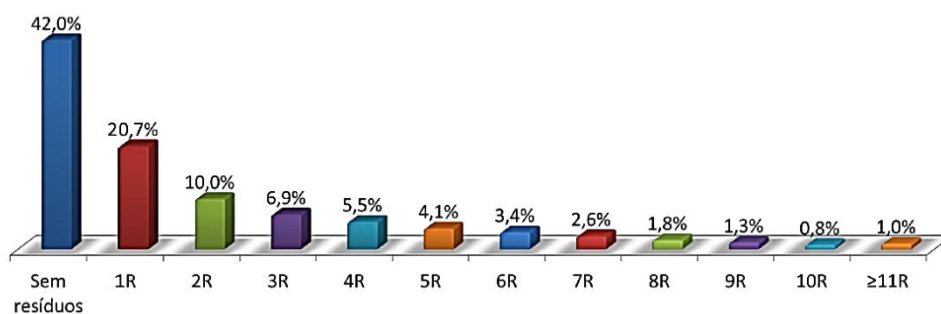


Figura 9 - Perfil de detecções de pesticidas em uma mesma amostra, considerando os resíduos detectados como regulares e irregulares.
Fonte: BRASIL, 2016. Nota: R: Resíduos detectados simultaneamente em uma mesma amostra.

De modo geral os pesticidas mais utilizados são os herbicidas, seguidos pelos inseticidas e fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral, sua toxicidade é menor que a dos inseticidas. Os inseticidas podem ser classificados em 4 classes: organofosforados, piretróides, carbamatos e organoclorados. Dentre essas quatro classes os organoclorados possuem as maiores estabilidades no ambiente (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

3.2.1 Pesticidas organoclorados (OCPs)

Dados estatísticos demonstram que 40% de todos os pesticidas utilizados pertencem à classe de produtos químicos organoclorados. Devido ao seu baixo custo e à necessidade de controle de pragas, os OCPs como DDT, hexaclorociclohexano (HCH), aldrin e dieldrin estão entre os pesticidas mais utilizados nos países em desenvolvimento (FAO, 2005; GUPTA, 2004).

OCPs foram e ainda são muito utilizados no controle da malária e tifo, mesmo sendo banidos na maioria dos países desenvolvidos (AKTAR et al., 2009).

Além disso alguns OCPs banidos podem fazer parte da formulação de OCPs ainda liberados, como é o caso do OCP Dicofol, que pode conter resíduos de DDT (ZENG et al., 2017).

O Aldrin ($C_{12}H_8Cl_6$) (1,2,3,4,10,10-Hexaidro-1,4,4a,5,8,8a-hexaidro-1,4-endo, exo-5,8-dimetanonaftaleno) é rapidamente metabolizado para Dieldrin ($C_{12}H_8Cl_6O$) (1,2,3,4,10,10,-Hexaclaro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octaidroexo-1,4-endo-5,8-dimetanonaftaleno) (Figura 10), tanto pelas plantas como pelos animais e, por esta razão, apresenta persistência e tempo de meia vida no solo de 20-100 dias (CENTENO et al., 2007).

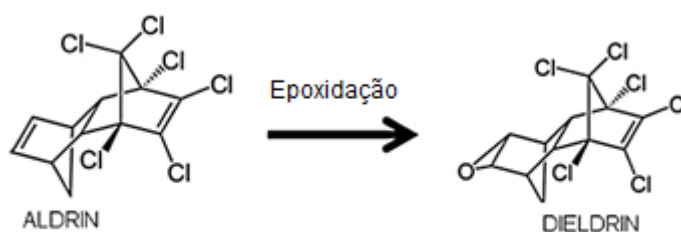


Figura 10 - Reação de epoxidação do Aldrin à Dieldrin.
Fonte: PANDOLFO, 2012.

A abreviação para o nome científico do Aldrin é HHDN. Aldrin grau técnico contém 85,5% de Aldrin. Outros nomes utilizados para identifica-lo são Aldrec, Aldrex, Drinox, Octaleno, Seedrin e Componente 118 (ATSDR, 2002). Está presente na Convenção de Estocolmo no Anexo A de produtos que devem ser eliminados.

O Aldrin é um inseticida, no entanto segundo a página da Convenção de Estocolmo também pode matar aves, peixes e humanos. Em humanos adultos, a dose fatal é estimada em cerca de cinco gramas. Os seres humanos são principalmente expostos a este pesticida através de produtos lácteos e carnes animais. Estudos na Índia indicam que a ingestão média diária de Aldrin e seus subprodutos de Dieldrin são de aproximadamente 19 microgramas por pessoa (STOCKHOLM CONVECTION, 2018).

No Brasil, a Companhia Shell formulou Aldrin e Endrin nos anos de 1977 a 1990 no Estado de São Paulo e, mesmo produzindo, o Brasil importou mais 294 toneladas de Aldrin entre 1989 e 1991. Nos dias de hoje, provavelmente ainda existam estoques deste produto. A Companhia Shell possui 1250 toneladas de solo contaminando por Aldrin, Dieldrin e Endrin no estado de São Paulo (BARRA et al., 2006).

A comercialização do Aldrin foi interrompida no Brasil em 1985, através da portaria 329 de 02 de setembro de 1985 do Ministério da Agricultura, sendo ainda permitida a comercialização de iscas para formigas e cupinicida destinados a reflorestamentos elaborados a base de Aldrin. Entretanto a fabricação para exportação continuou até 1990.

Em 1998, através da Portaria n.º 12 do Ministério da Saúde, este produto foi proibido para todas finalidades.

Assim como o Aldrin, o Dieldrin é altamente persistente no solo, com um tempo de vida de 3 a 4 anos em climas temperados, e possui alta tendência à bioconcentração (CENTENO et al., 2007). A abreviação do nome científico do Dieldrin é HEOD, outros nomes utilizados para identifica-lo são Alvit, Dieldrix, Octalox, Quintox e Red Shield (ATSDR, 2002).

Este OCP está presente na Convenção de Estocolmo no anexo A, como produto a ser eliminado. É utilizado principalmente para controlar pragas têxteis e para controlar doenças transmitidas por insetos. É altamente tóxico para peixes e outros animais aquáticos, particularmente rãs, cujos embriões podem desenvolver deformidades da coluna vertebral após exposição a este composto. Resíduos deste pesticida foram encontrados no ar, água, solo, peixes, aves e mamíferos, incluindo humanos (STOCKHOLM CONVECTION, 2018).

Dieldrin é um produto sintético, não encontrado naturalmente no meio ambiente. Ele pode ser originado da epoxidação do Aldrin (Figura 10) ou através da produção industrial.

Aldrin e Dieldrin puros são pós brancos e evaporam lentamente no ar, sendo que o Aldrin volatiliza mais rapidamente do que o Dieldrin, tendo ambos odores suaves (ATSDR, 2002).

Devido às suas semelhanças estruturais, esses compostos compartilham certas características físico-químicas, como a persistência, bioacumulação e toxicidade. A persistência é definida como meia-vida superior a dois meses em água ou seis meses no sedimento do solo. A persistência dos OCPs de maneira geral varia entre moderada com meia vida de aproximadamente 60 dias a alta com meia-vida de até 10-15 anos (AUGUSTIJN-BECKERS et al., 1994).

A intoxicação por Aldrin e Dieldrin pode gerar alterações neurotóxicas, reprodutivas, de desenvolvimento, imunológica, genotóxica, efeitos teratogênicos, náuseas, vômitos, espasmos musculares e anemia aplástica (USEPA, 2003).

Um dos OCPs mais utilizado historicamente na prática agrícola é o diclorodifeniltricloroetano (DDT), que é moderadamente perigoso, com alta persistência e meia-vida de 2 a 15 anos (AUGUSTIJN-BECKERS et al., 1994).

O DDT ($C_{14}H_9Cl_5$) - (1,1,1-Tricloro-2,2-bis-(4-clorofenil)-etano) salvou várias vidas no controle de pragas como a malária, porém sua persistência e lipofilicidade causou a morte de vários animais (CENTENO et al., 2007).

Este OCP está na convenção de Estocolmo no seu anexo B, indicando que os países signatários devem evitar a utilização deste produto. O DDT foi amplamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial para proteger soldados e civis contra a malária, o tifo e outras doenças espalhadas por insetos. Após a guerra, ele continuou a ser usado para controlar a doença, e foi pulverizado em uma variedade de culturas agrícolas, especialmente o algodão. Continua a ser aplicado contra mosquitos em vários países para controlar a malária (STOCKHOLM CONVECTION, 2018).

O início da sua produção foi na década de 50. Entre 1959 a 1982, 75,5 mil t de DDT foram produzidos e entre 1959 a 1975 as importações atingiram 31,3 mil t. Atualmente uma das possíveis fontes deste OCP para o meio ambiente é a

produção do pesticida dicofol, o qual pode conter resíduos de DDT (ZENG et al., 2017).

O inseticida DDT constitui uma mistura formada por: p,p'- DDT (77,1%), o,p'- DDT (14,9%), p,p'- DDD (0,3%), o,p' – DDD (0,1%) e impurezas (3,5%). Logo que o DDT entra em um determinado organismo ocorre a metabolização em DDE (Figura 11) que é o composto menos tóxico e o mais encontrado nos organismos contaminados (D' AMATO et al., 2002). Já o DDD (Diclorodifenildicloroetano), outro derivado do DDT, é tóxico para insetos e possui menos toxicidade que o DDT para peixes (CLARK, 2001).

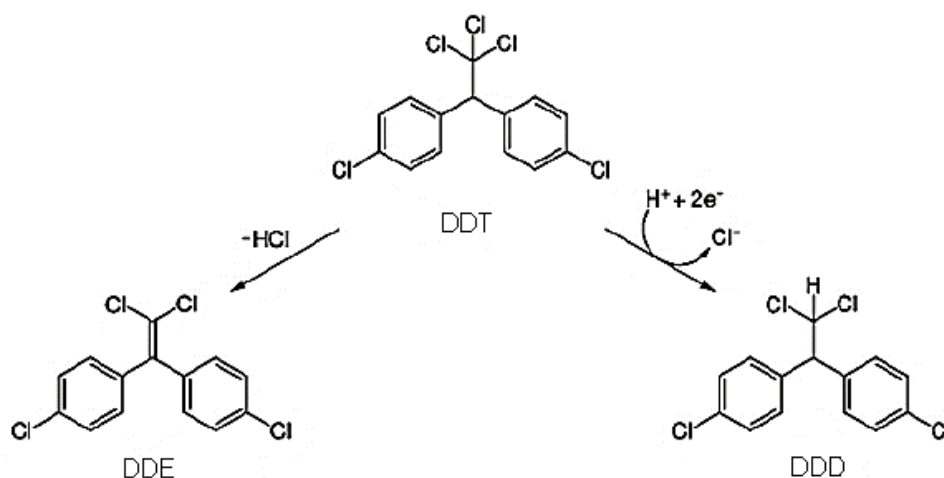


Figura 11 - Reação de metabolização do DDT em DDD e DDE.
Fonte: PANDOLFO, 2012.

Os principais sintomas relacionados à intoxicação por DDT são náuseas, tonturas, confusão, dor de cabeça, letargia, descoordenação, vômitos, fadiga, tremores nas extremidades, anorexia, anemia, fraqueza muscular, hiperexcitabilidade, ansiedade e tensão nervosa (KLAASSEN et al., 1996).

Outro OCP utilizado historicamente em grande escala é o endosulfan - ($C_9H_6Cl_6O_3S$) (6,7,8,9,10,10-Hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexaidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide). O endosulfan contém os isômeros α - e β - endosulfan. Os tempos de meia vida no solo são cerca de 35 e 150 dias para os isômeros α e β , respectivamente (Figura 12). Nas plantas, ele é rapidamente degradado em endosulfan sulfato (CENTENO et al., 2017).

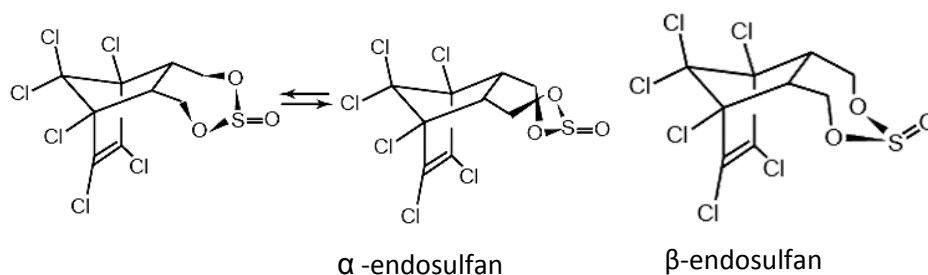


Figura 12 - Isômeros de endosulfan
 Fonte: BRASIL, 2017.

O endosulfan é um OCP ainda em voga em muitas partes do mundo para combater pragas, a fim de aumentar a produtividade agrícola (KULLMAN e MATSUMURA, 1996). Sua importação para o Brasil iniciou na década de 60, sendo que entre 1962 e 1982 foram importadas 6,6 mil toneladas. Entre 2000 e 2003 a importação atingiu 16 mil toneladas (IBAMA, 2003).

Entre os efeitos causados por uma intoxicação por endosulfan, podem-se citar diminuição da contagem de glóbulos brancos e migração de macrófagos, efeitos adversos no sistema imunológico humoral e mediado por células. Pode afetar a qualidade do sêmen, contagem de espermatozoides, células espermatogônicas e gerar outras alterações nos hormônios sexuais masculinos, além de causar dano e mutação no DNA (PANDEY et al., 1990; SUSAN e SANIA, 1999; SINGH et al., 2007).

O poder residual considerado como de qualidade decididamente positiva desses compostos começou a ser encarado como sério inconveniente, encerrando significado ecológico de extrema gravidade, pois os OCPs bioacumulam no tecido adiposo de várias espécies animais (SVENSSON, 1994), devido a sua estabilidade química que lhe proporciona baixa degradabilidade no ambiente (BRUZZONITI et al., 2014).

Esta é a principal forma de contaminação de produtos de origem animal, pois sequencialmente eles entram na cadeia alimentar dos seres humanos (WORTHING e WALKER, 1987; GUO et al., 2009). A partir do início dos anos 1970 o uso de OCPs tem sido progressivamente restringido a aplicações específicas em diversos países (FAO/WHO, 2010; EFSA, 2013).

Além disso, esses compostos podem se degradar ou originar metabólitos no ambiente, que por muitas vezes são mais tóxicos e estáveis que o OCP que os originou. Vários processos no ambiente podem levar a degradação de um OCP, os

principais são: hidrólise, fotodegradação, redução ou oxidação e degradação através de microrganismos (DEAN, 1998).

Esse processo de transformação e degradação no meio ambiente depende tanto das características do próprio ambiente, como das características físico-químicas das substâncias (MUSUMECI, 1992; ANDRÉA, 2004).

Devido às propriedades de estabilidade, geradas pelas características químicas de suas moléculas, os OCPs são transportados para longas distâncias o que propicia sua detecção em locais, como as regiões árticas, muito distantes de onde eles foram aplicados (ALAMDAR et al., 2014).

3.2.1.1 Propriedades físico-químicas relevantes dos OCPs

Devido à variabilidade estrutural dos pesticidas, o estudo de suas propriedades físico-químicas possibilita prever seu comportamento no meio ambiente e no organismo animal.

Segundo Dean (1998) as principais propriedades químicas de um pesticida que influenciam sua estabilidade no meio ambiente são: estrutura química, massa molecular, ponto de fusão/ebulição, estado físico a 20-25°C, pressão de vapor a 20-25°C, solubilidade em água a 20-25°C, coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e Coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}).

Na Tabela 2 tem-se as principais características físico químicas de alguns OCPs.

Tabela 2 - Características físico químicas de alguns OCPs.

Pesticida	Fórmula molecular	MM g/mol ^a	P.F °C ^b	P.E °C ^c	Log Kow ^d	PV(mPa) 25°C ^e	Koc ^f	Sol mg/L 25°C ^g
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	363.873	104	145	6.75	3	5,4	0,014
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380.91	177	385	5,4	0,024	5,4	0.195
p,p'-DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.49	109	185	6.91	0.025	5.18	0.025
p,p'-DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318.01	87	316,5	6.51	0,799	4.70	0.12
Endosulfan α/β	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	405.81	106	-	3,86/3,62	0,022	4,03/4,13	0,32

Fonte: PUBCHEM, 2018 e ATSDR, 2018.

Nota: a. massa molecular, b. ponto de fusão, c. ponto de ebulição, d. logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, e. pressão de vapor, f. Coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico, g. solubilidade em água a 20-25°C.

Uma das características químicas dos pesticidas e especialmente dos OCPs que mais influencia nas suas propriedades físicas e na sua reatividade é a estrutura química. Alguns OCPs apresentam estrutura aromática, possuindo além disso uma

ou mais ligações cloro-carbono, assegurando à molécula estabilidade. (SOLOMONS et al., 2009).

Os OCPs apresentam também baixa solubilidade em água, porém alta solubilidade em meios apolares lipofílicos. O grau de hidrofobicidade de uma substância é representado pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), ou seja:

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{água}} \quad (1)$$

Onde:

$C_{octanol}$: concentração da substância em n-octanol

$C_{água}$: concentração da substância em água

O valor de K_{ow} é reportado frequentemente na literatura na sua forma logarítmica decimal, devido a sua grandeza que em alguns casos ultrapassa um milhão. Por exemplo, o K_{ow} do DDE é de cerca de 100.000 (10^5), sendo o $\log K_{ow} = 5$ (BAIRD, 2002; MACKAY et al., 2006)

Em geral, quanto maior for o coeficiente de partição K_{ow} octanol-água, maior será a probabilidade de encontrar o OCP na matéria orgânica de solos e sedimentos e tecidos gordurosos de organismos vivos (BAIRD, 2002).

Porém, valores de $\log K_{ow}$ de 7, 8 ou maiores são indicativos de produtos químicos capazes de adsorver fortemente aos sedimentos, o que tomará realmente improvável que adquiram mobilidade suficiente para introduzir-se nos tecidos vivos. Por essa razão, os produtos químicos com valores de $\log K_{ow}$ na faixa de 4-7, como a maioria dos OCPs (Tabela 2) são os que se bioconcentram em maior grau (BAIRD, 2002).

Outro parâmetro utilizado para prever a presença dos OCPs no ambiente e na biota é o coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}), que prevê a tendência do pesticida em ficar adsorvido na matéria orgânica do solo e águas superficiais. Moléculas solúveis em água apresentam valores de K_{oc} baixos, podendo ser mais facilmente biodegradáveis (BARCELÓ e HENNION, 2006).

O valor K_{oc} aumenta proporcionalmente com a hidrofobicidade (K_{ow}) de um composto, ou seja, maior será sua afinidade pela matéria orgânica (GHISELLI, JARDIM, 2007; MUNARETTO, 2013).

Quando a água passa através das brânquias dos peixes, os compostos se difundem de forma seletiva para os tecidos, além disso, quando os peixes se alimentam de organismos aquáticos pertencentes à sua cadeia alimentar, há um aumento na concentração destes compostos nos tecidos, gerando a bioconcentração (BAIRD, 2002).

Bioconcentração é o processo que causa o aumento na concentração de uma substância química em um organismo aquático em relação a sua concentração na água, devido a incorporação através de sua absorção unicamente pela água, a qual pode ocorrer pela superfície respiratória e/ou pela pele. Já a biomagnificação pode ser definida como a acumulação de uma substância na biota em toda a extensão da cadeia alimentar através da alimentação. A bioacumulação é o somatório destes dois processos (VOUTSAS, MAGOULAS e TASSIOS, 2002; BUAH-KWOFIE, HUMPHRIES, PILLAY, 2018).

Pode-se citar como exemplo de bioconcentração os resultados obtidos no estudo desenvolvido por Almatari et al. (2017) em que avaliando o músculo de várias espécies de peixe coletadas no Lago Temsah (Egito), obteve concentrações médias de OCPs entre 38,8 ng g⁻¹ e 83,5 ng g⁻¹, já na água deste mesmo lago a concentração média ficou em 1,31 ng mL⁻¹, indicando um alto nível de bioconcentração.

Como exemplo de biomagnificação, tem-se o exemplo da determinação de DDT na água marinha de Long Island Sound. Na água a concentração de DDT determinada foi de cerca de 0,000003 ng g⁻¹, mas atinge 0,04 ng g⁻¹ no plâncton, 0,5 ng g⁻¹ na gordura de peixes vairões, 2 ng g⁻¹ nos peixes-agulha que nadam nestas águas e 25 ng g⁻¹ na gordura dos cormorões e águias-pescadoras que se alimentam de peixe, perfazendo um fator de biomagnificação total de cerca de dez milhões (BAIRD, 2002).

O contato de OCPs com peixes podem gerar a acumulação de quantidades de OCPs significativamente maiores daquelas encontradas nas águas em seu entorno, devido à sua baixa capacidade para metaboliza-los, geralmente os acumulam em concentrações mais elevadas do que animais terrestres (MARTI et al., 2010). Sendo assim, peixes tornam-se uma importante fonte de contaminação para seus predadores, inclusive os seres humanos (LEDOUX, 2011).

3.3 PEIXE

A produção mundial de pescados vem aumentando, alcançando 169,2 milhões de toneladas em 2015, destes 68% são peixes (FAO 2017). O Brasil ocupa a 19ª posição na produção mundial de pescados, tendo a China como maior produtor mundial (BRASIL, 2014).

No que diz respeito à aquicultura continental, a produção brasileira em 2011 foi de 544,4 mil toneladas, sendo baseada principalmente na criação de peixes, visto que os outros ramos praticados em água doce não apresentaram números significativos. As regiões Sul, Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste tiveram as maiores produções, respectivamente (BRASIL, 2013).

As espécies de água doce tiveram sua produção amplificada, principalmente devido ao baixo custo de produção, permitindo que o mercado cresça. Segundo a FAO espécies como a Carpa e a Tilápia, representarão em 2025 60% da produção aquícola mundial.

As exportações brasileiras alcançaram no ano de 2016 o montante de 236 milhões de dólares, correspondendo a 40 mil toneladas, sendo que Estados Unidos, Espanha e Vietnã são os três principais exportadores (BRASIL 2017).

Este alto consumo deve-se principalmente ao fato do peixe ser uma excelente fonte de proteína animal e de outros nutrientes essenciais, contribuindo para a segurança alimentar em numerosas regiões (FAO 2006).

O peixe contém comparando-se a outras espécies animais, grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo. A composição lipídica dos peixes contrasta com a de mamíferos por conter elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, além de possuir todos os aminoácidos essenciais para os seres humanos (SARTORI e AMANCIO, 2012).

3.3.1 Tilápia e Lambari

No Brasil segundo o Ministério da Pesca e Agricultura, a produção pesqueira, continental e marítima, alcançou 1,43 milhão de toneladas em 2011, ou seja, 13,2% a mais do que em 2010, sendo que 67% da produção aquícola cultivada no continente é constituída por Tilápia e Lambaqui (BRASIL, 2013). Dentre as espécies dulciaquícolas cultivadas no mundo, a Tilápia ocupa atualmente uma posição de destaque, ficando em segundo lugar, perdendo apenas para as carpas.

Tilápia é o nome genérico de um grupo de Ciclídeos endêmicos da África, acredita-se que sua domesticação teve início no Egito em 2000 a.C, apesar do primeiro registro de cultivo ter sido realizado no Quênia em 1924 (WAGNER, 2002). Abaixo na Figura 13, um exemplar da espécie *Oreochromis niloticus*.



Figura 13 - Espécime de *Oreochromis niloticus*.
Fonte: FISH BASE, 2017.

O grupo dos Ciclídeos é constituído por gêneros importantes para a aquicultura: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. Os nomes científicos das espécies de Tilápias têm sido muito revisados nos últimos 30 anos, criando algumas confusões. O nome científico da Tilápia do Nilo tem sido dado como *Tilapia nilotica*, *Sarotherodon niloticus*, e correntemente como *Oreochromis niloticus* (POPMA e MASSER, 1999).

Segundo Hilsdorf (1995), a Tilápia alimenta-se da base da cadeia trófica, aceita uma variedade grande de alimentos e apresenta uma resposta positiva à fertilização em viveiros.

Além disso, suporta elevadas temperaturas, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, tolera altos níveis de amônia e nitrito, além de ser resistente a doenças, apresenta excelente desempenho de crescimento, carne de coloração branca e sabor suave (CARMO, 2003).

Outra espécie muito consumida no Brasil é o *Astyanax sp* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Characidae) (Figura 14), conhecido popularmente como Lambari. Ocorre em rios e reservatórios neotropicais como os encontrados na maioria dos ecossistemas brasileiros, é nativo do Brasil, além de ser conhecido como Lambari, também é chamado em algumas regiões de piaba de rabo amarelo ou lambari de cauda amarela. É um forrageiro onívoro e tornou-se uma parte vital da base nutricional de muitas populações (DE CARVALHO et al., 2009).

O Lambari aceita alimentação artificial com facilidade e tem um bom potencial para a aquicultura. Sua importância comercial é relevante como isca na pesca

esportiva, alimentação e como peixe ornamental, normalmente os machos possuem de 7 a 9 cm de comprimento e as fêmeas de 12 a 15 cm de comprimento (SATO et al., 2006).



Figura 14 - *Astianax* sp
Fonte: BENECEUTI, 2010

A atividade reprodutiva neste gênero começa quando atingem cerca de 5 cm de comprimento (SANTOS et al., 1991), podendo ocorrer desova total ou dividida, dependendo das condições ambientais (GARUTTI, 1989). Esta espécie não faz migração, se reproduz em ambientes lênticos e lóticos, possuindo um longo período de reprodução (GODINHO et al., 2010).

O Lambari e a Tilápia podem ser considerados bons biomarcadores da contaminação ambiental (DOS SANTOS et al., 2012), pois devido aos diferentes tipos de habitats que ocupam, os peixes, de maneira geral, têm desenvolvido diferentes estratégias de sobrevivência, o que os torna particularmente úteis em estudos de ecotoxicologia, permitindo assim avaliar os efeitos de uma vasta gama de contaminantes sob um largo espectro de condições (TELES, 2006).

O biomonitoramento é uma forma de monitoramento ambiental, usando, por exemplo, organismos vertebrados como os peixes, que podem refletir a contaminação do ambiente em que eles se encontram através da determinação da concentração destes em seus tecidos, bem como da avaliação concomitante com parâmetros ecológicos/biológicos (LAM e WU, 2013).

3.4 CONTAMINAÇÃO POR OCPs EM PEIXES

A concentração de contaminantes nos peixes pode refletir o estado de poluição do ambiente circundante, pois os peixes estão frequentemente no topo da cadeia alimentar aquática, podendo concentrar grandes quantidades destes

contaminantes da água e também os absorver através da sua dieta (BLOCKSOM et al., 2010)

Compostos químicos como os OCPs são onipresentes em sistemas aquáticos (ZHAO et al., 2014). Estudos indicam que a exposição dos peixes a eles, pode gerar modificações estruturais nas brânquias, causando alterações inclusive no equilíbrio osmótico (CAPKIN; ALTINOK; KARAHAN, 2006), alterações morfológicas no fígado, alterações celulares, depleção do conteúdo de glicogênio e até mesmo morte celular por necrose (GLOVER et al., 2007). Essas alterações dependerão do tempo de exposição e concentração dos compostos no ambiente e da dieta dos organismos aquáticos.

A absorção dos contaminantes através da dieta é a principal fonte de contaminação por OCPs em peixes, pois a maioria destes possui um Log K_{ow} maior que 5 e não estão dispersos livremente na água (FISK, et al., 1998).

Assim, além dos efeitos tóxicos dos OCPs para a exposição humana, a possibilidade de as espécies de níveis tróficos elevados serem afetadas pode acarretar desequilíbrio na estrutura das comunidades, mesmo peixes que não são de níveis tróficos elevados, mas absorvem nutrientes do sedimento podem apresentar altos índices de contaminação por estes compostos (WHO, 1987).

Devido a isto, vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar OCPs em peixes.

Sapozhnikova, Bawardi e Sohlenk, (2004), realizaram um trabalho na Califórnia, de verificação das concentrações de pesticidas organoclorados em *Tilapia mossambique* e *Cynoscion xanthulu*, peixes típicos da região do estudo, observando concentrações de DDT e DDE no músculo e fígado de peixe acima do permitido pela legislação.

