

DEMÉTRIO DE ABREU SOUSA

Ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos de *Caiman yacare*  
(jacaré-do-Pantanal)

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, no âmbito do Programa  
DINTER - CAPES com o Instituto Federal do Mato  
Grosso, como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa R. de Marchi  
Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana P. de Oliveira

Araraquara  
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S725o Sousa, Demétrio de Abreu  
Ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos  
de *Caiman yacare* (jacaré-do-Pantanal) / Demétrio de Abreu  
Sousa. – Araraquara: [s.n], 2014  
113 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi  
Coorientador: Adriana Paiva de Oliveira

1. Química analítica. 2. Quimiometria. 3. Jacaré.  
4. Estudos de validação. 5. Extração por solventes.  
6. Cromatografia a gás. I. Título.

## DADOS CURRICULARES

### Dados pessoais

**Nome** Demétrio de Abreu Sousa

**Endereço profissional** Instituto Federal de Mato Grosso, Campus Cáceres  
Av. dos Ramires, S/N  
Distrito Industrial - Cáceres  
78200-000, MT - Brasil  
Telefone: 65 32212600

### Endereço eletrônico

E-mail: demetrio.sousa@cas.ifmt.edu.br  
e-mail alternativo : demetrioabreu@yahoo.com.br

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2010** Doutorado em Química.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
Título: Ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos de *Caiman yacare* (jacaré-do-Pantanal)  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi
- 2005 - 2008** Mestrado em Química.  
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Brasil  
Título: Grupo de estudo de professores de química: uma investigação-ação, Ano de obtenção: 2008  
Orientador: Wilson Botter Junior
- 2009-** Graduação interrompido(a) em Licenciatura em Química - Modalidade EAD.  
Instituto Federal de Mato Grosso, IFMT, Cuiabá, Brasil  
Ano de interrupção: 2010
- 1999 - 2004** Graduação em Farmácia - Habilitação Análises Clínicas.  
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil  
Título: Infecção Hospitalar em Neonatos  
Orientador: Fabiana Nuevo Roquette Giachetto

---

### Formação complementar

- 2009 -** MBA em Gestão e Perícia Ambiental.  
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 1994 - 1997** Técnico Em Química.  
Escola Técnica Federal do Mato Grosso, ETFMT, Cuiabá, Brasil

---

### Atuação profissional

#### 1. Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT

---

#### Vínculo institucional

- 2010 - Atual** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Docente , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

## **2. Centro Universitário de Várzea Grande - UNIVAG**

---

### **Vínculo institucional**

**2009 - 2010** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 24, Regime: Parcial

## **3. Universidade de Cuiabá - UNIC**

---

### **Vínculo institucional**

**2009 - 2010** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 9, Regime: Parcial

## **4. Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT**

---

### **Vínculo institucional**

**2008 - 2009** Vínculo: Contrato , Enquadramento funcional: Professor Substituto , Carga horária: 16, Regime: Parcial

**2004 - 2005** Vínculo: Professor Substituto , Enquadramento funcional: Professor Substituto , Carga horária: 40, Regime: Integral

## **5. Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT**

---

### **Vínculo institucional**

**2008 - 2008** Vínculo: Contrato, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 12, Regime: Parcial

## **6. Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA-CE**

---

### **Vínculo institucional**

**2007 - 2007** Vínculo: Contrato , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

## **7. Cooperativa de Ensino do Médio Araguaia - COOPEMA**

---

### **Vínculo institucional**

**2004 - 2005** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor titular , Carga horária: 10, Regime: Parcial

## **8. Instituto Madre Marta Cerutti - IMMC**

---

### **Vínculo institucional**

**2005 - 2005** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: professor titular , Carga horária: 8, Regime: Parcial

---

## Projetos

### **2011 - 2012 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO CUMBARU (DIPTERYX ALATA VOG) PRODUZIDO EM POCONÉ (MT).**

Descrição: O projeto visa realizar análises bioquímicas e bromatológicas no cumbaru que é colhido na região de Poconé. As análises serão realizadas na amêndoa in natura e torrada, no fruto e em alimentos produzidos a partir destes produtos. Visamos avaliar as qualidades nutricionais dos produtos e a viabilidade de uso para produção de biodiesel.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Demétrio de Abreu Sousa (Responsável); Mayara Chagas de Ávila.

Financiador(es): Instituto Federal de Mato Grosso-IFMT

### **2010 - 2011 ESTUDO DAS POTENCIALIDADES DE USO DO BAGAÇO DE CANA PARA A CONSTRUÇÃO DE UM FILTRO PARA ÓLEO RESIDUAL**

Descrição: Óleos vegetais residuais devem passar por processos de limpeza antes de serem utilizados na fabricação de biodiesel. O projeto propõe a utilização de bagaço de cana como meio filtrante e adsorvente de possíveis contaminantes que estejam presentes no óleo residual.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Demétrio de Abreu Sousa (Responsável); Juliana Avelar de Carvalho

Financiador(es): Instituto Federal de Mato Grosso-IFMT

### **2010 - 2011 Caracterização físico-química e microbiológica de mananciais hídricos da região de Cáceres (MT)**

Descrição: Este projeto visa realizar a caracterização da qualidade da água de mananciais os quais serão analisadas as características físico-químicas e microbiológicas de águas superficiais na região de Cáceres. Os resultados das análises serão utilizados para caracterização da qualidade da água, sendo, então, possível de indicar pontos de contaminação química e/ou microbiológica. Em caso de contaminação, os resultados serão apresentados ao Poder Público para que o mesmo possa tomar medidas mitigadoras.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (5);

Integrantes: Demétrio de Abreu Sousa (Responsável); Thalita Neves Marostega; Juçara Tinasi de Oliveira

Financiador(es): Instituto Federal de Mato Grosso-IFMT

### **2010 - 2011 Utilização de óleo de fritura para a produção de biodiesel e sabões funcionais**

Descrição: O presente projeto tem a pretensão de reaproveitar o óleo de descarte do IFMT – Campus Cáceres para a produção de sabões funcionais e biocombustível, em nível de bancada, visando esta prática como um recurso pedagógico para o curso de Tecnologia em Biocombustíveis.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (5);

Integrantes: Demétrio de Abreu Sousa (Responsável); Mayara Chagas de Ávila.

## Produção

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. **SOUSA, DEMÉTRIO A., GONÇALVES, RENATO M., HELENO, FERNANDA F., DE QUEIROZ, MARIA ELIANA L.R., DE MARCHI, MARY ROSA R.** Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. *Microchemical Journal (Print)*. , v.114, p.266 - 272, 2014.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. CARVALHO, J. A., **SOUSA, Demétrio de Abreu**. Study the potential use of sugarcane bagasse for adsorption of metals in residual oil In: Rio Oil & Gas Expo and Conference 2012, 2012, Rio de Janeiro. **Rio Oil & Gas Expo and Conference 2012**, 2012.
2. MAROSTEGA, T. N., **SOUSA, Demétrio de Abreu**. O perfil do estudante de tecnologia em biocombustíveis (IFMT/Cáceres) e as relações com o currículo In: V Congresso Internacional de Bioenergia, 2010, Curitiba. **Anais do V Congresso Internacional de Bioenergia**, 2010.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUSA, DEMÉTRIO A. ; DE MARCHI, MARY ROSA R. . PERSISTENT ORGANIC COMPOUNDS IN CAIMAN YACARE EGGS: VALIDATION OF A METHOD BASED ON SOLID LIQUID EXTRACTION WITH LOW-TEMPERATURE PARTITION (SLE-LTP). In: 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC), 2014, Riva del Garda (Italia). **GCxGCLifetimeAchievementAwardLecture**, 2014.
2. MAROSTEGA, T. N., SOUSA, Demétrio de Abreu, ARAUJO, L. M., RANZANI, R. E. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE MANANCIAS HÍDRICAS DA REGIÃO DE CÁCERES (MT) In: Congresso de Iniciação Científica, 2013, Cáceres. **Anais**, 2013. v.8.

## Orientações e Supervisões

### Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Danillo Ferreira Souza. **AINES no meio ambiente: uma revisão sobre a ocorrência e principais fontes de contaminação**. 2012. Monografia (Especialização em Farmacologia e Dispensação Farma) - Instituto Brasil de Pós-Graduação, Capacitação e Assessoria
2. Salviano Dias Vieira. **LEVANTAMENTO DA FREQUÊNCIA DE EXAMES RADIOLÓGICOS REALIZADOS NO MUNICÍPIO DE CUIABÁ (MT)**. 2010. Monografia (Auditoria em Serviços de Saúde) - Universidade de Cuiabá

### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Rogério João Nunes Batista. **Levantamento do Perfil de 50 hipertensos do município de Barra do Graças - MT, Assistidos pelo Programa Saúde da Família-Unidade Centro**. 2004. Curso (Farmácia - Habilitação Análises Clínicas) - Universidade Federal de Mato Grosso

### Iniciação científica

1. Mayara Chagas de Ávila. **ANÁLISE BROMATOLÓGICA DO CUMBARU (DIPTERYX ALATA VOG) PRODUZIDO EM POCONÉ – MT**. 2012. Iniciação científica (Tecnólogo em Biocombustíveis) - Instituto Federal de Mato Grosso
2. Thalita Neves Marostega. **Caracterização físico-química e microbiológica de mananciais hídricos da região de Cáceres (MT)**. 2011. Iniciação científica (Biocombustíveis) - Instituto Federal de Mato Grosso
3. Juliana Avelar de Carvalho. **Uso de bagaço de cana para adsorção de fósforo em óleo residual**. 2011. Iniciação científica (Biocombustíveis) - Instituto Federal de Mato Grosso
4. Mayara Chagas de Ávila. **Utilização de óleo de fritura para a produção de biodiesel e sabões funcionais**. 2011. Iniciação científica (Biocombustíveis) - Instituto Federal de Mato Grosso

## **Bancas**

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. SOUSA, Demétrio de Abreu, MONTECCHI, I. A. D. Participação em banca de Célia Ribeiro Fancio. **EDUCAÇÃO AMBIENTAL COMO EXERCÍCIO DE CIDADANIA NO PROEJA FIC**, 2012. (Especialização PROEJA) Instituto Federal de Mato Grosso

#### **Graduação**

1. FLUMINGAN, D. L., SOUSA, Demétrio de Abreu, RIZZATTO, M. Participação em banca de Ana Larissa de Moraes. **Caracterização da identidade e controle de qualidade de óleo vegetal, matéria-prima para produção de biodiesel**, 2013. (Biocombustíveis) Instituto Federal de São Paulo

2. SOUSA, Demétrio de Abreu, TOLEDO, Olegário Rosa de, DAVID, Flávia Lucia. Participação em banca de CAROLINA CARNICEL. **ANÁLISE COMPARATIVA NA REDUÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR PELOS INIBIDORES ECA EM DIABÉTICOS HIPERTENSOS**, 2004 (Farmácia - Habilitação Análises Clínicas) Universidade Federal de Mato Grosso

3. SOUSA, Demétrio de Abreu, SCHERER, Edson Fredulin, ROBLES, Renata. Participação em banca de FERNANDO VENTURINI. **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA BACTERIANA EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO EM PONTAL DO ARAGUAIA**, 2004 (Farmácia - Habilitação Análises Clínicas) Universidade Federal de Mato Grosso

4. SOUSA, Demétrio de Abreu, SCHERER, Edson Fredulin, ROBLES, Renata. Participação em banca de ALAN RODRIGO PETRENKO. **INCIDÊNCIA DE MALÁRIA NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE JURUENA-MT**, 2004 (Farmácia - Habilitação Análises Clínicas) Universidade Federal de Mato Grosso


5. SOUSA, Demétrio de Abreu, ROBLES, Renata, LEITE, Tatiane Morbeck. Participação em banca de ROGÉRIO JOÃO NUNES BATISTA. **LEVANTAMENTO DO PERFIL DE 50 HIPERTENSOS DO MUNICÍPIO DE BARRA DO GARÇAS - MT, ASSISTIDOS PELO PROGRAMA SAÚDE DA FAMÍLIA - UNIDADE CENTRO**, 2004 (Farmácia - Habilitação Análises Clínicas) Universidade Federal de Mato Grosso

DEMÉTRIO DE ABREU SOUSA

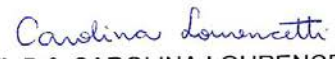
Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 21 de julho de 2014.


BANCA EXAMINADORA

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARIA LUCIA RIBEIRO  
Instituto de Química de Araraquara / UNESP / Araraquara

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CAROLINA LOURENCETTI  
Instituto Federal de São Paulo / IFSP / Matão

  
Prof. Dr. MARIO SERGIO GALHIANE  
Faculdade de Ciências de Bauru / UNESP / Bauru

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARIA ELIANA LOPES RIBEIRO DE QUEIROZ  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas / UFV / Viçosa



## AGRADECIMENTOS

Durante minha formação de pesquisador, tem algo ainda mais valioso que aprendi além dos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos pela academia. Aprendi que ciência é feita por pessoas (no sentido mais pluralista possível). Do meu trabalho de doutorado tenho a consciência de que nada fiz sozinho, pois se consegui chegar longe é porque estive apoiado em ombros de amigos, de familiares e de outros pesquisadores, que são maiores que os gigantes de Newton.

Agradecer a estas pessoas é o mínimo que posso fazer para reconhecer o seu valor e sua contribuição para a construção desta tese. Então eu agradeço:

Aos meus pais, Itália e Salviano, por terem sempre colocado a educação e o amor em primeiro lugar;

Ao meu companheiro Danilo pelo amor, pela amizade, pela ajuda no laboratório e com os cromatogramas, pelo apoio desde o mestrado e ter suportado, pacientemente, tantas vezes o meu único assunto – “o doutorado”;

À minha irmã Monique pelo amor, apoio e por ter conseguido minha permanência em Araraquara;

À orientadora Mary por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer e, assim, ter acreditado em meu potencial em uma simples conversa pelo telefone. Também agradeço pela parceria no forró;

À amiga Carol pelas contribuições e ensinamentos científicos, pela parceria no forró e aventuras radicais;

Aos colegas do GRESCO (Claudia P., Elissandro, Lucy, Patrícia e Paulo) pelas contribuições científicas, ajudas e risadas no laboratório.

Aos amigos Renato (Zé) e Marcos (Pipoca), nossos ‘estatísticos’, pelas explicações e ensinamentos estatísticos.

Às amigas Débora (Brabu) e Stephane (Absoluta) que me acolheram quando precisei e pelas longas discussões científicas durante as madrugadas;

Aos amigos Pedro e Nathalie (Nathalinda) pela diversão, companheirismo e treinamento no ECD;

Ao amigo Bruno pela acolhida e aos amigos Dayana (Day) e Danilo pela gentileza de cederem a casa para morar;

Ao amigo Prof. Dr. Vitor Aleixo e aos pantaneiros pela ajuda nas coletas de ovo de jacaré. Prova de que o conhecimento técnico necessita estar aliado ao conhecimento tácito.

À equipe do LAQUA da Universidade Federal de Viçosa, em especial Profa. Dra. Maria Eliana Queiroz e Dra. Fernanda Heleno, por terem carinhosamente e pacientemente me ensinado a técnica de extração que utilizei neste trabalho.

Ao Eduardo (Pousada Piuval) por ter permitido a coleta dos ovos em sua fazenda.

Às colegas Daryne Lu e Denise pela paciência em liofilizar as amostras.

Aos colegas e profissionais do IQ e do IFMT que ajudaram direta ou indiretamente em minhas dúvidas e solicitações.

*Com todos vocês eu divido esta Tese.*

## RESUMO

Mostramos aqui a ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos de jacaré-do-Pantanal (*Caiman yacare*), coletados em dois municípios do estado de Mato Grosso (Brasil), em 2012 e 2013. *p,p'*-DDE foi o composto encontrado em maior concentração (51,3 – 78,1 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado) em ambas as regiões estudadas. Para a extração de pesticidas organoclorados - OCPs - (*p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, β-endosulfan e endosulfan sulfato) e bifenilas policloradas - PCBs - (congêneres 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180), o conteúdo total de ovos de *C. yacare*, exceto a casca, foi homogeneizado, liofilizado e submetido a um método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) que previamente foi otimizado e validado. Foi utilizado um cromatógrafo a gás (CG) com detector por captura de elétrons (ECD) para a detecção destes analitos. PCB 209 a 10 ng mL<sup>-1</sup> e tetrabromobenzeno (TBB) a 10 ng mL<sup>-1</sup> foram utilizados como padrão interno e como padrão de recuperação (surrogate), respectivamente. O método de extração foi otimizado através de um estudo quimiométrico que incluiu um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> com triplicata do ponto central, para determinação das melhores condições de análise dos compostos de interesse. Volume de solvente extrator (8 – 12 mL), tempo de agitação em vortex (1 – 5 min), tempo de centrifugação a 2.500 rpm (5 – 15 min) e tempo de congelamento (4 – 12 h) foram as variáveis consideradas e testadas em dois níveis, mais a triplicata do ponto central. A recuperação normalizada foi utilizada como resposta para avaliação dos fatores que influenciam o método de extração. As respostas normalizadas foram submetidas ao teste t de Student para determinação dos fatores significativos e as interações entre os fatores foram avaliadas a partir da superfície de resposta. O método otimizado inclui 12 mL de solvente extrator (acetoneitrila: acetato de etila - 6,5:1,5 v/v), 5 min de tempo de agitação em vortex, 15 min de centrifugação a 2.500 rpm e 12 h de congelamento. Para a validação do método, a área cromatográfica de cada analito em relação a área cromatográfica do padrão interno versus concentração foram utilizados para construção de três curvas analíticas: (1) em solvente, (2) na matriz e (3) extraída. Todos os pontos de cada curva foram submetidos ao teste de Huber para exclusão de valores anômalos e a linearidade das curvas foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) e homocedasticidade. A detectabilidade da resposta cromatográfica instrumental foi avaliada pela *curva em solvente* (3,0 – 71,7 ng mL<sup>-1</sup> em isoctano). A *curva na matriz* (2,3 – 53,8 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado) foi utilizada para avaliação de efeito matriz, por comparação da variância residual entre a *curva em solvente* e a *curva na matriz*. Os resultados mostraram que os componentes da matriz podem afetar a quantificação dos compostos estudados. A *curva extraída* (2,3 – 53,8 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado) foi utilizada para a determinação dos parâmetros analíticos (exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade e precisão intermediária) do método baseado em ESL-PBT. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através dos parâmetros da *curva extraída*. O limite de detecção do método (LOD) variou entre 5,3 ng g<sup>-1</sup> (*o,p'*-DDE) e 14,4 ng g<sup>-1</sup> (PCB 52), enquanto que o limite de quantificação (LOQ) variou entre 10,0 ng g<sup>-1</sup> (*o,p'*-DDE) e 35,8 ng g<sup>-1</sup> (PCB 52). O método apresentou recuperação relativa entre 60% (*o,p'*-DDE) e 120% (*o,p'*-DDT), desvio padrão relativo (RSD) menor que 25% para todos os analitos. O uso de ovos de aves como bioindicador de *background* para contaminação de poluentes orgânicos persistentes é recomendado pela Convenção de Estocolmo. Porém, este estudo, inédito no bioma Pantanal, indicou que o uso do ovo de *C. yacare*, réptil que possui o sexo determinado pela temperatura do ninho, é promissor como bioindicador de contaminação de *background* para OCPs e PCBs considerando que foi detectada a presença destes compostos a partir de uma técnica otimizada e validada aplicada nas amostras coletadas no Pantanal mato-grossense.

**Palavras-chave:** *Caiman yacare*, poluentes orgânicos persistentes, extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura, cromatografia gasosa.

## ABSTRACT

This work shows the occurrence of persistent organic pollutants in the eggs of *Caiman yacare*, collected in two regions from Pantanal mato-grossense (Brazil), in 2012 and 2013. p,p'-DDE was the analyte found in higher concentration (51.3 - 78.1 ng g<sup>-1</sup> of lyophilized egg) in both regions studied. For the extraction of organochlorine pesticides (p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT, o,p'-DDD, o,p'-DDE,  $\beta$ -endosulphan and endosulphan sulfate) and polychlorinated biphenyls - PCBs - (congeners 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) *C. yacare* eggs, except shell, were homogenized, lyophilized and was applied a method solid-liquid extraction with low temperature partition (SLE-LTP) optimized and validated. A gas chromatograph (GC) with electron capture detector (ECD) was used. PCB 209 10 ng mL<sup>-1</sup> was used as internal standard and tetrabromobenzene (TBB) 10 ng mL<sup>-1</sup> was used as surrogate. The optimization was based on a chemometric study included a 2<sup>4</sup> factorial design with three replications of the central point to determine the best conditions for the analysis of compounds of interest. Volume extracting solvent (8-12 mL), vortexing time (1-5 min), centrifugation time at 2,500 rpm (5-15 min) and time freezing (4-12 h) were the variables considered and tested at two levels, plus the triplicate central point. The normalized recovery was used as a response to evaluation of factors that influence the extraction method. The normalized responses were submitted to the Student's t-test to determine the significant factors and interactions between factors were evaluated from the response surface. The optimized method includes: extractor solvent 12 mL (acetonitrile: ethyl acetate - 6,5:1,5 v/v), 5 min of vortexing time, 15 min centrifugation at 2,500 rpm and 12 hour freezing. To validate the method, The chromatographic area of each analyte relative to the internal standard chromatographic area vs. concentration were used to construct three analytical curves: (1) analytical curve based on standard solution, (2) analytical curve based on matrix (3) analytical curve based on extract. All points of each curve were submitted to Huber's test for exclusion of outliers and the linearity was evaluated by the coefficient of determination (r<sup>2</sup>) and homoscedasticity. The instrumental detectability was evaluated by analytical curve based on standard solutions (3.0 - 71.7 ng mL<sup>-1</sup> isooctane). The analytical curve based on matrix (2.3 - 53.8 ng g<sup>-1</sup> lyophilized egg) was used to evaluate the matrix effect by comparing the residual variance between the analytical curve based on standard solution and the based on matrix. The results showed that the matrix components may affect the quantification of the analytes. The analytical curve based on extract (2.3 - 53.8 ng g<sup>-1</sup> lyophilized egg) was used to determine the analytical parameters (accuracy, limit of detection, limit of quantitation, repeatability and intermediate precision) of SLE-LTP method. The limit of detection (LOD) ranged 5.3 ng g<sup>-1</sup> (o,p'-DDE) and 14.4 ng g<sup>-1</sup> (PCB 52), whereas the limit of quantitation (LOQ) ranged from 10.0 ng g<sup>-1</sup> (o,p'-DDE) and 35.8 ng g<sup>-1</sup> (PCB 52). The method showed a relative recovery from 60% (o,p'-DDE) and 120% (o,p'-DDT), the relative standard deviation (RSD) of less than 25% for all analytes. The Stockholm Convention recommends the use of bird's eggs as bioindicator for contamination background of persistent organic pollutants. However, this study, unique in the Pantanal biome, indicated that the use of the egg of *C. yacare*, reptile which has sex determined by nest temperature, is promising as a bioindicator of OCPs and PCBs; it was detected present at these compounds in samples collected in Pantanal.