Campos et al., (2005), determinaram isômeros do HCH (α , β , δ e γ), p,p'-DDD, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, HCB e Aldrin em músculo de três espécies de peixes (*Sardina pilchardus*, *Trachurus trachurus* e *Scomber scombrus*), encontrando níveis significativos de p,p'-DDT e p,p'-DDD nestas amostras.

Miranda, (2008), avaliou a contaminação por vinte e seis compostos organoclorados em músculo de traíra, bem como as alterações fisiológicas decorrentes. Os espécimes estudados apresentaram alterações fisiológicas, lesões

no fígado como fibrose tissular, infiltração de leucócitos e necroses, bem como 100% dos tecidos estavam contaminados por algum tipo de OCP.

Fernández-Bringas et al., (2008), analisaram 16 amostras de Tilapia, verificando a presença de DDE e α -HCH em altas concentrações.

Szlinder-Richert et al., (2008), analisaram músculo de cinco espécies de peixes quanto à contaminação por p,p'-DDT e seus metabólitos e isômeros de HCH e HCB, verificando que entre o DDT e seus metabólitos o mais abundante é o p,p'-DDE e com relação aos isômeros do HCH o mais abundante foi o β -HCH.

Em outro trabalho Norli, Christianses e Deribe (2011), verificaram a presença de endosulfan sulfato, DDT e DDE em Tilápias do Nilo (*O. Niloticus*), em carpa (*Cyprinus carpio*) e em bagre africano (*Clarias gariepinus*), observando uma contaminação maior em espécies com maior teor de gordura, obtendo valores altos para DDT, seu metabólito DDE e para endosulfan sulfato nas amostras analisadas.

Ogbeide, Tongo e Ezemonye (2015) avaliaram a presença de OCPs em peixes da espécie *Clarias gariepinus* e *Tilapia zilli* presentes em um rio da Nigéria e verificaram valores de contaminação acima do permitido pela legislação.

Kafilzadeh (2015) avaliou a contaminação por OCPs em músculo de diferentes espécies de peixe do lago Tashk (Iran), verificando altos níveis de DDE, além de DDT e endosulfan.

Em outro estudo Hinojosa-Garro, Chan e Osten, (2016) avaliaram em dois diferentes reservatórios do México, peixes das espécies *Cichlasoma urophthalmus* (Mayan cichlid) e *Oreochromis niloticus* quanto a contaminação por alguns OCPs, obtendo valores de p,p-DDT acima do limite permitido pela legislação.

Stremel et al. (2017) avaliaram músculo de *Oreochromis niloticus* e *Astianax altiparanae* comercializados na cidade de Ponta Grossa, Paraná, quanto a contaminação por Aldrin, DDT, DDE, α -endosulfan e β -endosulfan, detectando todos os compostos em concentrações abaixo do limite máximo estipulado por órgãos internacionais.

Chang (2017), avaliou músculo de diferentes espécies de peixe, encontrando valores altos de contaminação por DDT e Dieldrin em concentrações abaixo dos limites estabelecidos por legislações internacionais.

Buah-Kwofie, Humphries e Pillay (2018), avaliaram amostras de peixe das espécies *Oreochromis mossambicus* e *Clarias gariepinus* presentes em um lago na

África do Sul, quanto à contaminação por OCPs, observando altas concentrações de p,p-DDT, Aldrin, Dieldrin e Endosulfan.

O monitoramento da concentração de OCPs em tecidos de peixe pode ser um desafio, principalmente devido às baixas concentrações dos analitos alvo nos tecidos e altas concentrações de substâncias interferentes inerentes à matriz que podem afetar negativamente os resultados da análise (SU et al., 2011, DOS REIS et al. 2013).

Devido a isso, diversas técnicas podem ser empregadas, objetivando uma extração e determinação mais eficazes.

3.5 EXTRAÇÃO DE OCPs EM PEIXE

Os principais interferentes em tecidos de peixe são os lipídeos, que podem ser extraídos de forma contígua com os analitos alvo (CHAMKASEM et al., 2013; RAJSKI et al., 2013). A remoção eficiente destes compostos do extrato durante o preparo da amostra é crucial para limitar a interferência e minimizar problemas de sensibilidade e reprodutibilidade durante a análise cromatográfica (HONG et al., 2004; BADUEL et al., 2015 e CHO et al., 2015), evitando assim o comprometimento do sistema de detecção, o que impossibilitaria resultados confiáveis (WALTERS, 1990 e SUN et al., 2015).

O preparo é o processo de transformação de uma amostra em uma forma adequada para a análise (HARRIS, 2012). Esse processo envolve várias etapas em função da complexidade das amostras e das baixas concentrações dos analitos alvo, visa também a eliminação de interferentes, buscando alcançar os limites de detecção e quantificação requeridos pela técnica de determinação empregada (NOLLET, 2006).

Dentre algumas etapas comuns no preparo de amostra estão a extração, *clean up*, concentração, ajuste de condições, ajuste de concentração/volume e outras, antes da determinação do analito de interesse (LANÇAS, 2004).

Observa-se na literatura, devido à complexidade da matriz, o uso de diversas técnicas de preparo de amostras para extração de OCPs em tecidos de peixe, objetivando a minimização do manuseio da amostra, determinando níveis cada vez menores de concentração, bem como reduzindo os resíduos gerados.

Tendo em vista esta complexidade, vários métodos de preparo de amostra foram desenvolvidos e utilizados ao longo do tempo, como por exemplo, a extração por Soxhlet (SUDARYANTO et al., 2007; Al-SHWAFI et al., 2009 e WANG et al., 2013), extração líquido-líquido (LLE) (CUI et al., 2015), extração líquida pressurizada (PLE) (PEDRO et al., 2017), extração assistida por micro-ondas (MAE) (HINOJOSA-GARRO et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2017), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (SHEN et al., 2011), extração acelerada por solvente (ASE) (YANG et al., 2010, YEHOUENOU et al., 2006, SUCHAN et al., 2004) e a extração utilizando ultrassom (HONG et al., 2004, SAPOZHNIKOVA et al., 2004 e YANG et al., 2007), seguidas de uma etapa de eliminação dos interferente, como por exemplo a cromatografia por permeação em gel (GPC) (TERZOPOULOU e VOUTSA, 2017), a extração em fase sólida (SPE) (FONTANALS et al., 2005; JORDAN et al., 2009).

No entanto, esses procedimentos tradicionais de preparo de amostra para determinação de OCPs em tecidos de peixe são normalmente demorados, há uso intensivo de mão-de-obra e equipamentos, são complexos e caros. Além disso, utilizam frequentemente grandes volumes de solventes tóxicos e massa de amostra (CHOI; LEE; JUNG, 2016).

Isso pode ser observado, por exemplo, na extração por Soxhlet em que há a necessidade de grandes volumes de solventes e longo tempo de extração (BEYER e BIZIUK, 2008), na extração utilizando micro-ondas, que apresenta frequentemente baixa seletividade e é imprópria para extração de compostos termolábeis (CAMEL, 1998; PAPADAKIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2006).

Na extração acelerada por solvente, em que faz-se necessário equipamento específico, bem como o tempo para a limpeza do extrato e do equipamento após a extração é longo (CARABIAS-MARTINEZ et al., 2005; GIERGIELEWICZ-MOZAISKA et al., 2001) e na dispersão da matriz na fase sólida, nela são utilizados grandes quantidades de massas de solventes, impossibilitando o preparo de várias amostras de forma simultânea e não é aplicada adequadamente a amostras desidratadas (BARKER, 2000; VALSAMAKI et al., 2006).

O desenvolvimento de novos métodos de preparo de amostra vem de encontro a necessidade recente da química analítica moderna em aplicar os chamados procedimentos da química verde, em que uma pequena quantidade de amostra e reagentes é usada, com o mínimo de etapas, equipamentos simples e

reagentes com baixo potencial tóxico para a saúde e meio ambiente (CAJKA et al., 2012; SADOWSKA-ROCIEK et al., 2013).

Para satisfazer essa necessidade por um método rápido, fácil, eficaz, robusto e seguro o método QuEChERS foi desenvolvido (ANASTASIADES et al., 2003). Ele inclui a extração e limpeza da amostra e possibilita a análise simultânea de múltiplos compostos de maneira conjunta. (LAZARTIGUES et al., 2011), possui diversas vantagens quando comparado aos métodos tradicionais mencionados anteriormente, como por exemplo, a capacidade de extrair diferentes grupos de substâncias químicas e a relação custo/benefício/tempo.

Este método desenvolvido inicialmente por Anastasiades e colaboradores para extração de pesticidas em frutas e vegetais envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguida de um particionamento líquido-líquido após a adição de uma mistura de sais, acompanhada de uma etapa de limpeza utilizando d-SPE (ANASTASIADES et al., 2003; HOU et al., 2013).

Após várias modificações este método foi também aplicado com sucesso para determinar vários pesticidas e outros contaminantes, como sulfonamidas, bifenilas policloradas (PCBs) e PBDEs em diversos tipos de amostras, como alimentos e amostras ambientais (LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005; CHAFER-PERICAS et al. 2013; FONTANA et al. 2010; DAGNAC et al. 2009).

Recentemente sofreu diferentes modificações objetivando sua aplicação na extração de compostos orgânicos, especialmente os pesticidas, em amostras gordurosas, como azeitona (GILBERT-LOPEZ et al., 2010), abacate (RAJSKI et al., 2013), óleo de amendoim (SU et al., 2011), leite bovino (DAGNAC et al., 2009), ovo de galinha (CHOI et al., 2015), cereais (HE et al., 2015; KACZYNSKI, 2017), sangue humano (TALIANSKY-CHAMUDIS et al., 2017) e peixe (LAZARTIGUES et al., 2011; DERIBE et al., 2011; KALACHOVA et al. 2013; WANG et al., 2017).

A maioria destas modificações citadas levaram em consideração o tipo e quantidade de solvente de extração, as formulações de sal e sorvente na etapa de particionamento e limpeza e a quantidade de amostra necessária para a extração. Muitas dessas modificações emergiram da necessidade de obter melhores valores de recuperação em matrizes de diferentes complexidades, evitando a degradação de analitos e diminuindo os efeitos da matriz (GONZALEZ-CURBELO et al., 2015).

Para determinação de resíduos de pesticidas em matrizes ambientais os solventes usuais são a acetona (FIDALGO-USED, et al., 2003; ANASTASSIADES, LEHOTAY, et al., 2003; LUKE; FROBERG; MASUMOTO et al., 1975), acetato de etila (HOLSTEGE et al., 1994; MOL et al., 2007; HOLMES et al., 2015), acetonitrila (MASTOVSKA e LEHOTAY, 2004; LEHOTAY et al., 2001; SCHENCK et al., 2002; BADUEL et al., 2015; CHO et al., 2015), todos eles garantem boas recuperações dos analitos.

Embora a acetona seja miscível em água, sua separação é possível utilizando-se de maneira conjunta solventes não-polares, como o hexano. A acetona é aplicada principalmente na extração de compostos apolares e é compatível com etapas de limpeza que utilizam sorventes sólidos como a SPE e a d-SPE, possui ainda uma pressão de vapor e ponto de ebulição considerados adequados para sistemas de injeção em cromatógrafos a gás (MATOVSKA e LEHOTAY, 2004).

Já o acetato de etila é apenas parcialmente miscível com água, e pouco aplicável para extração de compostos altamente polares e extrai mais compostos lipofílicos da amostra que a acetona. A acetonitrila é muito utilizada no preparo de amostras de alimentos (frutas e vegetais), sendo que os extratos de acetonitrila podem ser separados facilmente da água (WILKOWSKA et al., 2011), no entanto tem como desvantagens um maior volume de expansão de solvente durante a vaporização em cromatógrafo a gás (GC), menor volatilidade, maior custo e maior toxicidade (CURBELO ET AL 2015; ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003).

Essa discussão indica que a seleção do solvente ideal para a introdução no GC depende de vários fatores, como a técnica de injeção de GC empregada e o tipo de analito e amostra analisada.

Levando-se em consideração, principalmente, o tipo de analito e composição química da amostra, pode-se utilizar um parâmetro que prevê a eficiência de soluções extratoras para extração de OCPs em amostras, esse parâmetro é chamado de solubilidade de Hildebrand/Hansen.

A teoria da solvência de Hildebrand/Hansen tem como premissa que a raiz quadrada da densidade de energia de coesão entre as moléculas expressa um valor numérico que indica a capacidade de solvência de um solvente específico (BURKE, 2011).

Este valor foi denominado parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ_t). Compostos com δ_t próximos geralmente formam misturas entre si. Sendo assim, solventes que apresentam um δ_t próximo ao δ_t de um analito teoricamente resultam em boa eficiência de extração (VILLA et al., 2011).

A mistura de solventes acetona:hexano 1:1 (v/v) possui um parâmetro de solubilidade de Hildebrand/Hansen de $23,9 \text{ J}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$, a acetonitrila pura possui um valor de parâmetro de solubilidade de $25,1 \text{ J}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$ e os analitos p,p'-DDT e α -endossulfam possuem valores de parâmetro de solubilidade de Hildebrand/Hansen de 25,6 e 22,8 $\text{J}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$ respectivamente, ou seja teoricamente qualquer um desses solventes poderia ser utilizado para a extração dos OCPs (VILLA et al., 2011).

No entanto, além do tipo de solvente utilizado no preparo da amostra, a quantidade de amostra disponível para a análise pode ser um empecilho, pois em algumas espécies de peixes a quantidade total de tecido disponível chega a no máximo 5,0 gramas (YAMAMOTO et al., 2016), inviabilizando a utilização de algumas técnicas de preparo de amostras para a determinação de OCPs.

A maioria dos métodos de preparo necessita de grande massa de amostra (entre 10 e 15 gramas) e conseqüentemente solvente, sendo assim, modificações no método de extração que propiciem a utilização de uma menor massa de amostra, mas sem perder a precisão e exatidão são necessárias. Uma das técnicas já relatadas na literatura que podem ser utilizadas na etapa de extração dos OCPs é a extração assistida por ultrassom (AKOTO et al., 2016; SUN et al., 2015).

A extração assistida por ultrassom é considerada uma boa alternativa para a obtenção de compostos orgânicos de diferentes matrizes, pois há um contato mais eficiente entre o sólido e o solvente, devido a um aumento da pressão (o que favorece a penetração e transporte) e temperatura (melhora a solubilidade e difusividade), favorecendo, assim, a extração dos OCPs em pequenas massas de amostra (BABIC et al., 1998; PENA et al., 2006).

Nesta técnica, são produzidas ondas elásticas de frequência mais alta do que ondas sonoras, ou seja, maiores do que 16 kHz (CASTRO e CAPOTE, 2007). Normalmente são aplicadas para a extração frequências entre 20 kHz e 500 kHz. Durante a sonicação, uma pressão acústica periódica é criada no meio tratado, o que desencadeia numerosos mecanismos que aceleram o processo de extração (transferência de massa) (SLIWINSKI, 1993).

Os mais importantes destes mecanismos incluem a cavitação e o atrito na interface (BABIC e PETROVIC, 1999). Outro processo encontrado em meio tratado com ultrassom é a absorção das energias de ultrassom com produção de calor, o que acelera a extração.

A USEPA, (1996), estabelece no documento USEPA 3550B, a metodologia de extração de OCPs por ultrassom em amostras complexas. Vários trabalhos com matrizes de origem animal vêm utilizando ultrassom como opção no processo de extração de pesticidas organoclorados, obtendo resultados satisfatórios (PINHO et al., 2010; SAPOZHNIKOVA e SCHLENK, 2004; YANG et al., 2007; VALLEJO et al., 2010).

O uso da sonicação durante a extração de OCPs em peixe já foi relatado na literatura como um método eficaz, no entanto há a necessidade de um grande volume de amostra (5-10g) e de solvente (20-90mL), para que a extração seja efetiva (AKOTO et al., 2016; SUN et al., 2015).

O uso da extração por QuEChERS aliado ao uso da sonicação já foi reportado na literatura para amostras de peixe e tem-se demonstrado eficaz na otimização deste método (WANG et al., 2017), no entanto de maneira geral a massa de amostra necessária à extração fica em torno de 5-10 gramas, sendo que esta quantidade pode ser considerada alta quando se deseja analisar o músculo de espécies com peso total que varia entre 5 e 10 gramas, como por exemplo o *Astyanax* sp (NAVARRO et al., 2013).

Aliado a etapa de extração, tem-se a etapa de determinação destes compostos. A determinação de OCPs é realizada normalmente através de técnicas cromatográficas aliadas aos detectores normalmente específicos aos compostos em estudo.

3.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

3.6.1 Cromatografia gasosa (CG)

Cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase fixa de grande área

superficial denominada fase estacionária e outra o fluido que percola a primeira, sendo, portanto, a fase móvel (NIESSEN, 2001; YUWONO e INDRAYANTO, 2004).

Dentre as técnicas de análise cromatográfica tem-se a CG, que é uma técnica com alto poder de resolução, capaz de separar dezenas de substâncias em uma mesma análise, aliado a variados tipos de detectores pode alcançar baixos limites de quantificação, o que a torna uma excelente técnica quantitativa. (PETROVIC et al., 2002; COLLINS et al., 2006).

Um cromatógrafo a gás (GC) é composto basicamente pelo gás de arraste, controlador da vazão e regulador de pressão, sistema de injeção de amostra, um forno de temperatura programável onde está localizada a coluna cromatográfica, sistema de detecção e um registrador dos dados (YUWONO e INDRAYANATO, 2004; COLLINS et al., 2006).

No GC o analito volátil ou volatilizável, termicamente estável é transportado através da coluna por uma fase gasosa móvel, conhecida como gás de arraste. A coluna pode ser do tipo gás-líquido em que a fase estacionária é um líquido não volátil que recobre a coluna internamente ou um suporte sólido finamente dividido. Na cromatografia de adsorção gás-sólido, o analito é diretamente adsorvido sobre as partículas sólidas da fase estacionária (HARRIS, 2012).

A fase móvel utilizada em CG deve ser quimicamente inerte, sendo o He a fase móvel mais comum. Dois tipos de colunas são comumente empregados em CG, as colunas capilares e colunas empacotadas. As capilares são as mais utilizadas atualmente e tem geralmente entre 30 e 50 m de comprimento (SKOOG et al., 2006).

A CG sozinha não qualifica os analitos, sendo necessário o uso de detectores para a qualificação e quantificação dos mesmos. Dentre os detectores utilizados em equipamentos de GC podem-se citar os por ionização em chamas (flame ionization detector, FID), por condutividade térmica (thermal conductivity detector, TCD), por captura de elétrons (electron capture detector, ECD) e o detector por espectrometria de massas (mass spectrometry, MS) (COLLINS et al., 2006; HERBERT e JOHNSTONE, 2002).

Na análise da maioria dos OCPs a técnica recomendada para a separação dos analitos é a CG. Diversos trabalhos empregaram esta técnica, aliada aos detectores específicos (ECD) e gerais (MS).

Al-Shwafi, Al-Trabeen, Rasheed (2009) avaliaram a contaminação por OCPs em tecidos de peixe coletados no mar vermelho e golfo de Adén utilizando um GC-ECD. Em outro estudo, Kafilzadeh (2015) avaliou a contaminação por OCPs em músculo de diferentes espécies de peixe do lago Tashk (Iran) utilizando um GC-ECD.

Ogbeide, Tongo e Ezemonye (2015) avaliaram a presença de OCPs em peixes da espécie *Clarias gariepinus* e *Tilapia zilli* presentes em um rio da Nigéria utilizando um GC-ECD.

Em outra pesquisa Shamsipur, Yazdanfar e Ghambarian (2016), avaliaram a presença de diversos pesticidas em amostras de água, leite, mel entre outros, utilizando um GC-MS.

Olutona, Olatunji, Obisanya (2016) verificaram a presença de OCPs em sedimento de um lago na Nigéria utilizando como técnica de separação e detecção a GC-ECD.

Wang et al. (2017) determinaram o nível de OCPs em amostras de tecido de peixe utilizando um GC-ECD.

Em outro estudo, Buah-Kwofie, Humphries e Pillay (2018), avaliaram amostras de peixe das espécies *Oreochromis mossambicus* e *Clarias gariepinus* presentes em um lago na África do Sul, quanto à contaminação por OCPs utilizando um GC-MS.

Verifica-se que para análise de OCPs em matrizes ambientais faz-se o uso de dois principais detectores, o ECD e o MS. Em um estudo realizado com óleos essenciais de plantas cítricas compararam-se a contaminação por OCPs detectada por GC-ECD e GC-MS, verificando-se limites de detecção inferiores e melhores recuperações em GC-ECD (ALVES et al., 2012).

Segundo Skoog et al (2006), o detector ideal deve possuir: boa reprodutibilidade, estabilidade e sensibilidade, boa resolução, faixa de temperatura desde a ambiente até 400°C, tempo de resposta curto e independente da vazão, alta confiabilidade e facilidade de uso, similaridade de resposta a todos os solutos e não deve destruir a amostra.

3.6.2 Detectores

Nenhum detector pode ser considerado ideal, no entanto eles possuem especificidade, o que garante uma aproximação da característica ideal citada

anteriormente. Para a análise de compostos halogenados, como os OCPs, os detectores mais utilizados são o de captura de elétrons (ECD) e o espectrômetro de massas (MS) (WEN-XIU et al., 2016; GERBER et al., 2016; ZHENG et al., 2016; NUAPIA et al., 2016; XIAO-CHEN et al., 2017)

O ECD possui uma sensibilidade muito alta aos compostos orgânicos contendo em suas moléculas átomos de cloro e flúor, teve um papel vital no controle e proteção do meio ambiente, sua utilização ajudou a provar a presença de OCPs no meio ambiente, conscientizando sobre a extensão global da poluição (ETTRE e MORRIS, 2007).

No detector de captura de elétrons a amostra eluída de uma coluna passa sobre uma fonte radioativa emissora, geralmente níquel-63. Um elétron do emissor causa a ionização do gás carregador (frequentemente nitrogênio) e a produção de uma rajada de elétrons. Na ausência de espécies orgânicas, produz-se uma corrente constante entre um par de eletrodos em decorrência desse processo de ionização. Contudo, a corrente decresce significativamente na presença de moléculas orgânicas que contêm grupos funcionais eletronegativos, como os OCPs que tendem a capturar elétrons. Estes compostos são detectados com alta sensibilidade. O detector é insensível a grupos funcionais como aminas, álcoois e hidrocarbonetos (SKOOG et al., 2006).

Outro detector utilizado para qualificação e quantificação de OCPs em amostras ambientais é o espectrômetro de massas, a combinação de cromatografia à gás e espectrômetro de massas é conhecido como CG-MS, este detector é conhecido como universal e possui capacidade de distinção entre diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2012; COLLINS et al., 2006).

Devido à esta capacidade de reconhecer compostos com o mesmo tempo de retenção, a MS é considerada uma técnica microanalítica de grande importância, além de ser capaz de elucidar a estrutura dos constituintes de uma amostra (VEGA-BUSTILLOS et al., 2001).

Na espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8}) do sistema do espectrômetro de massas.

No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização. As fontes de ionização para a espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes. As fontes de ionização em CG/MS produzem fragmentos, os quais podem também ser ionizados. Portanto, os íons das moléculas da amostra, denominados íons moleculares, íons de fragmentos e moléculas não-ionizadas, saem da fonte de ionização (SKOOG et al., 2006).

Muitas são as opções de fontes de ionização em espectrometria de massas, dependendo das características dos analitos interesse.

As moléculas não-carregadas e os fragmentos são normalmente extraídos da fonte de íons através de bombas de vácuo empregadas para produzir o ambiente de baixa pressão. A próxima seção do espectrômetro de massas é o estágio analisador. O analisador serve para selecionar os íons de acordo com seus valores massa(m)/carga(z). Os íons separados são então detectados e um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon versus m/z é produzido pelo sistema de dados (SKOOG et al., 2006).

3.7 PLANEJAMENTO FATORIAL

Em decorrência dos grandes avanços da ciência, especialmente na área de química, tem-se verificado a necessidade de uso de ferramentas estatísticas (PEREIRA-FILHO et al., 2002).

Buscando-se otimizar técnicas já existentes, desenvolver novas ou melhorar técnicas de produção foi desenvolvida a otimização de experimentos, que em alguns casos pode ser feita de forma univariada, ou seja é avaliado o efeito de uma variável por vez, esse processo apresenta desvantagens como o tempo gasto na otimização e a falta de avaliação das possíveis interações presentes entre as variáveis que afetam o processo em estudo, impedindo o estabelecimento de ótimos verdadeiros, o que se obtém com sistemas multivariados (CUNICO et al., 2008).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas fatoriais destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

Nesta técnica estão envolvidos k fatores ou variáveis, cada um deles presente em diferentes níveis e para realiza-lo escolhem-se as variáveis a serem estudadas e fazem-se experimentos em diferentes níveis, a seguir são realizados experimentos em todas as combinações possíveis para os níveis selecionados, verificando-se ao final o modelo matemático para os fatores e condições estudadas (NEVES et al., 2002; VIEIRA, 1999).

De acordo com NEVES et al. (2002), este tipo de planejamento normalmente é representado por b^k , sendo que k representa o número de fatores e “b” o número de níveis escolhidos (NEVES et al., 2002).

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) é uma ferramenta de otimização baseada nos planejamentos fatoriais que vem sendo utilizada desde 1950 na modelagem de diversos processos, possui as etapas de modelagem e deslocamento, que são repetidas até atingir uma região ótima da superfície estudada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

De maneira geral inicia-se a avaliação utilizando-se um modelo linear em torno das condições habituais do processo. Caso o planejamento em estudo avalie k fatores em 2 níveis, tem-se um planejamento com 2^k experimentos. Pode-se utilizar um ponto central para este exemplo e nesse caso tem-se 3 níveis de cada fator (Figura 15), permitindo avaliar se há ou não falta de ajuste para cada fator, a resposta é estimada pela Equação 2 (TEÓFILO, FERREIRA, 2006; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

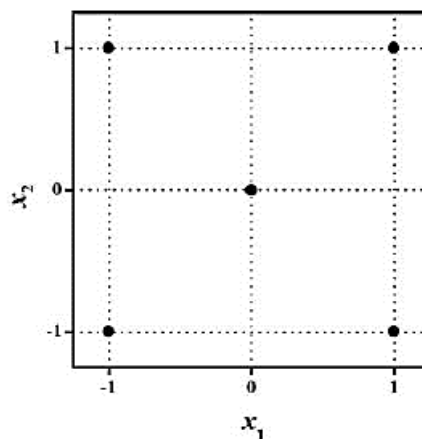


Figura 15 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central
Fonte: TEÓFILO, FERREIRA, 2006.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + e \quad (2)$$

onde:

x_1 e x_2 : fatores variáveis

b_0 : valor populacional de todas as médias obtidas

b_1 e b_2 : coeficientes relacionados às variáveis x_1 e x_2

e : erro aleatório associado ao modelo

A partir do planejamento montado é possível construir a matriz contraste (X) que juntamente com o vetor de respostas y é utilizada para o cálculo dos coeficientes do modelo (TEOFILO, FERREIRA, 2006).

Caso o modelo linear utilizado seja incapaz de descrever os dados, faz-se o uso do modelo quadrático, cuja expressão está representada na Equação 3.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3)$$

Este modelo tem seis parâmetros, sendo uma ampliação do modelo linear, a forma mais comum de fazer essa ampliação é o planejamento em estrela, que adiciona ao planejamento inicial pontos iguais ao original, mas girados em 45° , obtendo-se uma distribuição octagonal, como verificado na Figura 16.

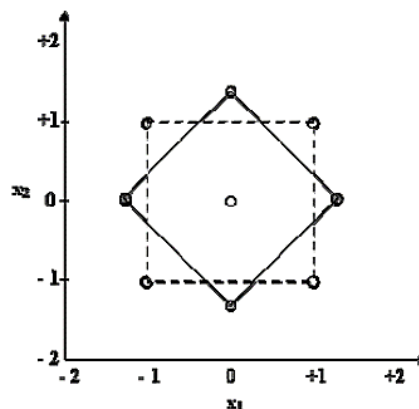


Figura 16 - Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas.
Fonte: MUNARETTO, 2012.

Diversos estudos de otimização vêm empregando como ferramenta durante o desenvolvimento o planejamento fatorial.

Peña, Ruano e Mingorance (2006), desenvolveram um método para determinação de pesticidas em sementes de oliva variando os fatores volume de solvente, massa das sementes de oliva, tempo de sonicação e quantidade de etapas de sonicação em um planejamento completo 2^4 .