**Keywords:** *Caiman yacare*, persistent organic pollutants, solid-liquid extraction with low temperature partitioning, gas chromatography

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sub-regiões do Pantanal em território brasileiro com destaque para as regiões que estão inseridas neste trabalho _____	21
<b>Figura 2</b> – Exemplo de vegetação em mosaico no Pantanal durante o período chuvoso _____	23
<b>Figura 3</b> – Área plana de campo inundado dominada por gramíneas, no início do período de seca, localizada em Poconé – Rodovia Transpantaneira _____	24
<b>Figura 4</b> – Exemplo de reação de deslocamento mono e bimolecular para o p,p'-DDT _____	30
<b>Figura 5</b> – Exemplo de reação de eliminação mono e bimolecular para o p,p'-DDT _____	30
<b>Figura 6</b> – Proposta de mecanismo de reação da degradação do p,p'-DDT em p,p'-DDE em água no ambiente _____	31
<b>Figura 7</b> – Jacaré-do-Pantanal ( <i>Caiman crocodilos yacare</i> ) _____	37
<b>Figura 8</b> – Interação de interferentes endócrinos e receptores nucleares em crocodilianos _____	40
<b>Figura 9</b> – Localização aproximada dos municípios de Poconé (1) e Barão de Melgaço (2) no Estado de Mato Grosso _____	45
<b>Figura 10</b> – Região de coleta na Fazenda Piuval (Poconé, MT): localização dos ninhos amostrados em janeiro/2012 e 2013 _____	45
<b>Figura 11</b> – Região de coleta em Barão de Melgaço, margens do Rio Cuiabá, ponto de coleta de 10/02/2012 _____	46
<b>Figura 12</b> – Procedimento de coleta dos ovos de jacaré-do-Pantanal, em Mato Grosso _____	47
<b>Figura 13</b> – Demonstração gráfica para a determinação de LOD (A) e LOQ (B) a partir da curva analítica _____	51
<b>Figura 14</b> – Fluxograma geral da técnica de ESL-PBT _____	52
<b>Figura 15</b> – Cromatograma (GC/ECD) para uma solução em isoctano contendo todos os analitos a 10 ng mL <sup>-1</sup> _____	60
<b>Figura 16</b> – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da curva em solvente entre 3,0 e 71,7 ng mL <sup>-1</sup> de isoctano _____	61
<b>Figura 17</b> – Curva em solvente para o o,p'-DDD entre 7,0 e 71,7 ng mL <sup>-1</sup> de isoctano _____	63
<b>Figura 18</b> – Distribuição dos resíduos para o o,p'-DDD entre 7,0 e 71,7 ng mL <sup>-1</sup> de isoctano _____	63
<b>Figura 19</b> – Probabilidade normal vs efeitos _____	67
<b>Figura 20</b> – Gráfico de Pareto para o sistema ESL-PBT _____	68
<b>Figura 21</b> – Superfície de resposta para o planejamento proposto _____	71

<b>Figura 22</b> – Cromatograma CG/ECD: ponto na matriz (A1) em isoctano a 11,25 ng g <sup>-1</sup> de ovo liofilizado para todos os analitos e testemunha (A2) em isoctano. B1 e B2 são uma ampliação para melhor visualização no intervalo de tempo de retenção entre 21 e 36 min	73
<b>Figura 23</b> – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da curva na matriz (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	74
<b>Figura 24</b> – Curva na matriz do o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	74
<b>Figura 25</b> – Distribuição dos resíduos da curva na matriz para o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	75
<b>Figura 26</b> – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da curva extraída (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	77
<b>Figura 27</b> – Curva extraída do o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	78
<b>Figura 28</b> – Distribuição dos resíduos da curva extraída para o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> de amostra liofilizada)	78
<b>Figura 29</b> – Comparação entre as três curvas analíticas (em solvente, na matriz e extraída) para o o,p'-DDD.	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Lista dos POPs de acordo com a Convenção de Estocolmo _____	27
<b>Tabela 2</b> – Sumário de artigos encontrados na literatura incluindo a determinação de POPs em ovos de diversas espécies silvestres. _____	33
<b>Tabela 3</b> – Sumário da aplicação de extração líquido-líquido ou sólido-líquido com partição em baixa temperatura _____	36
<b>Tabela 4</b> – Características gerais do jacaré-do-Pantanal _____	38
<b>Tabela 5</b> – Sumário de estudos realizados com jacaré-americano e diversos interferentes endócrinos _____	41
<b>Tabela 6</b> – Localização geográfica dos ninhos encontrado em Poconé e Barão de Melgaço e número de ovos coletados em 2012 e 2013 _____	44
<b>Tabela 7</b> – Condições cromatográficas para separação dos analitos _____	49
<b>Tabela 8</b> – Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial $2^4$ usado na otimização do método ESL-PBT _____	54
<b>Tabela 9</b> – Parâmetros analíticos e estatísticos da curva em solvente para cada um dos padrões analíticos ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	62
<b>Tabela 10</b> – Normalização da porcentagem de recuperação obtidas para os analitos na otimização da técnica ESL-PBT e CG/ECD _____	65
<b>Tabela 11</b> – Resultados dos efeitos _____	66
<b>Tabela 12</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ após a remoção da coluna “FT” dos fatores descritos na Tabela 10. _____	67
<b>Tabela 13</b> – Parâmetros analíticos e estatísticos para curva na matriz ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	76
<b>Tabela 14</b> – Parâmetros estatísticos e efeito matriz: comparação entre a curva em solvente (CS) e a curva na matriz (CM) para cada analito ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	76
<b>Tabela 15</b> – Parâmetros analíticos e estatísticos para a curva extraída ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	79
<b>Tabela 16</b> – Parâmetros estatísticos e comparação entre a curva na matriz (CM) e a curva extraída (CE) para cada analito ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	80
<b>Tabela 17</b> – Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método ESL-PBT proposto para todos os analitos, obtidos a partir da curva extraída nas faixas lineares entre 2,3 e 53,8 ng g <sup>-1</sup> ( $n \geq 25$ ) <sup>a</sup> _____	82
<b>Tabela 18</b> – Recuperação, desvio padrão relativo, LOD e LOQ reportados em diferentes estudos que usaram ovos de animais silvestres ou de galinha _____	83
<b>Tabela 19</b> – Recuperação relativa média e desvio padrão relativo para todos os analitos em mix ovos de C. yacare extraídos em três níveis de fortificação no mesmo dia ( $n = 10$ ) <sup>a</sup> _____	84

**Tabela 20** – Recuperação média e desvio padrão relativo para todos os analitos em mix de ovos de *C. yacare* fortificados com  $45,0 \text{ ng g}^{-1}$  e extraídos em três dias diferentes ( $n = 10$ )<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_ 84

**Tabela 21** – Concentrações ( $\text{ng g}^{-1}$  de ovo liofilizado) encontradas nos ovos de jacaré-do-Pantanal analisadas ( $n = 9$ )<sup>a</sup> \_\_\_\_\_ 85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAP	– Bacia hidrográfica do Alto rio Paraguai
BDE	– Bromodifeniléter
CBP	– Proteína de ligação do citosol
CT	– Tempo de centrifugação
DDD	– Diclorodifenildicloroetano
DDE	– Diclorodifenildicloroetano
DDT	– Diclorodifeniltricloroetano
DHT	– Dihidroxitestosterona
ECD	– Detector de captura de elétrons
ES	– Solvente extrator
ESL	– Extração sólido-líquido
PBT	– Partição em baixa temperatura
FLD	– Detector de fluorescência
FT	– Tempo de congelamento
GC	– Cromatografia gasosa
Gn	– Gonotropinas
HCB	– Hexaclorobenzeno
HCH	– Hexaclorociclohexano
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC	– Cromatografia líquida
LOD	– Limite de detecção
LOQ	– Limite de quantificação.
MS	– Espectrômetro de massa
OCP	– Pesticidas organoclorados
PBDEs	– Polibromados difeniléteres
PCB	– Bifenilas policloradas
PCDD	– Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PCDEs	– Policlorados difeniléteres
PCDF	– Dibenzofuranos policlorados
PFD	– Detector fotométrico de chama
PFOS	– Ácidos perflúorooctano sulfônico
PFOSF	– Perfluorooctano sulfonilflúor
POP	– Poluente orgânico persistente
RSD	– Desvio padrão relativo
SBP	– Proteína de ligação de hormônios sexuais
SISBIO	– Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UNEP	– United Nations for the Environment Protection
UPLC	– Cromatografia líquida de alta eficiência
UV	– Detector de ultravioleta
VT	– Tempo de agitação em vortex



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>O Pantanal .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Jacaré-do-Pantanal .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta dos ovos e determinação do teor de gordura .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Condições cromatográficas .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da resposta cromatográfica .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>Otimização do método de Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) por planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com triplicata do ponto central e metodologia de superfície de resposta.....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Validação do método.....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Teor de gordura total em ovos de <i>C. yacare</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da resposta cromatográfica instrumental a partir da <i>curva em solvente</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3</b>	<b>Otimização da ESL-PBT por planejamento fatorial .....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Recuperações e recuperação normalizada .....</b>	<b>64</b>
<b>5.5</b>	<b>Resultados dos efeitos e superfície de resposta .....</b>	<b>66</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Efeitos principais.....</b>	<b>68</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Efeitos de interações de 2<sup>a</sup>-ordem .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Efeitos de interações de 3<sup>a</sup>-ordem .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Efeito de interação de 4<sup>a</sup>-ordem.....</b>	<b>70</b>
<b>5.5.5</b>	<b>Superfície de resposta.....</b>	<b>70</b>
<b>5.6</b>	<b>Validação do método.....</b>	<b>72</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Avaliação do efeito matriz .....</b>	<b>72</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Curva extraída</i> e validação do método ESL-PBT .....</b>	<b>77</b>
<b>5.7</b>	<b>Aplicação do método .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Poluentes orgânicos persistentes (POPs), tais como pesticidas organoclorados (OCPs) e bifenilas policloradas (PCBs), são amplamente distribuídos no ambiente. Neste trabalho mostramos a ocorrência de OCPs e PCBs em ovos de jacaré-do-Pantanal (*Caiman yacare*), coletados no Pantanal mato-grossense, e apontamos o seu uso como um possível bioindicador de contaminação de *background*.

Matrizes ambientais e biológicas em geral são matrizes complexas e o método de extração dos compostos de interesse deve ser efetivo na eliminação de macromoléculas como lipídios, pois são incompatíveis com análises cromatográficas com detector por captura de elétrons (ECD) e podem produzir efeito matriz. O desafio adicional é a remoção dos compostos interferentes recuperando os analitos não-polares (POPs). Ovos de crocodilianos são ricos em lipídios pois essa energia concentrada é necessária para o desenvolvimento embrionário, durante a incubação, e para a estrutura da membrana celular<sup>1</sup>. O uso de qualquer organismo como bioindicador de contaminação ambiental requer o emprego de critérios ecológicos apurados, além de cuidadosa avaliação da confiabilidade analítica do método de análise a ser empregado.

Neste trabalho, um método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) foi proposto para determinar OCPs e PCBs no conteúdo total de ovos de *Caiman yacare*, exceto a casca, que foi previamente homogeneizado e liofilizado. ESL-PBT é um método simples, de baixo custo, que permite realizar a extração e o clean-up em uma única etapa.

O método foi otimizado por planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta empregada auxiliou a determinar as variáveis que influenciam na eficiência do método de extração e clean-up. A otimização univariada avalia os efeitos de resposta para cada fator/variável separadamente e cada nível do fator analisado possui um tratamento de dados diferente, onde o tratamento é um indicativo de resposta e efeito em cada

experimento<sup>2</sup>. Este método tem a desvantagem de depender um longo período de tempo para avaliar o efeito de cada variável e não é capaz de prever as interações que podem ocorrer entre as variáveis a serem analisadas. Sendo assim, o planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta têm a vantagem de avaliar diversos fatores separadamente e suas interações, indicando as condições mais importantes para alcançar a resposta desejada. Portanto, o uso do planejamento fatorial e da metodologia de superfície de resposta tendem a fornecer uma ideia consideravelmente melhor do efeito global das condições experimentais<sup>3; 4; 5</sup>. A quimiometria mostrou ser proeminente neste estudo ambiental, pois é uma ferramenta sem limitações para otimização de experimentos. Sem esta ferramenta não teria sido possível, em um número reduzido de experimentos, estabelecer quais variáveis são significativas e como estas podem interagir entre si. A etapa de otimização foi publicada no periódico *Microchemical Journal* (Anexo A).

Além do uso de planejamento fatorial, foi proposto um protocolo analítico e estatístico a partir da comparação das variâncias residuais de três curvas analíticas: (1) *curva em solvente*; (2) *curva na matriz* e (3) *curva extraída*.

A *curva em solvente* é uma curva analítica construída a partir das respostas cromatográficas de soluções padrão de OCPs e PCBs em doze concentrações entre 3,0 e 71,7 ng mL<sup>-1</sup> em isoctano para cada analito. A *curva na matriz* foi construída a partir de extratos obtidos a partir de ovo liofilizado que foi submetido ao método ESL-PBT otimizado e fortificados com soluções padrão de OCPs e PCBs após o processo de extração, em doze concentrações entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado. O método de sobreposição na matriz consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações na matriz e construção da curva analítica relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões<sup>6</sup>, nesta tese esta curva analítica foi denominada *curva extraída* e foi obtida nas mesmas condições que a *curva na matriz*, porém com fortificações no ovo liofilizado duas horas antes do processo de extração pelo método ESL-PBT.

A partir da avaliação estatística foi possível determinar que, neste estudo, a matriz e o processo de extração influenciam significativamente na precisão dos resultados e na resposta cromatográfica.

A *curva em solvente* tem por objetivo fazer a avaliação da resposta do sistema cromatográfico, sendo possível determinar a detectabilidade instrumental, representada pelos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) instrumentais. O LOD é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, pela técnica instrumental, enquanto que o LOQ é a menor concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método<sup>6; 7</sup>. Enquanto que a *curva na matriz* é um recurso útil para avaliação de efeito matriz, o qual foi identificado para todos os analitos neste trabalho.

Quando a extração influencia na sensibilidade do método, determinada pelo coeficiente angular da curva, a *curva extraída* deve ser utilizada para calcular os parâmetros analíticos do método (linearidade, repetitividade, precisão intermediária, LOD e LOQ), pois a determinação pela *curva extraída* é mais robusta se comparado com métodos mais utilizados, tais como relação sinal-ruído do branco para a determinação do limite de detecção.

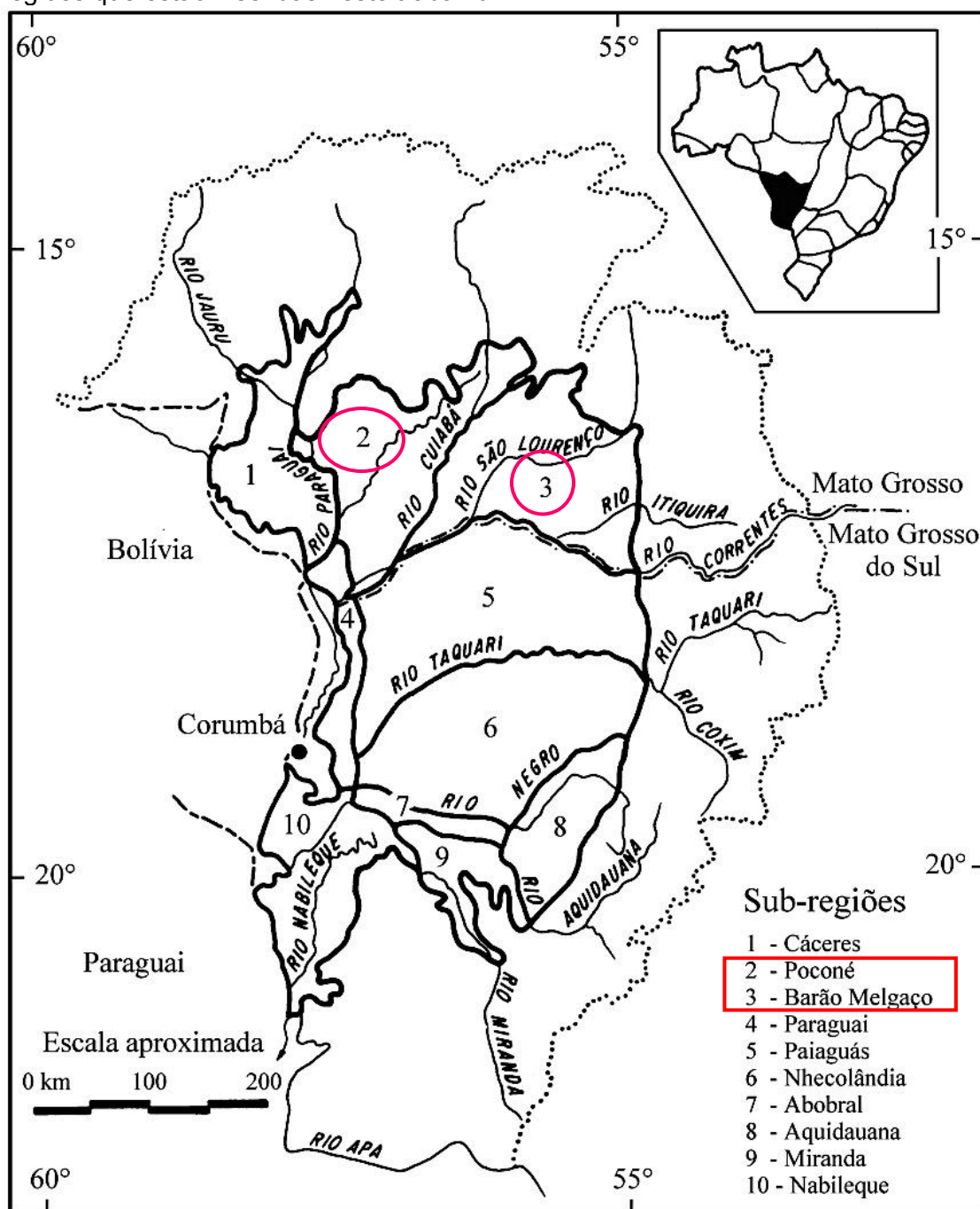
Este trabalho é o primeiro registro de contaminação de POPs em material de origem animal no Pantanal brasileiro baseando-se em uma busca no sistema Scopus, sem restrição de data de publicação, com os descritores: Pantanal and Brazil; Pantanal and pesticide or POPs or PCB or organochlorinated compounds.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Pantanal

A planície pantaneira abrange área brasileira, paraguaia e boliviana, sendo delimitada a oeste pela Cordilheira dos Andes e a leste pelo Planalto Central. Esta planície sedimentar ainda está ativa e sendo formada desde o período Quaternário da Era Cenozóico<sup>8</sup>. No Brasil, está situado nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, com área de aproximadamente 150.000 km<sup>2</sup>, inserido na bacia hidrográfica do Alto rio Paraguai ( AP ), ue por sua vez está inserida na bacia do Prata<sup>9</sup>. A parte brasileira do Pantanal representa 38,21% (aproximadamente 57.300 km<sup>2</sup>) da área total e compreende 16 municípios. Mato Grosso possui 35,36% da área brasileira, com participação de sete municípios. Assim, o Pantanal inicia, ao Norte, no município de Cáceres (MT) e finaliza, ao Sul, no município de Porto Murtinho (MS)<sup>10</sup>. A Figura 1 apresenta uma ilustração das sub-regiões do Pantanal, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

**Figura 1** – Sub-regiões do Pantanal em território brasileiro com destaque para as regiões que estão inseridas neste trabalho



Fonte: Silva; Abdon (1998)<sup>10</sup>.

As principais atividades econômicas no Pantanal mato-grossense são a pecuária extensiva, a pesca, o turismo e a mineração<sup>11</sup>. A pecuária<sup>12</sup>, as alterações no regime de inundações e as queimadas<sup>13</sup> são as atividades que mais contribuem para o desmatamento na planície pantaneira.

Estima-se que a biodiversidade do Pantanal é composta por, aproximadamente, 470 espécies de aves, 270 espécies de peixes, 120 espécies de mamíferos, 180 espécies de répteis e 40 espécies de anfíbios e cerca de 1860 espécies formam a flora pantaneira<sup>14; 15</sup>.

O pulso de inundação contínuo é o principal fator para a manutenção desta biodiversidade e seus processos ecológicos<sup>16</sup>. Nas últimas duas décadas o Pantanal se tornou uma grande área de refugio para espécies que estão criticamente ameaçadas de extinção no restante do Brasil, como por exemplo, tuiuiú (*Jabiru mycteria*), arara azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), mutum de penacho (*Crax fasciolata*)<sup>17</sup>, veado pantaneiro (*Blastocerus dichotomus*) e veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*)<sup>18</sup>.

Este trabalho, incluiu duas sub-regiões localizadas no estado de Mato Grosso, inseridas no denominado Pantanal-Norte: Poconé e Barão de Melgaço, em destaque na Figura 1. A sub-região de Poconé agrega áreas dos municípios de Cáceres, Poconé, Nossa Senhora do Livramento, Barão de Melgaço e Santo Antônio do Leverger, enquanto que a sub-região de Barão de Melgaço conta com áreas dos municípios de Itiquira, Barão de Melgaço e Santo Antônio do Leverger. Estas duas sub-regiões contribuem com 10,21% e 7,8%, respectivamente, da área total do Pantanal brasileiro. Barão de Melgaço, apesar de contribuir com menor área, contém 99,2% de sua área territorial dentro do Pantanal, Poconé possui 80,3%<sup>10</sup>. A coleta dos ovos de jacaré-do-Pantanal (*Caiman yacare*) dependia de apoio de cooperativas locais de criação de jacaré, de fazendeiros e pantaneiros da região, estas foram as regiões onde este apoio foi obtido.

Os principais rios destas sub-regiões são o rio Paraguai e o rio Cuiabá<sup>10</sup>. A drenagem do Pantanal Norte se dá principalmente pelo rio Paraguai, sendo o rio Cuiabá um dos seus principais afluentes. A inundação desta região ocorre pela ação da chuva, mas, principalmente, pela baixa declividade, formando um mosaico de habitats (Figura 2), resultado da combinação de diferentes tipos de solo e do regime de inundação<sup>19</sup>.

**Figura 2** – Exemplo de vegetação em mosaico no Pantanal durante o período chuvoso



Fonte: Oliveira (2014)<sup>20</sup>

Este mosaico é formado por diversos tipos de vegetação, sendo a mais representativa o cerrado (36%), cerradão (22%), cerrado *sensu stricto* (14%) e campo inundado (7%). Na região de estudo deste trabalho, prevalece o cerradão e o campo inundado (16,8% em Poconé, Figura 3) e cerrado (35,8% em Barão de Melgaço)<sup>15</sup>, influenciando na distribuição dos ninhos de jacaré. Pois, em geral, os crocodilianos desovam, preferencialmente, em mata ciliar (bosque) e em campos inundados (savanas)<sup>21</sup>. Sendo assim, as coletas em Poconé foram realizadas em campo inundado (localmente denominado de campão) e em Barão de Melgaço em cerrado, próximo a mata ciliar.



**Figura 3** – Área plana de campo inundado dominada por gramíneas, no início do período de seca, localizada em Poconé – Rodovia Transpantaneira



**Fonte:** autor

Estudos pluviométricos e de variação de cheias e vazantes no Rio Paraguai, medidas desde 1900, demonstram diferentes cotas médias anuais para o Rio Paraguai<sup>22</sup>. Assim, a distribuição das chuvas durante o período destes estudos variou alternadamente e influenciou diretamente na dinâmica do principal rio da planície pantaneira. A inundação do Pantanal promove a ligação de diferentes áreas (rio e planície, rio e lagoa, lagoa e planície) e esta conexão determina a transferência de matéria, nutrientes e animais entre os compartimentos ligados. A transferência de matéria é influenciada também pela profundidade da água na planície, pela dinâmica espaço/temporal e pela extensão do alagamento, alterando a oferta de alimentos e estocagem de água no Pantanal<sup>23</sup>.

O sistema de alagamento do Pantanal depende de dois fatores preponderantes, chuva e inundação oriunda de rios. O primeiro fator se torna relevante quando o nível fluviométrico dos rios atingem valores que não permitam o escoamento das águas. Com o início das chuvas, o solo encharca

e o nível dos rios sobe alagando o pantanal, enquanto que no período de seca a diminuição da precipitação pluviométrica e a diminuição do nível dos rios reduzem a profundidade de água na planície, ocasionando o escoamento e a evapotranspiração, formando poças de água isoladas<sup>23</sup>.

O processo de inundação e escoamento não é uniforme em toda a região do Pantanal, podendo ocorrer regiões que serão inundadas primeiramente e serão as últimas a serem escoadas, ocasionando inundações de baixa amplitude, porém de longa duração. Estas regiões contribuem para um maior contato dos animais com o ambiente aquático por um maior período de tempo. Devido a este processo, o Pantanal, mesmo em locais com pouca atividade antrópica, pode receber uma variedade de compostos orgânicos, inclusive os chamados poluentes orgânicos persistentes - POPs<sup>24; 25; 26</sup> através dos rios que passam por diferentes cidades, que não pertencem a este bioma.

## **2.2 POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes**

Em 2001, o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) selecionou um grupo de 12 compostos químicos (ou classes de compostos) para o mais importante monitoramento global de poluentes. Estes compostos foram denominados de poluentes orgânicos persistentes (POPs)<sup>27</sup> e possuem uma combinação particular de propriedades físicas e químicas, tais como coeficiente de partição octanol-água e solubilidade, de tal modo que, uma vez liberados para o ambiente, eles<sup>28; 29</sup>:

- Permanecem inalterados durante longos períodos de tempo (vários anos);
- Tornam-se amplamente distribuídos por todo ambiente como resultado de processos naturais, envolvendo o solo, a água e o ar;
- Acumulam-se em tecidos adiposos dos organismos vivos, incluindo seres humanos;
- São encontrados em concentrações mais elevadas em níveis mais elevados na cadeia alimentar e

- São tóxicos/interferentes endócrinos para seres humanos e animais silvestres.