Durante a otimização de um método de extração de OCPs em músculo de peixe, Munaretto et al. (2013) utilizaram um planejamento fatorial em estrela variando os fatores massa de sais e volume de água.

Em outro estudo, Chatterjee et al. (2016) otimizaram um método de extração de OCPs em tecidos de peixe, variando os fatores tipo de solvente e de sorvente utilizando análise multivariada.

Em outra pesquisa Friedrich et al. (2016), otimizaram um método de extração de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 com as variáveis tipo de agitação, sais utilizados na partição e sorventes utilizados no clean up.

3.8 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

De maneira geral quando são empregados métodos analíticos que sofreram modificações ou que foram desenvolvidos é necessária a etapa de validação deste método, garantindo assim que este método é adequado para o fim destinado a ele (HARRIS, 2012)

Devido à possibilidade da presença de vários pesticidas e seus metabólitos, ou outros componentes contaminantes de origem sintética ou natural, torna-se impossível especificar um único procedimento analítico que determine satisfatoriamente o resíduo de um pesticida particular em qualquer substrato. É necessário usar um procedimento validado para a situação ou adaptar e validar um procedimento aceitável para circunstâncias particulares envolvidas, tais como a natureza da amostra e do resíduo e as interferências a serem encontradas (IAL 2008).

Validar um sistema é dar ao mesmo validade, credibilidade e confiança. A validação objetiva principalmente assegurar que o sistema funcione adequadamente dentro das condições de análise para as quais foi validado. Todo sistema apresenta limitações, o importante é conhecer essas limitações e assegurar que o sistema analítico apresente o desempenho adequado (KAZUSAKI et al., 2012).

No Brasil diversos órgãos produziram guias para normatizar a validação, entre eles a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), com a resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2011) com o documento DOQ-CGCRE-008 de 2011. No âmbito internacional

também foram produzidos guias como da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1995), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 2002) e SANCO (2013).

A validação deve se referir a um "sistema de análise" ao invés de um "método analítico", o sistema de análise que compreende o protocolo de um método, numa gama de concentração definida para o analito, e um tipo especificado de material de teste (IUPAC, 2002).

Segundo FDA (2015) e BRASIL (2003), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação e exatidão adequados à análise, além do efeito matriz.

3.8.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração do analito (INMETRO, 2011).

A resposta que um determinado método bioanalítico apresenta para as diversas substâncias presentes em uma amostra é definida como seletividade, enquanto que a especificidade se baseia na habilidade que um determinado método apresenta em responder a uma única substância de interesse dentre outras presentes na amostra (CASSIANO, et al., 2009).

Como há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas um analito o termo seletividade é mais adequado (VESSMAN et al., 2001).

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (WHO, 2016).

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2011).

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou

medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (KAZUSAKI et al., 2012).

A seletividade garante que determinado pico se refere ao analito interesse e caso ela não seja assegurada, a linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidas (BRASIL, 2003).

3.8.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (WHO, 2016).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011)

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica (US-FDA, 2001).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é (Equação 3):

$$y = a + bx \quad (3)$$

sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2011).

Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é

estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (CHUI et al., 2001).

A BRASIL (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2011) um valor acima de 0,90.

3.8.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20 (RIBANI et al., 2004).

A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações:

$$s = \sqrt{\frac{(Xi - \bar{X})^2}{N-1}} \quad (4)$$

$$DPR(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (5)$$

Onde x_i é o valor individual de uma determinação, $\bar{x}$ é a média aritmética das determinações, N é o número de determinações e s o desvio entre as determinações.

A precisão pode ser avaliada através da repetibilidade (precisão intra-corrida) que verifica a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste, sendo aceitável realizar adição de padrão na amostra para avaliar esta figura de mérito (WHO, 2016).

3.8.4 Exatidão e Recuperação

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (WHO, 2016).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa (CASSIANO et al., 2009).

A ICH (1995) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (BRASIL, 2003). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (CASSIANO, et al., 2009).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (GARP, 1999).

3.8.5 Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas e deve ser 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (KAZUSAKI et al., 2012).

O LOD pode ser determinado baseado em parâmetros da curva analítica, como segue;

$$LOD = 3,3x \frac{s}{S} \quad (6)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (RIBANI, 2004).

O LOD também é normalmente, na área de cromatografia, calculado com base na relação do sinal com o ruído, este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a

relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras.

Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (GARP, 1999).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Pode-se adotar os mesmos critérios de LOD para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LOQ, a partir da equação (RIBANI et al., 2004):

$$LOQ = 10x \frac{s}{S} \quad (7)$$

3.8.6 Efeito matriz

Outro fator a ser avaliado durante a validação de um método analítico é o efeito matriz (EM). É realizado pois a matriz de amostra pode conter componentes que interferem com o desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de seletividade. As interferências podem aumentar ou diminuir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (GUIDI et al., 2015).

O EM é mais pronunciado em amostras complexas, como tecidos animais. Destaca-se como principal fator o sistema de injeção. Quando as soluções padrão, que serão utilizadas para obtenção da curva analítica são preparadas em solvente puro e analisadas em CG, os sítios ativos do insertor (*liner*) estão disponíveis para a retenção dos analitos, sendo assim, uma menor quantidade de analitos será detectada. Diferentemente ao se analisar o extrato da matriz com os analitos adicionados há uma competição por esses sítios ativos do insertor (Figura 17).

Assim ao comparar-se as respostas obtidas dos analitos adicionados em extrato da matriz àqueles adicionados em solvente puro, há uma superestimação dos resultados (PINHO et al., 2009).

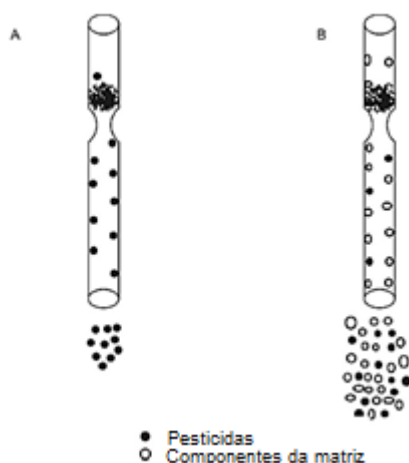


Figura 17 - Possíveis adsorções que ocorrem na superfície do insertor e da lâ de vidro. A. Analitos em solvente. B. Analitos adicionados ao extrato da matriz.

Fonte: Pinho, 2009.

Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do insertor (PINHO et al., 2009). Diferentes amostras, extratos e concentrações da matriz podem exibir diferentes níveis de EM. Quando não há efeito matriz significativo, a curva padrão pode ser preparada diretamente em solvente (THOMPSON et al., 2002). Se um EM for detectado, as curvas analíticas devem ser preparadas no extrato da matriz. Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser usados para estudar esse efeito (GUIDI et al., 2015).

A determinação de EM é algo relativamente recente na química analítica, sendo a pesquisa publicada por Erney, Gillespie e Gilvydis (1993) com análise de organofosforados em leite e manteiga por CG a primeira a estudar sistematicamente o EM. A partir deste momento novas pesquisas foram realizadas com o intuito de estudar o EM em diferentes matrizes.

Devido a complexidade de algumas matrizes, especialmente as de origem animal como o peixe, a determinação do EM é crucial. Munaretto et al (2013) durante o desenvolvimento de um método de extração avaliaram a presença de EM em músculo de peixe, obtendo valores expressivos de EM.

Outros autores também avaliaram o efeito matriz em tecido de peixe e outras matrizes alimentares, como Yarita, Aoyagi e Otake (2015), Chatterjee et al (2016) e Uclés et al. (2017), obtendo também valores altos de EM. Ambos os autores sugerem realizar uma saturação do sistema, como demonstrado na Figura 17b, ou preparo da curva analítica em extrato da matriz.

3.9 AVALIAÇÃO DE RISCO PARA SAÚDE

Um dos critérios a se avaliar após a determinação de compostos orgânicos em tecidos animais é o quanto a contaminação por esses compostos pode prejudicar a saúde do consumidor. Dados de poluentes acumulados em peixes não indicam somente o quanto o ambiente está contaminado, mas também indicam a transferência de poluentes através da cadeia trófica (GOBAS et al. 1999).

Avaliar o risco para a saúde humana causado pela exposição a substâncias químicas na dieta é amplamente reconhecido como um processo fundamental no desenvolvimento de padrões alimentares seguros, sendo que o risco pode ser definido como a probabilidade de um efeito adverso ocorrer em um organismo, sistema ou (sub)população causado sob condições específicas pela exposição a um agente (WHO, FAO, 1997).

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura estimados para o homem estão a IDA, também chamada de dose de referência pelo USEPA, esse parâmetro representa a quantidade da substância presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde (WHO, FAO, 1997).

Relacionado ao IDA pode-se calcular para avaliar o efeito da contaminação na dieta de consumidores a avaliação da exposição ou também chamada ingestão diária estimada (EDI) que é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos via alimento, bem como a exposição de outras fontes, se relevante (JARDIM e CALDAS, 2009).

Para um estudo preliminar de risco (HQ) pode-se comparar os dados de HQ obtidos com um padrão estabelecido pela Health Canadá (Health Canada, 2004) que para um $HQ \leq 0.2$ pode-se considerar que o risco é negligenciável e quando o valor de HQ exceder o valor citado anteriormente, há necessidade de uma avaliação de risco detalhada (HEALTH CANADA, 2004).

De maneira geral diversos autores ao determinar a contaminação por OCPs em produtos alimentares fazem uso deste critério relacionado à saúde do consumidor. Chang (2017) avaliou amostras de tecidos de peixe na Tailândia, obtendo valores de EDI inferiores aos valores de IDA estabelecidos pela FAO e WHO (1995), sendo segundo o autor as amostras consideradas seguras, mesmo apresentando contaminação por alguns OCPs.

Em outro estudo Barakat, Khairy e Aukaily (2016) avaliaram amostras de tecido de peixe de um lago no Egito e verificaram valores de IDE acima dos valores de IDA estabelecidos pela FAO e WHO (1995), concluindo que os níveis de OCPs dos peixes que habitam o lago em estudo constituiriam um risco potencial para a saúde do ser humano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA “BRANCO”

Em todas as etapas da otimização utilizou-se músculo de Tilápia (*Oreochromis niloticus*). As amostras foram coletadas em ambiente preservado onde a ausência dos analitos alvo foi verificada (Figura 18), sendo esta denominada de matriz branco.

Antes de serem sacrificados os indivíduos foram anestesiados com benzocaína (0,01%) em água. O sacrifício foi realizado por meio de seção na medula espinhal (YAMAMOTO et al. 2016).

O músculo dos indivíduos coletados foi separado e triturado em processador até obter uma amostra homogênea. Após processada, a amostra foi mantida em freezer em uma temperatura de cerca de -10°C até o momento da utilização.

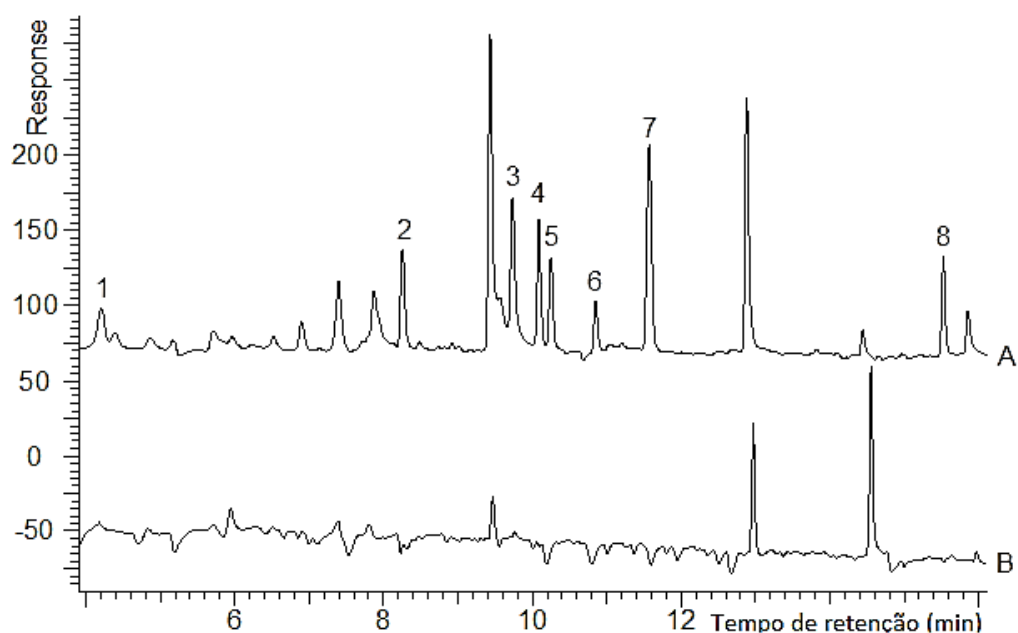


Figura 18 – Cromatogramas do extrato da matriz “branco”, adicionado de padrões analíticos (A) e sem a adição de padrões (B). Notas. Componentes: 1. 2,4,5,6- Tetracoloro – m- xylene (substituição), 2. Aldrin, 3. α -Endosulfan, 4. p,p-DDE, 5. Dieldrin, 6. β - endosulfan, 7.p,p- DDT, 8. Decachlorobiphenyl (substituição).

4.2 PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO (SURROGATE)

No presente trabalho utilizou-se os padrões de substituição

Decachlorobiphenyl e 2,4,5,6-Tetrachloro-m-xylene em todas as etapas de otimização, com a finalidade de avaliar as modificações realizadas no método de extração. A seleção destes compostos foi realizada com base nas recomendações apresentadas no método 8081b da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2007).

Soluções iniciais destes compostos foram preparadas em acetona grau HPLC na concentração de 10 mgL⁻¹. A partir destas soluções estoque individual preparou-se uma solução que continha os dois compostos na concentração de 1,0 mgL⁻¹, sendo essa a solução de trabalho.

Em todas as etapas os padrões de substituição foram adicionados, objetivando obter no extrato final uma concentração equivalente a 200 µgKg⁻¹.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Preparou-se individualmente cada padrão sólido e/ou líquido, levando-se em consideração a pureza dos mesmos, em acetona grau HPLC em uma concentração de 100 mgL⁻¹.

A partir destas soluções estoque individuais preparou-se uma mistura contendo todos os compostos em uma concentração de 10 mgL⁻¹ e a partir dessa solução foram preparadas as soluções analíticas de trabalho nas concentrações 5; 10; 25; 50; 100; 200 e 400 µgL⁻¹, as quais foram utilizadas para avaliar a linearidade do método.

Na Tabela 3 são apresentados os padrões analíticos utilizados no presente estudo bem como seu grau de pureza, fórmula química, número de registro CAS, entre outras informações. Todos os padrões utilizados neste estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich.

Tabela 3 – Características dos compostos utilizados neste estudo

Nome comum	Fórmula	MM	CAS	Pureza (%)	Classe
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,9	309-00-2	97,0	Inseticida
DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0	3424-82-6	99,0	Produto de degradação
DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,5	50-29-3	99,0	Inseticida
α-endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,9	959-98-8	96	Inseticida
β-endosulfan	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,9	19670-15-6	96	Inseticida

Fonte: adaptado de Munaretto, 2012. Nota: MM: massa molecular.

4.4 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE OCPs

Foram utilizados diferentes métodos de extração para definição de alguns parâmetros iniciais (EUROPEAN STANDARD, 2008; USEPA 3550b, 1996; USEPA 3660c, 2007 e NORLI et al., 2011). Os parâmetros iniciais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros iniciais utilizados para a otimização do método de extração.

Parâmetros	Valor (característica) de partida
Quantidade de amostra	5 gramas
Tipo de solvente	Acetonitrila
Quantidade de solvente	3 porções de 50 mL
Quantidade de etapas de sonicação	3
Sais utilizados na extração	NaCl*, NaSO ₄ * e MgSO ₄ *
Sorventes	PSA, C18 e MgSO ₄

Fonte: EUROPEAN STANDARD, 2008; USEPA 3550b, 1996; USEPA 3660c, 2007. Nota: * Massa utilizada variou conforme massa da amostra e volume de solvente (1º etapa).

O objetivo inicial da otimização era minimizar a utilização de amostra e solvente com etapas simples que envolvessem o mínimo de equipamentos complexos. Optou-se pelo uso durante a etapa de extração/partição da sonicação. A sonicação é um procedimento que aumenta o contato da amostra com o solvente extrator.

Inicialmente as variáveis quantidade de amostra, tipo de solvente extrator e de sorvente foram avaliadas através de um planejamento fatorial completo 2³ em triplicata. A Tabela 5 apresenta matriz do planejamento fatorial 2³.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo 2³

Experimento	Quantidade de amostra (g)	Tipo de solvente	Tipo de sorvente
1	0,5	Hex:Acet 1:1 v/v	PSA:C18
2	2,5	Hex:Acet 1:1 v/v	PSA:C18
3	0,5	Acetonitrila	PSA:C18
4	2,5	Acetonitrila	PSA:C18
5	0,5	Hex:Acet 1:1 v/v	Florisil
6	2,5	Hex:Acet 1:1 v/v	Florisil
7	0,5	Acetonitrila	Florisil
8	2,5	Acetonitrila	Florisil

Nota: para 0,5 gramas de amostra: Florisil (0,02 g); C18:PSA (0,005g +0,015g) para 2,5 gramas de amostra: Florisil (0,1g) e C18:PSA (0,025 +0,075).

Fonte: Os autores.

O objetivo deste primeiro planejamento foi selecionar o solvente e o sorvente mais promissores, bem como definir a quantidade de amostra necessária para a extração.

Após estas definições, avaliou-se os cromatogramas obtidos. Verificou-se que alguns dos interferentes mais significativos presentes no extrato eram derivados lipídicos. Optou-se então por realizar um novo planejamento em que a quantidade de C18 foi variada, com o objetivo de isentar ao máximo o extrato de interferentes lipídicos.

O segundo planejamento fatorial realizado foi um completo 2^3 com a adição de ponto central, sendo realizado em triplicata. Nele avaliou-se além da quantidade de C18 a quantidade de solvente extrator e o número de etapas de sonicação. A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento 2^3 com a adição de ponto central.

Tabela 6 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com a adição de ponto central

Experimento	Quantidade de solvente (mL)	Quantidade de etapas de sonicação	Quantidade de C18 (g)
1	10	3	0,03
2	5	3	0,03
3	10	1	0,03
4	5	1	0,03
5	10	3	0,01
6	5	3	0,01
7	10	1	0,01
8	5	1	0,01
9	7,5	2	0,02
10	7,5	2	0,02
11	7,5	2	0,02
12	7,5	2	0,02

Fonte: Os autores.

Ao se avaliar os resultados obtidos neste segundo planejamento, verificou-se a necessidade de realizar um deslocamento dos dados. O objetivo dessa etapa foi atingir uma maior amplitude nos níveis estudados quanto às variáveis quantidade de C18 e quantidade de solvente extrator. Assim, um novo planejamento 2^2 com ponto central, em estrela foi realizado, conforme verifica-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Matriz do planejamento 2² com com ponto central em estrela

Experimento	Quantidade de solvente (mL)	Quantidade de sorvente (g)
1	5	0,01
2	10	0,01
3	5	0,03
4	10	0,03
5	7,5	0,02
6	7,5	0,02
7	7,5	0,02
8	7,5	0,02
9	4	0,02
10	7,5	0,035
11	11	0,02
12	7,5	0,006

Fonte: Os autores.

Ao se avaliar os resultados obtidos no terceiro planejamento, foi possível através de análises de gráficos de superfície de resposta e do cálculo de valores críticos chegar aos parâmetros propostos no item 4.5.

4.5 MÉTODO PROPOSTO

Após as etapas de otimização descritas no item 4.4, obteve-se um método QuEChERS + ultrassom + d- SPE. Após a amostra ser adequadamente triturada e homogeneizada em um processador de alimentos Philco, pesou-se 0,5 g da mesma em balança analítica (SHIMADZU modelo AY 220) e adicionou-se 100µL de solução dos padrões de substituição no interior de um tubo de polipropileno (tubo Falcon) mantendo-o em uma temperatura de 8°C por um período de 12 horas.

Após este período, 9,2 mL de uma solução dos solventes acetona:hexano (1:1 v/v) é acrescentada ao tubo de polipropileno, realizando-se agitação manual por um período de 1 min. Em seguida adiciona-se ao mesmo tubo 2 g de Na₂SO₄ e novamente realiza-se agitação manual por um período de 1 min, acrescentando sequencialmente 4 g de MgSO₄ juntamente com 1g de NaCl.

Faz-se então uma agitação em vórtex (Biomixer, modelo QL-901) por um período de 1 minuto seguida de sonicação (Banho de ultrassom USC 2800- Unique) por um período de 10 minutos em potência máxima sucedida por uma centrifugação (Ultracentrífuga Refrigerada Hitachi Modelo Himac-CR21GII) por um período de 10

minutos a 4000 rotações por minuto e temperatura de 4°C.

Após a centrifugação, retira-se todo o sobrenadante e rotaevapora-se (Rotaevaporador QUIMIS Q-344B1) o mesmo à temperatura ambiente até secura completa, ressuspendendo-se os compostos extraídos em 2 mL de acetona:hexano (1:1 v/v). Este volume é adicionado a outro tubo de polipropileno contendo 0,1g de PSA, 0,023g de C18 + 0,4g MgSO₄. Após nova agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação a 4°C e 5000 rotações por minuto por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um *vial* com auxílio de um filtro de nylon (0,2µm) e seguiu para a análise cromatográfica. A figura 19 apresenta um fluxograma do método otimizado.

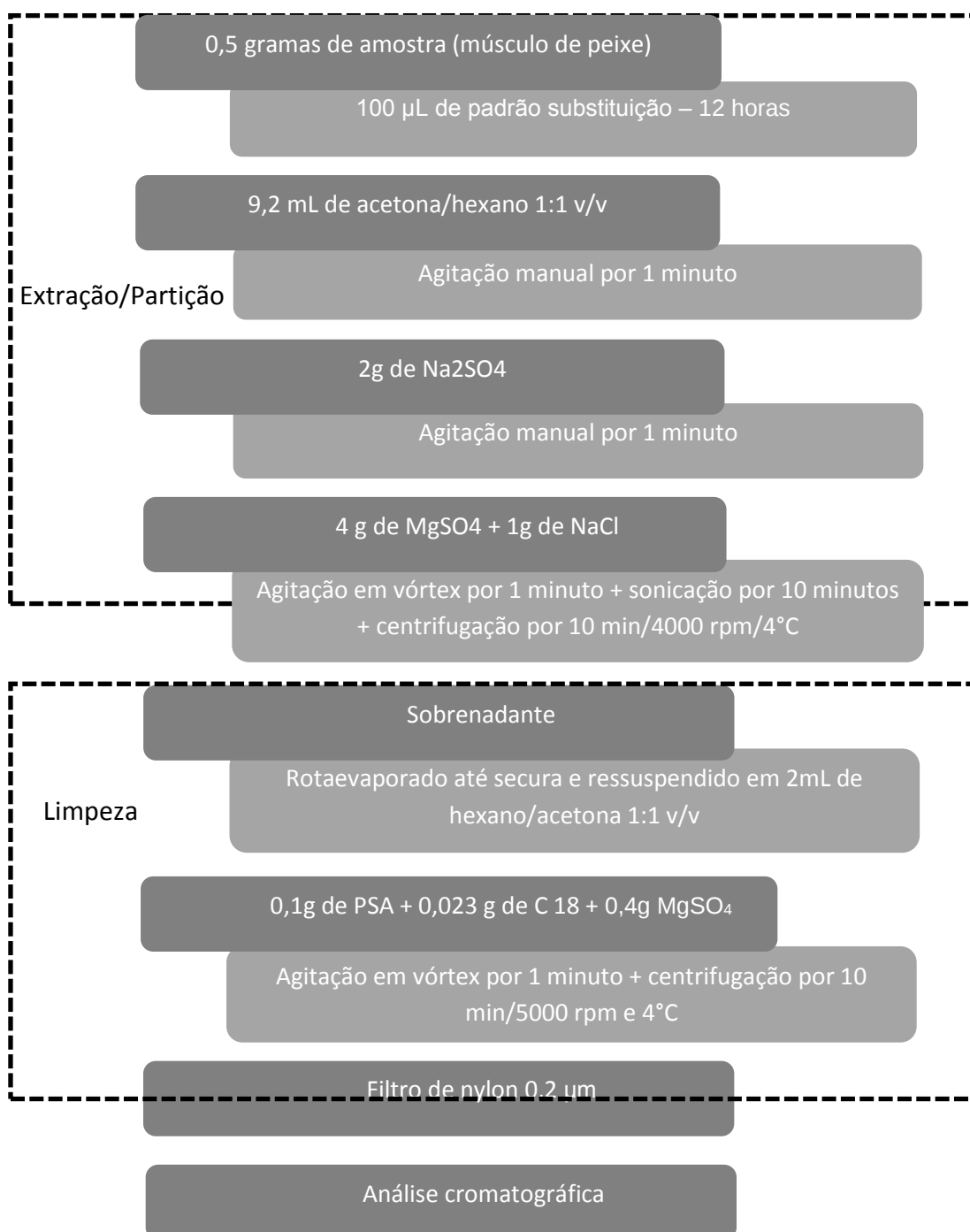


Figura 19 – Método otimizado
Fonte: Os autores.

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Os requisitos de desempenho para assegurar a adequação do método otimizado foram devidamente validados utilizando os parâmetros estabelecidos por IUPAC (2002), ANVISA (BRASIL, 2003), INMETRO (2011) e SANTE/11945/2015. Essas normativas foram selecionadas em decorrência de se tratar de órgãos internacionais e nacionais de importância na área de validação química.

Para a validação além dos padrões substituição Decachlorobiphenyl e 2,4,5,6-Tetrachloro-m-xileno, também foram adicionados à matriz padrões dos OCPs (Aldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α -endosulfan e β -endosulfan).

Os requisitos avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, precisão, exatidão e efeito matriz.

4.6.1 Linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi verificada utilizando-se injeções de soluções padrão preparadas em extrato da amostra (acetona:hexano 1:1 v/v), conforme indicado no item 4.5 nas concentrações 5; 10; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As curvas foram preparadas e injetadas no sistema cromatográfico 5 vezes, a partir dos resultados obtidos foi possível calcular a média da área de cada analito, obtendo-se sequencialmente a regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2) a fim de determinar a linearidade do método para cada analito.

Adicionalmente o modelo linear foi avaliado quanto a sua validade utilizando-se o suplemento *Action* do software Excel. Através da análise de variância fez-se a validação do modelo linear obtido para cada um dos analitos em estudo comparando-se a média quadrática da regressão com a média quadrática dos resíduos, através da expressão:

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} \quad (8)$$

No qual: MQreg: média quadrática da regressão e MQres: média quadrática dos resíduos. Quanto maior for essa razão apresentada na equação 8, melhor será

o modelo obtido (PIMENTEL e NETO, 1996).

Em sequência fez-se a avaliação da falta de ajuste do modelo utilizando-se o mesmo software. Comparou-se a relação entre as médias quadráticas da falta de ajuste e dos resíduos com o valor *f* de Fisher-Snedecor ($f_{v_{fav}, v_{ep}}$) e quando o valor obtido entre a relação das médias quadráticas foi menor que o valor da estatística *f*, considerou-se que o modelo não apresentava falta de ajuste (RIBANI et al., 2004).

4.6.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados à partir da relação sinal ruído (*signal/noise*) obtido através da análise de injeções sucessivas na menor concentração ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Os softwares utilizados neste estudo, nos diferentes GCs forneciam a relação sinal ruído para o cromatograma analisado e com base nesse valor calculou-se os limites de detecção e quantificação. O limite de detecção é aquela concentração que produzia uma relação sinal-ruído superior a 3:1 e o limite de quantificação àquela que produzia uma relação sinal-ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003).

4.6.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada através de injeções no sistema cromatográfico (GC-MS) do extrato da matriz branco, ou seja, extrato sem os analitos em estudo e de uma amostra fortificada com os analitos.

Foi realizada uma comparação entre os cromatogramas obtidos e dos espectros de massa, afim de evitar uma coeluição entre os analitos e os interferentes da matriz, garantindo a pureza.

4.6.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, fortificando a amostra branco com os analitos em estudo nas concentrações de 10; 25 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, seguindo o processo de extração otimizado, o processo foi realizado em triplicata. A exatidão foi calculada utilizando-se a expressão apresentada na Equação 9 (INMETRO, 2011).

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \times 100 \quad (9)$$

No qual: *C*₁: concentração experimental e *C*₂: concentração teórica.

4.6.5 Precisão

A precisão na determinação dos analitos em estudo foi avaliada por meio da análise de extratos de amostra adicionados dos analitos nas concentrações 10, 25 e 50 μgkg^{-1} . As leituras foram realizadas em triplicata e o coeficiente de variação (CV%) foi calculado, conforme expressão apresentada na Equação 10 (INMETRO, 2011).

$$DPR(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (10)$$

Na qual: $\bar{x}$ é a média aritmética das determinações e s o desvio padrão entre as determinações.

4.6.6 Efeito matriz (EM)

Avaliou-se o efeito matriz por meio de duas curvas analíticas, uma em extrato da amostra e outra em solvente. Para isso, comparou-se as áreas de pico dos analitos adicionados na matriz pós-extração, com as correspondentes áreas de pico dos mesmos analitos solubilizados em solvente acetona grau CG nas concentrações que variaram entre 5 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$ (SANTE, 2015). As análises foram realizadas em triplicata e com os valores das áreas foi possível calcular a porcentagem de aumento da resposta cromatográfica (Equação 11) (PINHO et al., 2010; CHATTERJEE et al., 2016).

$$\% = \frac{(a_{\text{matriz}} - a_{\text{solvente}})}{a_{\text{solvente}}} * 100 \quad (11)$$

Onde: a_{matriz} é a área do analito adicionado na matriz e a_{solvente} é a área do analito adicionado no solvente.

Verificou-se também o efeito matriz (EM%) relacionando-se a inclinação das curvas obtidas, através da Equação 12 (PIZUTTI et al., 2007).

$$EM(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} * 100 \quad (12)$$

Onde: X_1 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto estudado, preparadas na matriz (músculo de peixe) e X_2 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto estudado, preparadas em acetona grau GC.

Após obter as curvas foi possível calcular uma função de correção do efeito matriz para os analitos em estudo utilizando a Equação 13 (CHATTERJEE et al., 2016; PINHO et al., 2009).

$$X_{pm} = AX_{ps} + B \quad (13)$$

Onde: X_{pm} = concentração do padrão preparado em extrato da matriz; X_{ps} = concentração do padrão preparado em solvente; A= relação entre os coeficientes angulares e B= relação entre os coeficientes lineares.

4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO EM AMOSTRAS REAIS

Com o objetivo de avaliar o método proposto, amostras de tecido de peixe foram analisadas em triplicata. Três amostras de músculo de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e 3 amostras de músculo de Lambari (*Astyanax* sp), adquiridas em supermercados da cidade de Ponta Grossa, Estado do Paraná, Brasil.

Com o mesmo objetivo, espécimes de Lambari (*Astyanax altiparanae*) foram coletados na Represa de Alagados, no mês de setembro de 2017, época de seca, de acordo com o manual técnico da CETESB (2011).

Os peixes foram capturados em rede de espera malha 1, sendo a rede disposta em um único ponto no reservatório, indicado na Figura 19 (latitude 25° 01'03" S e longitude 50° 02' 08" W) onde há casas e agricultura às margens.

Quatorze espécimes de *Astyanax altiparanae* (Lambari) contendo ovas foram coletados, adicionados em um recipiente contendo solução aquosa de benzocaína a 0,01% e antes de serem sacrificados através de seção na medula espinhal, as massas dos indivíduos foram aferidas, suas dimensões determinadas, seus tecidos (músculo, vísceras e ovas) separados, resfriados a 8°C e encaminhados para o laboratório para resfriamento à -20°C até o momento da análise.

A bacia hidrográfica de Alagados está localizada na região de Campos Gerais, no sudeste do Paraná, quase que inteiramente no primeiro planalto (24 ° 52 ' S/50 ° 06 ' W), e é fonte de água de três cidades da região de Campos Gerais no sul do Brasil: Ponta Grossa, Castro e Carambeí (VOIGT et al 2014) (Figura 20).

É considerado um dos principais recursos hídricos do estado, tem aproximadamente 15 km de comprimento, uma largura média de 500 m, e sua

profundidade varia de 15 m próximo a barragem e entre 2 e 5 m na área restante (IAP, 2009).

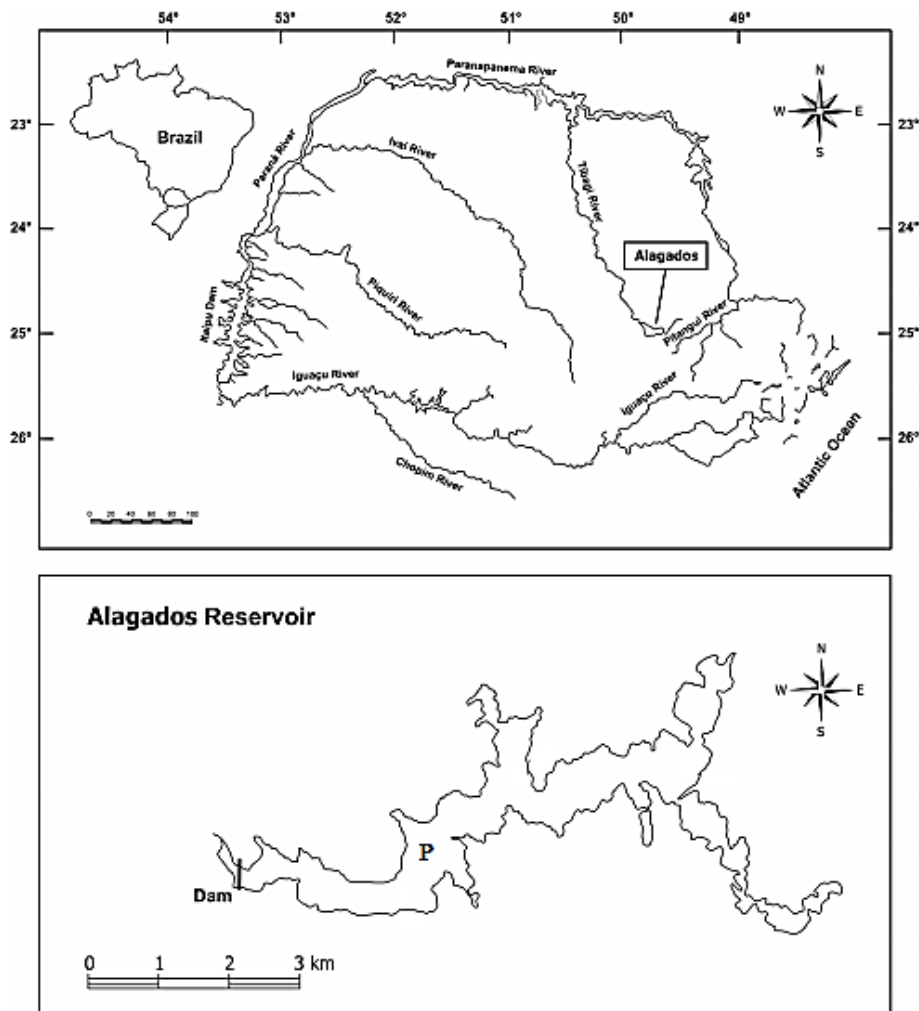


Figura 20 - Mapa da represa de Alagados com o destaque ao local de coleta das amostras (P) e sua localização no estado do Paraná, Brasil, com as coordenadas geográficas 24° 52' to 25° 05' S e 49° 46' to 50° 06' W.

Fonte: Adaptado de Doria et al., 2017.

4.7.1 Extração dos OCPs

A extração dos OCPs dos tecidos foi realizada conforme método otimizado neste estudo, descrito no item 4.5. Para tal, três porções de 0,5 gramas de amostra úmida de cada tecido, por indivíduo, ou seja sem a necessidade de “pool”, foram extraídos para determinação da concentração dos pesticidas organoclorados Aldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α -endosulfan β -endosulfan em todas as amostras e Dieldrin somente nas amostras coletadas na Represa de Alagados.

4.8 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS OCPS

As análises cromatográficas foram realizadas nos laboratórios: Complexo de Laboratórios Multiusuários (CLABMU-UEPG), Laboratório de análises de combustíveis e Biocombustíveis (LACBIO-UEPG) e Laboratório de Saneamento Ambiental e Qualidade da Água (UNICENTRO).

Para a realização da otimização do método desenvolvido foram utilizados dois equipamentos de cromatografia a gás. Um dos equipamentos possui um espectrômetro de massas (GC-MS – Perkin Elmer - Clarus 680) e foi utilizado no início do estudo para confirmação dos tempos de retenção e ao final durante a etapa de validação para avaliação da especificidade/sensibilidade.

Este GC é acoplado a um detector de massas (SQ8), single quadrupolo, utilizando o hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min⁻¹, a temperatura do injetor foi mantida a 250°C, a fonte de ionização por impacto de elétrons em 70 Ev e 250°C. A análise foi realizada no modo *Full Scan* em uma amplitude de massa de 50 a 500 Da.

Outro equipamento contendo um detector de captura de elétrons (GC-ECD - Perkin Elmer - Clarus 580) foi utilizado nas demais etapas da otimização. Este GC é acoplado a um detector de captura de elétrons que possui uma fonte radioativa de Ni-63. A temperatura do injetor foi mantida a 300°C e do detector em 320°C, utilizando o nitrogênio como gás de arraste com um fluxo de 2 mL min⁻¹ e make-up de 30 mL min⁻¹.

Finalmente um terceiro equipamento contendo um detector de captura de elétrons (GC - ECD - Shimadzu GC-2014) foi utilizado para analisar as amostras coletadas para aplicação do método. Este GC é acoplado a um detector de captura de elétrons que possui uma fonte radioativa de Ni-63. A temperatura do injetor foi mantida a 300°C e do detector a 320°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 2 mL min⁻¹ e o fluxo de make-up foi de 30 mL min⁻¹.

O volume de injeção nos três equipamentos foi de 1 µL em modo *splitless*, com temperatura de injeção programada. Para ambos os casos se utilizou a mesma coluna cromatográfica, coluna capilar DB-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano) com dimensões 30m x 0,25mm com 0,25µm de espessura de filme e o mesmo programa de temperatura do forno.

O programa de temperatura do forno iniciou em 150° C, depois aumentou para 310° C a 10 ° C min⁻¹ e manteve-se nessa temperatura durante 10 min.

4.9 AVALIAÇÃO DE RISCO

Para avaliar o risco potencial que o consumo de peixe contaminado por OCPs pode gerar para a saúde, foi calculada a ingestão diária estimada (EDI) com base nas concentrações médias de exposição (WHO / FAO, 1987). Este cálculo foi realizado com os percentis 50th e 95th das concentrações obtidas, usando:

$$EDI = C * \left(\frac{FR}{BW}\right) \quad (14)$$

onde C é a concentração média medida de pesticidas organoclorados (ng g⁻¹ ww), FR é a taxa diária estimada de consumo de peixe (g d⁻¹) e BW é o peso corporal hipotético médio (kg) definido em 60 kg para adultos (OMS, 2012). Uma taxa de consumo diário de 49,31 g d⁻¹ por pessoa foi assumida com base no consumo local de peixe (ANTONUCCI et al., 2017).

O risco para os seres humanos através da exposição a contaminantes através de um único caminho foi avaliado usando a abordagem do quociente de risco (HQ) (USEPA, 1991):

$$HQ = \frac{EDI}{ADI} \quad (15)$$

Onde ADI é a ingestão diária aceitável (tolerável) (US EPA, 1991), assumindo ser uma concentração segura para a exposição ao longo da vida. Para avaliação preliminar de risco quantitativo, um HQ ≤ 0,2 indica efeitos adversos insignificantes para a saúde, como resultado da exposição, enquanto valores de HQ que ultrapassam este limiar exigem uma avaliação de risco detalhada adicional ou realização de medidas de gerenciamento de riscos (HEALTH CANADA, 2004).

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Para avaliar a significância dos dados durante a otimização do método desenvolvido o software Statistica v 12.6 foi utilizado. Os parâmetros foram testados quanto à significância ao nível de 95% de confiança.

A avaliação da linearidade foi realizada utilizando o suplemento *Action* do software Excel.

A análise de variância foi utilizada para comparar as médias das concentrações de OCPs obtidas nos tecidos de peixe avaliados, bem uma comparação e correlação entre a dimensão e massa dos indivíduos, estes dados foram analisados utilizando o protocolo do modelo linear geral no software Statistica v 12.6. Para avaliar as diferenças e semelhanças estatísticas foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,01$).

Uma análise de componentes principais foi realizada utilizando o software Pirouette versão 4.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE OCPS EM MÚSCULO DE PEIXE

5.1.1 Otimização da quantidade de amostra, tipo de solvente extrator e sorvente

A primeira etapa de otimização foi o planejamento 2^3 completo, avaliando as variáveis quantidade de amostra e tipos de sorvente e solvente. A partir dos cromatogramas obtidos e recuperações calculadas foi possível avaliar os efeitos estimados de cada variável.

A Figura 21 apresenta os efeitos estimados das variáveis investigadas a partir dos resultados obtidos na primeira etapa da otimização.

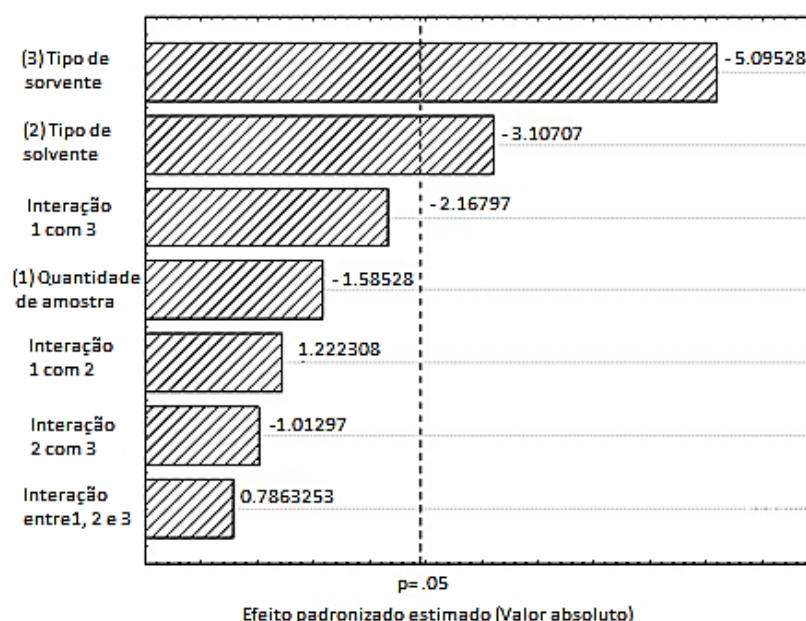


Figura 21 – Efeitos estimados obtidos na primeira etapa de otimização (2^3).
Fonte: Os autores.

Os resultados apresentados na Figura 21 evidenciam que as variáveis com efeito significativo (95% de confiança) foram o tipo de solvente (2) e de sorvente (3) e que os mesmos apresentam as melhores taxas de recuperação quando ajustados no nível menor (-1), ou seja, quando se utiliza a mistura de acetona:hexano 1:1 (v/v) e o sorvente PSA:C18. Na Figura 22 é apresentada uma superfície de contorno que relaciona os efeitos das variáveis tipo de solvente e tipo de sorvente.

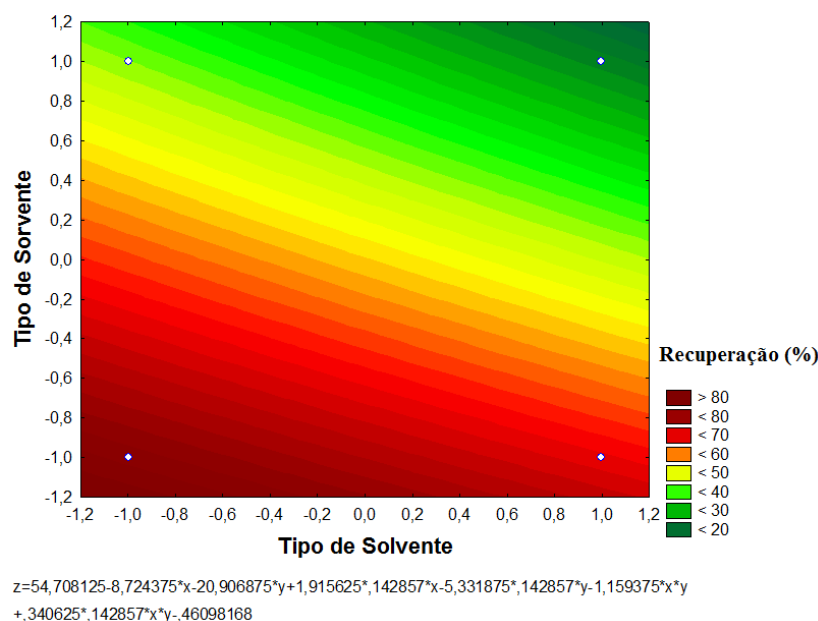


Figura 22 – Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do primeiro planejamento 2³, relacionando as variáveis tipo de solvente e tipo de sorvente.
Fonte: Os autores.

Como se visualiza na Figura 22, há uma tendência que relaciona os tipos de solvente e sorvente. Verifica-se que as maiores recuperações, representadas pelas cores mais escuras, são obtidas nos níveis inferiores para os dois fatores.

A mistura acetona:hexano possui diversas características adequadas ao seu uso como solvente na extração de OCPs. Esta mistura possui a solubilidade de Hildebrand semelhante à dos analitos, ou seja, os analitos são solubilizados facilmente nesses solventes o que favorece sua extração nas matrizes estudadas (VILLA et al, 2011).

Esta mistura de solventes é aplicada principalmente na extração de compostos apolares pois, possui pressão de vapor e ponto de ebulição considerados adequados para sistemas de injeção em GC e são compatíveis com etapas de limpeza que utilizam sorventes sólidos como a d-SPE (MATOVSKA e LEHOTAY, 2004).

Devido à essas características, a mistura acetona:hexano foi empregada satisfatoriamente em outros métodos de extração de OCPs em tecido de peixe (WITCZAK e AGNIESZKA, 2011).

Na etapa d-SPE, o tipo de sorvente também é um fator relevante no desenvolvimento de um método de preparo de amostra. O sorvente PSA possui um efeito quelante, ligando-se aos compostos como ácidos graxos livres e açúcares presentes na amostra. O PSA forma ligações de hidrogênio com compostos

contendo grupos hidroxí ou carboxí, retirando-os do extrato (CHATERJEE et al., 2016).

Já o C18 é um sorvente com características estruturais que promovem sua interação com compostos apolares nas amostras. O C18 é muito utilizado na remoção de interferentes em amostras com teor de gordura acima de 2% (LEHOTAY, 2007).

A mistura PSA:C18 vem sendo muito empregada na extração de compostos orgânicos em tecido de peixe (CHATERJEE et al., 2016; CABRERA et al., 2012; WILKOWSKA e BIZIUK, 2011 e LEHOTAY, 2007).

Devido às características dos sorventes citadas, pode-se afirmar que o método QueChERS empregando ultrassom com etapa d-SPE propicia uma adequada separação de interferentes de diferentes classes presentes em tecidos de peixe.

Verifica-se ainda na Figura 21 que a variável quantidade de amostra (1) não apresentou efeitos significativos ao nível de 95%. Estatisticamente fica evidenciado que, independentemente da quantidade de amostra utilizada na extração, os resultados de recuperação obtidos serão semelhantes, o que indica que a menor quantidade de amostra (0,5 gramas) avaliada pode ser empregada.

Na Figura 23 é apresentada uma superfície de contorno que relaciona as variáveis tipo de solvente e quantidade de amostra. Nesta figura é demonstrado que a variável quantidade de amostra não influencia de maneira significativa na obtenção dos resultados de recuperação dos analitos.

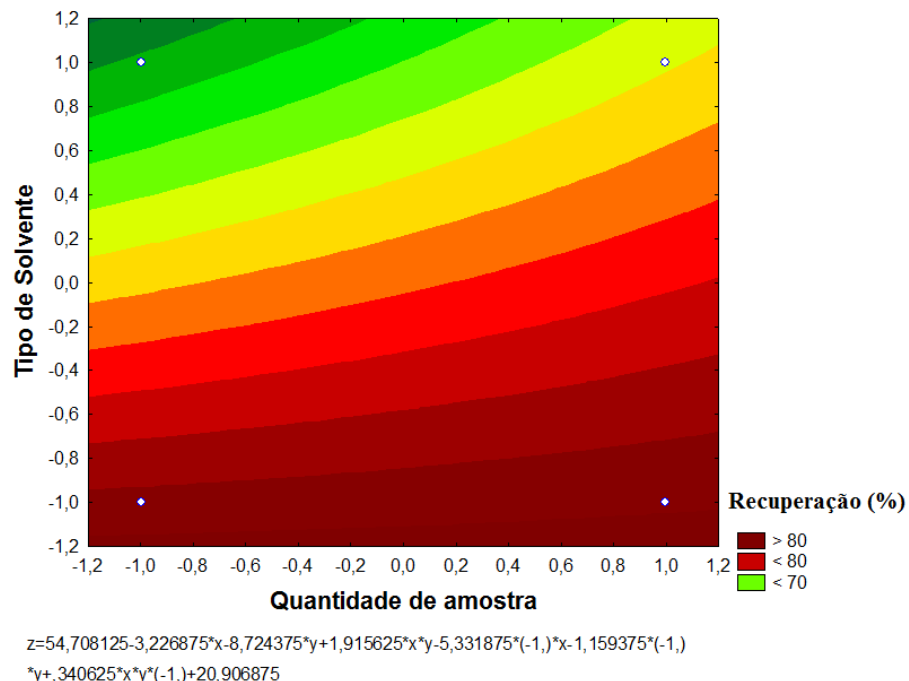


Figura 23 - Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do primeiro planejamento 2³, relacionando as variáveis tipo de solvente e quantidade de amostra.
Fonte: Os autores.

Essa insignificância estatística da variável quantidade de amostra pode ser justificada pela utilização do ultrassom durante a etapa de extração. O ultrassom proporciona um contato mais eficiente entre a amostra e os solventes extratores, aumentando a penetração deste na amostra e a solubilidade e difusividade dos analitos nos solventes (BIDARI et al., 2011 e PENA et al., 2006), sendo assim mesmo em pequenas quantidades de amostra, obtêm-se resultados satisfatórios de recuperação.

Niell e colaboradores (2015) em um estudo em que o objetivo era avaliar a extractabilidade de analitos lipofílicos presentes em amostras com altos teores de gorduras, concluíram que ao se aumentar a massa de amostra, a recuperação destes compostos é minimizada. Analitos como o DDT e DDE possuem uma forte tendência a permanecer na matriz, devido seu alto valor de log K_{ow} (6,91 e 6,36 respectivamente) (NIELL et al., 2015).

A minimização da quantidade de amostra também proporciona uma extração de menores quantidades de co-extrativos, como, por exemplo, os lipídios (CHATERJEE et al., 2016).

A quantidade de tecido de peixe utilizado na extração de OCPs é fator discrepante em diversas técnicas apresentadas na literatura. A maioria destas

emprega quantidades entre 2,5 gramas (MOLINA-RUIZ et al., 2015) e 25 gramas (EZEMONYE et al., 2015). Quantidade esta superior à massa total de indivíduos de certas espécies (YAMAMOTO et al., 2016).

Modificações em métodos de extração como as obtidas neste estudo podem assegurar a determinação de OCPs em espécies com pequena massa corporal, sem a necessidade de realização de agrupamento de amostras (*pool*).

O *poll* é uma estratégia utilizada em muitos casos em que se tem pequena massa de amostra, no entanto, quando utilizada pode ocultar a variância e atribuir uma falsa confiança em relação à significância dos dados (ZHANG e GANT, 2005).

Diante dos resultados obtidos nesta primeira etapa da otimização a quantidade de amostra foi fixada em 0,5 gramas e foram selecionados a mistura acetona:hexano e PSA/C18 para continuidade dos estudos de otimização da etapa de preparo de amostra.

5.1.2 Otimização da quantidade de etapas de extração, de solvente extrator e C18

Após as definições obtidas no primeiro planejamento, buscou-se otimizar a quantidade de solvente extrator, número de etapas de extração e a quantidade de C18. A Figura 24 apresenta os efeitos estimados das variáveis investigadas a partir dos resultados obtidos na segunda etapa da otimização (2^3 com ponto central).

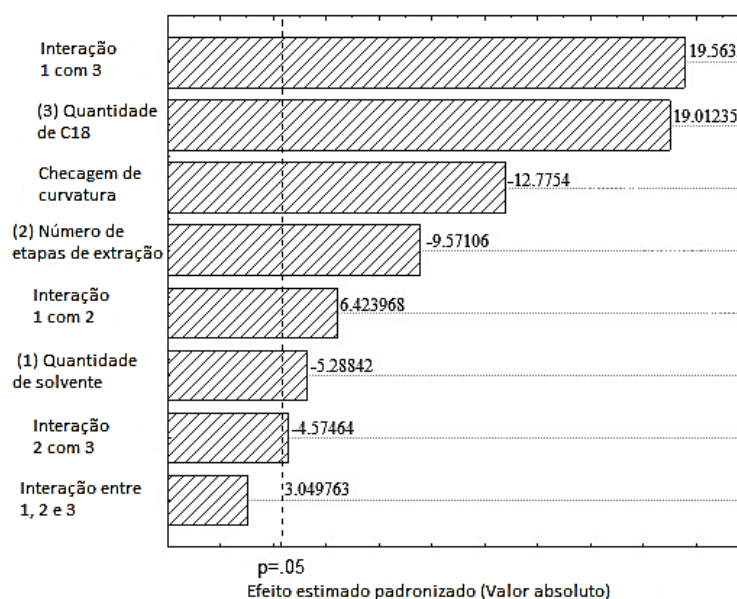


Figura 24 – Efeitos estimados obtidos na segunda etapa de otimização (2^3 com ponto central).
Fonte: Os autores.

Verifica-se na Figura 24 que as variáveis quantidade de solvente (1) e número de etapas de extração (2) apresentaram efeito significativo (95%) no nível inferior (5mL e uma etapa de extração, respectivamente).

Na Figura 25 tem-se a superfície de contorno que relaciona os efeitos das variáveis quantidade de etapas de extração e quantidade de solvente.

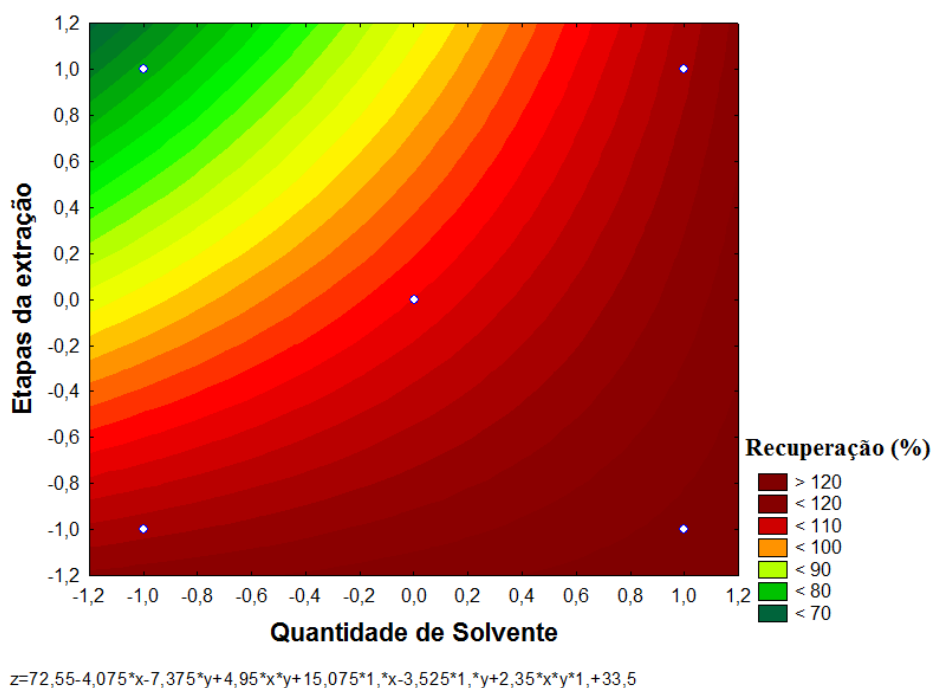


Figura 25 - Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do segundo planejamento 2^3 , relacionando as variáveis quantidade de solvente e quantidade de etapas de extração.
Fonte: Os autores.