Em 2005, o Brasil tornou-se signatário da convenção de Estocolmo, através do Decreto nº 5472, de 20 de junho de 2005, comprometendo-se a proibir e/ou adotar as medidas jurídicas e administrativas que fossem necessárias para eliminar a produção, a utilização, a importação e a exportação de poluentes orgânicos persistentes, bem como estimular e/ou efetuar atividades de pesquisa, desenvolvimento, monitoramento dos poluentes orgânicos persistentes<sup>30</sup>.

Em 2009, nove compostos foram adicionados à lista original. No mesmo ano, o Relatório Regional da América Latina e Caribe sobre monitoramento dos POPs<sup>31</sup> destacou que nestas regiões os dados sobre a presença de POPs no ambiente são insuficientes. Também destacou que alguns dos dados existentes, por falta de controle de qualidade, não poderiam ser considerados no cenário global. A geração de dados para a ocorrência de POPs e sua dispersão com alta confiabilidade analítica continua a ser uma questão crítica para a América Latina. Em 2011, houve mais uma inclusão na lista, totalizando 22 compostos ou classe de compostos, descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Lista dos POPs de acordo com a Convenção de Estocolmo

Item	Composto ou classe*	Uso	Isômeros, homólogos ou metabólicos
1	Aldrin	Pesticida	Aldrin e isodrin
2	Dieldrin	Pesticida	
3	Endrin	Pesticida	
4	Clordano	Pesticida	$\alpha$ e $\beta$ isômeros
5	Heptacloro	Pesticida	
6	HCB	Pesticida e industrial	
7	Mirex	Pesticida	
8	Toxafeno	Pesticida	Centenas de isômeros
9	DDT	Pesticida	p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDD
10	PCB	Industrial e subproduto	209 congêneres
11	PCDD	Subproduto	75 congêneres
12	PCDF	Subproduto	135 congêneres
13	Chlordecane (Kepone)	Pesticida	
14	Lindano	Pesticida	
15	$\alpha$ -HCH	Pesticida e subproduto	
16	$\beta$ -HCH	Pesticida e subprodutos	
17	Hexabromobifenila	Industrial	42 congêneres
18	Tetra e penta-BDE	Industrial	
19	Hexa e hepta-BDE	Industrial	
20	PFOS e seus sais PFOSF	Industrial	Isômeros de cadeia lateral
21	Pentaclorobenzeno	Pesticida, industrial e subproduto	
22	Endosulfan	Pesticida	$\alpha$ e $\beta$ isômeros sulfato de endosulfan

\*abreviações de acordo com a lista de abreviaturas

Fonte: Convenção de Estocolmo (2014)<sup>27</sup>

Pesticidas organoclorados (OCPs) e bifenilas policloradas (PCBs) são compostos não polares, classificados como POPs de acordo com a Convenção de Estocolmo, sendo amplamente distribuídos e objetos de crescente atenção científica<sup>32</sup>.

Para estudos de monitoramento global de POPs, a UNEP (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente) os caracterizou em “essenciais” ou “recomendados”. p,p'-DDD, p,p'-DDE e p,p'-DDT foram classificados como “essenciais”, sendo o DDE considerado o metabólito mais importante. Os isômeros o,p'-DDD, o,p'-DDE e o,p'-DDT foram classificados como “recomendados”. Para estudo de PCBs, o mínimo deve ser de sete congêneres (28/31, 52, 101/90, 118, 138, 153 e 180) que foram considerados “essenciais”

para monitoramento de rotina em amostras de peixes ou produtos alimentícios ao redor do mundo<sup>33</sup>.  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e endossulfan sulfato não foram classificados pela UNEP, porém no Brasil sua comercialização foi permitida até 31 de julho de 2013<sup>34</sup>.

Neste trabalho, optou-se por estudar pesticidas organoclorados (isômeros do DDT e seus metabólicos,  $\alpha$  e  $\beta$  endossulfan e endossulfan sulfato) e sete congêneres de PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180).

OCPs foram largamente utilizados durante a II Guerra Mundial para o controle da malária e dengue e até a década de 1970 foram utilizados para controle de insetos transmissores destas doenças<sup>35</sup>. No Brasil, além do controle da malária e dengue, o DDT foi utilizado para o controle de leishmaniose visceral e comumente usado na agricultura como pesticida, devido ao seu baixo custo e alta eficiência<sup>36</sup>. No estado de Mato Grosso, após a proibição do uso de DDT, o excesso deste pesticida foi estocado de maneira irregular em área aberta da Fundação Nacional de Saúde, na cidade de Várzea Grande (região metropolitana de Cuiabá), resultando na contaminação do solo desta região<sup>37</sup>.

O endossulfan tornou-se um importante agroquímico e agente de controle de pragas, resultando na sua utilização global (por exemplo: União Europeia, América do Norte, Brasil, México e Canadá) no controle uma grande variedade de pragas de insetos<sup>38</sup>. Estima-se que o uso de endossulfan no Brasil foi de 23.000 toneladas entre 1958 e 2002<sup>39</sup>.

PCBs foram amplamente utilizados em uma grande variedade de atividades e aplicações industriais e comerciais, incluindo óleo de transformadores, óleos hidráulicos, fluidos de transferência de calor e aditivos plásticos, devido à sua alta estabilidade química, não são inflamáveis, apresentam ponto de ebulição elevado e propriedades de isolante elétrico<sup>40; 41</sup>. Os congêneres 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180, dentre outros, eram os congêneres mais abundantes do Aroclor<sup>®</sup>, o mix de PCBs mais comum e conhecido que foi produzido entre 1930 e 1970<sup>42</sup>. No Brasil, não existe registro de produção de PCBs, todos os produtos utilizados foram importados dos Estados Unidos ou Alemanha. Em 1981, a produção, importação e uso foram

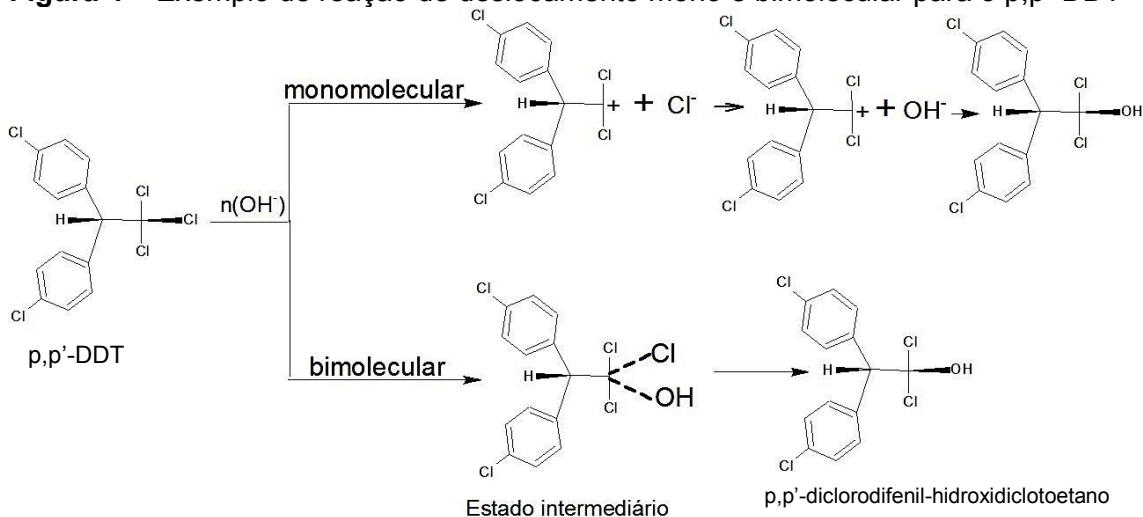
proibidos no Brasil, porém equipamentos que continham óleo isolante com PCBs já instalados continuaram em operação, tornando-se potencial fonte de contaminação, até serem totalmente substituídos por produtos livres de PCBs<sup>43</sup>.

OCPs e PCBs têm sido reportados em estudos ecológicos e de saúde humana como interferentes endócrinos, supressores do sistema imune, cancerígenos e neurotóxicos<sup>44; 45; 46</sup>. Possivelmente, OCPs e PCBs podem atuar no sistema endócrino porque alguns receptores endócrinos, em especial os estrogênicos, são receptores nucleares e particularmente pouco específicos, sendo suscetíveis à ativação por uma variedade de xenoestrógenos<sup>47</sup>.

O p,p'-DDE, por exemplo, é considerado um antagonista de receptores androgênicos, inibindo a ligação de andrógenos, tais como DHT([<sup>3</sup>H]-5  $\alpha$ -dihidrotestosterona), aos receptores androgênicos de ratos machos influenciando em seu desenvolvimento<sup>48</sup>. Metabólitos hidroxilados de PCBs podem inibir a ação de sulfotransferases necessárias para o metabolismo de estradiol, aumentando assim a biodisponibilidade do 17- $\beta$ -estradiol<sup>49</sup>.

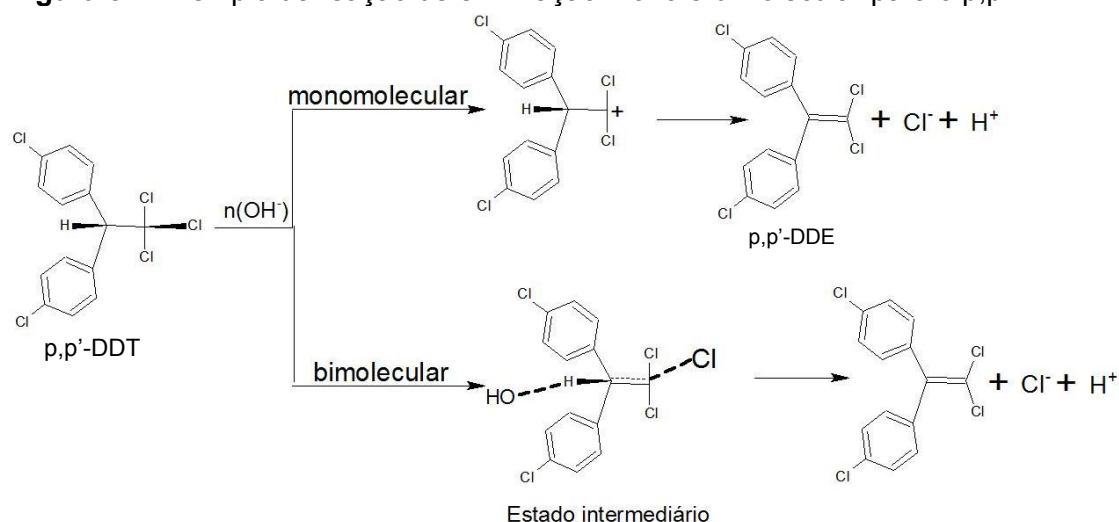
OCPs e PCBs possuem baixa hidrossolubilidade (solubilidade entre 1,2 e 5,5  $\mu\text{g/L}$  a 25 °C) e alta lipossolubilidade ( $\log K_{ow}$  entre 4,62 e 9,64)<sup>36</sup>. Quando estes compostos estão no ambiente e não foram absorvidos por plantas, microorganismos ou animais, geralmente, estão presentes em água, que, geralmente, possui um pH7 $\pm$ 2 e baixa concentração de reagentes nucleófilos e eletrófilos. Nestas condições, as reações de deslocamento bimolecular e eliminação bimolecular não são observadas<sup>50</sup>. Reações de ionização são favorecidas em água devido a sua capacidade de solvatação de íons e alta constante dielétrica que estabilizam íons intermediários. Portanto, reações de deslocamento monomolecular ou eliminação monomolecular são mais frequentes em condições ambientais<sup>50</sup>. Considerando estas reações, propomos as equações para o DDT em reações de deslocamento (Figura 4) e eliminação (Figura 5). De fato, Bailey<sup>50</sup> indica degradação de DDT a DDE e a maior persistência do DDE.

**Figura 4** – Exemplo de reação de deslocamento mono e bimolecular para o p,p'-DDT



Fonte: proposta do autor

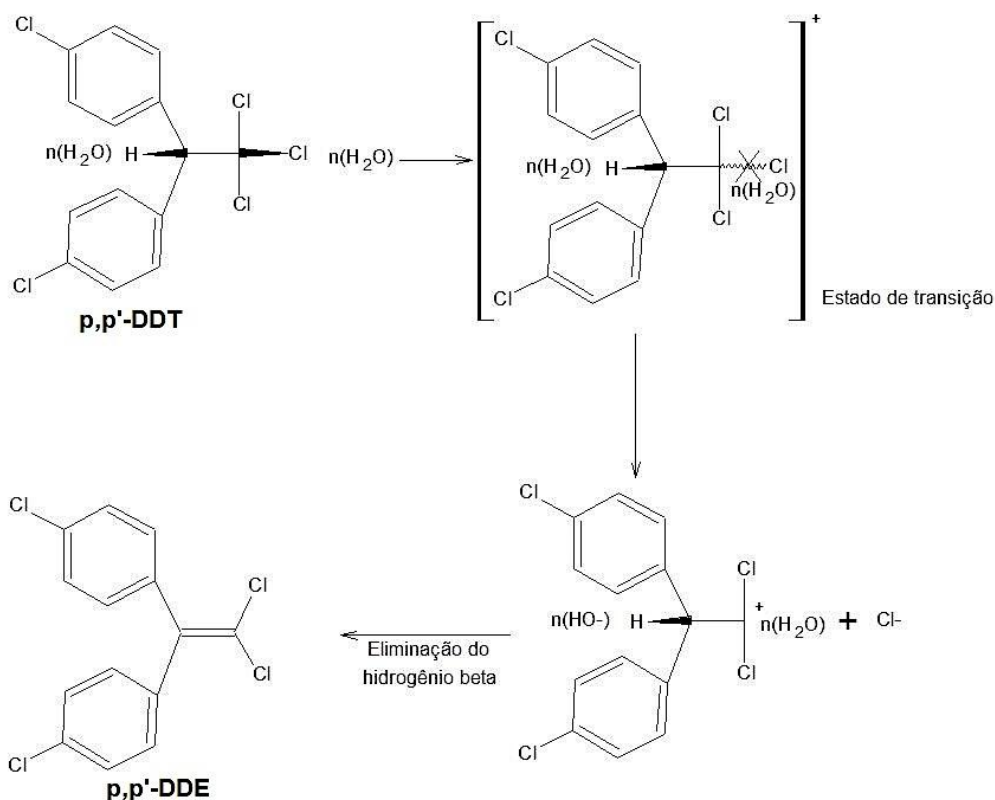
**Figura 5** – Exemplo de reação de eliminação mono e bimolecular para o p,p'-DDT



Fonte: proposta do autor

A reação de eliminação de cloro do DDT em solução aquosa e pH neutro produz o DDE, com proposta de mecanismo demonstrado na Figura 6, que é mais estável por possuir orbital  $sp^2$  no carbono alifático terciário, conseqüentemente mais resistente à degradação. As reações de deslocamento ou eliminação monomolecular em orbital  $sp^2$  (mais eletronegativos que os  $sp^3$ ) não são observadas por não poder estabilizar uma carga positiva e não poder formar um carbocátion intermediário necessário<sup>50</sup>.

**Figura 6** – Proposta de mecanismo de reação da degradação do p,p'-DDT em p,p'-DDE em água no ambiente



Fonte: proposta do autor

Devido a alta lipossolubilidade e por estar presente na forma molecular, estes compostos apresentam capacidade de bioacumulação no tecido adiposo de organismos ou em tecidos com alto teor de lipídios de vegetais, favorecendo a biomagnificação na cadeia trófica<sup>51</sup>.

Considerando-se a distribuição ubíqua dos POPs, estes compostos tem sido encontrados em água de rio<sup>51; 52</sup> e sedimentos<sup>52; 53; 54</sup> na região do Pantanal. Possavatz e colaboradores<sup>55</sup> detectaram  $\alpha$ -endossulfan e endossulfan sulfato em concentrações entre 5,7 e 79,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em sedimento de fundo no rio Cuiabá. Maraschim<sup>56</sup> detectou p,p'-DDT em concentrações de 0,10 e 0,24  $\mu\text{g L}^{-1}$  e dieldrin (abaixo do limite de quantificação) em rios desta região, dentre eles o rio Cuiabá. Cunha<sup>57</sup> detectou p,p'-DDT (em 54% das amostras), p,p'-DDE (em 35% das amostras) e  $\beta$ -endossulfan (em 22,7% das amostras) em



sedimentos dos mesmos rios estudados por Maraschim. Vieira e colaboradores<sup>26</sup> destacam diversos trabalhos que foram realizados no Pantanal Sul, os quais relatam a ocorrência de pesticidas organoclorados em rios formadores do Pantanal. Os principais resultados apresentados pelos autores são níveis de ciclodienos (grupo químico do dieldrin, endosulfan, endrin e heptacloro) que variaram entre 0,21 e 4,5 mg kg<sup>-1</sup> (base seca) para sedimentos do Rio Taquari. Laabs e colaboradores<sup>24</sup> detectaram 19 pesticidas (principalmente organoclorados) e 3 metabólitos (p,p'-DDE, endosulfan sulfato, dietilatrazina) em amostras de água e sedimento no rio Cuiabá, no rio Mutum, na lagoa Sia Mariana e em água de chuva na região de Barão de Melgaço.

O monitoramento ambiental (quali e/ou quantitativo) destes compostos pode ser realizado utilizando a determinação da dose corpórea dos mesmos em organismos, denominados bioindicadores<sup>58</sup>. A escolha do bioindicador deve ser coerente com os objetivos da pesquisa, preencher a lacuna entre as ações necessárias e sustentabilidade, gerar resultados de fácil interpretação e depende das informações específicas do ambiente de estudo e das características ecológicas das espécies que estão presentes no local<sup>59; 60</sup>. A escolha de uma espécie como bioindicador deve levar em conta sua ocorrência (endêmica ou migratória), alimentação, hábitos, nível da cadeia alimentar, facilidade de coleta e influência das estações climáticas<sup>58; 60</sup>. O uso de ovos de aves silvestres como bioindicador de *background* de POPs é recomendado pela UNEP<sup>33</sup>. Ovos de outros animais silvestres como bioindicadores de POPs também tem sido reportado na literatura, na Tabela 2 estão sumarizados alguns dos estudos encontrados. O estudo com ovos também tem sido correlacionados com a possibilidade de transferência materna de POPs em aves<sup>61; 62</sup>, tartarugas<sup>63; 64</sup> e crocodilianos<sup>65</sup>, com possibilidade de bioacumulação e diminuição da taxa de eclosão dos ovos em fêmeas de jacaré expostas à interferentes endócrinos<sup>65</sup>. Além disso, répteis têm sido usados como bioindicadores de contaminantes ambientais<sup>66</sup>.

**Tabela 2** – Sumário de artigos encontrados na literatura incluindo a determinação de POPs em ovos de diversas espécies silvestres.

Ref.	Animal / local	Analitos*	Extração/clean up	Análise*
63	Tartaruga-gigante ( <i>Dermochelys oriacea</i> ) / Estados Unidos	PCBs, OCPs e PCBDEs	Fluido pressurizado/alumina	CG/ECD e CG/MS
67	Tartaruga marinha ( <i>Caretta caretta</i> ) / Estados Unidos	PCBs	Soxhlet/ florisil	CG/ECD e CG/MS
68	Tartaruga marinha ( <i>Caretta caretta</i> ) / Estados Unidos	PCBs e OCPs	Fluido pressurizado/florisil	CG/ECD
69	Tartaruga-verde ( <i>Chelonia mydas</i> ) / Malásia	PCBs, OCPs e PBDEs	Solvente pressurizado e temperatura elevada/cromatografia em gel e florisil	CG/MS/MS
70	Gaivota ( <i>Pagophila eburnea</i> ) / Arquipélago Ártico canadense	PCBs, OCPs, PBDEs	Sólido-líquido/cromatografia em gel e florisil	CG/MS
71	Ave marinha ( <i>Stercorarius skua</i> ) / Escócia	PCBs	Micro-extração em fase sólida/florisil	CG/ECD
72	Gaivota-de-pata-amarela ( <i>Larus michahellis</i> ) / Península Ibérica	PFOS	Sólido-líquido/carvão ativado e ácido acético glacial	UPLC-MS/MS
73	Duas espécies de estorninho ( <i>Sturnus vulgaris</i> e <i>Sturnus unicolor</i> ) / América do Norte, Europa e Austrália	OCPs, PBDEs, HCHs e PCBs	Soxhlet/sílica acidificada	CG/MS
74	Quatro espécies de gaivota e corvo ( <i>Corvus cornix</i> ) / Karelia (Rússia)	DDE, lindano	Sólido-líquido/ácido sulfúrico	CG/ECD
75	Duas espécies de gaivotas ( <i>Larus michahellis</i> e <i>Larus audouinii</i> ) / Espanha	PCDDs, PBDEs, PCBs, OCPs, PFCs	Sólido-líquido ou Soxhlet/filtro de PTFE	UPLC-MS/MS, CG/MS
76	Quatro espécies de gaivotas (Laridae) / Canadá	PBDEs	Sólido-líquido	GC/MS
77	14 espécies de pássaros / Espanha	PBDEs	Líquido pressurizado/SPE com alumina	CG/MS
78	Jacaré do papo-amarelo ( <i>Caiman latirostris</i> ) / Argentina	OCPs e PCBS	Sólido-líquido/ SPE com alumina e florisil	CG/ECD
79	Jacaré do papo amarelo ( <i>Caiman latirostris</i> ) / Argentina	PCBs e OCPs	Sólido-líquido/ SPE com alumina e florisil	CG/ECD
80	Crocodilo do Nilo ( <i>Crocodylus niloticus</i> ) / Moçambique	OCPs, PCBs, PBDEs	Líquido-líquido/ácido sulfúrico	CG/MS
81	Crocodilo Morelet ( <i>Crocodylus moreletii</i> ) / Belize	OCPs	Cromatografia de permeação em gel	CG/ECD
82	Jacaré americano ( <i>Alligator mississippiensis</i> )	PCBs	Soxhlet/florisil	CG/ECD

\*Abreviações de acordo com a lista de abreviações

Sendo assim, considerando que o jacaré-do-Pantanal (*Caiman yacare*) é uma espécie abundante na região do Pantanal, topo de cadeia alimentar, com postura anual bem delimitada, o uso de ovos desta espécie para estudo de ocorrência de POPs na região do Pantanal se torna uma possibilidade viável.

O ovo de jacaré pode ser considerado como uma matriz complexa, sendo composta principalmente por lipídios e proteínas. Análises por Cromatografia Gasosa (CG) requerem preparação das amostras com o intuito de separar os interferentes, tais como a gordura, e concentrar os analitos de interesse. Amostras ricas em lipídios podem influenciar na escolha dos métodos de clean-up e de extração e, assim, nos resultados analíticos. Comparando o mesmo método com diferentes matrizes, van der Hoff e colaboradores<sup>83</sup> demonstraram que para a determinação de pesticidas organoclorados em diferentes amostras gordurosas utilizando um mesmo método de clean-up e extração gera resultados distintos. Por exemplo, segundo os autores, amostras de gordura de porco resultaram em limites de detecção (LOD) entre 10 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de gordura para níveis de fortificação entre 190 e 510  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de gordura, enquanto que amostras de ração de coelho resultaram em LOD entre 0,1 e 0,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para níveis de fortificação entre 1 e 6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de gordura aplicando os mesmos métodos de clean-up e de extração.

Os principais métodos de extração para determinação de OCPs e PCBs em matrizes ambientais são Soxhlet convencional ou automatizado, extração por fluido supercrítico, cromatografia em coluna, ultrassom assistido, por micro-ondas assistido, líquido pressurizado e extração em fase sólida<sup>84</sup>. Enquanto que o uso de ácido sulfúrico, alumina, sílica, florisil e cromatografia de permeação em gel são os métodos de clean-up mais utilizados<sup>84</sup>. Porém, em geral, estes métodos apresentam um alto custo de solventes orgânicos e/ou envolve várias etapas de preparação.

A extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) é um método simples e de baixo-custo, permitindo em uma única etapa a extração e o clean-up. O uso da ESL-PBT tem sido reportado para a extração de piretróides e organofosforados em alimentos frescos ou processados<sup>85, 86</sup>. No entanto, sua aplicação para a extração de POPs em amostras com alto teor

lipídico ainda não havia sido reportado. Outra vantagem no uso de baixa temperatura no processo de extração é que OCPs, como o p,p'-DDT, podem degradar na extração sólido-líquido com o aumento de temperatura<sup>87</sup>. A Tabela 3 sumariza as principais aplicações do método de extração sólido-líquido ou líquido-líquido com partição em baixa temperatura.

**Tabela 3** – Sumário da aplicação de extração líquido-líquido ou sólido-líquido com partição em baixa temperatura

Ref.	Matriz	Analitos	Análise*	Limites (detecção/ quantificação)*	Recuperação (%)
88	Água	Piretróides ( $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOD 1,1 a 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ LOQ 2,7 a 9,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	57 a 81
89	Óleo de soja, de amendoim e de gergelim	14 pesticidas organofosforados	GC/PFD	LOD 2 a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOQ 7 a 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$	58 a 106
90	Leite	Piretróides (cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOQ 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$	84 a 93
91	Peixe	02 piretróides e 19 pesticidas organoclorados	GC/MS	LOD 0,5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	81,3 a 113,7
92	Água	Carbamatos (aldicarb, carbofuran e carbaril)	LC-UV	LOD 5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ LOQ 17 a 33 $\mu\text{g L}^{-1}$	90 a 96
93	Manteiga	Piretróides (cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOD 0,082 e 0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ LOQ 0,28 e 0,32 $\mu\text{g g}^{-1}$	90
85	Tomate	Organofosforados (clorpirifós, cialotrina) Piretróides (cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOD 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ LOQ 0,0125 $\mu\text{g g}^{-1}$	79 a 97
94	Mel	Organofosforados (clorpirifós, cialotrina) Piretróides (cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOD 0,016 $\mu\text{g g}^{-1}$ LOQ 0,032 $\mu\text{g g}^{-1}$	85
86	Batata	Organofosforados (clorpirifós, cialotrina) Piretróides (cipermetrina, deltametrina)	GC/ECD	LOQ 18,7 a 26,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	82,1 a 97,9
95	Urina humana	Benzodiazepinos (diazepam, bromazepam, clonazepam, lorazepam)	LC/MS	LOD 1 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ LOQ 3,3 a 17 $\mu\text{g L}^{-1}$	72,4 a 100,4
96	Músculo bovino	Avermectina e milbemicim	LC-MS e LC-FLD	LOD 0,5 a 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOQ 1 e 2 $\mu\text{g g}^{-1}$	88,9 a 100,7

\*Abreviações de acordo com a lista de abreviações.

### 2.3 Jacaré-do-Pantanal

O jacaré-do-Pantanal (Figura 7) é um crocodiliano que pertence à ordem Crocodylia, família Alligatoridae. Esta família contém quatro gêneros *Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*<sup>97</sup>. A *Caiman crocodilus yacare* é a espécie que ocorre, principalmente, no Pantanal.

**Figura 7** – Jacaré-do-Pantanal (*Caiman crocodilus yacare*)



Fonte: autor

Este crocodiliano é generalista, ou seja, sua alimentação é variada, dependendo da disponibilidade e facilidade de captura. No Pantanal, a dieta do jacaré depende da dinâmica hídrica, sendo que peixes e insetos são os principais itens consumidos pelo jacaré-do-Pantanal<sup>98</sup>.

Estudos de zoologia do *Caiman yacare* estão em desenvolvimento, sendo uma espécie com muitos aspectos ainda desconhecidos, como por exemplo, um estudo detalhado do desenvolvimento embrionário desta espécie, sistema de reprodução em cativeiro, comportamento ecológico e determinação de níveis de POPs. Na base Scopus, uma busca realizada em 08 de maio de 2014, por “*Caiman crocodilus yacare*”, “*Caiman yacare*” ou “*Caiman c. yacare*”

resultou em 25 trabalhos sendo alguns deles sobre: proteínas séricas<sup>99; 100</sup>; contagem populacional, conservação e gestão<sup>18; 101; 102</sup>; diferentes análises da carne do jacaré<sup>103; 104</sup>; marcadores seletivos de estresse oxidativo<sup>105</sup>; presença de mercúrio em jacaré capturados em quatro regiões diferentes do Pantanal<sup>106</sup>; relações de tamanho e idade desta espécie<sup>107</sup>; presença de parasitas<sup>108; 109</sup>; processamento da carne<sup>110; 111; 112</sup>; análises microbiológicas de carne<sup>113</sup> e aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos<sup>114; 115; 116</sup>.

Em contraponto, a espécie *Caiman latirostris* (jacaré do papo-amarelo) possui estudos mais amplos sobre o sistema de criação e reprodução<sup>117; 118</sup>; fertilidade<sup>119</sup>; termo-regulação, comportamento ecológico-comportamental<sup>120</sup> e outros. Esta espécie possui ampla distribuição geográfica, no Brasil, ocorre naturalmente na Bacia do rio São Francisco e do rio Paraná<sup>121</sup>. As principais diferenças entre as duas espécies são formato do focinho (*C. latirostris* possui um focinho mais largo), número de escudos nucais (*C. latirostris* possui três e *C. yacare* possui quatro), o ciclo reprodutivo do *C. Latirostris* é variável, com postura entre janeiro e junho, dependendo da região em que vive e não havendo forte influência da temperatura e do nível da água durante as chuvas quanto o ciclo reprodutivo do *C. yacare*<sup>122</sup>. Algumas características da espécie *C. yacare* estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4** – Características gerais do jacaré-do-Pantanal

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
<b>Tipo de ninho</b>	'em monte' utilizando galhos e folhas secas
<b>Média do tamanho do ninho</b>	150 x 40 cm
<b>Período de postura</b>	Janeiro e Fevereiro
<b>Período de incubação</b>	70 dias
<b>Ovos por ninho (média)</b>	15 a 40 (25)
<b>Comprimento médio do ovo</b>	6,8 cm
<b>Largura média do ovo</b>	4,2 cm
<b>Peso médio do ovo</b>	75,3 g
<b>Temperatura interna do ninho</b>	25 a 32 °C
<b>Distinção visual externa entre macho e fêmea</b>	Não há
<b>Maturidade sexual</b>	Machos acima de 90 cm e fêmeas acima de 80 cm (equivalente até dez anos de idade)

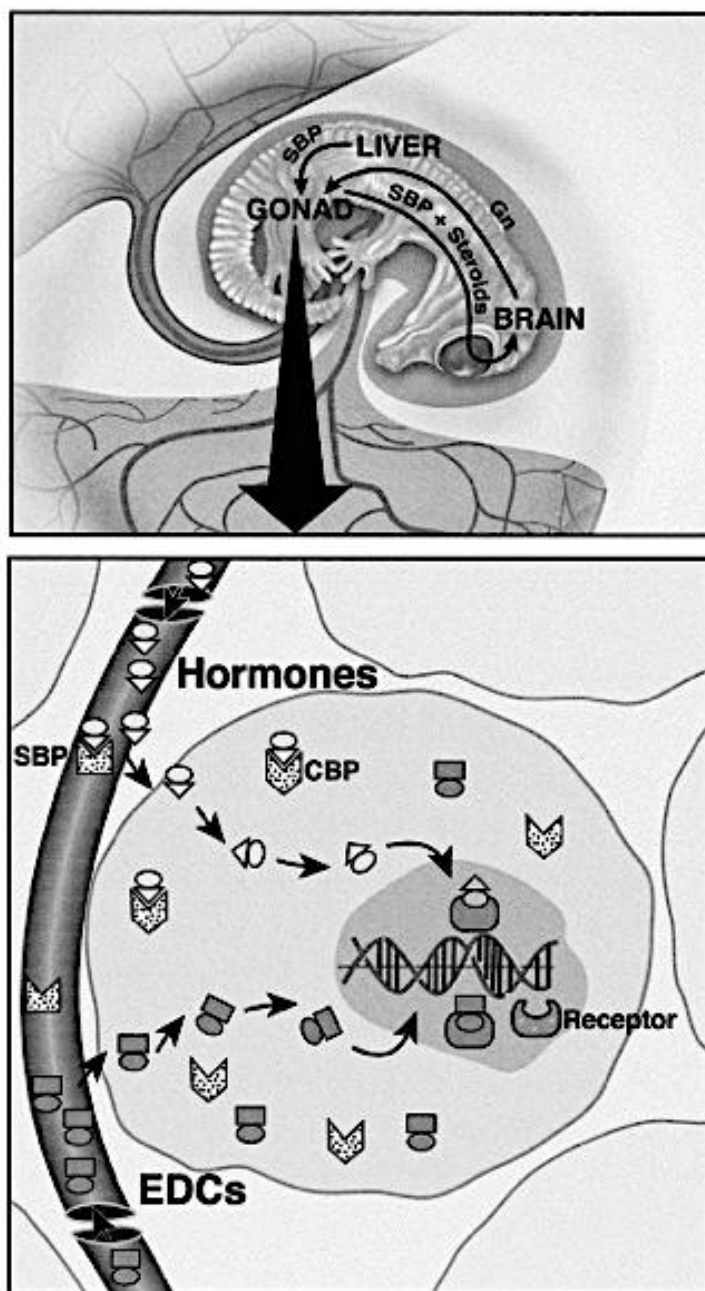
**Fonte:** Campos et al (2014)<sup>107</sup>; Coutinho et al (2005)<sup>122</sup>; Ferguson (1985)<sup>123</sup>; Campos (2003)<sup>124</sup>

Devido a ausência de cromossomos sexuais, o sexo dos filhotes de jacaré-do-Pantanal, assim como de todos os crocodilianos, é determinado pela temperatura de incubação no ninho<sup>125</sup>. A temperatura do ninho depende do local de postura e é afetada pelo nível de insolação, pelas chuvas, pela temperatura do ambiente e pelo calor produzido pela decomposição do material do ninho. Também afeta a probabilidade de sobrevivência dos embriões, acelerando o seu desenvolvimento e diminuindo o tempo em que os ovos estão vulneráveis a inundação e a predação<sup>124;126</sup>. Para o jacaré-do-Pantanal, temperaturas menores que 30 °C geram 100% de filhotes fêmeas, temperaturas entre 30,5 e 31,5 °C geram aproximadamente 10% machos e temperaturas acima de 31,5 °C geram de 80 a 100% de filhotes machos<sup>124</sup>.

Por demonstrar dependência da temperatura para determinação do sexo, os crocodilianos são mais susceptíveis à ação de interferentes endócrinos em comparação às espécies que não dependem da temperatura por possuir genótipo de determinação sexual<sup>127</sup>. Esta susceptibilidade pode estar relacionada com a ação de substâncias estrogênicas ou androgênicas durante o desenvolvimento das gônadas destes répteis no período de incubação<sup>128</sup>, em especial até os 40 dias de incubação quando ainda pode haver reversão sexual nesta espécie<sup>124</sup>. Conforme citado anteriormente, receptores estrogênicos são do tipo nuclear pouco seletivo. A Figura 8 ilustra a interação entre interferentes endócrinos e os receptores nucleares em crocodilianos<sup>129</sup>. Note que não há interação entre os interferentes endócrinos com receptores da circulação e do citosol<sup>130</sup>.



**Figura 8** – Interação de interferentes endócrinos e receptores nucleares em crocodilianos



SBP: Proteína de ligação de hormônios sexuais; CBP: proteína de ligação do citosol; EDCs: interferentes endócrinos; Gn: gonotropinas.

Fonte: Guillette (2000)<sup>129</sup>

Um estudo realizado com jacaré-americano (*Alligator mississippiensis*)<sup>131</sup> demonstrou alterações nas gônadas de filhotes, cujos ovos foram expostos a p,p'-DDE durante a incubação. Neste estudo, ovos de jacaré-americano foram expostos ao p,p'-DDE e estrógenos (como grupo controle positivo) em

temperaturas controladas para a geração de machos (acima de 31,5 °C). De acordo com os autores, o p,p'-DDE, em concentrações entre 0,0001 e 100 ng g<sup>-1</sup> de ovo, foi capaz de influenciar na diferenciação das gônadas, porém não alterou, significativamente, as funções das gônadas e características sexuais primárias. O mais importante neste estudo foi terem demonstrado a sensibilidade das gônadas deste crocodiliano à baixas concentrações de um interferente endócrino de alta persistência. A Tabela 5 relaciona outros estudos realizados com interferentes endócrinos e *A. mississippiensis*.

**Tabela 5** – Sumário de estudos realizados com jacaré-americano e diversos interferentes endócrinos

Ref	Principais resultados
132; 133	Relaciona ação estrogênica (anti-androgênico) dos compostos p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDE em machos e antiestrogênica em fêmeas
132	Relaciona a ação de indutor enzimático (P450 aromatase) da atrazina
134; 135	Demonstram possíveis interações do DDT, dieldrin, alachlor com receptores estrogênicos e de progesterona
130	Interação de POPs com proteínas do citosol não foi detectada.
136	Fêmeas jovens na região da Flórida – lago Apopka - (níveis elevados de POPs) apresentaram folículos policísticos nos ovários
132	Diminuição da atividade da enzima aromatase gonadal em fêmeas da região da Flórida
136; 137	Diminuição da concentração de testosterona, na organização dos túbulos seminíferos e no tamanho do pênis em machos jovens na região da Flórida
138	Queda na produção de 17-β-estradiol em fêmeas jovens e aumento em machos jovens na região da Flórida
139 140	Diminuição na viabilidade dos ninhos com queda na taxa de eclosão de ovos no lago Apopka.

Diversos estudos foram realizados com o jacaré-americano do lago Apopka, pois este lago, segundo maior lago da Flórida (EUA) com aproximadamente 12.500 ha, foi muito conhecido pelo esporte de pesca na década de 1970. Porém, o desenvolvimento da agricultura, industrial e urbano ao redor do lago contribuíram para a degradação da qualidade da água e do habitat silvestre. A partir da década de 1980, notaram o declínio da população de jacaré-americano, do esporte de pesca, culminando no final da década de 1990 na ocorrência de mortalidade de 676 aves (principalmente pelicanos)<sup>141;142</sup>. Estes eventos foram atribuídos a toxicidade de pesticidas e resultou em anos de pesquisas e remediação para garantir o futuro da vida silvestre no local.

Diante do exposto, nota-se que poluentes orgânicos persistentes têm sido relatados em ovos de animais silvestres e que podem influenciar na dinâmica da vida silvestre por serem bioacumulativos e atuarem nos receptores estrogênicos, exibindo ação de interferente endócrino, em especial nos crocodilianos. Assim, o *C. yacare*, espécie pouco estudada atualmente, se torna uma alternativa de bioindicador para monitoramento de contaminação de *background* de POPs no bioma Pantanal.

### 3 OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivo geral contribuir para a avaliação de ovos de jacaré como bioindicador da contaminação do Pantanal mato-grossense por poluentes orgânicos persistentes (POPs).

Como objetivos específicos destacam-se:

- Estabelecer e validar método para determinação de POPs em ovos de jacaré-do-Pantanal (*Caiman yacare*);
- Avaliar a presença de POPs em ovos de jacaré coletados em duas regiões do Pantanal Norte, em duas épocas de coleta.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta dos ovos e determinação do teor de gordura

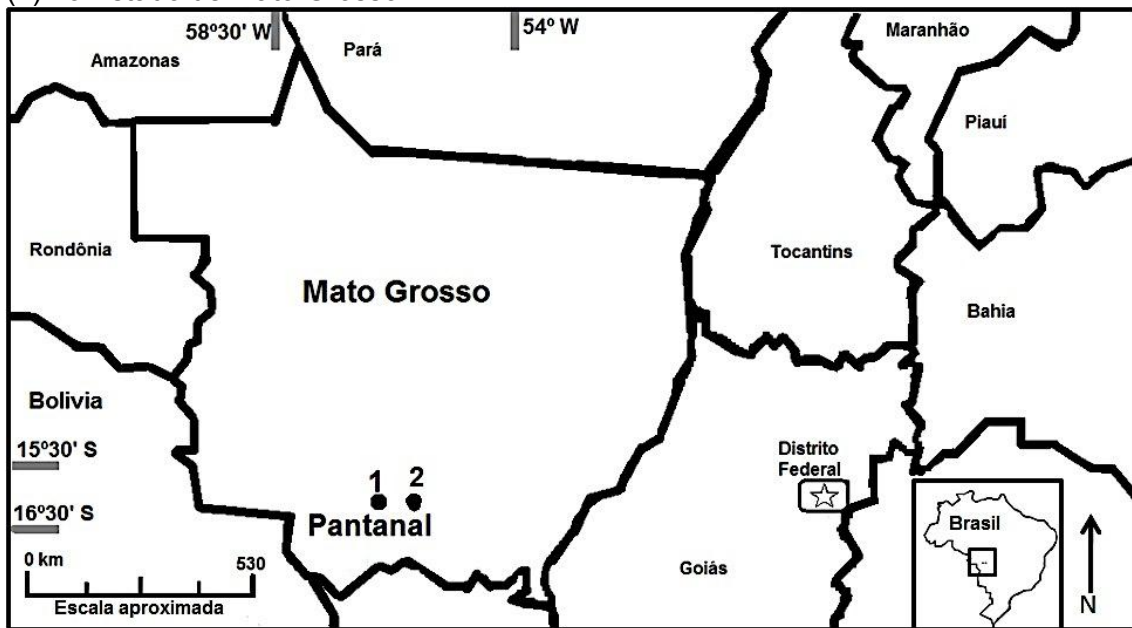
A coleta dos ovos foi autorizada pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), processo nº 27347-2 (Anexo B).

Em janeiro e fevereiro de 2012 e 2013, foram coletados ovos de jacaré-do-Pantanal, no Pantanal norte (Figura 9), no município de Poconé (MT), na fazenda Piuval (Figura 10), situada a aproximadamente 12 km desta cidade pela Rodovia Transpantaneira; e em Barão de Melgaço (MT), a margem do Rio Cuiabá, localizado a aproximadamente 25 km da cidade e a 1 km de uma vila de pescadores (Figura 11). No total foram coletados ovos de nove ninhos na região de Poconé e de seis ninhos na região de Barão de Melgaço (Tabela 6). Todos os ovos de cada ninho foram coletados devido a predação por animais silvestres que existe após a coleta<sup>124</sup>. A média foi de 26 ovos/ninho (variando no intervalo de 18 – 32). Devido a dificuldade de se estabelecer o dia de postura, os ovos foram coletados em diferentes períodos de incubação, sendo que ovos de sete ninhos estavam inválidos devido ao processo natural de inundação.

**Tabela 6** – Localização geográfica dos ninhos encontrado em Poconé e Barão de Melgaço e número de ovos coletados em 2012 e 2013

<i>Município</i>	<i>Data</i>	<i>Localização do ninho</i>	<i>número de ovos / ninho</i>
<b>Poconé</b>	16/01/2012	16°22'23"S 56°37'18"O	26
		16°22'22"S 56°37'40"O	18
		16°22'46"S 56°37'42"O	28
	08/02/2013	16°20'16"S 55°56'36"O	25
		16°20'23"S 55°56'27"O	26
		16°20'07"S 56°35'55"O	27
		16°17'51"S 56°34'43"O	24
		16°22'25"S 56°37'00"O	32
		16°20'08"S 56°35'52"O	20
	<b>Barão de Melgaço</b>	10/02/2012	16°20'38"S 55°57'9"O
			31
06/02/2013		16°20'52"S 55°56'17"O	23
		16°20'58"S 55°56'30"O	30
		16°21'06"S 55°56'32"O	25
	16°21'05"S 55°56'23"O	28	

**Figura 9** – Localização aproximada dos municípios de Poconé (1) e Barão de Melgaço (2) no Estado de Mato Grosso



Fonte: autor

**Figura 10** – Região de coleta na Fazenda Piuval (Poconé, MT): localização dos ninhos amostrados em janeiro/2012 e 2013



Fonte: Google earth

**Figura 11** – Região de coleta em Barão de Melgaço, margens do Rio Cuiabá, ponto de coleta de 10/02/2012



Fonte: Google earth

Para a coleta dos ovos no ninho segue-se um procedimento padrão (esquemático na Figura 12), visando à segurança dos pesquisadores e evitar agressão à fêmea. Então, ao localizar o ninho, caracterizado por ser um monte de galhos e folhas secas e organizadas, os pesquisadores procuram pela fêmea e se aproximam do ninho com cuidado, porém não é feito silêncio, com intuito de que a fêmea se manifeste, caso não tenha sido localizada anteriormente. Quando ocorre manifestação da fêmea ou a mesma é localizada, com um laço em mastro, a fêmea é imobilizada e logo em seguida à coleta é solta em seu habitat. Durante a coleta, os ovos foram acondicionados em caixa térmica e posteriormente, no laboratório do IFMT-Cáceres, congelados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até realização da análise. Em Cáceres (MT), um ovo de cada ninho foi descongelado, em temperatura ambiente, para determinação do teor total de lipídios. Os ovos foram misturados, homogeneizados e secos a aproximadamente  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  em estufa de ar circulante, durante 24 horas, para posterior determinação do teor de lipídios totais por extração com éter de petróleo e gravimetria, de acordo com o método 960 AOAC<sup>143</sup>. Acondicionados em caixa térmica, os ovos congelados foram transportado por via aérea até o Instituto de Química – Unesp Araraquara para a realização da etapa analítica.



**Figura 12** – Procedimento de coleta dos ovos de jacaré-do-Pantanal, em Mato Grosso



Fonte: autor



## 4.2 Reagentes

Padrões analíticos (pureza entre 95 e 97%) dos analitos o,p'-DDE (CAS n°. 3424-82-6), p,p'-DDE (CAS n°. 72-55-9), o,p'-DDD (CAS n°. 53-19-0), p,p'-DDD (CAS n°. 72-54-8), o,p'-DDT (CAS n°. 789-02-6), p,p'-DDT (CAS n°. 50-29-3),  $\alpha$ -endosulfan (CAS n°. 959-98-8),  $\beta$ -endosulfan (CAS n°. 33213-65-9) e endosulfan sulfato (CAS n°. 1031-07-8), bem como uma solução padrão de PCBs, a  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  em ciclohexano, incluindo os congêneres 28 (CAS n°. 7012-37-5), 52 (CAS n°. 35693-99-3), 101 (CAS n°. 37680-73-2), 118 (CAS n°. 31508-00-6), 138 (CAS n°. 35065-28-2), 153 (CAS n°. 35065-27-1) e 180 (CAS n°. 35065-29-3), além da solução do padrão interno PCB 209 (CAS n°. 2051-24-3) a  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  em ciclohexano, foram adquiridos pela empresa Dr. Ehrenstorfer GBd(Alemanha). O surrogate 1,2,4,5-tetrabromobenzeno – TBB (97,0 %, CAS n°. 636-28-2) foi obtido da Sigma–Aldrich (EUA). Os solventes acetonitrila (J.T. Baker, EUA), acetato de etila e isoctano (Mallinckrodt Chemicals, EUA) grau HPLC e o sulfato de sódio anidro(Synth, Brasil) de grau analítico foram usados como recebidos.

Soluções estoque foram preparadas separadamente em isoctano para cada analito em concentração entre 20 e  $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Solução de trabalho contendo todos os analitos foi preparada a  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  a partir da solução estoque e, a partir desta, foram preparadas todas as demais soluções padrão de trabalho. Todas as soluções foram armazenadas a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para separação dos analitos foram baseadas nas já empregadas neste grupo de pesquisa em estudos sobre a ocorrência de POPs no ar (dados não publicados), e estão na Tabela 7.

**Tabela 7** – Condições cromatográficas para separação dos analitos

<b>Equipamento</b>	Varian 450 GC-ECD
<b>Coluna</b>	ZB-5ms (Phenomenex, EUA) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm com pré-coluna de 10 m x 0,25 mm
<b>Vazão do gás de arraste (N<sub>2</sub>)</b>	0,7 mL/min
<b>Vazão do gás auxiliar, N<sub>2</sub> (<i>make up</i>)</b>	29 mL/min
<b>Temperatura do injetor</b>	240 °C
<b>Temperatura do detector</b>	300 °C
<b>Volume de injeção</b>	1 µL (injetor automático)
<b>modo de inserção da amostra</b>	Splitless/Split com tempo de purga de 0,5 min e razão split de 20:80
<b>Gradiente de aquecimento da coluna</b>	160 °C/1min $\frac{3^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 214 °C/2min $\frac{0,8^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 220 °C/1min $\frac{10^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 290 °C/10 min

#### 4.4 Avaliação da resposta cromatográfica

Neste trabalho, foram utilizadas curvas analíticas dos analitos dissolvidos em solvente isoctano, denominada *curva em solvente*, para determinação da linearidade, homocedasticidade e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) instrumental. A *curva em solvente* foi construída com soluções em doze concentrações entre 3,0 e 71,1 ng mL<sup>-1</sup> em isoctano para cada analito, que foram injetadas em triplicata. O PCB 209 a 10 ng mL<sup>-1</sup> foi utilizado como padrão interno para correção de erros inerentes ao processo cromatográfico. TBB (tetrabromobenzeno) a 10 ng mL<sup>-1</sup> foi utilizado como padrão de recuperação (surrogate) para avaliação de erros inerentes ao processo de extração.