Como se evidencia na Figura 25 os níveis da variável quantidade de solvente têm pouca interferência nos resultados obtidos, pois independentemente do nível obteve-se recuperações próximas a 100%.

A variável quantidade de C18 (3) apresentou efeito significativo no nível superior, ou seja, 0,03 g de C18 (Figura 24). Nota-se também um significativo efeito de interação (quantidade de solvente com quantidade de C18), sendo este positivo, indicando que quando a quantidade de C18 for maior (0,03g), um maior volume de solvente faz-se necessário.

A maioria dos trabalhos que empregam a extração por ultrassom o fazem em duas (SUN et al., 2015) ou três etapas (AKOTO et al., 2016). No entanto, esta necessidade de um maior número de etapas de sonicação consome tempo e maior

volume de reagentes, algo minimizado neste estudo onde apenas uma etapa de sonicação foi necessária.

Nesta etapa da otimização verificou-se que 0,01 gramas de C18 não são suficientes para a adequada separação de interferentes apolares em tecido de peixe.

A Figura 26 apresenta os cromatogramas do extrato da matriz obtido utilizando diferentes quantidades de C18.

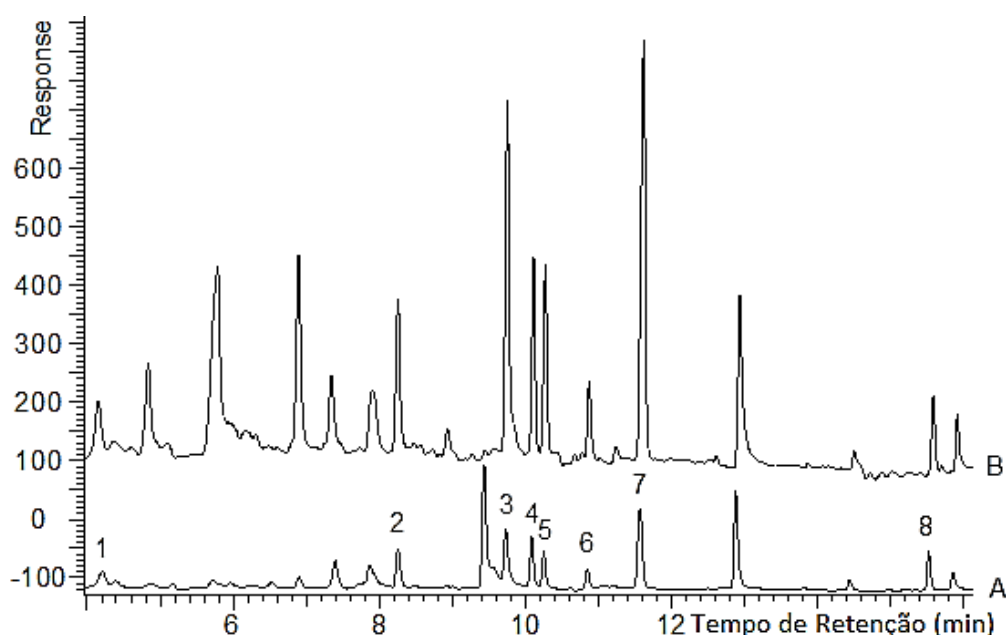


Figura 26. Cromatogramas de extratos de amostra obtidos utilizando C18.

Notas: A: com 0.03g de C18. B: com 0.01g de C18. Componentes: ¹. 2,4,5,6- Tetraclo-ro – m- xylene (surrogate), ². Aldrin, ³. α -Endosulfan, ⁴. p,p-DDE, ⁵. Dieldrin, ⁶. β - endosulfan, ⁷.p,p- DDT, ⁸. Decachlorobiphenyl (surrogate). As amostras apresentadas na figura foram dopadas em diferentes concentrações. Fonte: Os autores.

Na Figura 26 A-B, comprova-se que a maior massa de C18 adicionada propicia uma limpeza do extrato mais efetiva, diminuindo interferentes, como por exemplo, o ácido oleico e colesterol, compostos estes que possuem tempos de retenção muito próximos aos tempos de retenção dos analitos em estudo (MUNARETTO et al.,2013).

Ao se avaliar o efeito de interação significativo, apresentado na Figura 24, em que um maior volume de solvente é necessário em maiores massas de C18, fez-se necessária uma terceira etapa de otimização (deslocamento), ampliando os níveis dos fatores quantidade de C18 e quantidade de acetona:hexano 1:1(v/v), através de um planejamento 2² em estrela com ponto central.

Através do teste estatístico ANOVA, verificou-se que este terceiro planejamento pode ser considerado significativo, tendo um r de 0,9513, sendo o experimento explicado pelo modelo em um nível de 0,8904, além disso, o modelo foi validado, verificando-se uma variação inferior a 5% entre os valores preditos pelo modelo e os observados.

Na Figura 27 é apresentada uma superfície de contorno desta etapa da otimização.

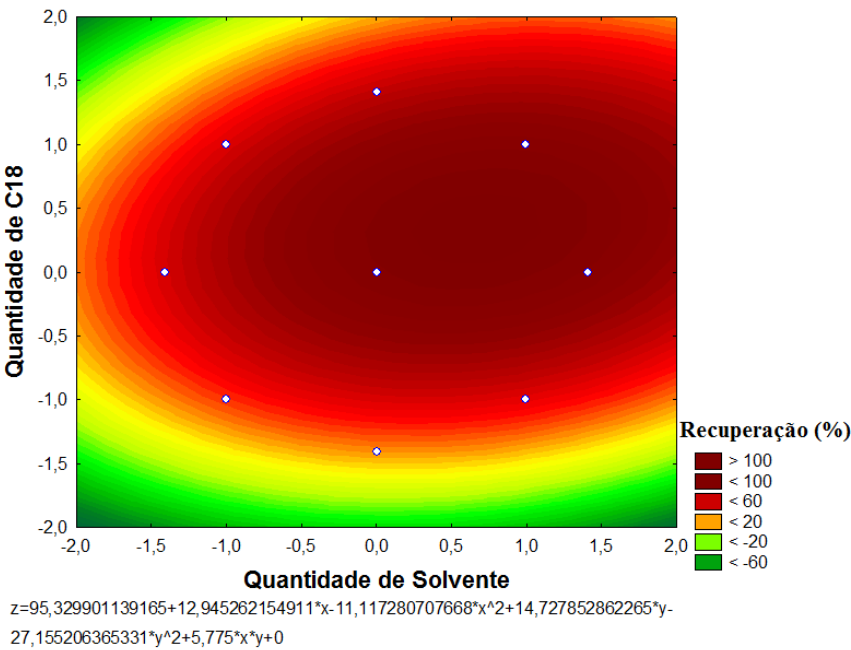


Figura 27 – Superfície de contorno obtida com os dados de recuperação do terceiro planejamento 2², em estrela com ponto central relacionando as variáveis quantidade de solvente e quantidade de C18. Fonte: Os autores.

Avaliando-se a superfície de contorno apresentada na Figura 27 verificou-se que as maiores recuperações obtidas encontraram-se próximas ao ponto central. Na Tabela 8 são apresentados os valores críticos do planejamento.

Tabela 8 - Valores críticos obtidos na otimização do método de extração em estudo.

Fator avaliado	Nível otimizado
Quantidade de amostra	0,5 gramas
Tipo de solvente de extração	Acetona:hexano (1/1 v/v)
Tipo de sorvente	PSA: C18
Quantidade de etapas de extração (sonicação)	1
Quantidade de sorvente	0,1 gramas (PSA) e 0,023g (C18)
Quantidade de solvente	9,2 mL

Fonte: Os autores.

Na Tabela 8 verificam-se os parâmetros do método QuEChERS com ultrassom e d-SPE desenvolvido neste trabalho que tem como características utilizar uma pequena massa de amostra (0,5 gramas), com uma mistura de solventes (acetona:hexano 1:1 v/v) favorável à utilização em sistemas cromatográficos (MATOVSKA e LEHOTAY, 2004).

Nestas condições foi possível otimizar o método para a realização da extração em uma única etapa. As características do ultrassom, aliadas às características do QuEChERS viabilizam a realização de várias extrações de maneira simultânea, além de possibilitar um menor consumo de amostra.

A determinação do volume de solvente próximo de 10 mL vai de encontro ao relatado por Niell e colaboradores em 2014. Segundo os autores quantidades inferiores a 10mL de solvente propiciaria uma menor recuperação dos analitos apolares, como os OCPs, pois os mesmos teriam uma maior interação com a matriz. Os autores verificaram que 10 mL de solvente eram necessários para se obter recuperações satisfatórias empregando 2 gramas de amostra.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Após a otimização, o método foi submetido a validação analítica.

5.2.1 Linearidade

As Tabelas 9 e 10 apresentam os dados dos coeficientes de determinação (r^2), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) para as equações da curva analítica preparadas em solvente e em extrato da matriz.

Tabela 9 - Valores de r^2 , coeficiente angular, coeficiente linear para as curvas analíticas preparadas em solvente e faixa linear para cada OCP estudado

Analito	r^2	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aldrin	0,998	3042,5	- 18373	5 - 200
p,p'-DDT	0,957	5828,1	- 180420	5 - 400
p,p'-DDE	0,988	6512,2	- 129622	5 - 400
α -endosulfan	0,982	4935,7	-122520	5 - 400
β -endosulfan	0,965	734,12	- 11975	5 - 200

Fonte: Os autores.

Tabela 10 - Valores de r^2 , coeficiente angular, coeficiente linear para as curvas analíticas preparadas em extrato de matriz e faixa linear para cada OCP estudado.

Analito	r^2	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aldrin	0,994	4809,2	- 59232	5 - 200
p,p'-DDT	0,999	10343	- 65541	5 - 400
p,p'-DDE	0,990	15487	- 341049	5 - 400
α -endosulfan	0,999	7413,6	- 52059	5 - 400
β -endosulfan	0,998	941,75	11478	5 - 200

Fonte: Os autores.

A partir da avaliação das Tabelas 9 e 10 verifica-se que a linearidade para os compostos em estudo foi mais eficiente quando os mesmos foram adicionados em extrato da matriz. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Munaretto et al. (2013) que avaliaram o efeito matriz em análise cromatográfica de extrato de tecido de peixe.

Verifica-se também na Tabela 10 que os valores obtidos de r^2 para todos os analitos adicionados ao extrato da matriz foi acima de 0,99. No caso dos analitos preparados em solvente esses valores estão abaixo do estabelecido como ideal (0.99) pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância, verificação de validade e falta de ajuste das curvas analíticas. Verificou-se que em todos os casos as curvas obtidas apresentaram boa linearidade e não apresentaram falta de ajuste, sendo consideradas adequadas estatisticamente. Portanto pode-se afirmar que o método de determinação apresentou boa linearidade.

5.2.2 Limites de detecção e quantificação

A Tabela 11 apresenta os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos para os analitos estudados.

Tabela 11 - LOD e LOQ dos analitos estudados.

Composto	LOD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
Aldrin	0.24	0.8	200
α -Endosulfan	2.88	9.6	100
B- Endosulfan	1.32	4.4	100
p,p - DDE	2.76	9.2	5000
p,p - DDT	1.2	4	5000

Fonte: LMR: FAO/WHO, 2006, LOD e LOQ: Os autores.

Verifica-se na Tabela 11 que os valores de LOD variaram entre $0,24 \mu\text{gKg}^{-1}$ para o composto Aldrin a $2,88 \mu\text{gKg}^{-1}$ para o composto α -Endosulfan, já os valores de LOQ variaram entre $0,8 \mu\text{gKg}^{-1}$ para o composto Aldrin a $9,6 \mu\text{gKg}^{-1}$ para o composto α -Endosulfan.

Os valores de LOD e LOQ podem ser considerados satisfatórios de acordo com o método otimizado e validado uma vez que são inferiores aos valores de limite máximo de resíduos estipulado por alguns órgãos internacionais para contaminação por esses compostos em tecido animal (FAO; WHO, 2006).

Os resultados aqui apresentados se assemelham aos publicados por Wang et al. (2017) que obtiveram, para os mesmos OCPs, valores de LOD variando entre $1,35 \mu\text{gKg}^{-1}$ e $1,49 \mu\text{gKg}^{-1}$ e valores de LOQ variando entre $4,51 \mu\text{gKg}^{-1}$ e $4,93 \mu\text{gKg}^{-1}$.

Em outro trabalho Molina-Ruiz et al. (2015) obtiveram para o mesmo tipo de matriz e os mesmos analitos valores de LOD que variaram entre $2 \mu\text{gKg}^{-1}$ e $3 \mu\text{gKg}^{-1}$ e valores de LOQ entre $5 \mu\text{gKg}^{-1}$ e $8 \mu\text{gKg}^{-1}$.

5.2.3 Seletividade

Na Figura 28 tem-se dois cromatogramas, em A a matriz com a presença dos analitos em estudo e em B a matriz sem a adição dos analitos em estudo (amostra “branco”).

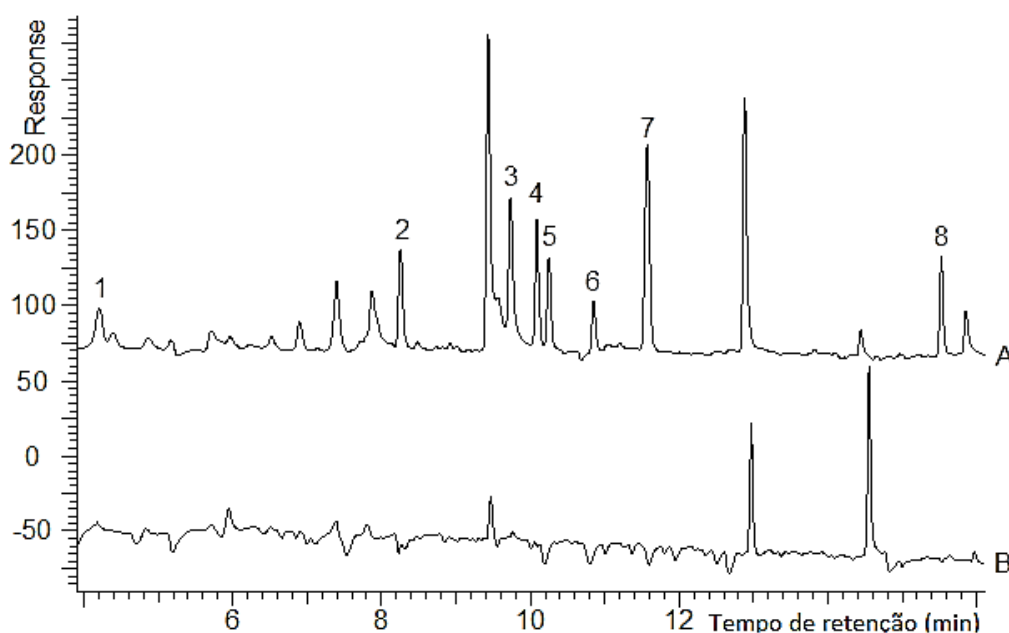


Figura 28 – Cromatogramas do extrato da matriz “branco”, adicionado de padrões analíticos (A) e sem a adição de padrões (B). Notas. Componentes: ¹. 2,4,5,6- Tetracloro – m- xylene (surrogate), ². Aldrin, ³. α -Endosulfan, ⁴. p,p-DDE, ⁵. Dieldrin, ⁶. β - endosulfan, ⁷.p,p- DDT, ⁸. Decachlorobiphenyl (surrogate). Fonte: Os autores.

Avaliando-se a Figura 28 verifica-se que a seletividade do método pode ser considerada adequada, uma vez que não houve coeluição entre os analitos em estudo e entre eles e os interferentes da amostra. Isso foi confirmado pela análise dos espectros de massa (Figuras 29 a 32) de cada um dos picos destacados na Figura 28 A.

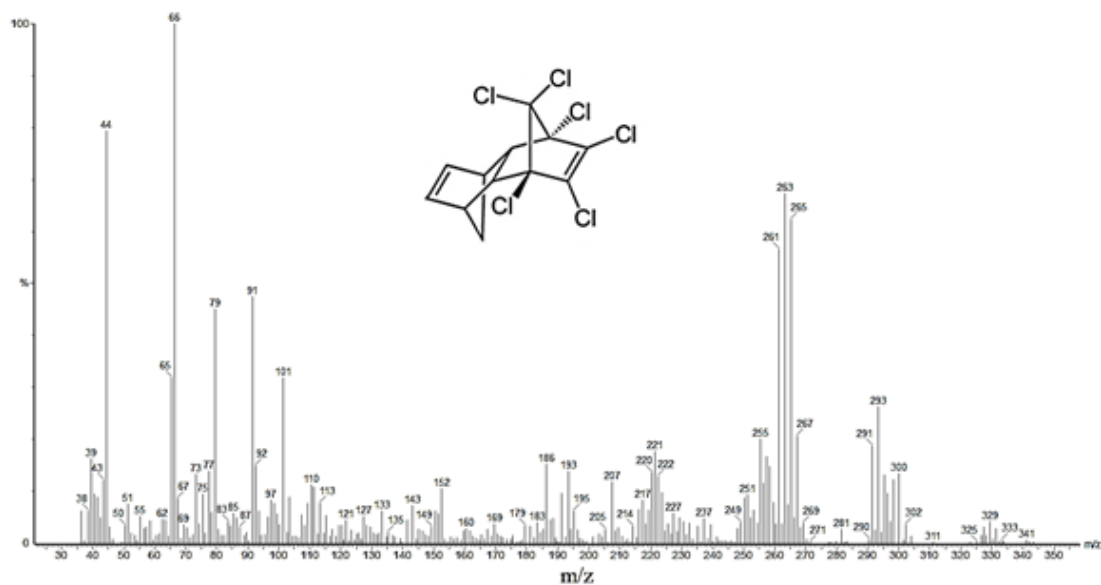


Figura 29 - Espectro de massas do composto Aldrin.
Fonte: Os autores.

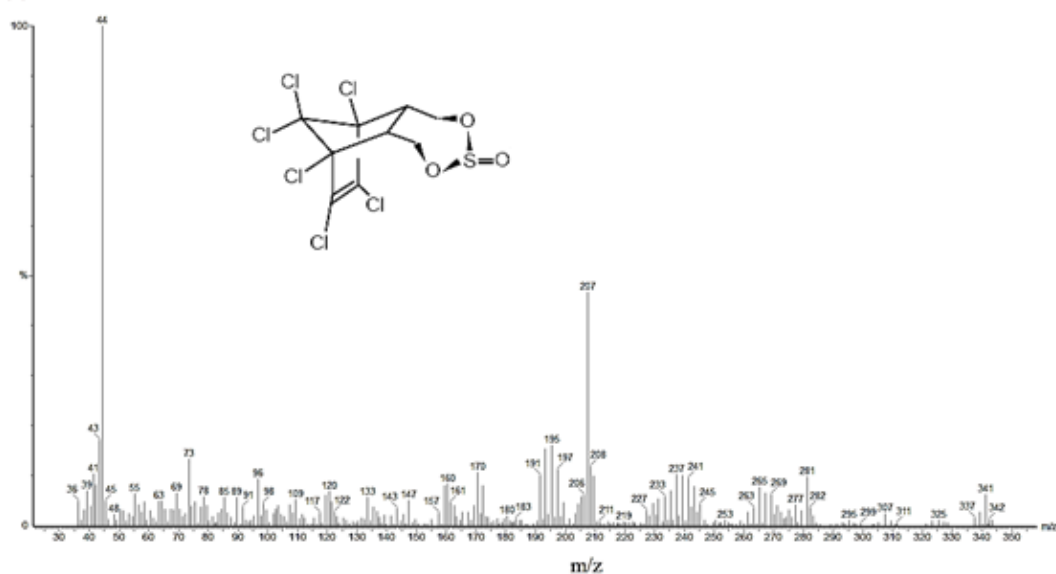


Figura 30 - Espectro de massas do composto Endosulfan.
Fonte: Os autores.

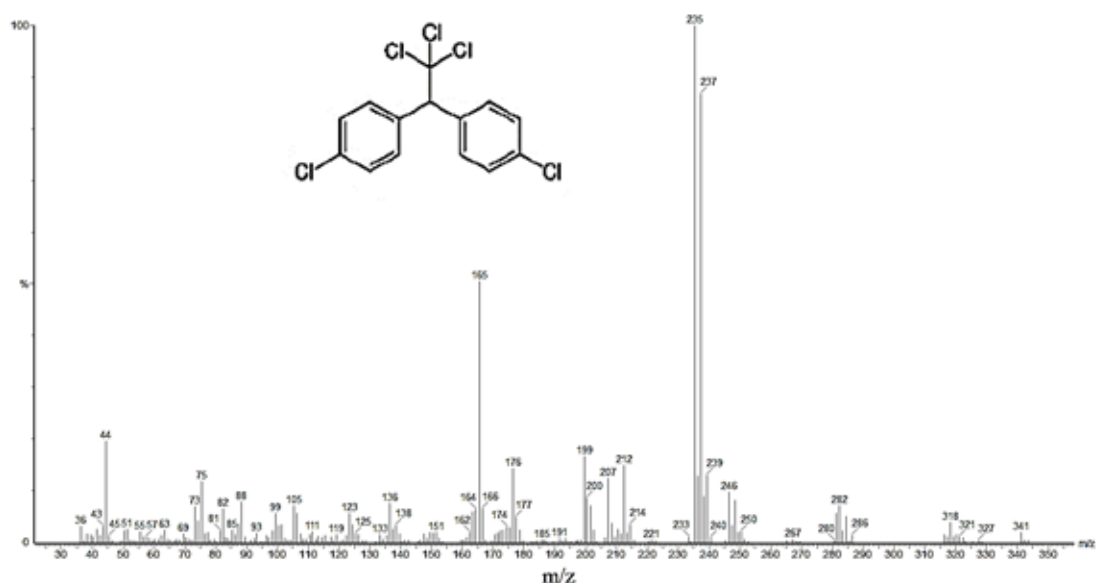


Figura 31 - Espectro de massas do composto p,p'-DDT.
Fonte: Os autores.

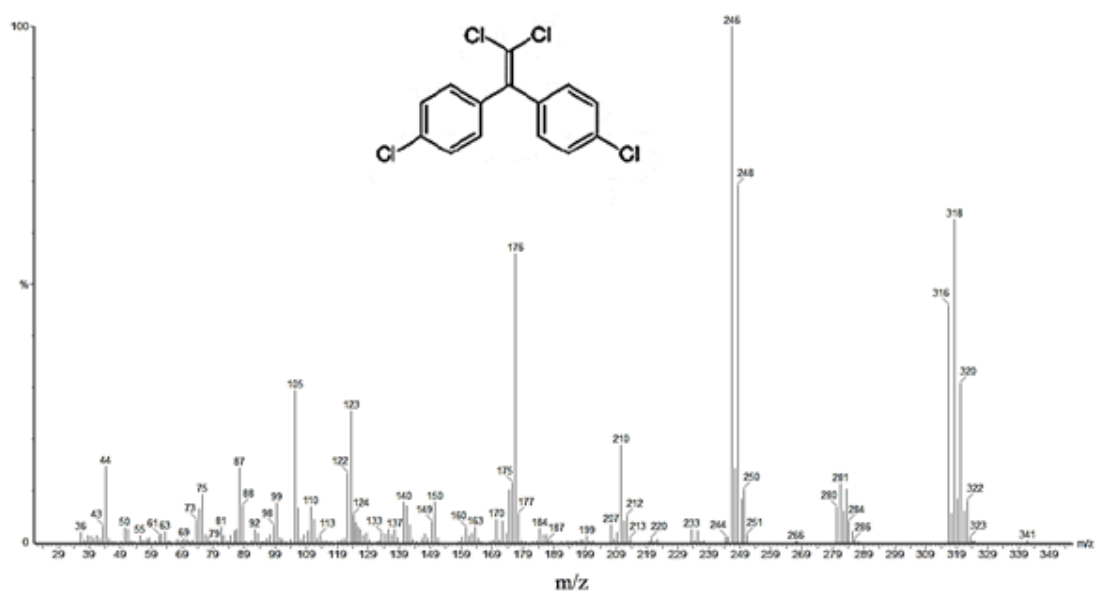


Figura 32 - Espectro de massas do composto p,p'-DDE.
Fonte: Os autores.

Tratando-se de uma amostra complexa a avaliação da seletividade é de suma importância, garantindo que diferentes compostos não apresentavam o mesmo tempo de retenção, fato esse que interferiria no resultado da análise.

Os espectros apresentados nas Figuras 29 a 32 foram obtidos da amostra adicionada dos analitos interesse e garantem a ausência de quaisquer outros interferentes no mesmo tempo de retenção.

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004)

5.2.4 Exatidão (Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

Na Tabela 12 são apresentados os resultados de precisão e recuperação obtidos para os analitos em estudo.

Tabela 12 - Precisão (CV%) e Exatidão (Rec %) dos analitos em estudo nas concentrações 10 µgKg⁻¹, 25 µgKg⁻¹ e 50 µgKg⁻¹

Analitos	10µgKg ⁻¹		25µgKg ⁻¹		50µgKg ⁻¹	
	Rec (%)	CV%	Rec %	CV%	Rec %	CV%
Aldrin	89,3	12,2	92,4	6,5	88,8	3,4
α-Endosulfan	96,5	12,6	90,4	3,4	102,2	3,7
p,p-DDE	90,4	8,9	77,3	6,9	98,6	4,9
β-Endosulfan	108,4	6,7	98,0	5,8	97,2	3,7
p,p - DDT	110,8	10,2	90,6	6,8	96,7	9,3

Fonte: Os autores

Verifica-se na Tabela 12 que os valores de recuperação (Rec%) estiveram entre 77,3% e 110,8%, portanto, dentro do estabelecido na literatura para análise de compostos traço (SANTE, 2017).

Boa precisão em termos de repetibilidade foi observada para todos os analitos com coeficientes de variação entre 3,4% e 12,6%, estando estes valores de acordo com a legislação internacional sobre desempenho de métodos analíticos (SANCO/12571, 2013 e SANTE, 2017). Considera-se, portanto o método adequado quanto à sua exatidão e precisão.

As percentagens de recuperação obtidas neste estudo são semelhantes às apresentadas por Molina-Ruiz et al. (2015), que obtiveram em extrato de tecido de peixe, para os mesmos analitos valores entre 67% e 108% com coeficiente de variação entre 3% e 12%.

Em outro estudo Wang et al., (2017) ao avaliar extrato de tecido de peixe obtiveram valores de recuperação entre 90,1% e 98,8% e coeficiente de variação entre 7,3% e 12,4%, assemelhando-se aos dados obtidos neste estudo.

5.2.5 Avaliação do efeito matriz (EM)

Na Tabela 13 verifica-se o efeito matriz observa para os analitos em estudo em músculo de Tilápia do Nilo.

Tabela 13 - Efeito matriz observado para os analitos em estudo

Composto	Efeito Matriz (%)
Aldrin	58,06
α -Endosulfan	50,2
β - Endosulfan	28,3
p,p' - DDE	137,81
p,p' - DDT	77,46

Fonte: Os autores.

Avaliando-se os dados apresentados na Tabela 13, observa-se que há efeito matriz positivo para todos os compostos estudados, como demonstrado no gráfico representativo da Figura 33.

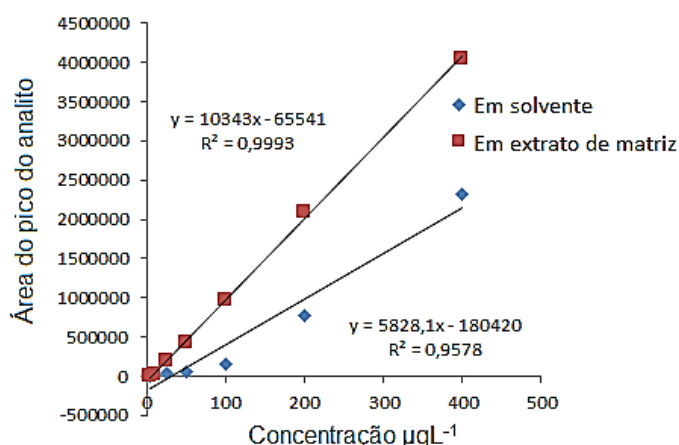


Figura 33. Curvas analíticas em matriz e em solvente do analito p,p'-DDT.
Fonte: Os autores.

Valores de EM entre 10 e 50% indicam aumento moderado do sinal e valores de EM acima de 50% indicam alto aumento do sinal (CHATERJEE et al., 2016). Observou-se aumento significativo do sinal cromatográfico para 80% dos analitos testados e 20% apresentou moderado aumento do sinal cromatográfico.

Resultados semelhantes para os analitos em estudo em tecido de peixe foram reportados na literatura. Munaretto et al, (2013) verificou a ocorrência de efeito matriz na determinação de compostos orgânicos entre eles OCPs em músculo de peixe, obtendo valores que variaram entre -5,6 a 3476%.

Em outro estudo os autores verificaram que quando o analito estudado era um halogenado, como os OCPs, o efeito matriz sempre era positivo. Os autores

concluíram que a provável fonte de efeito matriz são os sítios ativos do *liner* no injetor do GC. Assim, para quantificação dos resíduos, padrões de calibração preparados em extrato da matriz devem sempre ser empregados (CHATTERJEE et al., 2016).

Avaliou-se também o aumento da resposta cromatográfica gerada quando da preparação da curva em extrato da matriz.

Os resultados do aumento da resposta cromatográfica estão apresentados na Figura 34.

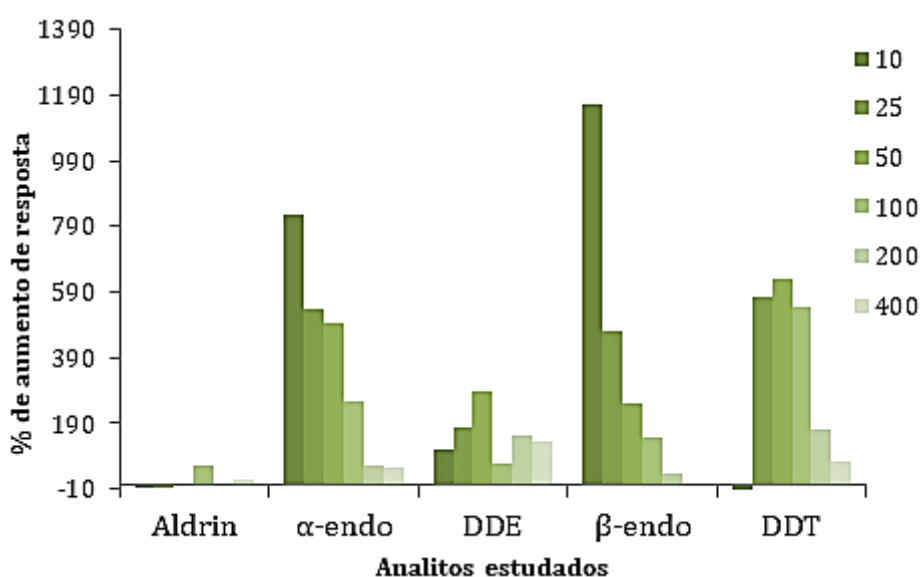


Figura 34 - Porcentagem de aumento da resposta cromatográfica quando o analito é adicionado ao extrato da matriz para obtenção da curva analítica.
Fonte: Os autores.

Verifica-se na Figura 34 que quanto maior a concentração do analito na curva analítica, menor o aumento da resposta cromatográfica. Afere-se, portanto, que o efeito matriz é mais significativo quando os analitos estão em concentrações mais baixas.

Nessa situação quando injetada a solução padrão dos analitos preparados em solvente puro, em baixa concentração, uma quantidade expressiva é retida na interface do *liner*, conseqüentemente uma pequena quantidade do analito é detectada (PINHO, 2009).

Quando os extratos são analisados apenas uma pequena parte dos analitos é retida. Isso ocorre porque a proporção de componentes matriz/analitos é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Alguns compostos, se

preparados em solvente puro para obtenção da curva analítica, podem ainda ser degradados termicamente durante a injeção (PINHO, 2009), sendo o ideal seu preparo em extrato da matriz.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO EM AMOSTRAS REAIS

A aplicação do método proposto consistiu na análise de amostras comercializadas em supermercados da cidade de Ponta Grossa, Paraná e de amostras coletadas na represa de Alagados em Ponta Grossa, Paraná.

Os resultados foram obtidos em um GC-ECD. Na Figura 35 é apresentado um cromatograma representativo desta etapa.

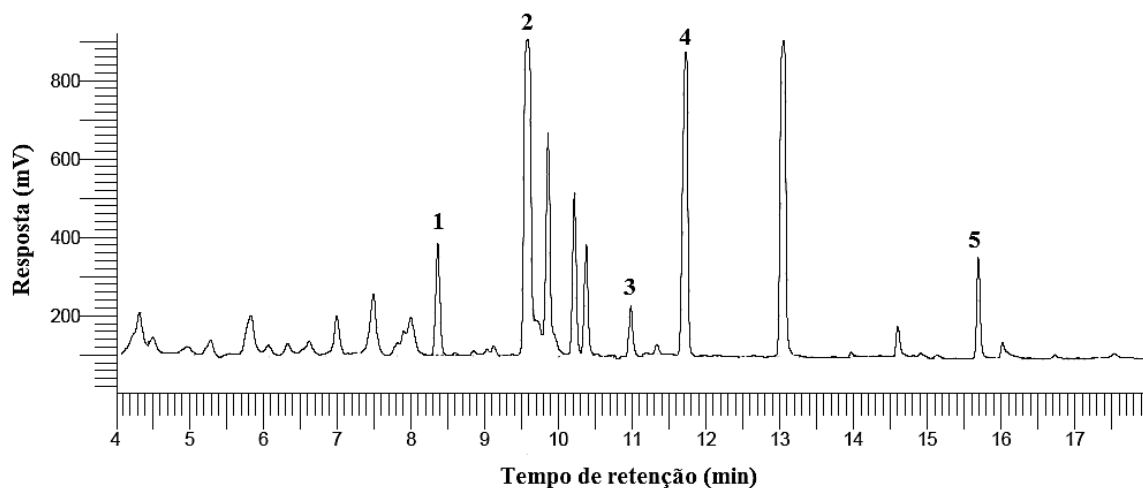


Figura 35 – Cromatograma representativo de uma das amostras analisadas durante a aplicação do método desenvolvido. Nota: 1. Aldrin; 2. α -endosulfan; 3. p,p'-DDE; 4. β -endosulfan e 5. p,p'-DDT. Fonte: Os autores.

A Tabela 14 apresenta os valores de contaminação obtidos em GC-ECD dos OCPs estudados em amostras de músculo de Tilápia e Lambari comercializados na cidade de Ponta Grossa.

Tabela 14 - Concentração dos OCPs em estudo em amostras de músculo de Tilápia e Lambari comercializados em Ponta Grossa, Paraná.

	A ¹ (µgKg ⁻¹)	A ² (µgKg ⁻¹)	D ³ (µgKg ⁻¹)	B ⁴ (µgKg ⁻¹)	D ⁵ (µgKg ⁻¹)
T1	<LD	417.6±11.7 ^a	19.4± 2 ^b	44.8±11 ^b	6.0±0.3 ^a
T2	9.0±2.1 ^a	371.5±8.7 ^a	12.8± 4.5 ^b	447.8±41.25 ^a	6.7±1.3 ^a
T3	14.3±11.6 ^a	249.8±8.9 ^b	68.0±4.5 ^a	389.5±19.5 ^a	4.0±2.9 ^a
L1	<LD	202.2±1.4 ^b	74.7±4 ^a	331.0±4.2 ^a	5.7±0.6 ^a
L2	<LD	199.5±1.9 ^b	12.3± 4.9 ^b	21.9±1.5 ^b	7.1±0.9 ^a
L3	12.7±4 ^a	247.3±2.6 ^b	17.3± 2.5 ^b	144.5±4.6 ^b	10.4±2.2 ^a
LMR	200	100	5000	100	5000

Nota: T: músculo de Tilápia, L: músculo de Lambari. 1, 2 e 3: indivíduos analisados. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% através do teste de Scott Knott. ¹. Aldrin ². α-Endosulfan. ³. p,p-DDE, ⁴. β-Endosulfan, ⁵. p,p-DDT. Fonte LMR: FAO, WHO, (2006).

Conforme pode-se verificar na Tabela 14, as amostras de músculo de Tilápia analisadas pelo método proposto apresentaram contaminação por Aldrin (9,0 a 14,3 µg/Kg⁻¹), α-endosulfan (249,8 a 417,7 µgKg⁻¹), β-endosulfan (44,8 a 447,8 µgKg⁻¹), p,p'-DDE (12,8 a 68 µgKg⁻¹) e p,p'-DDT (4,0 a 6,7 µgKg⁻¹).

Em Lambari uma amostra apresentou contaminação por Aldrin acima do LOQ (12,7 µg/Kg), α-endosulfan (199,5 a 247,3 µg/Kg), β-endosulfan (21,9 a 331 µg/Kg), p,p'-DDE (12,3 a 74,7 µg/Kg) e p,p'-DDT (5,7 a 10,4 µg/Kg).

Dos OCPs analisados os únicos que foram detectados em concentrações acima do estipulado como LMR pela FAO/WHO (2006) foram o α e o β-Endosulfan em Lambari e Tilápia.

Resultados semelhantes de contaminação por OCPs foram obtidos por Botaro et al., (2011) em uma pesquisa realizada em músculo de Tilápia de fazendas de peixe no Brasil.

Verifica-se na Tabela 14 que o p,p'-DDE foi detectado em concentrações superiores ao p,p'-DDT. A prevalência do p,p'-DDE sobre o p,p'-DDT é explicada pelo menor tempo de meia vida do p,p'-DDT (8 meses) quando comparado ao tempo de meia vida do p,p'-DDE (7 anos) (BOTARO et al., 2011).

Ezemonye et al., (2015) e Ogbeide; Tongo e Ezemonye (2015) também relataram maiores concentrações de endosulfan quando comparadas às

concentrações determinadas de outros OCPs em amostras analisadas de músculo de Tilápia do Nilo.

O pesticida endosulfan foi um dos últimos a entrar na lista de compostos proibidos para uso na agricultura, tendo essa proibição no Brasil entrado em vigor a partir de 31 de julho de 2013, sendo assim ainda é possível, como verifica-se neste estudo, encontrar níveis destes compostos no meio ambiente, especialmente na biota.

Esses resultados positivos para os OCPs em músculo de peixe comercializado mostram a necessidade de monitoramento dos resíduos destes compostos, pois essa contaminação gera grandes impactos ambientais e à saúde humana (MUNARETTO et al., 2013).

Em vista do exposto anteriormente, espécimes de Lambari (*Astianax altiparanae*) foram coletados, suas massas e dimensões aferidas (Tabela 14) e seus tecidos (músculo, ovas e vísceras) separados.

Na Tabela 15 são apresentadas as dimensões e massa dos espécimes analisados.

Tabela 15 - Dimensões (cm) e massa corpórea dos indivíduos (*Astianax altiparanae*) coletados na represa de Alagados

Indivíduos	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Massa corpórea (g)
1	9,9	3	14,29
2	10,2	2,7	15,15
3	10,5	3	15,09
4	10,3	2,8	14,91
5	9,4	2,8	12,97
6	10,2	3,1	17,14
7	9,1	3	16,13
8	9,5	2,8	11,93
9	11	3,1	17,91
10	10	2,7	13,77
11	10,3	3,2	15,69
12	10,9	3,2	17,27
13	9,7	3	15,11
14	10,3	3,1	16,84

Fonte: Os autores.

Os resultados das médias das concentrações de Aldrin, p,p'-DDT, p,p'-DDE, Dieldrin, α -endosulfan e β -endosulfan estão apresentados nas Tabelas 16 a 18.

Na Tabela 16 são apresentadas as médias das concentrações dos OCPs em estudo em músculo de Lambari.

Tabela 16 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em músculo de Lambari

Peixe n°	A ¹ (µg Kg ⁻¹)	AE ² (µg Kg ⁻¹)	D ³ (µg Kg ⁻¹)	Di ⁴ (µg Kg ⁻¹)	B ⁵ (µg Kg ⁻¹)	D ⁶ (µg Kg ⁻¹)
1	<LOD	4,2 ± 0,7 ^f	12,7 ± 11,9 ^d	<LOD	8,6 ± 2,2 ^e	16,4 ± 8,4 ^b
2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	34,7 ± 21,8 ^b	22,3 ± 0,2 ^a
3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,4 ± 2,7 ^e	<LOD
4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	11,3 ± 9,8 ^c	23,1 ± 13,1 ^a
5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	58,5 ± 28,7 ^a	<LOD
6	<LOD	4,6 ± 1,3 ^e	15,5 ± 8,7 ^c	<LOD	12,0 ± 3,5 ^d	<LOD
7	8,3±0,5 ^d	<LOD	15,3 ± 3,3 ^c	<LOD	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	20,6 ± 8,9 ^c	<LOD
9	<LOD	4,7 ± 0,3 ^d	20,1 ± 1,7 ^b	<LOD	<LOD	<LOD
10	<LOD	12,3 ± 3,4 ^b	13,4 ± 2,6 ^d	<LOD	20,1 ± 9,1 ^c	12,8 ± 11,6 ^c
11	<LOD	<LOD	16,8 ± 0,2 ^c	<LOD	<LOD	<LOD
12	9,1 ± 0,1 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	26,1± 0,2 ^a	18,9 ± 12 ^a	40,2 ± 4,5 ^a	45,60 ± 2,01 ^a	<LOD	20,7 ± 9,7 ^a
14	13,1 ± 5,7 ^b	9,5 ± 4,4 ^c	38,1 ± 9,1 ^a	<LOD	13,3 ± 2,9 ^e	12,0± 8,7 ^c
LMR	200	100	5000	200	100	5000
(µgKg ⁻¹)						

Nota: ¹. Aldrin ². α-Endosulfan. ³. p,p'-DDE, ⁴. Dieldrin, ⁵. β-Endosulfan, ⁶. p,p'-DDT.

Fonte LMR: FAO, WHO, (2006). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% através do teste de Scott Knott.

É possível verificar na Tabela 16 que o músculo dos espécimes coletados apresentou contaminação por Aldrin (8,28 a 26,16 µg Kg⁻¹), α-endosulfan (4,16 a 12,3 µg Kg⁻¹), p,p'-DDE (12,7 a 40,17 µg Kg⁻¹), Dieldrin (45,6 µg Kg⁻¹), β-endosulfan (8,58 a 58,54 µg Kg⁻¹) e p,p'-DDT (12 a 23,1 µg Kg⁻¹).

Estes resultados estão abaixo do limite máximo de resíduos estipulado pela FAO, WHO (2006). Comparando-se os resultados de contaminação expostos nas Tabelas 14 e 16, verifica-se maiores contaminações nos músculos de peixes comercializados, ou seja, o local de origem desses peixes possuía, provavelmente, uma maior taxa de OCPs na água, gerando consequentemente uma maior bioacumulação destes compostos nos peixes.

Dos OCPs determinados constata-se na Tabela 16 que o presente em maiores concentrações foi o p,p'-DDE. No entanto esses resultados são inferiores aos apresentados por Akan et al., (2013) que avaliaram músculo de peixe, de um lago da Nigéria, quanto à contaminação por OCPs, verificando a presença de p,p'-DDE (4320 µgKg⁻¹), p,p'-DDT (2760 µgKg⁻¹) e endosulfan (4810 µgKg⁻¹).

Os resultados de determinação de OCPs em músculo de peixe se assemelham aos relatados por Barnhoorn et al., (2015), que detectaram p,p'-DDE, Aldrin e endosulfan em lagos da África do Sul.

Na Tabela 17 tem-se a contaminação por OCPs nas ovas de *Astianax altiparanae*, coletado na represa de Alagados.

Tabela 17 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em ovas de Lambari

Peixe n°	A ¹ (µg Kg ⁻¹)	A ² (µg Kg ⁻¹)	D ³ (µg Kg ⁻¹)	Di ⁴ (µg Kg ⁻¹)	B ⁵ (µg Kg ⁻¹)	D ⁶ (µg Kg ⁻¹)
1	<LOD	6,8 ± 3,8 ^e	33,6 ± 0,06 ^f	82,9 ± 11,5 ^f	6,0 ± 0,91 ^f	56,6 ± 26,9 ^d
2	<LOD	8,7 ± 2,5 ^d	134,7 ± 68,9 ^a	<LOD	23,3 ± 6,7 ^c	<LOD
3	<LOD	5,3 ± 1,5 ^f	92,3 ± 28,6 ^c	124,3 ± 20,5 ^d	10,2 ± 0,9 ^e	<LOD
4	<LOD	5,7 ± 0,2 ^f	113,5 ± 0,2 ^b	143,9 ± 0,1 ^c	15,4 ± 0,1 ^d	<LOD
5	<LOD	5,4 ± 0,6 ^f	24,2 ± 0,3 ^g	120,7 ± 49,9 ^d	51,6 ± 0,1 ^a	<LOD
6	<LOD	<LOD	24,4 ± 0,5 ^g	101,9 ± 21,6 ^e	<LOD	97,9 ± 12,2 ^c
7	30,8 ± 4,4 ^d	3,4 ± 0,6 ^g	4,2 ± 0,3 ⁱ	98,5 ± 27,5 ^e	10,3 ± 0,05 ^e	67,7 ± 23,2 ^d
8	48,9 ± 1,9 ^c	11,1 ± 3,8 ^c	46,1 ± 0,1 ^e	105,9 ± 31,6 ^e	31,4 ± 5 ^c	118,4 ± 0,8 ^b
9	<LOD	23,5 ± 15,0 ^a	17,3 ± 4,9 ^h	77,8 ± 19,9 ^f	43,8 ± 11,7 ^b	128,8 ± 0,4 ^b
10	17,07 ± 2,9 ^e	20,0 ± 0,7 ^a	61,0 ± 17,3 ^d	183,1 ± 0,6 ^a	6,8 ± 0,06 ^f	129,3 ± 1,1 ^b
11	63,6 ± 9,6 ^b	10,2 ± 0,3 ^c	11,3 ± 0,1 ^h	96,7 ± 0,1 ^e	13,8 ± 0,2 ^d	<LOD
12	50,6 ± 27,9 ^c	8,8 ± 4,2 ^d	<LOD	89,2 ± 2,1 ^f	35,8 ± 24,3 ^c	123,0 ± 20,8 ^b
13	74,0 ± 23,0 ^a	8,0 ± 1,1 ^d	<LOD	162,6 ± 70,5 ^b	16,4 ± 3,8 ^d	87,9 ± 4 5,0 ^c
14	22,3 ± 6,4 ^e	14,9 ± 0,2 ^b	<LOD	64,7 ± 1,4 ^g	<LOD	286,8 ± 5,6 ^a
LMR	200	100	5000	200	100	5000

Nota: ¹. Aldrin ². α-Endosulfan. ³. p,p'-DDE, ⁴. Dieldrin, ⁵. β-Endosulfan, ⁶. p,p'-DDT.

Fonte: Os autores. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% através do teste de Scott Knott.

Verifica-se na Tabela 17 que as amostras de ovas de Lambari analisadas apresentaram contaminação por Aldrin (17,07 a 50,6 µgKg⁻¹), α-endosulfan (3,4 a 23,5 µgKg⁻¹), p,p'-DDE (4,2 a 134,7 µgKg⁻¹), Dieldrin (84,7 a 183,1 µgKg⁻¹), β-endosulfan (6,0 a 51,6 µgKg⁻¹) e p,p'-DDT (56,6 a 286,8 µgKg⁻¹).

Ao se comparar os dados de contaminação por OCPs em ovas (Tabela 17) com os dados obtidos em músculo (Tabela 16) verifica-se uma maior concentração destes nas ovas.

O percentual de gordura nos tecidos do peixe varia conforme a fase da vida em que ele se encontra. Na fase reprodutiva, quando há a produção das ovas, os lipídeos são mobilizados do fígado e principalmente, do músculo para as gônadas (CASTELL et al., 1972).

Na Tabela 18 tem-se as médias das concentrações dos OCPs em estudo em vísceras de Lambari.

Tabela 18 - Médias das concentrações dos OCPs em estudo em vísceras de Lambari

Peixe n°	A ¹ (µg Kg ⁻¹)	AE ² (µg Kg ⁻¹)	D ³ (µg Kg ⁻¹)	Di ⁴ (µg Kg ⁻¹)	B ⁵ (µg Kg ⁻¹)	D ⁶ (µg Kg ⁻¹)
1	72,5 ± 9,2 ^b	37,0 ± 0,01 ^a	<LOD	193,5 ± 55,8a	39,1 ± 14,5 ^e	89,2 ± 0,2 ^a
2	93,3 ± 0,1 ^a	<LOD	<LOD	155,4 ± 0,5 ^c	<LOD	<LOD
3	32,4 ± 0,2 ^f	33,0 ± 0,1 ^a	110,0 ± 0,1 ^d	<LOD	21,0 ± 0,2 ^f	52,3 ± 0,3 ^b
4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	10,8 ± 0,2 ^g	8,7 ± 0,2 ^d	<LOD	61,8 ± 0,2 ^f	<LOD	<LOD
6	96,6 ± 0,3 ^a	8,3 ± 0,1 ^d	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	93,8 ± 3,7 ^a	35,4 ± 0,5 ^a	<LOD	<LOD	23,1 ± 0,2 ^f	<LOD
8	43,6 ± 0,1 ^e	28,5 ± 0,1 ^b	83,5 ± 0,1 ^e	18,0 ± 0,1 ^g	87,3 ± 0,7 ^b	<LOD
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	64,4 ± 1,2 ^c	<LOD
10	<LOD	<LOD	<LOD	136,4 ± 0,3 ^d	69,1 ± 2,3 ^c	<LOD
11	66,0 ± 18,3 ^c	31,2 ± 0,2 ^b	185,5 ± 0,5 ^b	179,0 ± 8,5 ^b	63,5 ± 0,7 ^c	<LOD
12	61,5 ± 7,0 ^c	24,7 ± 0,1 ^c	148,9 ± 2,5 ^c	155,5 ± 50,2 ^c	95,4 ± 16,3 ^a	<LOD
13	55,2 ± 0,4 ^d	<LOD	209,2 ± 0,3 ^a	137,7 ± 35,9 ^d	56,8 ± 4,8 ^d	<LOD
14	71,7 ± 18,1 ^b	29,5 ± 0,7 ^b	109,4 ± 0,5 ^d	87,2 ± 0,3 ^e	57,8 ± 1,0 ^d	57,3 ± 15,2 ^b
LMR	200	100	5000	200	100	5000
(µgKg ⁻¹)						

Nota: ¹. Aldrin ². α-Endosulfan. ³. p,p-DDE, ⁴. Dieldrin, ⁵. β-Endosulfan, ⁶. p,p-DDT.

Fonte: Os autores. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 95% através do teste de Scott Knott.

Verifica-se na Tabela 18 que as amostras de vísceras de Lambari analisadas apresentaram contaminação por Aldrin (19,8 a 93,3 µgKg⁻¹), α-endosulfan (8,3 a 37 µgKg⁻¹), p,p'-DDE (83,5 a 209,2 µgKg⁻¹), Dieldrin(18 a 193,5 µgKg⁻¹), β-endosulfan (21 a 95,4 µgKg⁻¹) e p,p'-DDT (52,3 a 89,2 µgKg⁻¹).

Em diferentes estudos, maiores concentrações de OCPs foram obtidas em vísceras de peixe quando comparado ao músculo e demais tecidos (AKAN et al., 2013; GUI et al., 2014)

Dos pesticidas analisados, todos, exceto o p,p'-DDT, foram detectados em concentrações que variaram, de maneira geral, da seguinte forma: Vísceras > Ovas > Músculo, como pode-se verificar nas Tabelas 16-18.

Ao se relacionar a contaminação do tecido com o tipo de OCP detectado foi possível obter o gráfico apresentado na Figura 36.

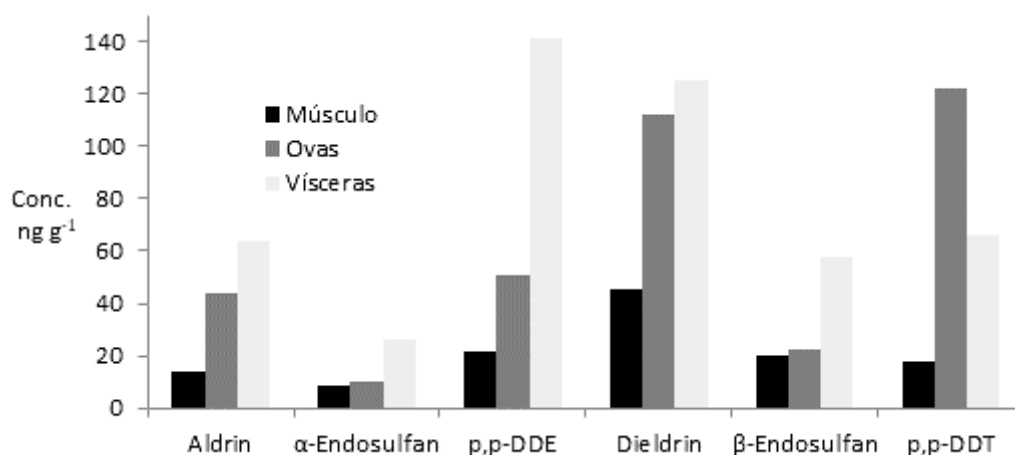


Figura 36 - Concentrações médias dos OCPs determinados em músculo, ovas e vísceras de *Astianax altiparanae*.
Fonte: Os autores.

As maiores médias de contaminação em vísceras foram obtidas para o pesticida p,p'-DDE (Figura 36). Nas vísceras temos órgãos como o fígado, rim, trato gastrointestinal entre outros órgãos. Alguns autores relatam que a acumulação é preferencial em órgãos como o fígado, baço, rim, trato gastrointestinal e gônadas quando comparado ao músculo (MIRANDA et al., 2008; AKAN et al., 2013; DANG et al., 2016).

Zhao e colaboradores (2014), verificaram uma maior acumulação de OCPs em órgãos como fígado e rim de diferentes espécies de peixe, indicando que a ingestão de OCPs através da dieta foi a principal via de exposição aos compostos.

Segundo os mesmos autores o músculo não é um tecido ativo, não acumulando tão efetivamente os OCPs. (ZHAO et al., 2014).

A prevalência de p, p'-DDE nos tecidos analisados reflete a transformação metabólica de p,p'-DDT para p,p'-DDE em peixes. Verificou-se que 57,14% das amostras de músculo, 78,6% das de ovas e 42,9% das de vísceras apresentaram contaminação por p,p'-DDE em níveis detectáveis, embora esses valores estivessem abaixo do limite estipulado pela FAO e WHO (2006).

Já o OCP p,p'-DDT foi detectado em 42,9% das amostras de músculo, 64,3% das amostras de ovas e 21,4% das amostras de vísceras em concentrações abaixo do limite estipulado pela FAO e WHO (2006). Atualmente uma das possíveis fontes de DDT, é a utilização do OCP Dicofol, o qual pode conter resíduos de DDT (ZENG et al., 2017).

As maiores médias de contaminação em músculo e ovas e uma das maiores em vísceras foram obtidas para o OCP Dieldrin, sendo que a concentração deste foi significativamente maior que a de Aldrin.

Presume-se que há mais Dieldrin no ambiente em comparação com Aldrin, o que é ocasionado pelo fato de ocorrer facilmente a fotólise do Aldrin em Dieldrin no ambiente, além disso, o Aldrin é prontamente convertido em Dieldrin em tecidos vegetais e animais, sendo que esse é extremamente apolar e, portanto, tem tendência a adsorver fortemente em lipídios tais como gorduras animais e ceras de plantas (ATSDR, 2002).

Matsumura (1985) aponta que o Dieldrin é um dos mais persistentes produtos químicos conhecidos. A bioacumulação do Dieldrin em tecido animal é devido à sua resistência à degradação e ao seu metabolismo. Semelhante ao DDT e seus metabólitos, o Dieldrin não é facilmente metabolizado em água e tem capacidade limitada de digestão e excreção pelo corpo, no entanto, é facilmente absorvido e transportado em todo o sangue de vertebrados e hemolinfa de invertebrados.