O teste de Huber foi usado para exclusão de valores extremos devido a sua robustez estimada<sup>144; 145</sup> e ajuste linear. Diferentemente do teste de Grubbs que utiliza a média, que pode ser influenciada por valores extremos, em seus cálculos para exclusão de valores anômalos, o teste de Huber usa a mediana, os resíduos e a mediana absoluta dos resíduos (MAD) para calcular os limites superior e inferior do intervalo linear do conjunto de dados (Eq. 1 e 2).

$$MAD = \text{mediana}[|x_i - \text{mediana}_{x_i}|] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$IC = \text{mediana}_{x_i} \pm 2 \cdot MAD \quad (\text{Eq. 2})$$

onde,  $x_i$  é a concentração/área cromatográfica para todas as replicatas,  $\text{mediana}_{x_i}$  é a mediana para todos os valores de  $x_i$  e IC é o intervalo de confiança entre os limites superior e inferior.

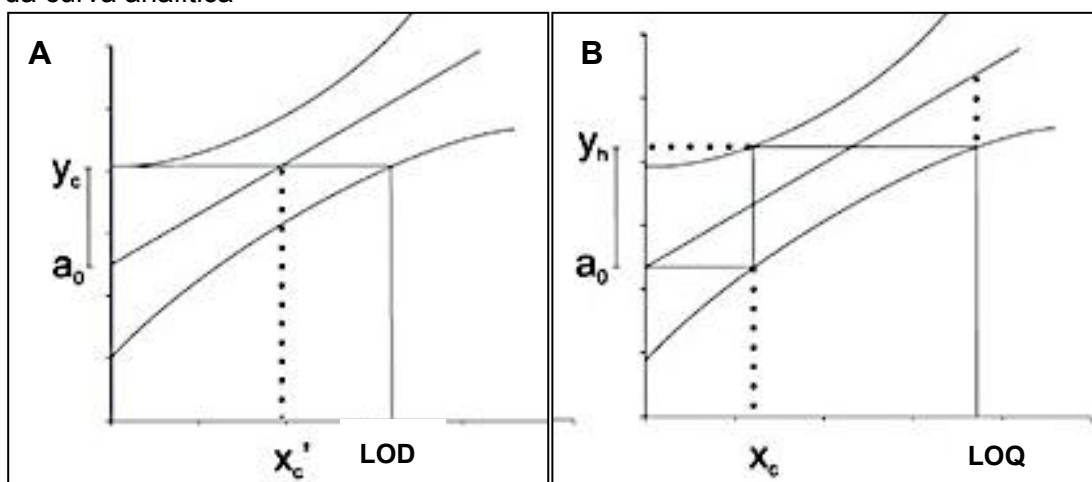
Os valores fora do intervalo são considerados *outliers* e deverão ser excluídos da construção da curva analítica. Após a exclusão dos valores anômalos, a curva analítica pode ser construída. O LOD e o LOQ foram calculados conforme proposto por Ribeiro e colaboradores<sup>7</sup>. A linearidade foi avaliada pela homocedasticidade e coeficiente de determinação. O LOD e LOQ foram calculados utilizando as equações 3 e 4, respectivamente.

$$LOD = 2 \cdot (s_y \cdot t/a_1) \cdot \left[ \sqrt{(1/N) + 1 + (y_c - \bar{y}) / (a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2)} \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

$$LOQ = (y_h - a_0/a_1) + (s_y \cdot t/a_1) \cdot \left[ \sqrt{(1/N) + 1 + (y_h - \bar{y}) / (a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2)} \right] \quad (\text{Eq.4})$$

onde,  $s_y$  é o desvio padrão residual do sinal analítico ( $y_i$ ),  $t$  é o  $t$  de Student (para um nível de significância de 5 % e  $n - 2$  graus de liberdade),  $a_0$  e  $a_1$  são, respectivamente, os coeficientes linear e angular,  $N$  é o número total de amostras,  $y$  foi determinado pela relação da área cromatográfica do analitos/área cromatográfica do padrão interno,  $\bar{y}$  é a media do valor de  $y$  para todas as amostras,  $y_c$  ( $y$  crítico) é o intercepto do limite superior no intervalo de confiança da curva analítica,  $\bar{x}$  é a media dos valores de concentração ( $x_i$ ) para todas as amostras e  $y_h$  é o valor de  $y$  a partir da projeção do valor da concentração ( $x$ ) (até o ponto onde  $a_0$  intercepta a regressão linear) no limite superior do intervalo de confiança da curva analítica. A figura13 demonstra graficamente como é determinado o LOQ e o LOD.

**Figura 13** – Demonstração gráfica para a determinação de LOD (A) e LOQ (B) a partir da curva analítica



Fonte: RIBEIRO et al (2008)<sup>7</sup>

Para cada curva foram avaliados os ajuste linear e ajuste quadrático, também foram determinados os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e os resíduos de todos os pontos pela diferença da área medida e da área interpolada, calculando a variância e o desvio padrão para cada nível de concentração. A partir dos desvios, foi calculado a diferença entre suas somas quadráticas, considerando o número total de pontos da curva, estimando, pelo teste-F (95% de confiança,  $n - 3$  graus de liberdade) e a significância entre os dois valores.

Se a razão entre a diferenças das somas quadráticas dos dois ajustes e a variância do ajuste quadrático for menor ou igual ao F tabelado, o ajuste linear é considerado mais adequado. Caso contrário, o ajuste quadrático será o mais adequado.

#### 4.5 Otimização do método de Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) por planejamento fatorial completo $2^4$ com triplicata do ponto central e metodologia de superfície de resposta

Basicamente, a ESL-PBT compreende oito etapas, esquematizadas na Figura 14. Destas, quatro diferentes fatores (adição de um solvente extrator, homogeneização, centrifugação e congelamento) foram estabelecidos como

variáveis para a otimização da extração de POPs de ovos de jacaré, neste trabalho.

**Figura 14** – Fluxograma geral da técnica de ESL-PBT



Fonte: autor

Para determinar as melhores condições para a extração de OCPs e PCB, uma mistura contendo dois ovos de cada ninho de todas as coletas ( $n = 28$ ) foi preparada. A mistura foi homogeneizada em um triturador (triturador de alimentos em inox de 8 L, Lucre, Brasil) e liofilizada (Liobras L101, Brasil). Amostras de 2,0 g de ovo liofilizado foram fortificadas com OCPs e PCBs, utilizando 90  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho de 500  $\text{ng mL}^{-1}$  para todos os analitos, correspondendo a 22,5  $\text{ng g}^{-1}$  de ovo liofilizado. Adicionou-se também 20  $\mu\text{L}$  de TBB a 750  $\text{ng mL}^{-1}$ , correspondendo a 10  $\text{ng mL}^{-1}$  de isoctano. As amostras foram centrifugadas e deixada em repouso durante 2 h em temperatura ambiente. Água ultrapura (4,0 mL) e um volume pré-definido de solvente extrator (acetoneitrila: acetato de etila - 6,5:1,5 v/v) foram adicionados. As amostras foram, em seguida, homogeneizadas em vortex, centrifugadas a 2500 rpm e congeladas a -18 °C. Após o congelamento, a fase líquida foi filtrada através de lã de vidro, com 2,0 g de sulfato de sódio anidro, previamente condicionado com 500  $\mu\text{L}$  de solvente extrator a -18 °C. A fase sólida congelada foi lavada três vezes com 500  $\mu\text{L}$  de solvente extrator a -18 °C. O solvente da fase líquida foi evaporado com N<sub>2</sub> e o resíduo foi recuperado com

volume final 1,5 mL em isoctano e analisados por CG-ECD. 95  $\mu\text{L}$  de PCB 209 a 80  $\text{ng mL}^{-1}$  foi adicionado na etapa de recuperação com isoctano, estas amostras foram denominadas de ponto extraído. Para cada ensaio, a área cromatográfica de cada analito foi dividida pela área do padrão interno, com intuito de minimizar os efeitos inerentes ao processo cromatográfico. A área cromatográfica do TBB foi utilizada para avaliação do processo de extração. Se houvesse uma variação maior que 20 % na área cromatográfica do TBB o processo de extração deveria ser repetido.

Para o cálculo de recuperação média relativa (parâmetro utilizado como resposta analítica no planejamento fatorial) ponto a ponto para cada experimento, amostras não fortificadas (denominadas amostras testemunha) passaram pelo mesmo processo de ESL-PBT, sendo posteriormente fortificados, na mesma concentração final de 22,5  $\text{ng g}^{-1}$ , somente na etapa de recuperação com isoctano, sendo denominados ponto na matriz.

Para evitar um número exaustivo de ensaios, o primeiro passo consistiu na otimização do método ESL-PBT com utilização de um planejamento fatorial completo  $2^4$  com três repetições no ponto central. O planejamento fatorial é útil quando um grande número de fatores podem ser avaliados simultaneamente, calculando-se os efeitos principais e de interações entre os fatores com um reduzido número de experimentos.

Os quatro fatores escolhidos no planejamento foram: (1) volume de solvente extrator, (2) tempo de agitação em vortex, (3) tempo de centrifugação e (4) tempo de congelamento. Um total de 19 experimentos foram realizados para a otimização do processo de extração (Tabela 8). As replicatas do ponto central tem dois objetivos: permitir a mensuração do erro absoluto e ajustar a variância da resposta predita<sup>146</sup>. Os experimentos foram randomizados para minimizar os erros indeterminados nas respostas reais devido a fatores externos<sup>147</sup>. A recuperação relativa em cada experimento foi utilizada como resposta analítica para avaliação fatorial. A recuperação para cada analito foi calculada comparando-se as áreas cromatográficas do analito no ponto extraído com a área do ponto na matriz descontando a área obtida para a amostra testemunha.

**Tabela 8** – Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial  $2^4$  usado na otimização do método ESL-PBT

Experimentos (Ordem realizada)	ES <sup>b</sup>		VT <sup>c</sup>		CT <sup>d</sup>		FT <sup>e</sup>	
	mL	Cód.	min	Cód.	min	Cód.	h	Cód.
1 (16)	12	+1	5	+1	15	+1	12	+1
2 (8)	12	+1	5	+1	15	+1	4	-1
3 (7)	12	+1	5	+1	5	-1	12	+1
4 (3)	12	+1	5	+1	5	-1	4	-1
5 (19)	12	+1	1	-1	15	+1	12	+1
6 (14)	12	+1	1	-1	15	+1	4	-1
7 (17)	12	+1	1	-1	5	-1	12	+1
8 (12)	12	+1	1	-1	5	-1	4	-1
9 (11)	8	-1	5	+1	15	+1	12	+1
10 (6)	8	-1	5	+1	15	+1	4	-1
11 (15)	8	-1	5	+1	5	-1	12	+1
12 (13)	8	-1	5	+1	5	-1	4	-1
13 (18)	8	-1	1	-1	15	+1	12	+1
14 (5)	8	-1	1	-1	15	+1	4	-1
15 (10)	8	-1	1	-1	5	-1	12	+1
16 (4)	8	-1	1	-1	5	-1	4	-1
17C <sup>a</sup> (1)	10	0	2	0	10	0	6	0
18C <sup>a</sup> (2)	10	0	2	0	10	0	6	0
19C <sup>a</sup> (9)	10	0	2	0	10	0	6	0

<sup>a</sup> ponto central; <sup>b</sup>Solvente extrator (acetoneitrila: acetato de etila - 6,5:1,5 v/v); <sup>c</sup>tempo de vortex; <sup>d</sup>tempo de centrifugação; <sup>e</sup> tempo de congelamento; Cód.: código na matriz (+1) para maior nível, (-1) para menor nível e (0) para o ponto central

O planejamento foi avaliado a partir da resposta da recuperação normalizada ( $R_n$ ) obtida para cada experimento. A resposta normalizada foi calculada com a equação 5<sup>148; 149</sup>:

$$R_n = \Sigma[R_x/R_{x(\max)}] \quad (\text{Eq. 5})$$

onde, x é o analito (PC 28; PC 52; o,p'-DDE; PC 101;  $\alpha$ -endosulfan; p,p'-DDE; o,p'-DDD;  $\beta$ -endosulfan; p,p'-DDD; o,p'-DDT; endosulfan sulfato, PCB 180; PC 118, PC 153 e p,p'-DDT/PCB 138),  $R_x$  é a recuperação obtida para o composto x, e  $R_{x(\max)}$  é a recuperação máxima obtida para o composto entre os 19 experimentos do planejamento fatorial.

Os resultados experimentais foram analisados utilizando Microsoft Excel 2007® e GNU-Octave 2.1.72. A significância dos efeitos foi determinada pela análise de variância e pelo teste t de Student com n - 1 grau de liberdade com uma significância estatística de 0,05. Este valor representa a probabilidade de o efeito de um fator ser unicamente devido à erro aleatório. Assim, se o efeito é

maior do que o t-crítico, o efeito do fator correspondente é significativo. Os efeitos e a significância das variáveis na ESL-PBT foram avaliados utilizando gráfico de Pareto<sup>150</sup>.

Para determinar o efeito e a influência dos níveis de cada fator no sistema proposto, estes níveis foram codificados como +1 e -1, para o maior e menor níveis, respectivamente, como exposto na Tabela 8.

Matematicamente, o efeito principal pode ser estimado de acordo com a equação 6, calculado como uma média dos efeitos individuais permitindo a avaliação média do efeito de cada fator separadamente das condições dos efeitos dos outros fatores<sup>151</sup>.

$$\text{Efeito principal} = 2(\sum y^+ - \sum y^-)/(b^a) \quad (\text{Eq. 6})$$

onde,  $y$  representa a média dos efeitos individuais em cada medida, os sinais (+) e (-) representam os níveis de cada fator e  $b^a$  representa o número total de experimentos.

Os efeitos de interações levam em conta os fatores combinados uns com os outros. Neste caso, foram calculados os efeitos de interação de 2<sup>a</sup>-ordem (dois fatores entre si), de 3<sup>a</sup>-ordem (três fatores entre si) e de 4<sup>a</sup>-ordem (todos os fatores entre si). Os efeitos de interações de 2<sup>a</sup>-ordem e 3<sup>a</sup>-ordem foram calculados usando as equações 7 e 8, respectivamente.

$$\text{Interações de 2}^{\text{a}}\text{-ordem} = 2[(\sum y^{++} + \sum y^-) - (\sum y^{+-} + \sum y^{+})]/(b^a) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{Interações de 3}^{\text{a}}\text{-ordem} = 2[(y^{+-} + y^{+-} + y^{+-} + y^{+++}) - (y^{--} + y^{+-} + y^{+-} + y^{+++})]/(b^a) \quad (\text{Eq. 8})$$

O efeito de interação de 4<sup>a</sup>-ordem, considerando todos os fatores entre si, pode ser calculado pela metade da diferença entre as interações de 3<sup>a</sup>-ordem entre três fatores pra dois níveis distintos do fator a ser analisado.

Depois de calcular todos os efeitos, um gráfico de 'probabilidade normal vs efeito' foi plotado com os valores de probabilidade para uma distribuição normal versus o valor calculado de cada efeito, com o objetivo de visualizar quais os fatores possuem efeitos mais proeminentes. A partir deste gráfico, é possível a exclusão de fator(es) que não produz(em) resposta(s) que possa(m)



influenciar nos resultados, ou seja, efeito praticamente zero. Com a remoção de um fator não significativo, o planejamento fatorial pode ser reduzido para a avaliação dos fatores mais importantes, por exemplo, redução de um planejamento  $2^4$  para um planejamento  $2^3$  se apenas um fator for excluído.

Com a redução do tamanho da matriz experimental, aumenta-se o número de replicatas para cada combinação. Neste caso, é possível calcular a variância experimental (eq. 9), o erro experimental (eq. 10), a variância dos efeitos (eq. 11) e o erro dos efeitos (eq. 12). Para calcular os efeitos a partir da matriz experimental reduzida, pode-se utilizar as equações 6, 7 e 8, descritas anteriormente. Então, é possível aplicar o teste t de Student para comparar as variâncias, erros experimentais e os efeitos. Um t-crítico pode ser obtido pela multiplicação do valor tabelado de t (com 95% de confiança e n graus de liberdade) e o erro de efeito. Se o efeito calculado for maior ou igual ao t-crítico, este efeito é considerado significativo e pode ser visualizado em um gráfico de Pareto<sup>150</sup>.

$$s^2 = (v_1s_1^2 + v_2s_2^2 + \dots + v_ms_m^2)/(v_1 + v_2 + \dots + v_m) \quad (\text{Eq. 9})$$

$$s = \sqrt{s^2} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\hat{s}^2 = (s^2/n) \cdot \sum a^2 \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\hat{s} = \sqrt{\hat{s}^2} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde,  $v_i$  é o número de graus de liberdade (n-1) de cada variância ( $s_m^2$ ) obtido para todos os experimentos para a  $i^{\text{th}}$  experimento. O parâmetro  $n$  é o número de replicatas para cada experimento e  $a$  é o coeficiente usado para calcular os efeitos.

Mais experimentos, tais como o ponto central, podem ser analisados e adicionados ao planejamento fatorial e o resultado pode ser usado para determinar uma superfície de resposta quadrática para os efeitos significativos. O modelo da superfície de resposta foi estabelecido usando a equação 13<sup>152</sup>.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_j X_j + \sum \beta_{jj} X_j^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 13})$$

onde,  $Y$  é o valor predito da resposta pelo modelo,  $\beta_0$  é uma constante e  $\beta_i$ ( $\beta_j$ ),  $\beta_{ii}$ ( $\beta_{jj}$ ) e  $\beta_{ij}$  são os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente. Neste modelo,  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes.

Determinado as melhores condições para realização da extração, a próxima etapa consiste na validação do método e avaliação de efeito matriz.

#### 4.6 Validação do método

Assim como descrito na seção 4.5, para a validação do método o conteúdo de dois ovos (exceto a casca) de cada ninho de todas as coletas ( $n = 28$ ) foram homogeneizados em triturador de alimentos em inox e a mistura foi liofilizada e congelada a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da análise.

O efeito matriz foi avaliado utilizando o extrato obtido a partir de 2 g de ovo liofilizado (usando o método ESL-PBT otimizado) com fortificação com solução de trabalho (OCPs e PCBs  $500\text{ ng mL}^{-1}$ ) após a extração, conforme descrito anteriormente, em doze concentrações entre 2,3 e  $53,8\text{ ng g}^{-1}$ . PCB 209 e TBB foram utilizados na concentração de  $10\text{ ng mL}^{-1}$  de isoctano para ambos. A curva analítica neste caso foi denominada de *curva na matriz*.

2 g de amostras de ovo liofilizado foram fortificadas com solução de trabalho, 2 h antes da ESL-PBT, em temperatura ambiente, em doze concentrações entre 2,3 e  $53,8\text{ ng g}^{-1}$ , para então serem submetidas a todo o processo de extração, conforme descrito anteriormente. A curva analítica obtida neste caso foi denominada de *curva extraída* e foi utilizada para avaliação da performance do método. A faixa de concentração foi selecionada com base nas concentrações relatadas na literatura para estes analitos em ovos de animais silvestres.

Para a construção de ambas as curvas foi aplicado o teste de Huber, conforme descrito na seção 4.4. Todas as amostras foram extraídas em duplicatas e, então, os extratos obtidos foram analisados por CG/ECD com quadruplicata de injeção para cada nível de fortificação. A partir dos dados de área cromatográfica dos pontos da *curva na matriz* e da curva extraída foi

possível calcular a recuperação relativa (exatidão do método) e o desvio padrão relativo – RSD (precisão do método) para todos os analitos.

O método foi avaliado a partir da linearidade, exatidão, precisão, LOD e LOQ, determinados a partir da curva extraída. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de determinação e homocedasticidade. A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa em três níveis de fortificação e os respectivos desvios padrão relativos.

A precisão foi avaliada pela repetitividade intra-dia e inter-dia. A precisão intra-dia foi avaliada a partir dos resultados cromatográficos de cinco replicatas de extrato (comparando ponto na matriz, ponto extraído e testemunha, conforme descrito anteriormente), com duplicata de injeção, em três níveis de fortificação e realizadas no mesmo dia. Enquanto que a precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada com a extração em dias diferentes (1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia) mas todas as replicatas no mesmo nível de fortificação.

O efeito matriz foi calculado de acordo com o preconizado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia)<sup>153</sup>, comparando as variâncias residuais da *curva em solvente* com a *curva na matriz*, através de um teste F e os coeficientes angulares de cada curva usando o teste t de Student. Primeiramente, o teste F foi aplicado para verificar se as variâncias de cada curva podem ser consideradas similares (Eq. 14).

$$F_{calculado} = s_1^2/s_2^2 \quad (\text{Eq. 14})$$

onde  $s_1^2$  and  $s_2^2$  são as variâncias residuais de cada curva, com o maior valor no numerador. Se F-calculado for menor que o F-crítico (significância de 5% e n -2 graus de liberdade) a diferença entre as variâncias não é significativa, e isso significa que a matriz não influencia na precisão do método.

Por outro lado, o teste t de Student pode demonstrar se a matriz afeta significativamente a resposta cromatográfica. O t-calculado pode ser obtido pela equação 15.

$$t_{calculado} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| / \left[ \sqrt{s^2 \cdot (1/N_1 + 1/N_2)} \right] \quad (\text{Eq. 15})$$

onde,  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  são a média do valor das concentrações das amostras preparadas em solvente ou na matriz, N é o número total de amostras preparadas no solvente ou na matriz e  $s^2$  é calculado pela equação 16.

$$s^2 = [(N_1 - 1) \cdot s_1^2 + (N_2 - 1) \cdot s_2^2] / (N_1 + N_2 - 2) \quad (\text{Eq. 16})$$

O valor de  $t_{\text{critico}}$  é obtido a partir da Tabela de distribuição de Student para um nível de significância de 5% e  $(N_1 + N_2 - 2)$  graus de liberdade. Se t-calculado for maior que t-crítico significa que a matriz afeta significativamente a resposta cromatográfica, ou seja, o efeito matriz está presente e é significativo.

O método de extração também foi avaliado de acordo com INMETRO comparando as variâncias residuais da *curva na matriz* e da curva extraída. Se F-calculado for maior que F-crítico a diferença é significativa entre as variâncias residuais de ambas as curvas, ou seja, o método ESL-PBT, neste caso, afeta a precisão do ensaio. Então, os limites de detecção e de quantificação do método e quantificação nas amostras ambientais devem ser calculadas pela curva extraída<sup>154</sup>.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

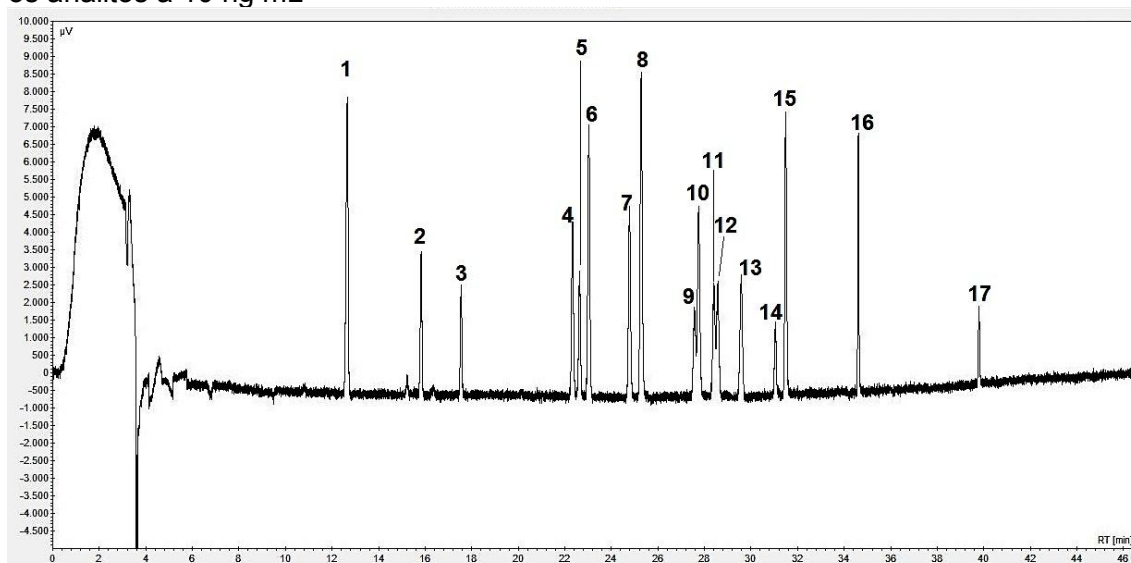
### 5.1 Teor de gordura total em ovos de *C. yacare*

O teor de lipídios nos ovos de *C. yacare* foi de  $52 \pm 7\%$ . Este valor pode ser considerado alto quando comparado com ovos de galinha (21,2%)<sup>155</sup> ou de tartarugas (29,8 – 42,1 %) <sup>156; 157</sup>.

### 5.2 Avaliação da resposta cromatográfica instrumental a partir da *curva em solvente*

O cromatograma de uma solução com a mistura dos padrões analíticos preparados em isoctano (Figura 15) mostra a separação dos analitos, indicando seletividade do método cromatográfico para todos os analitos, exceto para o p,p'-DDT e PCB 138, pois não houve separação entre eles (apesar de ter sido testado diversas condições de temperatura e vazão de gás). Sendo assim, foram quantificados juntos.

**Figura 15** – Cromatograma (GC/ECD) para uma solução em isoctano contendo todos os analitos a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$

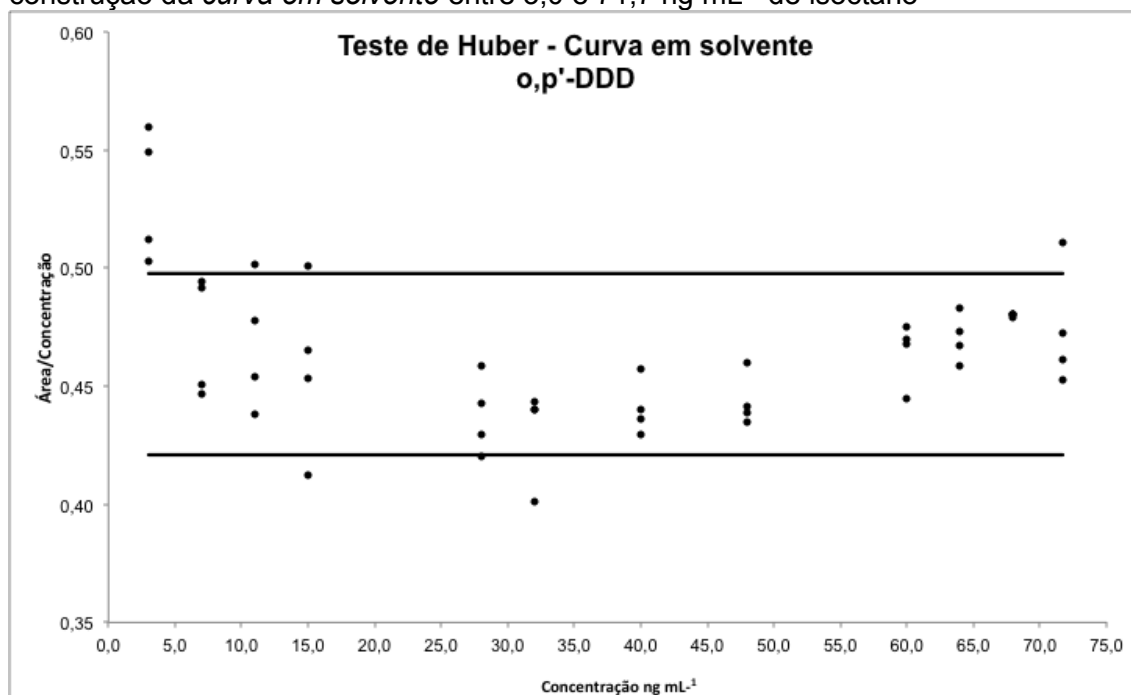


1: T (surrogate); 2: PC 28; 3: PC 52; 4: o,p'-DDE; 5: PC 101; 6:  $\alpha$ -endosulfan; 7: p,p'-DDE; 8: o,p'-DDD; 9: PC 118; 10:  $\beta$ -endosulfan; 11: p,p'-DDD; 12: o,p'-DDT; 13: PCB 153; 14: endosulfan sulfato; 15: p,p'-DDT + PCB 138 (coeluição); 16: PCB 180; 17: PCB 209 (padrão interno)

**Fonte:** autor

Após a exclusão dos valores anômalos pelo teste de Huber, a *curva em solvente* foi construída para todos os analitos na faixa de concentração entre 3,0 e 71,7 ng mL<sup>-1</sup> isoctano. A Figura 16 mostra, como exemplo, o teste de Huber para o o,p'-DDD. Neste exemplo, todas as replicatas do ponto de 3,0 ng mL<sup>-1</sup> devem ser excluídas.

**Figura 16** – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da *curva em solvente* entre 3,0 e 71,7 ng mL<sup>-1</sup> de isoctano



Fonte: autor

As equações de cada curva, coeficiente de determinação, LOD instrumental e LOQ instrumental, calculados conforme descrito anteriormente, são apresentadas na Tabela 9. Os coeficientes de determinação ( $r^2 > 0,99$ ) e os desvios padrão relativos ( $RSD < 20\%$ ) da *curva em solvente* para todos os analitos estão de acordo com as recomendações do INMETRO<sup>153</sup> para validação de métodos analíticos. Os LOD instrumentais variaram entre 3,8 ng mL<sup>-1</sup> (p,p'-DDE) e 5,9 ng mL<sup>-1</sup> (o,p'-DDT). Os LOQ instrumentais variaram entre 5,3 ng mL<sup>-1</sup> (p,p'-DDE) e 11,7 ng mL<sup>-1</sup> (o,p'-DDT).

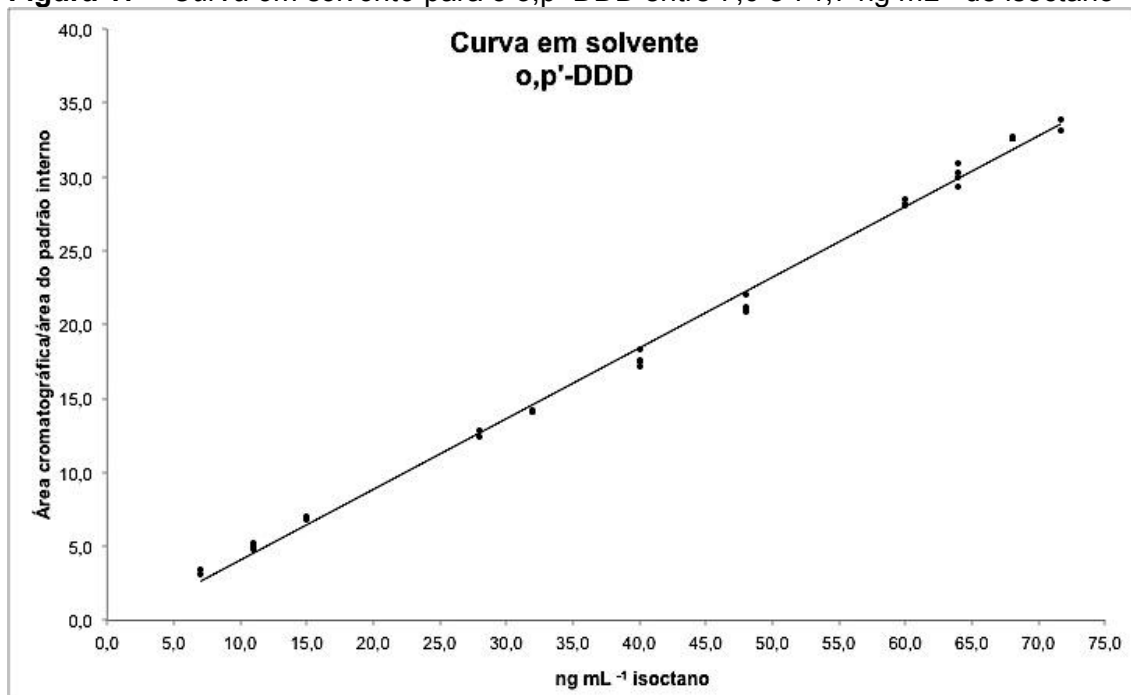
**Tabela 9** – Parâmetros analíticos e estatísticos da *curva em solvente* para cada um dos padrões analíticos ( $n \geq 25$ )<sup>a</sup>

Analito	Intervalo (ng mL <sup>-1</sup> )	Equação da curva	r <sup>2</sup>	RSD (%)	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
<i>o,p'</i> -DDD	7,0 – 71,7	$y = 0,479x - 0,544$	0,998	8	4,1	6,3
<i>o,p'</i> -DDE	3,0 – 71,7	$y = 0,216x - 0,275$	0,996	7	4,9	8,7
<i>o,p'</i> -DDT	3,0 – 60,0	$y = 0,075x - 0,103$	0,994	11	5,9	11,7
<i>p,p'</i> -DDD	7,0 – 71,7	$y = 0,108x + 0,092$	0,998	8	4,0	6,1
<i>p,p'</i> -DDE	3,0 – 71,7	$y = 0,252x - 0,215$	0,998	7	3,8	5,3
$\alpha$ -endosulfan	3,0 – 71,7	$y = 0,383x - 0,477$	0,998	9	4,5	7,6
$\beta$ -endosulfan	3,0 – 71,7	$y = 0,234x - 0,206$	0,998	12	4,2	6,5
Endosulfan sulfato	3,0 – 71,7	$y = 0,136x - 0,330$	0,994	9	5,7	11,2
PCB 28	7,0 – 71,7	$y = 0,145x - 0,144$	0,998	8	4,2	6,5
PCB 52	3,0 – 71,7	$y = 0,112x - 0,097$	0,998	8	4,1	6,4
PCB 101	7,0 – 71,7	$y = 0,146x - 0,068$	0,998	8	4,6	7,8
PCB 118	7,0 – 68,0	$y = 0,051x + 0,174$	0,992	12	5,2	9,5
PCB 153	7,0 – 71,7	$y = 0,195x - 0,143$	0,998	8	4,8	8,3
PCB 180	7,0 – 71,7	$y = 0,188x - 0,103$	0,998	6	4,1	6,4
<i>p,p'</i> -DDT + PCB 138*	3,0 – 71,7	$y = 0,315x - 0,283$	0,998	8	4,3	6,9

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e replicatas de injeção após a aplicação do teste de Huber; y é a relação entre a área cromatográfica do analito e a área cromatográfica do padrão interno; x é a concentração em ng mL<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RSD: desvio padrão relativo; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação. \*Coeluição

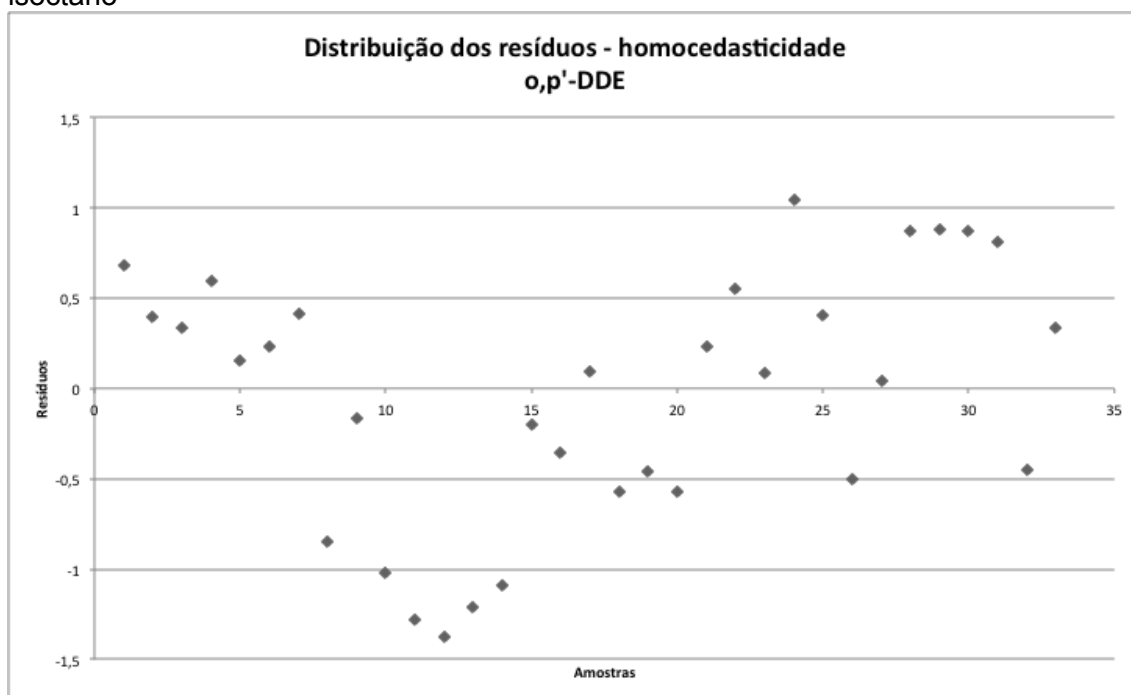
Para exemplificar, as figuras 17 e 18 mostram os gráficos de linearidade e homocedasticidade, respectivamente, para o analito *o,p'*-DDD, demonstrando que o ajuste linear é adequado e que possui uma distribuição aleatória dos resíduos.

**Figura 17** – Curva em solvente para o o,p'-DDD entre 7,0 e 71,7 ng mL<sup>-1</sup> de isoctano



Fonte: autor

**Figura 18** – Distribuição dos resíduos para o o,p'-DDD entre 7,0 e 71,7 ng mL<sup>-1</sup> de isoctano



Fonte: autor



### 5.3 Otimização da ESL-PBT por planejamento fatorial

### 5.4 Recuperações e recuperação normalizada

A recuperação dos analitos variou entre 2% (PCB 101) e 165% (PCB 52). Devido à dificuldade de trabalhar com as recuperações individualmente para otimizar uma análise multirresidual, optou-se por calcular o efeito a partir da recuperação normalizada (Eq. 5) em cada experimento. Os resultados obtidos de recuperação e de resposta normalizada por experimento estão apresentados na Tabela 10. As respostas normalizadas variaram entre 5,11 (experimento 9) e 13,24 (experimento 2), porém estes resultados são utilizados para cálculos de efeitos e determinação dos fatores significativos, não podendo ser discutidos de maneira isolada antes desta avaliação dos efeitos.

Exceto o PCB 52, devido ao efeito matriz que será explicado posteriormente, os PCBs tiveram as menores recuperações pois são os congêneres não-planares, com coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) ligeiramente menor que os congêneres planares, DDT, DDD e DDE, dificultando a extração com acetonitrila através das interações  $\pi$ <sup>158</sup>. O solvente também pode influenciar nas taxas de recuperações. O percentual de recuperação com o uso de acetado de etila diminui em compostos com  $pK_a > 4$ <sup>159</sup>, como é o caso dos PCBs ( $pK_a 4 - 11$ )<sup>160</sup>.

**Tabela 10** – Normalização da porcentagem de recuperação obtidas para os analitos na otimização da técnica ESL-PBT e CG/ECD

Exp	Matriz				Recuperação / %															Resposta normaliz. <sup>e</sup>
	ES	VT	FT	CT	PCB 28	PCB 52	o,p'-DDE	PCB 101	$\alpha$ -end <sup>a</sup>	p,p'-DDE	o,p'-DDD	$\beta$ -end <sup>b</sup>	p,p'-DDD	o,p'-DDT	end sulf <sup>c</sup>	PCB 180	PCB 118	PCB 153	PCB 138 <sup>d</sup>	
<b>1</b>	+	+	+	+	31	96	12	23	110	55	11	17	17	13	45	52	24	20	17	7,83
<b>2</b>	+	+	+	-	41	100	40	36	119	80	62	95	60	39	97	38	24	24	36	13,24
<b>3</b>	+	+	-	+	42	116	38	18	112	77	57	76	63	42	81	55	18	24	35	12,56
<b>4</b>	+	+	-	-	21	54	22	14	71	40	29	42	44	20	91	8	10	13	21	7,22
<b>5</b>	+	-	+	+	12	105	16	5	88	44	25	36	28	17	50	19	2	8	13	5,74
<b>6</b>	+	-	+	-	37	107	31	25	96	86	55	73	55	46	94	70	21	23	33	12,61
<b>7</b>	+	-	-	+	25	97	21	15	102	58	35	48	40	28	59	36	10	16	21	8,47
<b>8</b>	+	-	-	-	21	124	41	12	119	92	33	62	43	31	64	37	9	13	15	9,45
<b>9</b>	-	+	+	+	17	96	9	11	104	45	8	11	11	7	24	36	10	10	8	5,11
<b>10</b>	-	+	+	-	21	107	9	11	119	52	9	14	12	8	24	46	12	13	10	5,93
<b>11</b>	-	+	-	+	17	94	22	2	95	47	33	50	38	20	75	18	6	10	18	7,13
<b>12</b>	-	+	-	-	11	79	15	4	81	41	23	37	25	14	35	16	5	8	10	5,16
<b>13</b>	-	-	+	+	19	126	22	12	108	60	36	57	39	23	52	41	9	12	19	8,28
<b>14</b>	-	-	+	-	18	90	23	4	95	55	35	52	36	23	54	26	7	11	17	7,30
<b>15</b>	-	-	-	+	20	94	28	8	94	55	38	57	42	23	64	17	7	12	19	7,82
<b>16</b>	-	-	-	-	16	165	21	78	90	48	27	39	26	18	39	7	6	9	14	7,35
<b>17C</b>	0	0	0	0	30	80	48	22	75	58	46	65	50	30	93	12	14	20	29	10,08
<b>18C</b>	0	0	0	0	18	103	18	2	124	84	27	35	34	25	59	18	7	10	13	7,34
<b>19C</b>	0	0	0	0	25	16	41	18	24	58	40	56	47	27	64	10	12	19	21	7,99

Exp.: experimento; ES: solvente extrator; VT: tempo de agitação em vortex; FT: tempo de congelamento; CT: tempo de centrifugação; <sup>a</sup> $\alpha$ -endosulfan; <sup>b</sup> $\beta$ -endosulfan; <sup>c</sup>endosulfan sulfato; <sup>d</sup>PCB138+ p,p'-DDT; <sup>e</sup>Resposta normalizada obtida pela equação 5.

## 5.5 Resultados dos efeitos e superfície de resposta

Os resultados dos efeitos estão descritos na Tabela 11. O solvente extrator produziu o maior efeito positivo (+2,88) e o efeito de interação de 2<sup>a</sup>-ordem entre o tempo de centrifugação e o tempo de congelamento obteve o maior resultado de efeito negativo (-2,36). O efeito principal de tempo de congelamento foi praticamente nulo (0,11). Os outros efeitos estiveram entre +1,50 (interação de 2<sup>a</sup>-ordem entre solvente extrator e tempo de agitação) e -1,79 (interação de 3<sup>a</sup>-ordem entre solvente extrator, tempo de centrifugação e tempo de congelamento).

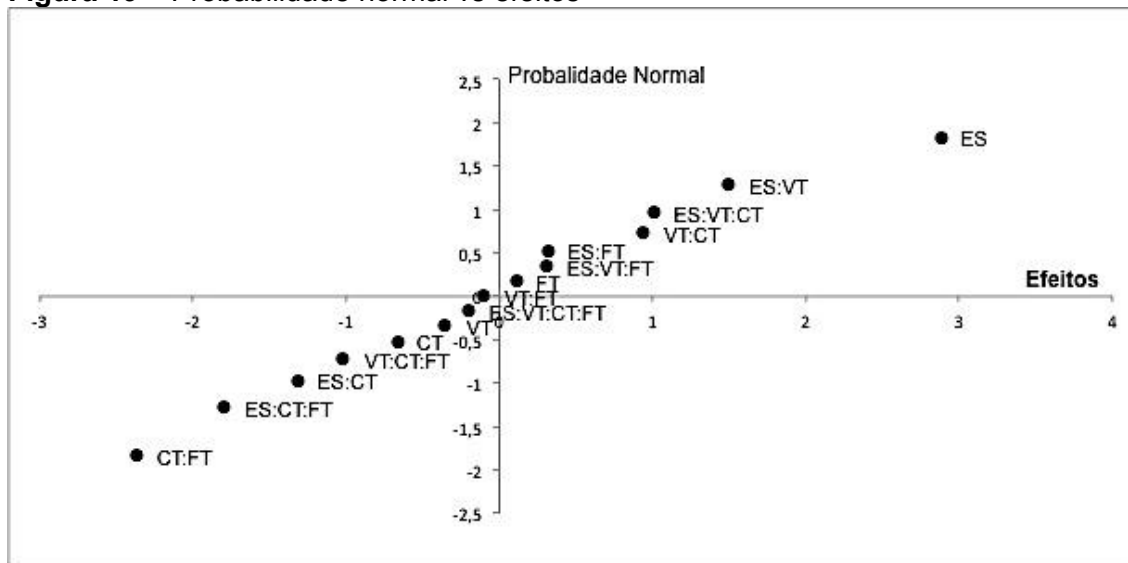
**Tabela 11** – Resultados dos efeitos

Efeitos	Fatores	Efeitos
<b>principais</b>	ES	2,88
	VT	-0,35
	FT	0,11
	CT	-0,66
<b>de 2<sup>a</sup>-ordem</b>	ES:VT	1,50
	ES:FT	0,32
	ES:CT	-1,31
	VT:FT	-0,10
	VT:CT	0,93
	FT:CT	-2,36
<b>3<sup>a</sup>-ordem</b>	ES:VT:FT	0,31
	ES:VT:CT	1,01
	ES:FT:CT	-1,79
	VT:FT:CT	-1,02
<b>4<sup>a</sup>-ordem</b>	ES:VT:FT:CT	-0,19

ES: solvente extrator; VT: tempo de agitação;  
FT: tempo de congelamento; CT: tempo de centrifugação

A partir destes dados, foi construído um gráfico de probabilidade normal (Figura 19), em que é possível notar que o fator que produz maior efeito positivo é o solvente extrator (ES). Os sinais na região central do gráfico são ruídos e possivelmente não produzem efeitos significativos no processo de extração.

**Figura 19** – Probabilidade normal vs efeitos



ES: solvente extrator (acetoneitrila: acetato de etila - 6,5:1,5 v/v); VT: tempo de agitação; CT: tempo de centrifugação; FT: tempo de congelamento

**Fonte:** autor

Depois desta organização dos dados, os mesmos foram reorganizados. Conseqüentemente, o planejamento inicial  $2^4$  (com 16 experimento sem replicatas) foi reduzido para um planejamento  $2^3$ , porém cada combinação de experimentos possui duas replicatas. Para a redução da matriz foi excluído como fator o tempo de congelamento por possuir efeito praticamente nulo. Neste caso, a partir dos dados descritos na Tabela 12, é possível calcular a variância experimental – eq. 9 – (5,05), o erro experimental – eq. 10 – (2,25), a variância dos efeitos – eq. 11 – (1,26) e o erro dos efeitos – eq. 12 – (1,12). A partir dos erros experimentais e dos efeitos é possível calcular o t-crítico e estabelecer qual fator é significativo.

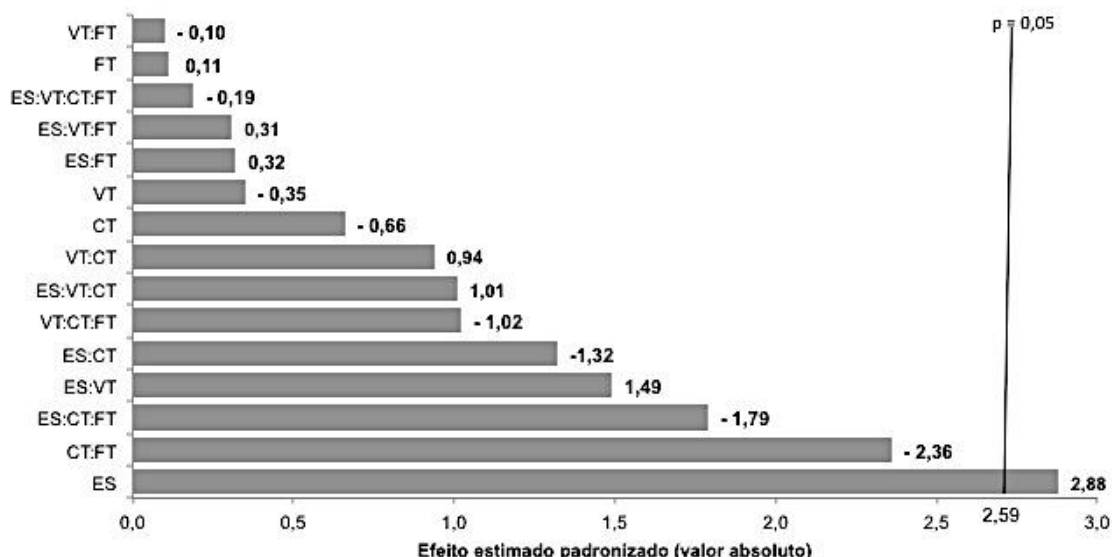
**Tabela 12** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  após a remoção da coluna “FT” dos fatores descritos na Tabela 10.