O OCP Aldrin foi detectado em concentrações acima do LOD em 28,6% das amostras de músculo, 50% das amostras de ovas e 78,6% das amostras de vísceras, já o OCP Dieldrin foi detectado em concentrações superiores ao LOD em 7,14% das amostras de músculo, 92,9% das amostras de ovas e 64,3% das amostras de vísceras. No entanto nenhuma das amostras extrapolou o limite máximo de resíduos para estes dois OCPS, que é de 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (FAO, WHO, 2006).

O OCP endosulfan foi detectado em 92,8% das amostras de ovas, 71,4% das amostras de vísceras e 64,3% das amostras de músculo de *Astianax altiparanae*, no entanto os valores estavam abaixo do valor estipulado pela WHO e FAO (2006) que é de 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

O pesticida endosulfan foi um dos últimos a entrar na lista de compostos proibidos para uso na agricultura no Brasil e sua proibição entrou em vigor a partir de 31 de julho de 2013.

Verifica-se que podem ocorrer diferentes processos de acumulação dos OCPs nos diferentes tecidos, especialmente devido à composição de cada tecido e características estruturais, o que pode resultar em concentrações dos compostos químicos (CUI et al., 2015). Sabendo disso, fez-se uma avaliação da relação entre o

tipo de tecido analisado e a concentração de determinado OCP detectada neste tecido.

Na Figura 37 é apresentada uma análise de componentes principais (PCA) que relaciona os fatores tipo de tecido e analitos detectados.

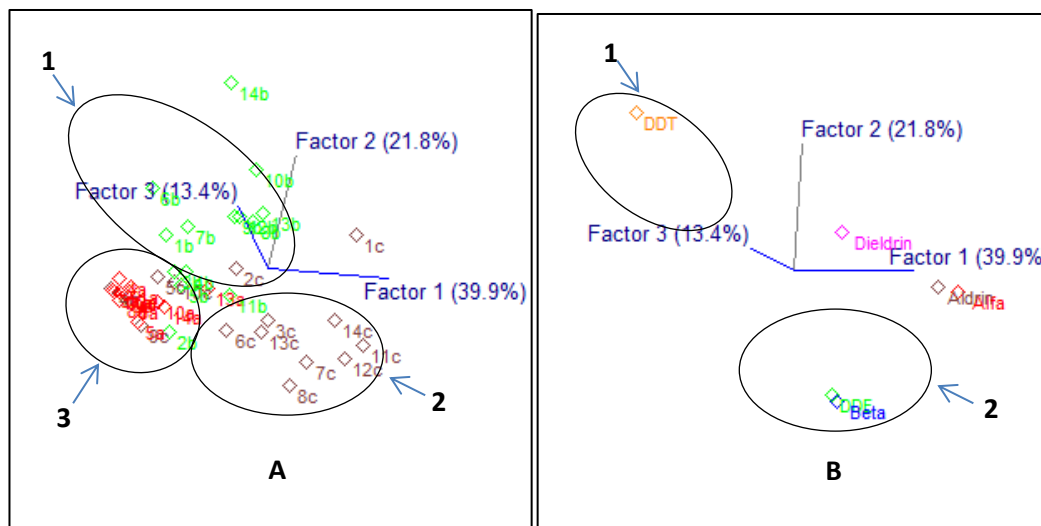


Figura 37 - Gráfico de scores (a) e loadings (b) das amostras de peixe analisadas por PCA, uma correlação entre a contaminação e o tecido. Nota: vermelho: músculo, verde: ovas e roxo: vísceras. Fonte: Os autores.

Como pode ser visualizado pelo agrupamento 1 destacado em A e em B (Figura 37), foi possível observar que o analito p,p'-DDT foi determinado em maior concentração nas ovas, quando comparado às vísceras.

Isso ocorre provavelmente porque o p,p'-DDT é no trato gastrointestinal rapidamente metabolizado e convertido em p,p'-DDE (KWONG et al., 2008), no entanto parte deste composto não é metabolizada, sendo acumulada neste tecido, que durante a fase de desova, possui um maior acúmulo de lipídeos.

Verifica-se ainda no agrupamento 2 (Figura 37A e 37B) que os analitos p,p'-DDE e β -endosulfan foram detectados em maiores concentrações nas vísceras.

Sob condições de anaerobiose o p,p'-DDT perde um cloro e se transforma em p,p'-DDE (Huang et al., 2001). Além disso, os peixes possuem a capacidade de metabolizar o DDT (Kwong et al., 2008). Esse fato justifica a maior concentração de p,p'-DDE nas vísceras. É possível ainda visualizar na Figura 37A um terceiro agrupamento (3) do tecido músculo, nas quais as concentrações dos OCPs foram bem inferiores às dos demais tecidos.

Na Figura 38 é apresentada uma PCA que relaciona os fatores largura dos espécimes analisados com a concentração dos OCPs nos tecidos.

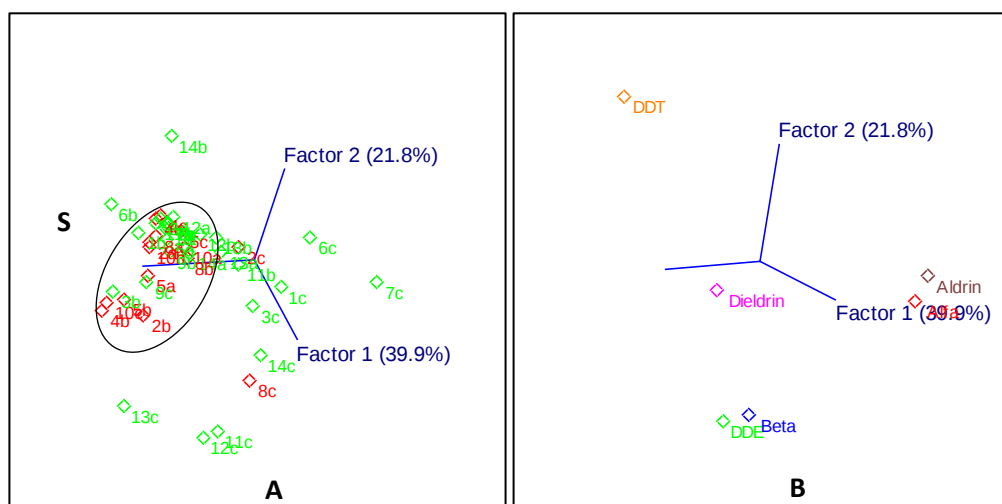


Figura 38 - Gráfico de scores (a) e loadings (b) de amostras de peixe analisadas por PCA, uma correlação entre largura corporal e contaminação. Nota: vermelho: menores larguras corporais, verde: maiores larguras corporais.
Fonte: Os autores.

Na análise de componentes principais apresentada na Figura 38A (scores) é possível verificar a formação de um agrupamento destacado por S, onde estão concentradas 85,7% das amostras com as menores larguras corporais (vermelho).

Avaliando-se a Figura 38B (loadings) verificou-se que os espécimes com a maior largura (verde) têm maiores concentrações dos analitos analisados. Presumivelmente este resultado relaciona-se com a quantidade de gordura corporal dos mesmos, ou seja, com uma maior largura corporal, há um maior depósito de gordura em seus tecidos favorecendo a bioacumulação dos OCPs.

Além disso, pode ser um indicativo de um grau maior de maturação sexual dos espécimes, já que na fase final de maturação, antes da desova, o abdômen das fêmeas aumenta significativamente (TOWERS, 2014).

O percentual de gordura nos tecidos do peixe varia conforme a fase da vida. Na fase reprodutiva os lipídeos são mobilizados do fígado e principalmente do músculo para as gônadas (CASTELL et al., 1972).

Marcon e colaboradores (2017) verificaram que mesmo quando as ovas de peixes são expostas a OCPs mantém suas características fisiológicas, possibilitando a ocorrência da desova normalmente.

No entanto, em um estudo, efeitos teratogênicos em larvas e embriões de linguado *Psetta maxima* foram observados em exposição à clorpirifós e dieldrin.

Ambos foram extremamente tóxicos para a espécie marinha, sendo as larvas mais sensíveis que os embriões. Além da mortalidade de embriões, foi relatada diminuição significativa no sucesso de eclosão, malformações, edema pericárdico e deformidades esqueléticas (MHADHBI e BEIRAS, 2012).

Em outro estudo realizado em ovos de caranguejos na Argentina foi verificada uma alta concentração de p,p'-DDE e p,p'-DDT (MENONE et al., 2004), sendo assim estes compostos foram transferidos aos descendentes, mesmo antes do nascimento e contato com o ambiente contaminado.

Os níveis residuais relativos mais baixos encontrados no músculo de *Astianax altiparanae* demonstraram que este tecido não é um alvo para o acúmulo dos OCPs em estudo (BALLESTEROS et al., 2011).

O reservatório em estudo não está localizado próximo a locais onde o uso de OCPs é liberado. Bouwman et al., (2008) sugerem a deposição atmosférica como via potencial de contaminação por OCPs em ecossistemas aquáticos.

Além disso, o escoamento superficial como resultado de possível uso ilegal destes pesticidas nas áreas adjacentes também poderia ser fonte possível de contaminação (BORMAN et al., 2007). Segundo um Sindicato relacionado à produção de produtos de defesa agrícola no Brasil, apenas em 2011, as apreensões de pesticidas falsificados e contrabandeados chegaram a 55 toneladas. No período entre 2001 e 2011, foram apreendidas 452 toneladas (AIRES, 2018).

A aplicação deste método propiciou a utilização de amostras de tecido dos peixes sem a necessidade de agrupamento de indivíduos, uma vez que a massa corporal média (Tabela 15) de uma das espécies analisadas (*Astianax altiparanae*) foi de 15,3 gramas. O agrupamento pode potencialmente ocultar a variância e dar uma falsa confiança em relação à significância dos dados (ZHANG e GANT, 2005).

Portanto, os resultados obtidos demonstram que o método é adequado para determinação de OCPs em tecidos de peixe, possibilitando uma avaliação criteriosa da contaminação ambiental de maneira individual, sendo esta característica promissora principalmente na área toxicológica.

5.4 AVALIAÇÃO DE RISCO PARA A SAÚDE HUMANA

Os níveis de OCPs detectados nas amostras não excederam os limites máximos de resíduos (LMR) impostos pela WHO e FAO (2006), como demonstrado anteriormente. Com base nas médias das concentrações dos OCPs detectados, uma avaliação de risco foi realizada.

Na Tabela 19 são apresentados os dados referentes à avaliação de risco aplicada às amostras comerciais

Tabela 19 - Ingestão diária estimada (EDI) ($\text{ng kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) e quociente de risco (HQs) calculado baseado nos percentis 50 e 95 da media das concentrações dos OCPs ($\text{ng g}^{-1}\text{ww}$) detectadas em músculo de Lambari e Tilápia comercializados em Ponta Grossa..

Analitos	ADI ($\text{ng Kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Tilápia		Lambari	
		50th (95th) EDI percentil	50th (95th) HQ percentil (10^{-3})	50th (95th) EDI percentil	50th (95th) HQ percentil (10^{-3})
A ¹	100	7,4 (11,8)	74,3 (117,5)	0 (10,4)	0 (104,3)
AE ²	6000	305,3 (343,2)	50,8 (57,2)	166,2(203,3)	27,7 (33,8)
D ³	10000	15,9(61,4)	1,5 (6,1)	14,2(61,4)	1,4(6,1)
BE ⁴	6000	320,1 (368,0)	53,3(61,3)	118,8(272,0)	19,8(45,3)
D ⁵	10000	4,9(5,5)	0,5(0,5)	5,8(8,5)	0,5(0,8)

Fonte: Os autores. Nota: A¹. Aldrin, AE². α -endosulfan, D³. p,p'-DDE, BE⁴. β -endosulfan, D⁵. p,p'-DDT.

Ao se avaliar os dados apresentados na Tabela 19 verifica-se que nenhum valor de percentil (50th e 95th) de ingestão diária estimada (EDI) para Lambrai e Tilápia foi superior ao valor de ingestão diária aceitável (ADI) estipulada pela USEPA (1991).

Os valores de quociente de risco (HQ) apresentados na Tabela 19 estão abaixo do limite (0,2) estabelecido pela Health Canada (2004), indicando que com a ingestão destes peixes a saúde do consumidor estaria sujeita a um risco insignificante (BUAH-KWOFIE et al., 2018).

Na Tabela 20 são apresentados os dados referentes à avaliação de risco aplicada às amostras coletadas na represa de Alagados.

Tabela 20 - Ingestão diária estimada (EDI) ($\text{ng kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) e quociente de risco (HQs) calculado baseado nos percentis 50 e 95 da média das concentrações dos OCPs ($\text{ng g}^{-1}\text{ww}$) detectadas em músculo, ovas e vísceras de *Astianax altiparanae*.

Analitos	Músculo			Ovas		Vísceras	
	ADI ($\text{ngKg}^{-1}\text{d}^{-1}$)	50th (95th) EDI percentil	50th (95th) HQ percentil (10^{-3})	50th (95th) EDI percentil	50th (95th) HQ percentil (10^{-3})	50th (95th) EDI percentil	50th (95th) HQ percentil (10^{-3})
A ¹	100	9,2 (19,9)	(9) (91)	40,2 (58,3)	402 (585)	54,3 (79,2)	542 (792)
AE ²	6000	5,8 (14,2)	0,9 (2,3)	7,1 (17,6)	1,1 (2,9)	24,2 (29,9)	4,0 (4,9)
D ³	10000	13,3 (32,4)	1,3 (3,2)	27,6 (102)	2,7 (10,1)	106,4 (167)	10,6(16,7)
Di ⁴	100	37,5 (37,5)	374 (374)	85,4 (139,5)	853 (1390)	113,1 (154,3)	1131 (1543)
BE ⁵	6000	10,9 (40,3)	1,8 (6,7)	13,1(38,9)	2,1 (6,4)	49,8 (75,4)	8,3 (12,5)
D ⁶	10000	15,2 (18,8)	1,5 (1,8)	97,3 (184)	9,7 (18,4)	47,1 (70,7)	4,7 (7,0)

Nota: EDI foi comparado com o ADI USEPA(1991). Valores de HQ em negrito excederam o limite estipulado pelo guia Health Canada (2004). A¹. Aldrin, AE². α -endosulfan, D³. p,p'-DDE, Di⁴. Dieldrin, BE⁵. β -endosulfan, D⁶. p,p'-DDT.

Fonte: Os autores.

Os dados apresentados na Tabela 20 demonstram que exceto para o OCP Dieldrin, os demais OCPs estudados estavam presentes em concentrações abaixo dos valores de ADI (USEPA, 1991).

Os valores de quociente de risco (HQ) calculados revelaram que o Dieldrin nas amostras de músculo, ovas e vísceras foi detectado em concentrações que excederam o valor limite (0,2) estabelecido pela Health Canada (2004).

Ou seja, neste caso há a necessidade de uma avaliação de risco detalhada adicional ou realização de medidas de gerenciamento de riscos indicando a necessidade de um estudo detalhado da avaliação de risco nessa população (HEALTH CANADA, 2004).

Os valores de HQ para o Aldrin, apresentados na Tabela 20 excederam o valor de 0,2 somente nas amostras de ovas e vísceras. Esses dados indicam possíveis riscos para a saúde associados com o consumo de *Astianax altiparanae*, embora seja necessária uma avaliação de risco mais detalhada para verificar o impacto provável na saúde humana.

Outros estudos realizados com tecidos de peixes obtiveram resultados semelhantes relacionados ao risco do Dieldrin e Aldrin para a saúde humana (BUAH-KWOFIE et al., 2018; Gerber et al., 2016; Barnhoorn et al., 2015), demonstrando que a contaminação por estes compostos é um problema atual e global.

Os riscos aqui avaliados não trazem alterações imediatas aos consumidores, no entanto, as estimativas de risco apresentadas representam uma avaliação preliminar do aumento da suscetibilidade à intoxicação pelo consumo destas espécies.

Os dados de contaminação aqui apresentados, não só refletem a disponibilidade de OCPs para absorção biológica dentro da área de estudo e de amostras comerciais, mas também fornecem uma indicação das concentrações que os seres humanos podem estar expostos da ocasião da ingestão.

6. CONCLUSÕES

O método proposto é simples e rápido de executar e permite a extração de OCPs de tecido de peixe, realizando várias extrações de maneira conjunta. A sua principal vantagem se encontra no uso de pequena quantidade de amostra (0,5g), fato este que permite o uso de tecidos de espécies de pequena massa corporal (menor que 10g, p.ex.), além disso, exige o uso de pequeno volume de solvente (9,2mL), massa de sorventes (0,1g de PSA e 0,023g de C18) e de somente uma etapa de extração, gerando economia no consumo destes reagentes.

Demonstrou ser satisfatório na extração dos OCPs através dos testes de recuperação (77,3 a 110,8%) e precisão (3,4 a 12,6%), alcançando adequados LOQs (0,8 a 9,6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) e seletividade. Verificou-se a presença de efeito matriz para os OCPs analisados, sendo necessária a obtenção da curva analítica em extrato da matriz, minimizando esse efeito.

A aplicação do método otimizado para extração de OCPs em tecidos de peixe em amostras reais mostrou um desempenho satisfatório. Os resultados provaram que o método é adequado para a utilização em análise de rotina para a determinação de resíduos de OCPs tecidos de peixe.

Verificou-se que as amostras comerciais de músculo de Tilápia e de Lambari adquiridas na cidade de Ponta Grossa possuem contaminação pelos OCPs Aldrin (9,0 a 12,7 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), p,p'-DDE (12,3 a 68,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), p,p'-DDT (4,0 a 10,4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), α -endosulfan (199,5 a 417,6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), e β -endosulfan (21,9 a 447,8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), no entanto essas concentrações estão abaixo dos limites máximos de resíduos estipulados pela legislação.

Verificou-se também que os tecidos (ovas, músculo e vísceras) de espécimes de Lambari coletados no reservatório de Alagados a apresentaram contaminação pelos OCPs Aldrin (8,28 a 96,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), Dieldrin (18,0 a 193,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), α -endosulfan (3,4 a 37,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), β -endosulfan (4,43 a 95,4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), p,p'-DDT (12,0 a 286,8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) e p,p'-DDE (4,2 a 209,2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), no entanto estas concentrações estavam do limite máximo de resíduos estipulado para cada OCP.

Avaliando-se comparativamente os tecidos analisados verificou-se que a contaminação pelos OCPs se concentra prioritariamente nas vísceras e ovas, devido

principalmente às características destes tecidos em relação ao teor de gorduras, o que propicia uma maior bioacumulação.

A presença de OCPs em ovos de peixe é algo considerado preocupante visto que pode gerar nos novos indivíduos alterações significativas em seu metabolismo implicando, possivelmente, em um impacto para a espécie em estudo no reservatório de Alagados.

Ao se realizar uma avaliação de risco verificou-se que para as amostras comerciais de músculo de Tilápia e Lambari os índices EDI (abaixo do IDA para cada OCP) e HQ ($<0,2$) estiveram dentro da faixa em que o consumo do alimento não gera riscos ao consumidor.

Já na avaliação de risco das amostras coletadas no reservatório de Alagados, para os OCPs Aldrin e Dieldrin o HQ calculado foi acima do estipulado por órgãos internacionais ($>0,2$) indicando que estas concentrações podem ao longo do tempo gerar efeitos adversos para a saúde dos consumidores destes peixes.

7. REFERÊNCIAS

- AGUERA, A. et al. Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analyst**, p. 127-347, 2002.
- AIRES, L. No mundo: **Os estragos causados pelo uso de agrotóxicos no mundo e no Brasil**. Disponível em: <<https://www.ecycle.com.br/component/content/article/35-atitude/1448-os-estragos-causados-pelo-uso-de-agrotoxicos-no-mundo.html>>, Acesso em 11 jan. 2018.
- AKAN, J.C. et al. Organochlorine Pesticide Residues in Fish Samples from Alau Dam, Borno State, North Eastern Nigeria. **J Environ Anal Toxicol**, v. 3, n. 3, 2013.
- AKOTO, O.; AZUURE, A.A.; ADOTEY, K.D. Pesticide residues in water, sediment and fish from Tono Reservoir and their health risk implications. **Springer Plus**.v. 5, n. 1849, 2016.
- AKTAR, M.W; SENGUPTA, D; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interd. Toxic**, v. 2, n.1, p. 1-12, 2009.
- ALAMDAR, A. et al. Organochlorine pesticides in surface soils from obsolete pesticide dumping ground in Hyderabad City, Pakistan: Contamination levels and their potential for air–soil Exchange. **Science Total environment**. n. 470-471, p 733-741, 2014.
- ALMATARI, M.S. et al. Residues of some organic pollutants, their bioaccumulation, and risk assessments profile in Lake Temsah, Ismailia, Egypt. **J Clin Exp Tox**, v.1, n.1, 2017.
- ALMEIDA, F.V. et al. Substâncias tóxicas persistentes no (STP) no Brasil, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília - DF, Brasil. **Quim. Nova**. v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.
- ALMEIDA, R. B. C. **Astyanax altiparanae (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação**. 2007. 119f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.
- AL-SHWAFI, N.; AL-TRABEEN, K.; RASHEED, M. Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Carcinogens Residual in some Fish and Shell Fish of Yemen. **Jordan J. of Bio. Sci.** v. 2, n 1, p. 23-28, 2009.
- ALVES, A.A.A. et al. Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the Determination of Residues of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides in Brazilian Citrus Essential Oils. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, n. 2, p. 306-314, 2012.
- 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, **J. Aoac Int.** v. 86, p. 412–431, 2003.
- ANDRÉA, M. M. **“Contaminação do solo por pesticidas”**. Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico. Disponível em: <http://www.geocities.com/~esabio/agua/>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- ANTONUCCI et al. Fish consumers in the pioneer northern Region of the State of Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 38, n. 1,p. 165-174, 2017.

ANVISA ; UFPR. **Seminário MERCADO DE AGROTÓXICO E REGULAÇÃO**, 2012. Brasília. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/seminario-volta-a-discutir-mercado-de-agrotoxicos-em-2012>. 2012. Acesso em 11 abr. 2017.

ATSDR. **DEPARTMENT of HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp1-c1-b.pdf>. 2002. Acesso em 10 jan. 2018.

AUGUSTIJN-BECKERS, P.W; HORNSBY, P.W; WAUCHOPE, R.D. Additional Properties Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, **SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decisionmaking II** v. 137, 1994.

BADUEL, C. et al. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. **Journ. of Chrom. A**. v. 1426, p. 33–47, 2015.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BAKER, B P, et al. Pesticide residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grow and organic foods: insights from three US data sets. **Foods, Addit. and Cont.** p. 427-46, 2002.

BALLESTEROS, M.L. et al. Uptake, tissue distribution, and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Environ Pollut.** v. 159, p. 1709–1714, 2011.

BARAKAT, A.M; KHAIRY, M; AUKAILY, I. Bioaccumulation of organochlorine contaminants in fish species from Lake Qarun, a protected area of Egypt. **Toxic. & Environ. Chem.** v. 99, n.1, p. 117-133, 2016.

BARCELÓ, D; HENNION, M.C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**, 2ª ed. Elsevier, Amsterdam, 2003.

BARNHOORN, I.E.J. et al. Organochlorine pesticide levels in *Clarias gariepinus* from polluted freshwater impoundments in South Africa and associated human health risks. **Chemosphere**. v.120, p. 391–397, 2015.

BARRA, R. et al. Persistent Organic Pollutants (POPs) in Eastern and Western South American Countries. **Review Environ Toxic.** v.185, p. 1-33, 2006.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre, Bookman, 2010. 414 p.

BEYER, A; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food. Chem.** v. 108, p, 669-680, 2008.

BIDARI, A. et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction, **Food. Chem.** v. 126, p.1840–1844, 2011.

BLOCKSOM et al. Persistent organic pollutants in fish tissue in the mid-continental great rivers of the United States. **Sci Total Environ.** v. 408, p.1180–1189, 2010.

BOMBARDI, L. M. **Pequeno ensaio cartográfico sobre o uso de agrotóxicos no Brasil**. São Paulo. Laboratório de geografia agrária. USP. Blurb, 2016.

BOMBARDI, L.M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. Laboratório de Geografia agrarian, FFLCH USP, São Paulo, 276p, 2017.

BORGA, K. et al. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. **Environ. Toxic. and Chem.** n. 23, 2004.

BORNMAN, M.S. et al. Endocrine Disruptive Activity and the Potential Health Risk in na Urban Nature Reserve. WRC report No. 1505/1/07. **Water Res. Comm.** Pretoria, South Africa, 2007.

BOTARO, D. et al. Organochlorine pesticides residues in feed and muscle of farmed Nile tilapia from Brazilian fish farms. **Food and Chem. Tox.** v.49, p. 2125–2130, 2011.

BRASIL, ANVISA. **NOTA TÉCNICA 02/2017**. Assunto: Posicionamento da Anvisa referente à Recomendação 028/2016 aprovada em Reunião Plenária do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – CONSEA Referência: Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA de 2013 a 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/NOTA+T%C3%89CNICA+02-2017/1c9e2a07-22fa-417b-a51c-0e9d982031f3>. Acesso em 13 jan. 2018.

BRASIL, ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015+VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. 2016. Acesso em 13 jan. 2018.

BRASIL, ANVISA. **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DOU de 02/06/2003, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – **Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**, 2003.

BRASIL. **DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 20 ago. 2017.

BRASIL. **Alice web**. Disponível em: http://www.mdic.gov.br/sistemas_web/aprendex/default/index/conteudo/id/2429/12 . Acesso em: 18 dez. 2017.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente. Convenção de Estocolmo**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>. Acesso em: 20 ago. 2017.

BRUZZONITI, M.C.; CHECCHINI, L.; DE CARLO, R.M.; ORLANDINI, S.; RIVOIRA, L.; DEL- BUBBA, M. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Anal Bioanal Chem.** v.406. n. 17, p. 4089-116, 2014.

BUAH-KWOFIE, A; HUMPHRIES, M.S; PILLAY, L. Bioaccumulation and risk assessment of organochlorine pesticides in fish from a global biodiversity hotspot: Simangaliso Wetland Park, South Africa. **Science of the Total Environ.** v.621, p. 273–281, 2018.

BURKE, J. **Solubility Parameters: Theory and Application**. Disponível em: <<http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v03/bp03-04.html>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Sci. Chrom.** v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CAJKA et al. Streamlining sample preparation and gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. **Anal. Chim. Acta.** v. 743, p. 51–60, 2012.

CAMEL, V. Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides Determination. **Journ. of Chrom. A.** n. 26, p. 99-111, 2008.

CAPKIN, E; ALTINOK, I; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere.** v.64. n. 10, p. 1793-1800, 2006.

CARABIAS-MARTINEZ et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journ. of Chrom. A**, v. 1089, n. 1-2, p.1–17, 2005.

CARMO, L. J. **Avaliação do crescimento de três linhagens de Tilápia *Oreochromis sp*, em sistema semi-intensivo, cultivadas em viveiros**. Dissertação de Mestrado (Recursos Pesqueiros e Aquicultura), Recife, 2003.

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

CASTELL, J. D. et al. Essential Fatty Acids in the Diet of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*): Lipid Metabolism and Fatty Acid Composition, **The Journ. of Nutr.** v. 102, n. 1, p. 93-99, 1972.

CASTRO, F.P; CAPOTE, L.Q. Ultrasound in analytical chemistry. **Anal Bioanal Chem**, v. 387, p. 249–257, 2007.

CENTENO, L. et al. Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. **Zoot. Trop**, v. 25, p. 237-243, 2007.

CETESB. **Guia Nacional De Coleta e Preservação De Amostras Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**. São Paulo, 2011.

CHAFER-PERICAS, C. et al. Dispersive solid-phase extraction and immunoassay with internal reference calibration using fatty acid-coated inorganic fluorescent nanoparticles. **Anal Biochem** , v. 432, p. 31–37, 2013

CHANG, G. R. Persistent organochlorine pesticides in aquatic environments and fishes in Taiwan and their risk assessment. **Environ. Scie and Poll Res.** v.1, 2017.

- CHATTERJEE, N.S. et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect, **Food Chem.** v. 196, p. 1–8, 2016.
- CHO, H.R. et al. Multiresidue method for the quantitation of 20 pesticides in aquatic products. **Anal Bioanal Chem.** v. 407, p.9043–9052, 2015.
- CHOI, S. et al. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chem.** v. 173, p. 1236–1242, 2015.
- CHOI, M; LEE. I.S; JUNG, R.H. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chem.** v. 205, p. 1–8, 2016.
- CHOPRA, A. K; SHARMA, M. K; CHAMOLI, S. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. **Environ. Mon. and Assess.** v. 173, p. 905–916, 2010.
- CHUI, Q.S.H; ZUCCHINI, R.R; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Quim. Nova.** v. 24, p374, 2001.
- CLARK, R.B. **Marine Pollution.** Oxford: Nova York, 2001.
- COLLINS, C.H. et al. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- CUI, L. et al. Concentrations, bioaccumulation, and human health risk assessment of organochlorine pesticides and heavy metals in edible fish from Wuhan, China. **Environ Sci Pollut Res.** v. 22, p.15866–15879, 2015.
- CUNICO, M.W.M et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acad.** Curitiba, v.9, n.1, 2008.
- CURBELO, G.M.A. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Tren. in Anal. Chem.** v. 71, p. 169-185, 2015.
- DAGNAC et al. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. **J Chromatogr A.** v. 1216, p. 3702–3709, 2009.
- DANG et al. Tissue distribution of organochlorine pesticides in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from laboratory exposure and a contaminated lake. **Environ. Poll.** p. 1-7, 2016.
- D' AMATO, C., TORRES, J.P.M., MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental - Uma Revisão. **Quím. Nova.** v.25, p. 995-1002, 2002.
- DE CARVALHO, P. A. et al. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characi-formes) in a reservoir in southeastern Brazil. **J Appl Ichthyol.** v.25, p.306–312, 2009.
- DEAN, JR. **Extraction methods for environmental analysis.** Wiley: Chichester, 1998.

DERIBE, E. et al. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: The influence of lipid content and trophic position. **Scie. of the Total Environ.** v. 410-411, p 136-145, 2011.

DOS REIS, M. R. S et al . Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. **Microchem J.** v. 10, p. 395–401, 2013.

DOS SANTOS, et al. Histological alterations in gills of *Astyanax aff. Bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Exp Toxicol Pathol.** v.64, p.861–866, 2012.

DUARTE, M, A, I. **Poluentes orgânicos persistentes**. 2002, 80f. (Monografia), Escola Politécnica da Universidade do Brasil – UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

EFSA. European Food Safety Authority; **The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food**. EFSA Journal, v. 11, n 3, 2013. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>._ Acesso em: 12 jan 2018.

ERNEY, D.R; GILLESPIE, A.M; GILVYDIZ, D.M. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journ. of Chromat.** v. 638, p. 57-63, 1993.

ETTRE, L.S; MORRIS, P.J.T. **The Saga of the Electron-Capture Detector**. LCGC North America. v.25, n.2, p 164–178, 2007.

EUROPEAN STANDARD. **Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method**. EN 15662. Brussels, 2008.

EZEMONYE, L. et al. Pesticide contaminants in *Clarias gariepinus* and *Tilapia zilli* from three rivers in Edo State, Nigeria; implications for human exposure. **Int. J. of Food Cont.** v. 2, n. 3, p.1-10. 2015.

FAO, Codex Alimentarius Commission. **Draft and proposed draft Maximum residue limits in foods and feeds**, CX/PR 06/38/5, Brazil, 2006. Disponível : https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/codex_ccpr_38_agenda_item6c_codex_en.pdf. Acesso em: 11 mar. 2018.

FAO, Food and Drug Administration, Proceedings of the Asia Regional Workshop, **Regional Office for Asia and the Pacific**, Bangkok, 2005.

FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Joint FAO/WHO, Geneva, pp. 29 e 35. **World Health Organization Technical Report Series**. p 859, 2010

FAO/WHO. **Codex Alimentarius Commission**, Thirty-eighth Session, Fortaleza, Brazil, 2006.

FAO. **Pesca e aquicultura**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf>. Acesso em 29 dez. 2017.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organisation). 2014. **“Codex Pesticides Residues in Food Online.”** 2015, Disponível em:< <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

FDA, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Pharmaceutical Quality/CMC **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry**, 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

FAO/WHO. World Health Organization; **Application of Risk Analysis to Food Standards** Issues. Report of a FAO/WHO Expert Consultation. WHO/FNU/FOS/95.3. Geneva, 1995.

FERNANDEZ-BRINGAS, L.M. et al. Organochlorine pesticides in lacustrine sediments and tilapias of Metztitlan, Hidalgo, Mexico. **Rev. Biol. Trop.** n. 56, v.3, p. 1381-1390, 2008.

FIDALGO-USED, et al. Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection. **Journ. of Chrom. A.** v. 1017, n. 1, p. 35–44, 2003

FISK, A.T. Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 17, p. 951-961, 1998.

FONTANA et al. Ultrasoundassisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquid-liquid microextraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta.** v. 82, n. 359, p 60–66, 2010.

FONTANALS, N; MARCE, R.M; BORRUL, F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. **T. in Anal. Chem.** v. 24, n. 5, p. 394-406. 2005.

FRIEDRICH, M.T. et al. Use of Factorial Design in the Development of Multiresidue Method for Determination of Pesticide Residues in Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Meth.** v.9, n.9, p. 2541–2551, 2016.

GARP. **Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.

GARUTTI, V. Contribution to the knowledge of breeding *Astyanax bimaculatus* in watercourses of the Paraná River basin. **Rev Bras Biol**, v. 49, p. 114-120, 1989.

GERBER, R. et al. Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and other organochlorine pesticides in na Apex aquatic predator from a premier conservation área. **Sci. of the Total Environ.** v.550, p. 522-533, 2016.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GIERGIELEWICZ-MOZAISKA et al. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples – some aspects of theory and practice. **Crit. Rev. in Anal. Chem.** v.31, p.149–165, 2001.

GOBAS, F.A.P.C. et al. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. **Environmental Science and Technology.** v. 33, p. 133–141, 1999.

GODINHO, A.L; LAMAS, I.R; GODINHO, H.P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environ. Biol. Fish.** v. 87, p.143–62, 2010.

GONZÁLEZ-CURBELO, M.A. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **T. in Ana. Chem.** v. 71, p. 169-185, 2015.

GUI, D. et al. Bioaccumulation and biomagnification of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. **Chemosphere**. v. 114, p. 106–113, 2014.

GUIDI, L.R. et al. Matrix effect on the analysis of amphenicols in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) VII Brazilian Congress on Metrology (Metrologia 2013). **Journ of Phys: Confer**, 2015.

GUO, Y; ZHENG, E.Y. Comment on “Halogenated Contaminants in Farmed Salmon, Trout, Tilapia, Pangasius, and Shrimp”. **Environ. Sci. e Techn.** v. 43, n. 19, 2009.

GUPTA, PK. Pesticide exposure-Indian scene. **Toxicology**. v. 198, p. 83- 90, 2004.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: LTC, 2012. 898 p

HE et al. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method. **Food Chem.** v.169, p. 372-380, 2015.

HEALTH CANADA. **Federal contaminated site risk assessment in Canada: PART 1: Guidance on human health preliminary quantitative risk assessment (PQRA)**, 2004. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/hecs-sesc/ehas/contaminated_sites.htm. Acesso em: 8 fev. 2018.

HERBERT, C. G; JOHNSTONE, R.A.W. **Mass Spectrometry Basics**. CRC Press. 2002, 474p.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas – uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, jan./jun. 1995.

HINOJOSA-GARRO, D; CHAN, A.M.B; OSTEN, J.R. Organochlorine Pesticides (OCPs) in Sediment and Fish of Two Tropical Water Bodies Under Different Land Use. **Bull Environ Contam Toxicol**. v.97, p. 105-111, 2016.

HOLMES et al. Single-Laboratory Ruggedness Testing and Validation of a Modified QuEChERS Approach To Quantify 185 Pesticide Residues in Salmon by Liquid Chromatography and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** v. 63, p. 5100–5106, 2015.

HOLSTEGE et al. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. **Journ. of AOAC Intern.** v. 77, n. 5, p.1263–1274, 1994.

HONG, J. et al. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journ. of Chrom. A**, v. 1038, p. 27–35, 2004.

HOU et al. Amultiresiduemethod for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chem.** v. 138, p. 1198–1205, 2013.

HUANG, H.J; LIU, S.M; KUO, C.E. Anaerobic biodegradation of DDT residues (DDT, DDD, and DDE) in estuarine sediment. **J. Environ. Sci. Health B**. v. 36, p. 273- 288, 2001.

HUBER, A.; BACH, M.; FREDE, H.G. Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. **Agric, Ecos. & Environ.** v. 80, n. 3, p. 191-204, 2000.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008

IAP, Environmental Institute of Paraná. **Monitoring of the quality of reservoirs in the state of Paraná, from 2005 to 2008**. Oficial Press, Curitiba. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/iap/arquivos/File/boletins/RELATORIO_AGUA/relatorio_RESERVATORIOS_2005_2008>. Acesso em: 20 Fev. 2018.

IBAMA. **Relatório de Consumo de ingredientes ativos de Agrotóxicos e afins no Brasil**, DILIQ, Publicação Restrita, Brasília, 2003.

IBGE/SIDRA. **Brasil, série histórica de área plantada; série histórica de produção agrícola; safras 1998 a 2011**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 13 jan. 2018.

ICH, International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/95), 1995. Disponível em: < www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Acesso em: 17 dez. 2017.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. 2011.

IUPAC. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis**. v. 74, n. 5, 2002.

JARDIM, A.N.O; CALDAS, E.D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. **Quim. Nova**. v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JAYARAJ, R; MEGHA, P; SREEDEV, P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. **Interdiscip Toxicol**. v.9, n 3-4, p. 90-100, 2016.

JORDAN, T.B; NICHOLS, D.S; KERR, N.I. Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. v.394, p. 2257–2266, 2006.

KACZYNSKI et al. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chem**. v. 1, n. 230, p. 524-531, 2017

KAFILZADEH, F. Assessment of Organochlorine Pesticide Residues in Water, Sediments and Fish from Lake Tashk, Iran, **Achiev in the Life Scien**, v. 9, p. 107–111, 2015.

KALACHOVA et al. Gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry: a powerful tool for the (ultra)trace analysis of multiclass environmental contaminants in fish and fish feed. **Anal Bioanal Chem**. v. 405, p. 7803–7815, 2013.

KAZUSAKI, M. et al. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis, **Chromatography**, v.33, n.2, 2012.

KLAASSEN, C.D; AMDUR, M.O; DOULL, J. Casarett & Doull's toxicology: **The basic science of poisons**, 5ª Ed. McGraw-Hill, New York, 1996.

KULLMAN,S.W; MATSUMURA,F. Metabolic pathway utilized by Phanerochaete hrysosporium for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. **Appl. Environ.Microbiol**, v.62, p. 593–600. 1996.

KWONG, R.W.M. et al. Uptake, elimination, and biotransformation of aqueous and dietary DDT in marine fish. **Environ. Toxicol. Chem.** v.27, p. 2053-2063, 2008.

LAM, P.K. WU, R.S.S. **Use of biomarkers in environmental monitoring. Scientific and technical advisory panel and global environment facility.** p. 79, 2003.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** São Carlos: Rima editora, v.4, p.96ed. 2004.

LAZARTIGUES M. et al. Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem** v. 400, p. 2185–2193, 2011.

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

LEHOTAY, S. J et al. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journ. of Agric. and Food Chem.** v. 49, n 10, p. 4589–4596, 2001.

LEHOTAY, S. J; MASTOVSKA, K; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices. **JAOAC Int**, v. 88, n. 2, p.630–638, 2005.

LEHOTAY, S. J. **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues.** Pesticide Protocols Methods in biotechnology, v.19, 2006.

Lehotay S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**, n. 90, p.485-520, 2007.

LUKE, M.A; FROBERG, J.E; MASUMOTO, H.T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **J Assoc Off Anal Chem.** v.58, n.5, p,1020-6, 1975.

MACKAY,D. et al. **Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemical**, Taylor, New York, 2006.

MARTI, M. et al. Persistent organic pollutants (PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, marker PCBs, and PBDEs) in health supplements on the Spanish market. **Chemosphere**, v.78, n. 10, p. 1256–1262, 2010.

MATOVSKA, K; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **J. of Chrom. A.** v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

MATSUMURA, F. General Principles of insecticide toxicology. **Toxicology of Insecticides**, p.11-43, 1985.

MENONE, M.L et al. The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulatus* in trapping organochlorine pesticides. **Mar. Pollut Bull**, v. 48, p.240–247, 2004.

MHADHBI, L; BEIRAS, R. Acute Toxicity of Seven Selected Pesticides (Alachlor, Atrazine, Dieldrin, Diuron, Pirimiphos-Methyl, Chlorpyrifos, Diazinon) to the Marine Fish (Turbot, *Psetta maxima*). **Water Air and Soil Poll.** v.223, n. 9, p.5917-5930, 2012.

MIRANDA, A. L et al. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ Int.** v. 34, p. 939–949, 2008.

MOL et al. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. **Anal. and Bioan. Chem.** v.389, p. 1715–1754, 2007.

MOLINA-RUIZ, J.M. et al. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Environ Sci Pollut Res.** v.22, p. 369–378, 2015.

MONTONE, R.C. **Poluentes Orgânicos Persistentes**. Disponível em: <http://www.io.usp.br/index.php/oceanos/textos/antartida/31-portugues/publicacoes/series-divulgacao/poluicao/812-poluentes-organicos-persistentes>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MUNARETTO, J.S. **Determinação de disruptores endócrinos em file de peixe utilizando QueChErs modificado e CG TQ-MS/MS**. 2012. 145f, Dissertação (Mestrado em Química). Santa Maria, 2012.

MUNARETTO, J. S.; FERRONATO, G.; RIBEIRO, L. C.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta**. v. 116, p. 827–834, 2013.

MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo, In: TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P.(org.) **Microb. do solo**, Campinas, Sociedade Brasileira do Sol, 1992, p.341-360.

NAVARRO et al. Plasma levels of luteinizing hormone and gonadal maturation of lambari females under different photoperiods. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.48, n.8, p.1064-1070, ago. 2013.

NEVES, C. F. C; SCHVARTZMAN, M. M. A. M; JORDAO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**. v.25, p.327, 2002.

NIELL, S. et al. QuEChERS Adaptability for the Analysis of Pesticide Residues in Beehive Products Seeking the Development of an Agroecosystem Sustainability Monitor. **J Agric Food Chem.** v. 13 n. 63, p. 4484-92, 2015.

NIESSEN, W.M.A. **Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry**. CRC Press, 2001.

NIKOLAIVITS, E. et al. Marine-Derived Biocatalysts: Importance, Accessing, and Application in Aromatic Pollutant Bioremediation. **Front. Microbiol.** v.8, p. 265, 2017.

NOLLET, L.M.L. **Chromatographic Analysis of the Environment**. 3ed. CRC Press,

2006.

NOLLET, L.M.L.; RATHORE, H.S. **Handbook of pesticides: Methods of pesticides residues analysis**. CRC Press. Nova York, 630p, 2010.

NORLI, H.R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Applications of QuEChERS method for extraction of select persistente organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **J. of Chrom. A**. v.1218, p. 7234-7241, 2007.

NUAPIA, Y; CHIMUKA, L; CUKROWSKA, E. Assessment of organochlorine pesticide residues in raw food samples from open markets in two African cities, **Chemosphere**. v.164, p. 480-487, 2016.

OGBEIDE, O; TONGO, I; EZEMONYE, L. Risk assessment of agricultural pesticides in water, sediment, and fish from Owan River, Edo State, Nigeria. **Environ Monit Assess**. v. 187, p. 654, 2015.

OLIVEIRA-SILVA, J.J. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev. de Saúde Púb.** São Paulo, v. 35, n. 1, p 30-35, 2001.

OLUTONA, G.O. et al. Downstream assessment of chlorinated organic compounds in the bed- sediment of Aiba Stream, Iwo, South- Western, Nigeria. **SpringerPlus**. V.5., n. 67, 2016.

PANDEY N. et al. Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide in mammalian germ cells. **Mutation Research**. v. 242, n. 1, p. 1–7, 1990.

PAPADAKIS, E. N; VRYZAS, Z; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry. **J. of Chrom. A**. v. 1127, n. 1–2, p.6–11, 2006.

PEDRO, A. et al. Blubber-depth distribution and bioaccumulation of PCBs and organochlorine pesticides in Arctic-invading killer whales. **Sci. of the T. Envi.**, v. 601–602, p. 237–246, 2017.

PELAEZ, V. **Monitoramento do mercado de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect>. Acesso em: 10 dez. 2015.

PENA, A. et al. Ultrasound-assisted extraction of pesticides from olive branches: a multifactorial approach to method development. **Anal. and Bioan. Chem**. v.385, n.5, p. 918-925, 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Eng. San. e Amb**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

PEREIRA-FILHO, E. R; POPPI, R. J; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p.246-253, 2002.

PERES, F. et al. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: Uma introdução ao tema**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003, 384p

PETROVIC, M. et al. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. **J. of Chrom. A**. v.974, p.23-51, 2002.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. **BioSciencen**. 36, p. 86-91. 1986.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Quim. Nova.** v.19, n.3, p.268- 277, 1996.

PINHO, G. P, et al. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Quím. Nova.** v. 33, p. 909-913, 2010.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova.** v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **J Chrom. A** . v. 123, n.1142, 2007.

PNUMA, Os nove novos pops: uma introdução às nove substâncias químicas adicionadas à convenção de Estocolmo na quarta reunião da conferência das partes. **Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes**, 2010.

PUBCHEM. Compounds characteristics. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 10 fev. 2018.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: life history and biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 283, 1999.

RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRE, C.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J.Chromatogr. A**. v.1304, p. 109–120, 2013.

RIBANI, M et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova.** v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, A.O. et al. Assessment of DDT and Metabolites in Soil and Sediment of Potentially Contaminated Areas of Belém, Amazon Region, Brazil. **Bull. of Envi. Cont. and Tox.**, v. 99, n. 1, p. 125–130, 2017.

SADOWSKA-RODZIEK, A; SURMA, M; CIESLIK, E. Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. **Environ Sci Poll Res.** v. 21, n. 2, p. 1326–1338, 2013.

SANCO. UNIÃO EUROPÉIA. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.**- 12571/2013.

SANTE. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.** SANTE/11945/2015, Disponível em http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf. Acesso em: 02 mar. 2017.

SANTE. **Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed.** European Commission directorate-General for Health and Food Safety. 11813, 2017.

SANTOS, R.A; CAMPOS, E.C; CAMARA, J.C. On the gonadal maturation and growth curves of females of “tambuí”, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), in Ibitinga Reservoir, São Paulo State, Brazil. **Bol. do Inst. de Pesca.** v.18, p. 1-11, 1991.

SAPOZHNIKOVA, Y; BAWARDI, O; SCHLENK, D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. **Chemosphere.** v. 55, p. 797–809, 2004.

SARTORI, A. G. O; AMANCIO, R.D. Pescado: Importância nutricional e consumo no Brasil. **Segur. Aliment. Nutr.** v. 19, n. 2, 2012.

SATO, Y. et al. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Rev Bras. de Zoologia.** v.23, p.267-273, 2006.

SHAMSIPUR, M; YAZDANFAR, N; GHAMBARIAN, M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice, **Food Chem.** v. 204, p.289-97, 2016.

SHEN, Z.L. et al. Matrix Solid Phase Dispersion-Accelerated Solvent Extraction for Determination of OCP Residues in Fish Muscles, **J. of the Chi. Chem. Soc.** 2011, 58, 494-50.

SINDVEG. **Estatísticas do setor.** Disponível em <<http://sindiveg.org.br/estatisticas-do-setor/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

SINGH, K. K.; GAYATRI V. Neem and its pesticidal characteristics. **Science and Culture** n. 67, p. 30–41, 2001.

SINGH, N. et al. Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. **J. of Applied Toxic.** v.27, n.2, p. 143–151, 2007.

SKOOG, D.A. et al. **Princípios de análise instrumental**, 5ª edição. Bookman: Porto alegre, 836p, 2002.

SLIWINSKI, A. **Ultradzwieki i ich zastosowania.** Warszawa, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1993.

SOLOMONS, T. W. et al. **Química Orgânica**, 9 ed. LTC, 2009.

STENERSEN, J. **Chemical pesticides: mode of action and toxicology.** 1. ed. Flórida: CRC Press, 2004

STREMEL, T.R.O. et al. Development, validation and matrix effect of a QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fish tissue. **J. Environ. Sci. Health B.** v. 53, n.4, 2017.

SU, R. et al. Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography–mass spectrometry. **J Chromatogr A.** v. 879, p. 3423–3428, 2011.

SUCHAN, P, et al., et al. Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. **Analytica chimica Acta.** p. 193-200, 2004.

SUDARYANTO, A, et al., et al. Levels and distribution of organochlorines in fish from Indonesia. **Envin. Intern.** v. 33, p. 750-758, 2007.

SUN, X. et al. Ultrasound-assisted extraction and solid-phase extraction as a cleanup procedure for organochlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls determination in aquatic samples by gas chromatography with electron capture detection, **J. Sep. Sci.** v. 38, p. 626–633, 2015.

SUSAN, S; SANIA, P. **Endosulfan - A review of its toxicity and its effects on the endocrine system**, WWF (World Wild Life Fund – Canada), 1999.

SZLINDER-RICHERT, J. et al. Organochlorine pesticides in fish from the southern Baltic Sea: levels, bioaccumulation features and temporal trends during the 1995-2006 period. **Mar Pollut Bull.** v.56, n. 5, p. 927-40, 2008.

TELES.M.P.M, **Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes**. 2006. 295 f. Tese (Doutorado em Biologia), Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2006.

TEOFILO, R.F; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais: um tutorial. **Química nova.** v. 29 n. 338, 2009.

TERZOPOULOU, E; VOUTSA, D. Study of persistent toxic pollutants in a river basin— ecotoxicological risk assessment. **Ecotoxicology**, v.26, p. 625–638, 2017.

THOMPSON, M. E; ELLISON, S. L. R; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Appl. Chem.** v. 74, p. 835–855, 2002.

TOPOS. **Sistemas Ambientais. Resíduos de praguicidas em águas**. Disponível em: <http://www.topos.com.br/cordella/prag.htm>. Acesso em 15 set. 2017.

TOWERS, L. **Maturation and spawning in fish**, 2014. Disponível em: < <https://thefishsite.com/articles/maturation-and-spawning-in-fish>> Acesso em 10 dez. 2017.

UCLÉS, S. et al. Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta.** v.174, p. 72–81, 2017.

UNEP/GEF, **Evaluación Regional Sobre Sustancias Tóxicas Persistentes**, Informe Regional De América Central y El Caribe. 2002. Disponível em: <[http://www.chem.unep.ch/pts/regreports/Translated%20reports/Central%20America%20 &%20Caribbean%20sp.pdf](http://www.chem.unep.ch/pts/regreports/Translated%20reports/Central%20America%20&%20Caribbean%20sp.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2017.

USEPA. Method 3550b. Ultrasonic extraction, 1996.

USEPA. **Risk Assessment Guidance for Superfund Volume 1: Human Health Evaluation Manual (Part B)**, Development of Risk-Based Preliminary Remediation Goals (No. EPA/540/R-92/003). 1991. Disponível em: < <https://www.epa.gov/risk/risk-assessment-guidancesuperfund-rags-part-b>>. Acesso em: 21 fev 2018.

US EPA. **Risk-based concentration table**. Philadelphia PA: United States Environmental Protection Agency, Washington, 2009.

USEPA, Method 3500C: **Organic extraction and sample preparation**. 2007.

USEPA, Method 3660c. **Clean up**. 2007.

USEPA. **About the National Center for Environmental Assessment (NCEA)**. Disponível em: <http://www.epa.gov/NCEA/iris/rfd.htm>. Acesso em: 02 fev. 2018

USEPA. **Health Effects Support Document for Aldrin/Dieldrin**, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Health and Ecological Criteria Division, Washington, 2003.

US-FDA. United States Food and Drug Administration. **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**, 2001. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 17 dez.2017.

VALLEJO, A. et al. Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography–mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples. **J. Chrom. A**. n. 1217, p.8327–8333, 2010.

VALSAMAKI et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. **Anal. Chim. Acta**. n.573–574, p. 195–201, 2006.

VEGA-BUSTILLOS, O.et al. **A espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo, 2001.VESSMAN et al., 2001

VESSMAN et al. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p.1381-1386, 2001.

VIEIRA S. **Estatística Experimental**. 2 ed. São Paulo, Atlas, 1999.

VILLA, R.D. et al. Avaliação dos parâmetros de solubilidade de Hildebrand/ Hansen na seleção de solventes para a extração de pesticidas organoclorados do solo. **Quim. Nova**. v.34, n.9, p. 1501-1506, 2011.

VOIGT, C.L. et al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environ Sci Pollut Res**. v. 22, n. 11, p. 8242-52, 2014.

VOUTSAS, E. et al. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. **Chemosphere**, v.30, n.2, 2002

WAGNER, P. M. **Avaliação de linhagens de Tilápia do Nilo(*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação**. Dissertação(Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 51p, 2002.

WALTERS, S M. Clean-up techniques for pesticides in fatty foods. **Anal. Chem. Acta**, pp. 77-82, 1990.

WANG, D. et. Al. Organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake, China, and associated human health risk assessment. **Eco. and Env. Saf**. v. 98, p.383–389, 2013.

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

WEN-XIU, L. et al. Aquatic biota as potencial biological indicators of the contamination, bioaccumulation and health risks caused by organochlorine pesticides in a large, shallow Chinese lake (Lake Chaohu). **Ecol. Indicators**. v.60, p.335-345, 2016.

WHO - FAO. World Health Organization; **Risk Management and Food Safety**. Food and Nutrition Paper, nº 65. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-w4982e.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2017.

WHO, **Guidelines on validation** – Appendix 4 3 Analytical Method Validation 4, 2016. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Guideline Validation AnalyticalMethodValidationQAS16-671.pdf. Acesso em: 08 nov 2017.

WHO, World Health Organization, Food Agriculture Organization, **Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants** (Technical Report No. 751). Cambridge University Press. 1987

WILKOWSKA, A; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS Methodology. **Food Chem.** v.125, p.803–812, 2011.

WITCZAK, A; PATRZYKAŁ, A. Comparison of two sample preparation methods for analysis of organochlorine pesticides residues in fish muscle, **J. of Env. Sci. and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.** v.46, n. 2, p.191-197, 2011.

WORTHING, C.R.; WALKER, S.B. The pesticide manual. **A world compendium, Croydon: British Crop Protection Council**, 8 ed, p. 231-2, 1987

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

YAMAMOTO, F.Y. et al. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environ Sci Pollut Res.** v. 23, p. 18111–18128, 2016.

YANG, R. et al. Organochlorine pesticides and PCBs in fish from lakes of the Tibetan Plateau and the implications. **Environ. Poll.** v. 158, p. 2310-2316, 2010.

YANG, R.; YAO, T.; XU, B.; JIANG, G.; XIN, X. Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau, **Envi. Int.** v. 33, p.151–156, 2007.

YARITA, T; AOYAGI, Y; OTAKE, T. Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography–mass spectrometry using isotope-labeled internal standards, **J. Chromat. A**, v. 1396, p. 109–116, 2015.

YEHOUENOU, E. et al. Contamination of fish by organochlorine pesticide residues in the Ouémé River catchment in the Republic of Bénin. **Environ. Internat.** v. 32, p. 594-599, 2006.

YU B; WANG, Y; ZHOU, Q. Human health risk assessment based on toxicity characteristic leaching procedure and simple bioaccessibility extraction test of toxic metals in urban street dust of Tianjin, china. **PLoS One.** v. 9, n. 3, 2014.

YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Gas chromatography. In: CAZES, J. (Ed.) **Analytical Instrumentation Handbook**. 2ed. CRC Press, 2004.

ZENG, F. et al. Evaluation of Bayesian approaches to identify DDT source contributions to soils in Southeast China. **Chemosphere.** v.176, p. 32 – 38, 2017.

ZHANG, S.D; GANT, T.W. Effect of pooling samples on the efficiency of comparative studies using microarrays. **Bioinformatics**. v. 21, n. 24, p. 4378–4383, 2005.

ZHAO, Z. et al. Bioaccumulation and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in freshwater fishes: a case study performed in Poyang Lake, China's largest lake. **Environ Sci Pollut Res**, v. 21, p. 8740–8749, 2014.

ZHENG, S. et al. Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiu long River and estuary in South China. **Chemosphere**. v. 144, p. 1177–1192, 2016