EXP <sup>a</sup>	Fatores			$\bar{x}_i$	$s_m^2$	n	$v_i$
	ES <sup>b</sup>	VT <sup>c</sup>	CT <sup>d</sup>				
1	+	+	+	10,20	11,19	2	1
2	-	-	-	7,32	0,00	2	1
3	+	-	-	11,03	4,98	2	1
4	+	+	-	10,23	18,11	2	1
5	-	+	+	6,12	2,04	2	1
6	-	-	+	8,05	0,10	2	1
7	+	-	+	7,10	3,71	2	1
8	-	+	-	5,54	0,30	2	1

<sup>a</sup>experimentos; <sup>b</sup>solvente extrator; <sup>c</sup>tempo de agitação; <sup>d</sup>tempo de centrifugação;  $\bar{x}_i$ : corresponde à média da resposta normalizada;  $s_m^2$ : variância de cada experimento; n: número de replicatas para cada experimento;  $v_i$ : grau de liberdade (n-1).

O t-crítico pôde ser calculado com 8 graus de liberdade:  $1,12 \times 2,31$  (tabelado com 95 % de grau de confiança). O t-crítico calculado foi 2,59. Os efeitos e as variáveis significativas foram avaliadas usando um gráfico de Pareto (Figura 20).

**Figura 20** – Gráfico de Pareto para o sistema ESL-PBT



ES: solvente extrator; VT: tempo de agitação; CT: tempo de centrifugação; FT: tempo de congelamento

**Fonte:** autor

O único efeito significativo foi o solvente extrator, mas cada efeito pode ser analisado separadamente antes da construção da superfície de resposta.

### 5.5.1 Efeitos principais

O método ESL-PBT proposto possui quatro etapas distintas: adição de solvente extrator (ES), tempo de agitação (VT), tempo de centrifugação (CT) e tempo de congelamento (FT). O maior efeito positivo destas variáveis foi o ES (+2,88), ou seja, este fator aumenta a eficiência da extração, conforme o esperado, visto que aumentando-se a quantidade de solvente aumenta-se a solubilização dos analitos, melhorando a eficiência da extração. Portanto, o volume estabelecido para o solvente extrator foi o de maior nível, ou seja, 12 mL.

O FT como fator principal praticamente não teve efeito sobre a extração nas condições avaliadas, provavelmente porque nos tempos de congelamentos selecionados o sistema já estava em equilíbrio. Este fator poderia ser significativo se os níveis de tempo de congelamento fossem menores.

VT e CT possuíram influência levemente negativa, porém não significativos. Contudo, o VT possui leve influencia positiva quando analisado nas interações de 2<sup>a</sup>-ordem, como explicado a seguir.

### **5.5.2 Efeitos de interações de 2<sup>a</sup>-ordem**

As interações de 2<sup>a</sup>-ordem exibiram efeitos positivos nas interações entre ES:VT (+1,49) e VT:CT (+0,94). Apesar de não ser significativo, a interação ES:VT resultou no maior efeito positivo entre todas as interações. Indicando que a extração pode ser mais eficiente com 12 mL de solvente extrator e 5 min de tempo de agitação em vortex.

O maior efeito negativo entre todas as interações possíveis, foi observado na interação de 2<sup>a</sup>-ordem entre CT:FT (-2,36), sendo também o segundo maior efeito produzido, apesar de não ser significativo. Isso indica que estes fatores devem ser associados em níveis opostos: por exemplo, menor tempo de centrifugação (5 min) e maior tempo de congelamento (12 h).

### **5.5.3 Efeitos de interações de 3<sup>a</sup>-ordem**

Os efeitos das interações entre três fatores quando compara-se as interações ES:VT:FT (+0,31) e ES:VT:CT (+1,01) mostra uma redução do efeito quando associado com o tempo de congelamento (FT).

Apesar de não serem resultados significativos, notou-se que a extração foi mais eficiente com o volume de solvente de extrator de 12 mL, tempo de agitação em vortex de 5 min e centrifugação de 15 min.

As interações de 3<sup>a</sup>-ordem, quando tempo de congelamento e tempo de centrifugação estão associados, sempre possuem um efeito negativo, sendo de – 1,02 para VT:CT:FT e de – 1,79 para ES:CT:FT. Demonstrando novamente que a associação dos maiores níveis de CT e FT produzem efeitos negativos no sistema proposto de ESL-PBT.

#### **5.5.4 Efeito de interação de 4<sup>a</sup>-ordem**

Apesar de não ser significativo, quando todos os fatores são associados em seus maiores níveis, o efeito é levemente negativo (– 0,19) devido a interação entre os níveis máximos do tempo de congelamento e de centrifugação, compensado pelos efeitos positivos do volume de solvente extrator e tempo de agitação, conforme mostrado anteriormente.

#### **5.5.5 Superfície de resposta**

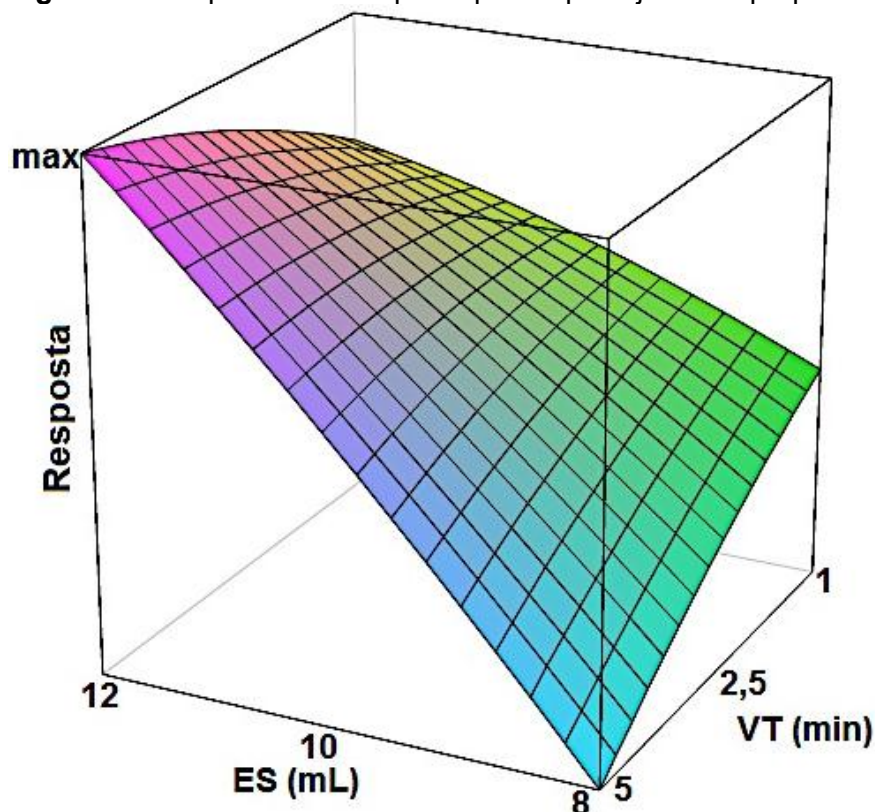
Os resultados experimentais, após aplicação do teste t de Student, demonstram que o volume de solvente extrator possui um efeito positivo significativo no sistema de ESL-PBT proposto. Apesar de não significativo, o efeito de 2<sup>a</sup>-ordem para a interação entre tempo de centrifugação e tempo de congelamento foi de – 2,36, sendo próximo do t-crítico de 2,59. Sendo assim, considerando apenas os efeitos positivos, uma superfície de resposta pode ser construída para a interação entre solvente extrator e tempo de agitação. A interpretação pode ser facilitada com o suporte da superfície de resposta construída a partir de todos os experimentos considerando apenas o volume de solvente e o tempo de agitação como fatores importantes. Sendo assim, a matriz do planejamento resultou em uma nova matriz de quatro diferentes ensaios com quatro replicatas, mais a triplicata do ponto central, e que a resposta obtida é representativa para todos os experimentos nos níveis e fatores estudados. Esta nova matriz gerou uma superfície de resposta

quadrática, descrita pela equação 17 (modelo eq. 13), e representada na Figura 21.

$$Y = 8,4717 + 1,4407X_i - 0,136X_i^2 - 0,177X_j - 0,136X_j^2 + 0,749X_iX_j \quad (\text{Eq. 17})$$

onde, Y é a resposta,  $X_i$  representa o volume de solvente extrator e  $X_j$  o tempo de agitação.

**Figura 21** – Superfície de resposta para o planejamento proposto



ES: solvente extrator; VT: tempo de agitação

Fonte: autor

Portanto, os fatores que contribuíram para uma melhor extração dos analitos, resposta máxima na Figura 21, foram o maior volume de solvente extrator e maior tempo de agitação em vortex. Considerando o efeito negativo entre a interação dos fatores tempo de congelamento e tempo de centrifugação, estes fatores foram selecionados em níveis opostos. Como não são valores significativos, a opção fica a critério do analista. Para a continuação do trabalho, optou-se pelo menor tempo de centrifugação e maior tempo de congelamento para o método otimizado com o intuito de facilitar a rotina em laboratório.



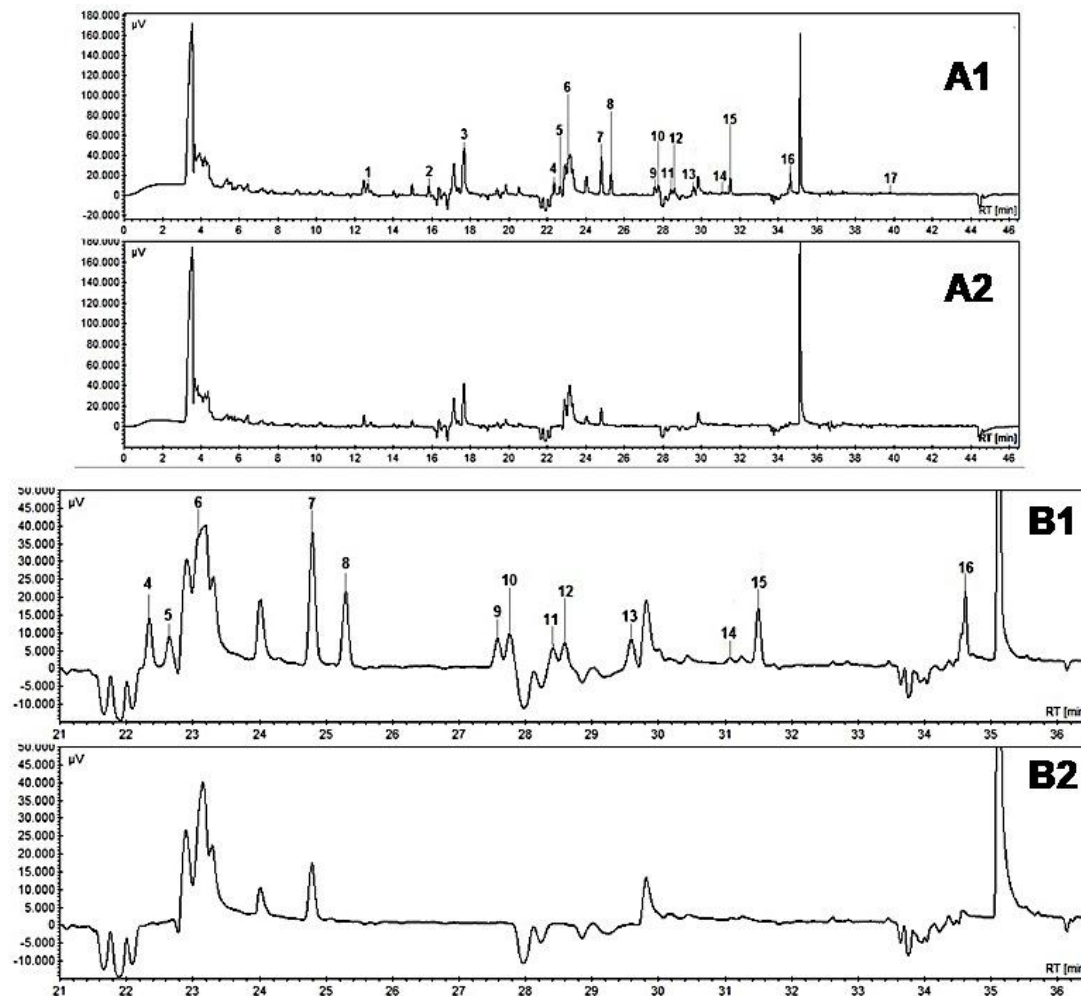
Então, o método otimizado inclui 12 mL de solvente extrator (acetonitrila:acetato de etila - 6,5:1,5 v/v), 5 min de agitação em vortex, 5 min de centrifugação a 2.500 rpm e 12 h de congelamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Durante a fase de otimização, a maior resposta normalizada, descrita na Tabela 10, foi obtida nestas condições (experimento 2) e a média das recuperações considerando todos os analitos foi de 59,5% para um nível de fortificação de  $22,5\text{ ng g}^{-1}$  de ovo liofilizado.

## **5.6 Validação do método**

### **5.6.1 Avaliação do efeito matriz**

A Figura 22 (A1 e A2) apresenta os cromatogramas de uma matriz fortificada (ponto na matriz) e de uma matriz não fortificada (testemunha), enquanto em B1 e B2 apresenta-se a ampliação dos cromatogramas no intervalo de tempo de retenção entre 21 e 36 min para melhor visualização das separações dos analitos ( $11,25\text{ ng g}^{-1}$ ) e interferentes da amostra. Pode-se notar que houve separação cromatográfica entre eles, exceto para o  $\alpha$ -endosulfan devido a uma forte interação com interferentes da matriz e entre o PC 138 e p,p'-DDT, conforme citado anteriormente. Então, não foi possível sua avaliação pois a variação da área cromatográfica não foi linear para estes analitos.

**Figura 22** – Cromatograma CG/ECD: ponto na matriz (A1) em isoctano a 11,25 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado para todos os analitos e testemunha (A2) em isoctano. B1 e B2 são uma ampliação para melhor visualização no intervalo de tempo de retenção entre 21 e 36 min

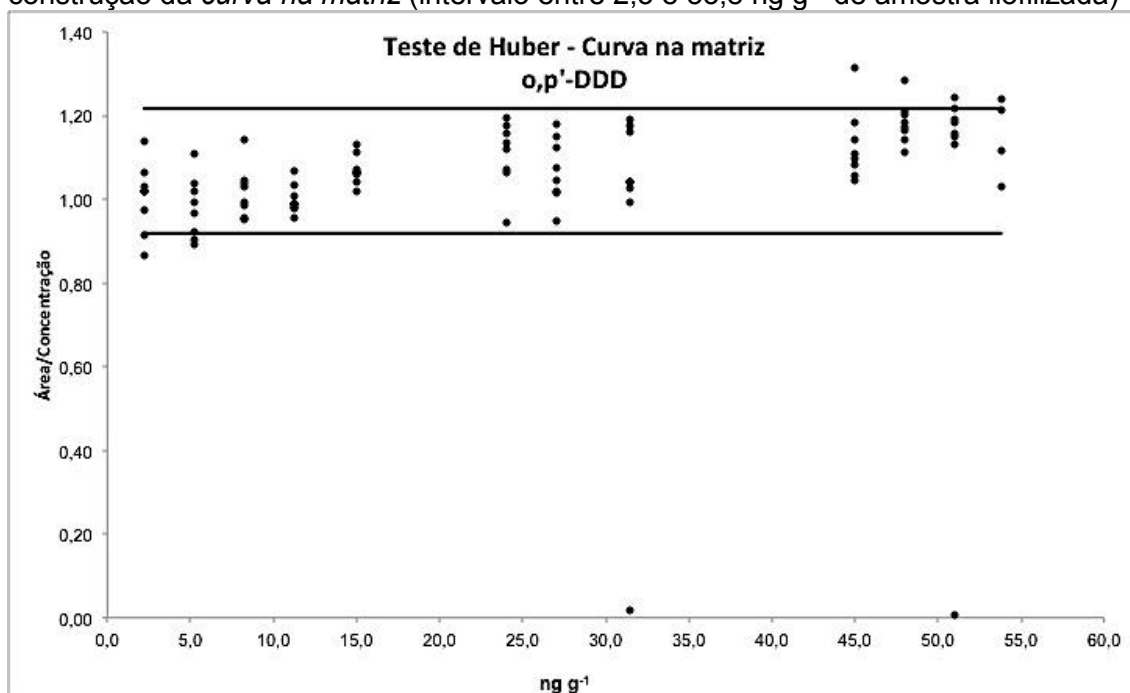


1: T (surrogate); 2: PC 28; 3: PC 52; 4: o,p'-DDE; 5: PC 101; 6:  $\alpha$ -endossulfan; 7: p,p'-DDE; 8: o,p'-DDD; 9: PC 118; 10:  $\beta$ -endossulfan; 11: p,p'-DDD; 12: o,p'-DDT; 13: PCB 153; 14: endossulfan sulfato; 15: p,p'-DDT + PCB 138; 16: PCB 180; 17: PCB 209 (padrão interno)

**Fonte:** autor

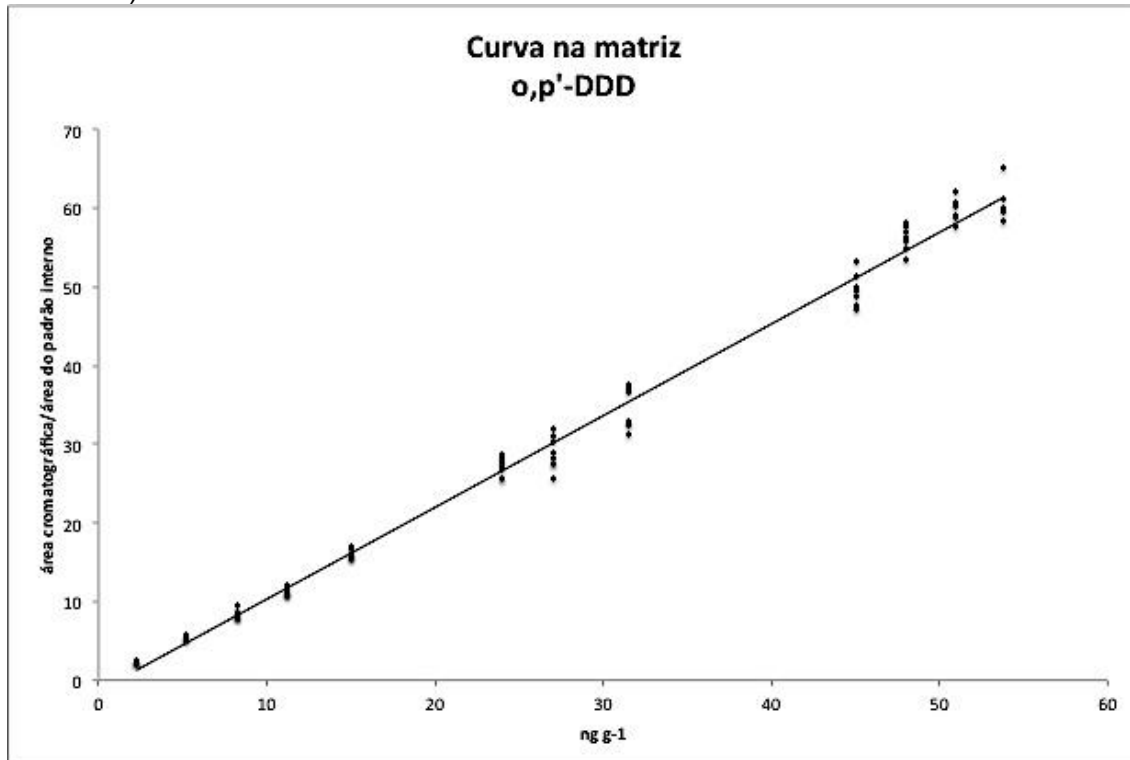
Foi realizado o teste de Huber para os valores de área versus concentração de todas as replicadas e todos os analitos antes de construir a curva analítica. A Figura 23 mostra um exemplo da aplicação do teste de Huber para o o,p'-DDD, com exclusão de valores anômalos em cinco pontos da curva. A curva analítica e a homocedasticidade para o o,p'-DDD estão exemplificadas nas figuras 24 e 25, respectivamente. Na figura 25 pode-se verificar distribuição aleatória dos resíduos.

**Figura 23** – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da *curva na matriz* (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



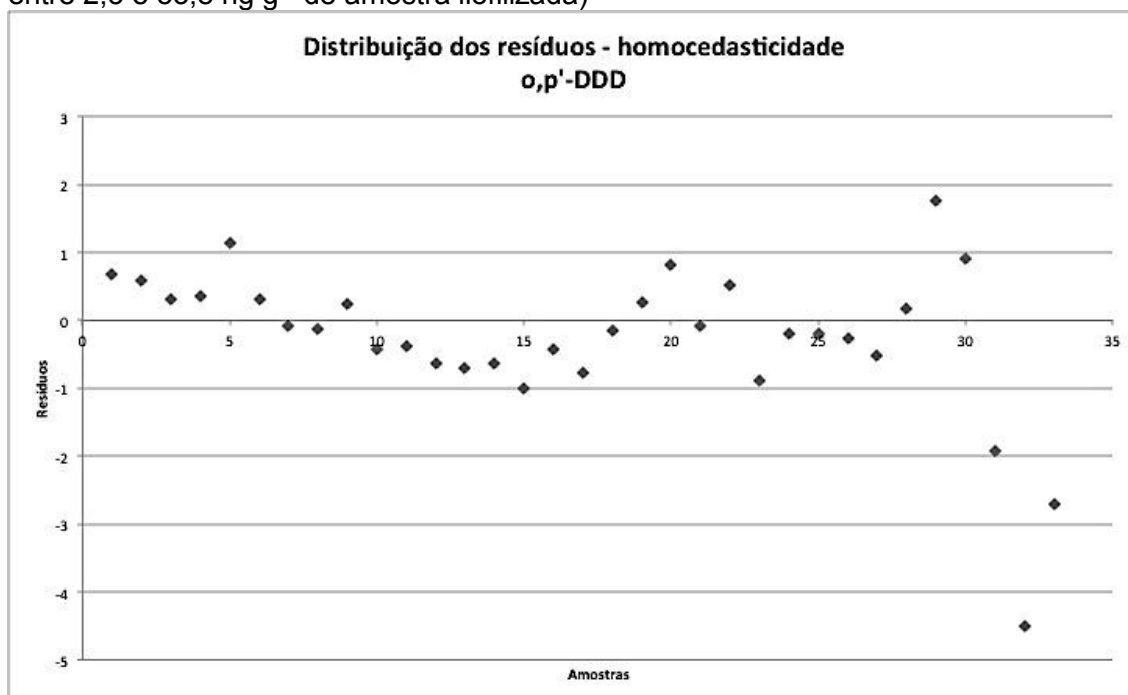
Fonte: autor

**Figura 24** – *Curva na matriz* do o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



Fonte: autor

**Figura 25** – Distribuição dos resíduos da *curva na matriz* para o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



Fonte: autor

A Tabela 13 mostra os parâmetros analíticos e estatísticos, obtidos a partir do que foi descrito na seção 4.4, para a *curva na matriz* de todos os analitos. Os coeficientes de determinação foram maiores que 0,910 e o RSD menor que 23 %, aceitáveis para amostras ambientais complexas<sup>161</sup>. O efeito matriz (Tabela 14) foi obtido pela comparação entre a *curva em solvente* e a *curva na matriz*, de acordo com que foi descrito na seção 4.6. Considerando que a curva no solvente é expressa em ng mL<sup>-1</sup> isoctano e a *curva na matriz* em ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada, foi necessário multiplicar os valores de concentração dos pontos da *curva na matriz* pelo fator de concentração 1,333 para que a comparação fosse feita em ng mL<sup>-1</sup> e os cálculos estatísticos fossem possíveis.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 14, a variância residual entre a *curva em solvente* e a *curva na matriz* foram diferentes (F-calculado > F-crítico) para todos os analitos, ou seja, a matriz influencia na precisão do método. O valores de t-calculado obtidos para todos os analitos foram maiores que o t-crítico e neste caso significa que o efeito matriz é

significativo, como é esperado para amostras ambientais complexas. Ou seja, a matriz influencia na sensibilidade do método.

**Tabela 13** – Parâmetros analíticos e estatísticos para *curva na matriz* ( $n \geq 25^a$ )

Analito	Intervalo (ng g <sup>-1</sup> )	Equação da curva	r <sup>2</sup>	RSD (%)
o,p'-DDD	2,3 – 53,8	y = 1,169x – 1,295	0,994	8
o,p'-DDE	2,3 – 53,8	y = 0,333x + 0,653	0,992	13
o,p'-DDT	2,3 – 53,8	y = 0,303x – 0,223	0,992	14
p,p'-DDD	2,3 – 53,8	y = 0,256x + 0,086	0,990	20
p,p'-DDE	8,3 – 53,8	y = 1,019x + 17,670	0,996	14
β-endosulfan	2,3 – 53,8	y = 0,375x + 2,099	0,984	20
Endosulfan sulfato	11,3 – 53,8	y = 0,036x + 1,515	0,970	23
PCB 28	5,3 – 53,8	y = 0,499x – 0,732	0,992	20
PCB 52	8,3 – 53,8	y = 0,485x + 68,885	0,910	22
PCB 101	2,3 – 53,8	y = 0,389x – 0,032	0,986	17
PCB 118	2,3 – 53,8	y = 0,330x – 0,144	0,988	12
PCB 153	2,3 – 53,8	y = 0,450x – 0,413	0,992	11
PCB 180	2,3 – 53,8	y = 0,363x – 0,905	0,986	20

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e replicatas de injeção depois da aplicação do teste de Huber; y é a relação entre a área cromatográfica do analito e a área do padrão interno (PCB 209) e x é concentração em ng g<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RSD: desvio padrão relativo.

**Tabela 14** – Parâmetros estatísticos e efeito matriz: comparação entre a *curva em solvente* (CS) e a *curva na matriz* (CM) para cada analito ( $n \geq 25$ )<sup>a</sup>

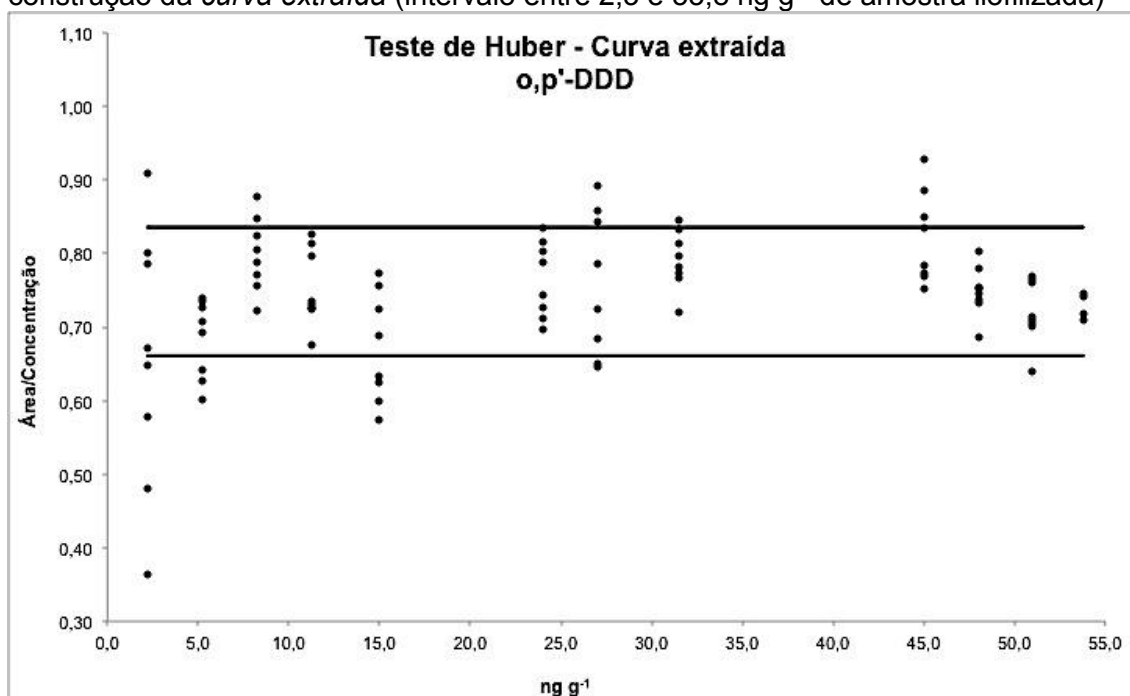
Analito	S <sub>y</sub> CS	S <sub>y</sub> CM	S <sub>b</sub> CS (x10 <sup>-3</sup> )	S <sub>b</sub> CM* (x10 <sup>-3</sup> )	F <sub>crit</sub>	F <sub>cal</sub>	t <sub>cri</sub>	t <sub>cal</sub>	Efeito matriz
o,p'-DDD	0,474	1,549	3,41	7,38	1,58	10,66	1,99	49,31	+
o,p'-DDE	0,302	0,533	2,20	3,98	1,62	5,66	2,01	30,01	+
o,p'-DDT	0,137	0,519	1,87	2,51	1,66	14,28	2,02	93,26	+
p,p'-DDD	0,102	0,433	0,767	2,48	1,67	18,04	2,00	33,30	+
p,p'-DDE	0,257	1,122	1,75	9,41	1,88	19,10	2,05	55,56	+
β-endosulfan	0,239	0,798	1,93	5,62	1,76	11,08	2,02	8,45	+
Endosulfan sulfato	0,244	0,105	1,66	1,04	1,98	5,39	2,04	108,27	+
PCB 28	0,179	0,664	1,36	4,23	1,71	13,79	1,97	54,64	+
PCB 52	0,112	2,562	0,784	2,34	1,98	524,8	2,06	10,93	+
PCB 101	0,178	0,792	1,33	4,94	1,68	19,85	2,00	29,76	+
PCB 118	0,089	0,573	0,889	3,12	1,67	40,96	1,97	112,08	+
PCB 153	0,254	0,618	1,85	3,53	1,63	5,91	2,00	57,98	+
PCB 180	0,191	0,694	1,36	4,24	1,61	13,22	2,00	31,54	+

S<sub>y</sub>: desvio padrão residual da curva; S<sub>b</sub>: desvio padrão da curva; F<sub>crit</sub>: F crítico com 5 % de significância e n – 2 graus de liberdade; F<sub>cal</sub>: F calculado; t<sub>crit</sub>: t crítico para 5% de significância e n – 2 graus de liberdade; t<sub>cal</sub>: t calculado; +: efeito matriz significativo; \*CM foi corrigida para concentração em ng mL<sup>-1</sup> (fator de concentração 1,333) para ser comparada com a CS.

### 5.6.2 Curva extraída e validação do método ESL-PBT

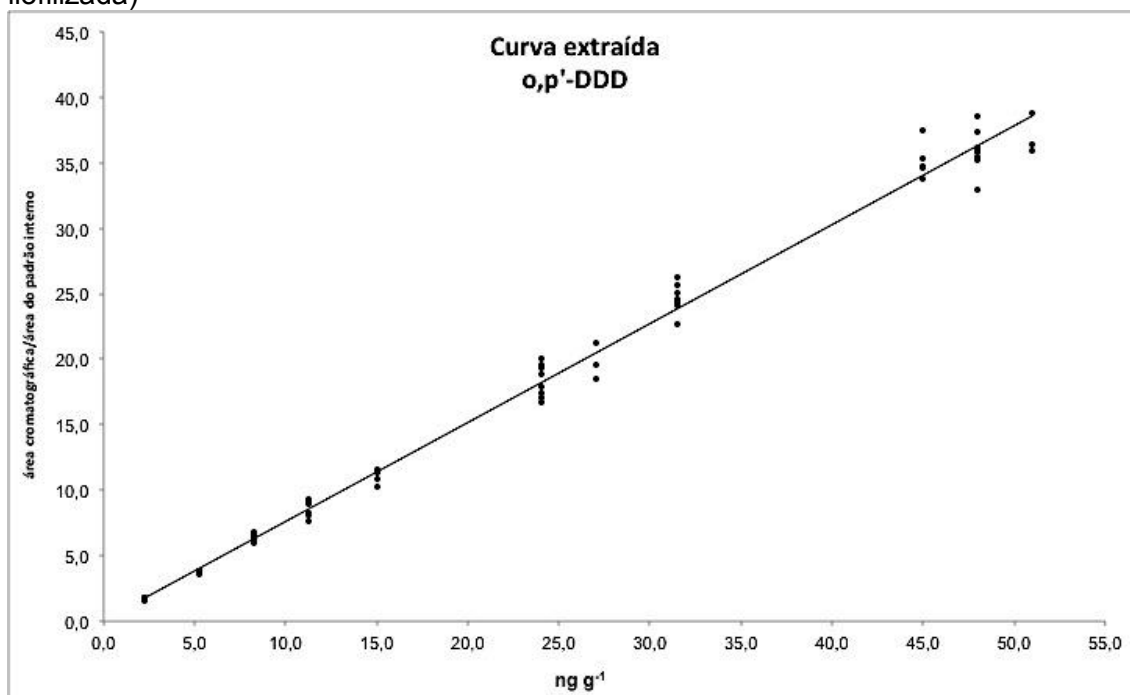
Para todos os analitos foi aplicado o teste de Huber e avaliação da homocedasticidade. O o,p'-DDD foi utilizado como exemplo da aplicação destes testes. Depois da exclusão dos valores anômalos em oito pontos da curva deste analito, pelo teste de Huber (Figura 26), a *curva extraída* foi construída no intervalo entre 2,3 e 51,3 ng g<sup>-1</sup> (Figura 27) e avaliada quanto à distribuição aleatória dos resíduos (Figura 28). Neste exemplo, como pode ser verificado comparando as Figuras 25 e 28, a *curva extraída* apresenta os resíduos com maiores valores se comparados com a *curva na matriz*, o que é esperado pois as áreas cromatográficas do analito, para a construção da *curva extraída*, sofre a influência da matriz e da técnica de extração, enquanto que as áreas cromatográficas do o,p'-DDD para a construção da *curva na matriz* possui influência apenas da matriz.

**Figura 26** – Demonstração gráfica do teste de Huber para o o,p'-DDD antes da construção da *curva extraída* (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



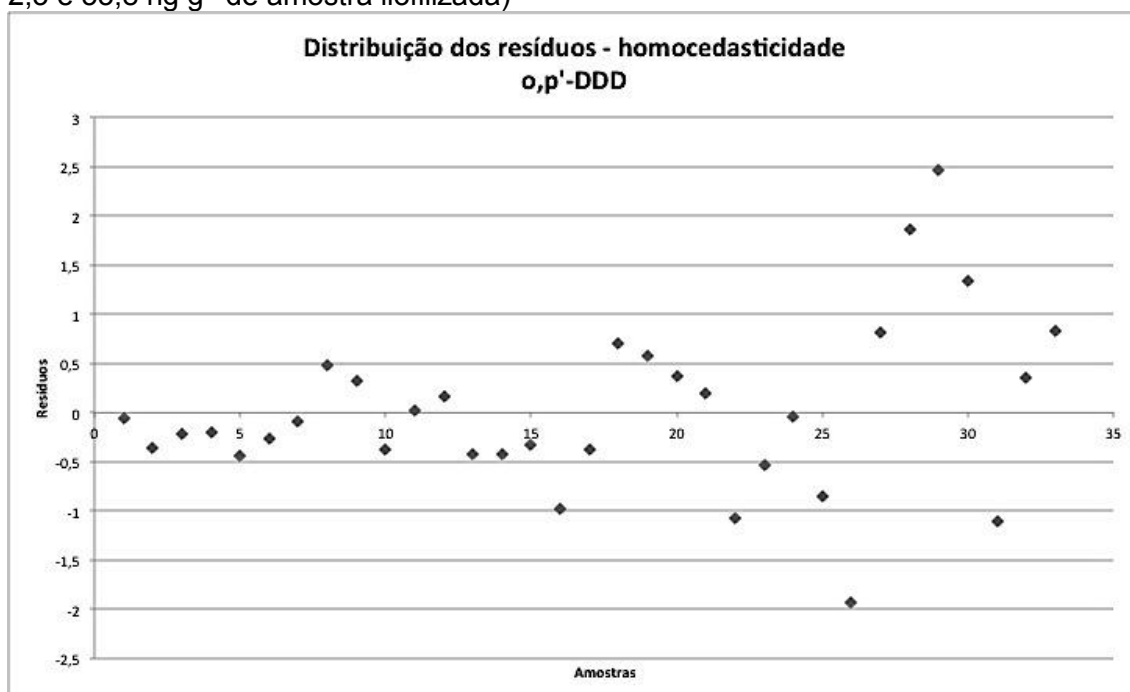
Fonte: autor

**Figura 27** – Curva extraída do o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



Fonte: autor

**Figura 28** – Distribuição dos resíduos da curva extraída para o,p'-DDD (intervalo entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada)



Fonte: autor

A Tabela 15 mostra as equações das curvas analíticas para todos os analitos, coeficiente de determinação ( $r^2 > 0,91$ ), desvio padrão relativo ( $RSD \leq$

24 %), calculados como descritos anteriormente, e aceitáveis para amostras ambientais.

**Tabela 15** – Parâmetros analíticos e estatísticos para a *curva extraída* ( $n \geq 25$ )<sup>a</sup>

Analito	Intervalo (ng g <sup>-1</sup> )	Equação da curva	r <sup>2</sup>	RSD (%)
<b>o,p'-DDD</b>	2,3 – 53,8	$y = 0,749x + 0,151$	0,990	12
<b>o,p'-DDE</b>	5,3 – 53,8	$y = 0,653x - 0,116$	0,992	16
<b>o,p'-DDT</b>	2,3 – 53,8	$y = 0,585x - 1,040$	0,990	18
<b>p,p'-DDD</b>	5,3 – 53,8	$y = 0,263x - 0,700$	0,988	16
<b>p,p'-DDE</b>	11,3 – 53,8	$y = 0,351x + 29,000$	0,994	17
<b>β-endosulfan</b>	8,3 – 53,8	$y = 0,138x + 1,147$	0,976	17
<b>Endosulfan sulfato</b>	18 – 53,8	$y = 0,035x + 0,525$	0,946	21
<b>PCB 28</b>	8,3 – 53,8	$y = 0,293x - 2,977$	0,982	13
<b>PCB 52</b>	15,0 – 53,8	$y = 0,999x + 56,405$	0,919	24
<b>PCB 101</b>	5,3 – 53,8	$y = 0,138 + 1,147$	0,976	15
<b>PCB 118</b>	2,3 – 53,8	$y = 0,073x + 0,095$	0,978	16
<b>PCB 153</b>	5,3 – 53,8	$y = 0,112x + 0,023$	0,982	16
<b>PCB 180</b>	2,3 – 53,8	$y = 0,047x - 0,063$	0,980	20

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e replicatas de injeção depois da aplicação do teste de Huber; y é a relação entre a área cromatográfica do analito e a área do padrão interno (PCB 209) e x é concentração em ng g<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RSD: desvio padrão relativo.

A variância residual das curvas na matriz e extraída foram comparadas pelo teste F e teste t de Student com intuito de avaliar se o processo de extração influencia a precisão dos resultados e/ou exerce algum efeito nas áreas cromatográficas, os resultados estão expostos na Tabela 16. O método de extração afeta a precisão dos resultados ( $F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$ ) para todos os analitos, exceto para o o,p'-DDD, p,p'-DDD, PCB 28 e endosulfan sulfato. Contudo, ao aplicar o teste t de Student, nota-se que o t calculado destes três compostos é maior que o t-crítico, ou seja, a extração produz um efeito significativo nas áreas cromatográficas destes compostos. O endosulfan sulfato foi o único analito em que o método não influencia na precisão dos resultados e que não gera efeito significativo nas áreas cromatográficas, possivelmente devido a menor sensibilidade do detector a este composto, resultando em um menor coeficiente angular. Sendo assim, a *curva extraída* pode corrigir perdas da recuperação e deve ser utilizada para estabelecer os parâmetros analíticos e estatísticos do método de extração e na quantificação dos analitos em ovos de jacaré na etapa ambiental.



**Tabela 16** – Parâmetros estatísticos e comparação entre a *curva na matriz* (CM) e a *curva extraída* (CE) para cada analito ( $n \geq 25$ )<sup>a</sup>

Analito	S <sub>y</sub> CM	S <sub>y</sub> CE	S <sub>b</sub> CM* (x10 <sup>-3</sup> )	S <sub>b</sub> CE* (x10 <sup>-3</sup> )	F <sub>crit</sub>	F <sub>calc</sub>	t <sub>crit</sub>	t <sub>calc</sub>	Conclusão
<b>o,p'-DDD</b>	1,549	1,285	9,83	8,25	1,47	1,45	1,98	25,79	A precisão do método <b>não</b> é afetada pela extração mas tem efeito significativo nas áreas cromatográficas
<b>o,p'-DDE</b>	0,533	1,072	3,98	7,42	1,52	4,04	1,99	37,80	A precisão é influenciada pela extração
<b>o,p'-DDT</b>	0,519	1,009	3,35	7,86	1,53	3,78	2,00	31,28	A precisão é influenciada pela extração
<b>p,p'-DDD</b>	0,433	0,512	3,31	4,07	1,57	1,39	1,98	8,28	A precisão do método <b>não</b> é afetada pela extração mas tem efeito significativo nas áreas cromatográficas
<b>p,p'-DDE</b>	1,122	0,572	12,5	7,58	2,10	3,84	2,06	45,53	A precisão é influenciada pela extração
<b>β-endosulfan</b>	0,798	0,439	7,50	5,13	2,06	3,29	2,05	26,00	A precisão é influenciada pela extração
<b>Endosulfan sulfato</b>	0,105	0,132	1,38	1,80	2,06	1,58	2,07	0,07	A precisão do método <b>não</b> é afetada pela extração e <b>não</b> tem efeito significativo nas áreas cromatográficas
<b>PCB 28</b>	0,664	0,666	5,64	5,42	1,57	1,01	1,98	53,06	A precisão do método <b>não</b> é afetada pela extração mas tem efeito significativo nas áreas cromatográficas
<b>PCB 52</b>	2,562	4,755	3,15	6,79	2,29	3,44	2,12	5,56	A precisão é influenciada pela extração
<b>PCB 101</b>	0,792	0,439	6,58	5,13	2,03	3,25	2,04	30,05	A precisão é influenciada pela extração
<b>PCB 118</b>	0,573	0,178	4,15	1,20	1,47	10,29	1,99	59,51	A precisão é influenciada pela extração
<b>PCB 153</b>	0,618	0,254	4,70	2,24	1,59	5,93	1,99	65,84	A precisão é influenciada pela extração
<b>PCB 180</b>	0,694	0,113	5,64	1,08	1,70	37,65	1,99	54,88	A precisão é influenciada pela extração

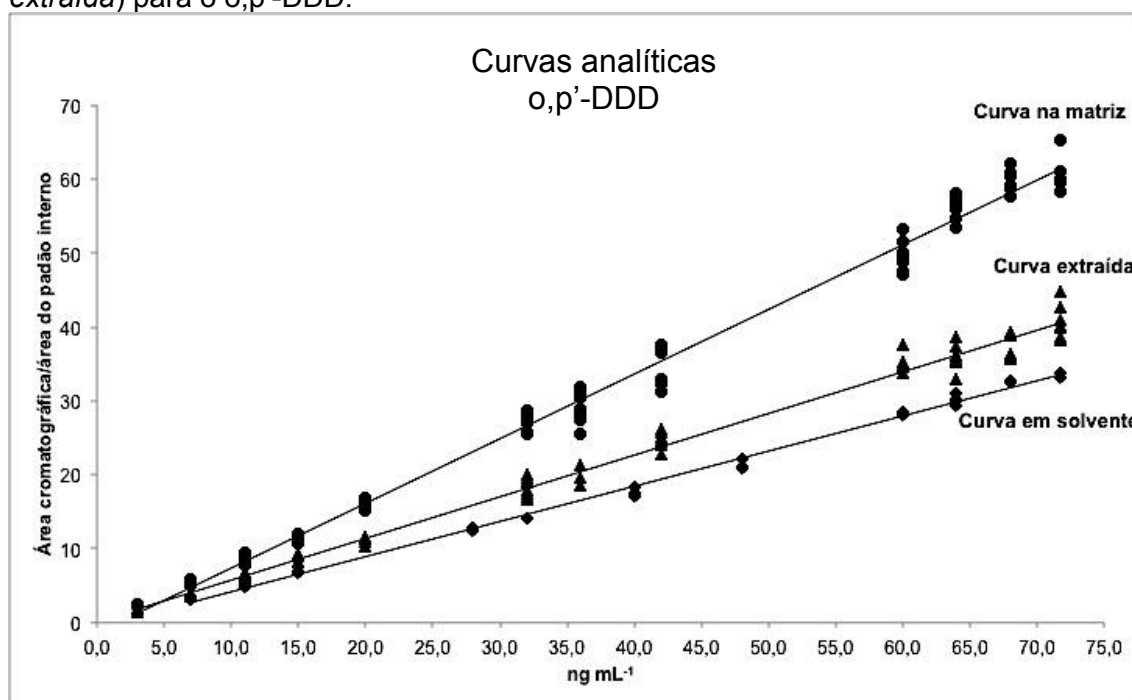
<sup>a</sup>n é a somatória de replicatas de amostras e replicatas de injeções após a aplicação do teste de Huber; S<sub>y</sub>: desvio padrão residual; S<sub>b</sub>: desvio padrão da curva; F<sub>crit</sub>: F crítico com 5% de significância e n – 2 graus de liberdade; F<sub>calc</sub>: F calculado; t<sub>crit</sub>: t-crítico para 5% de significância e n – 2 graus de liberdade; t<sub>calc</sub>: t calculado; \* CM e CE comparadas em ng g<sup>-1</sup>.

Comparando as três curvas (*em solvente*, *na matriz* e *extraída*), ajustadas para  $\text{ng mL}^{-1}$  e usando como exemplo o o,p'-DDD (Figura 29), pode-se notar que o sinal analítico é maior na *curva na matriz* comparado com a *curva em solvente*, devido ao efeito matriz positivo, pois a presença de co-extraídos podem aumentar o sinal analítico. Os coeficientes angulares das curvas também são diferentes, interferindo na sensibilidade do método.

O sinal da *curva extraída* é maior que o da *curva em solvente* (efeito matriz), porém menor que o da *curva na matriz*, devido aos efeitos de extração, como as perdas inerentes ao processo. A utilização da *curva extraída* corrige estas perdas e conseqüentemente na recuperação do método.

Neste exemplo, o efeito matriz e efeito de extração foram considerados significativos quando aplicado o teste t de Student.

**Figura 29** – Comparação entre as três curvas analíticas (*em solvente*, *na matriz* e *extraída*) para o o,p'-DDD.



Fonte: autor

Desta forma, o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura foi validado a partir da *curva extraída*, bem como seus limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir desta curva, com as

equações descritas anteriormente. A Tabela 17 mostra os limites de detecção e de quantificação para todos os analitos.

**Tabela 17** – Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método ESL-PBT proposto para todos os analitos, obtidos a partir da *curva extraída* nas faixas lineares entre 2,3 e 53,8 ng g<sup>-1</sup> (n ≥ 25)<sup>a</sup>

<b>Analito</b>	<b>Intervalo (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (ng g<sup>-1</sup>)</b>
<b>o,p'-DDD</b>	2,3 – 53,8	5,5	10,4
<b>o,p'-DDE</b>	5,3 – 53,8	5,3	10,0
<b>o,p'-DDT</b>	2,3 – 53,8	5,6	10,8
<b>p,p'-DDD</b>	5,3 – 53,8	5,9	11,9
<b>p,p'-DDE</b>	11,3 – 53,8	5,8	11,4
<b>β-endosulfan</b>	8,3 – 53,8	8,9	20,8
<b>Endosulfan sulfato</b>	18 – 53,8	10,4	24,8
<b>PCB 28</b>	8,3 – 53,8	6,6	13,9
<b>PCB 52</b>	15,0 – 53,8	14,1	35,8
<b>PCB 101</b>	5,3 – 53,8	8,9	20,9
<b>PCB 118</b>	2,3 – 53,8	6,9	14,9
<b>PCB 153</b>	5,3 – 53,8	6,7	14,1
<b>PCB 180</b>	2,3 – 53,8	7,0	15,0

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e replicatas de injeção depois da aplicação do teste de Huber; y é a relação entre a área cromatográfica do analito e a área do padrão interno (PCB 209) e x é concentração em ng g<sup>-1</sup>.

A Tabela 18 mostra estudos que reportam POPs em ovos de animais silvestres e de galinha. O efeito matriz não foi avaliado nos trabalhos citados. Neste trabalho o LOD e LOQ é baixo e adequado para estudos ambientais. Comparados com os estudos citados, o LOD e LOQ deste trabalho são ligeiramente maiores. Porém, os trabalhos encontrados que analisaram POPs em ovos de animais silvestres, em geral, possuem um foco maior nas questões ambientais e os limites (quando citados) são calculados pela razão sinal-ruído. Apesar de aceito, o limite calculado pela razão sinal-ruído possui uma dependência maior da interpretação do analista e não é robusto como os limites calculados a partir dos parâmetros da curva analítica, como foi o caso deste trabalho. Outra diferença deste trabalho com os citados é que a avaliação do método nos trabalhos citados foi realizada em ovos de galinha para então serem aplicadas em ovos de animais silvestres, enquanto que neste trabalho optou-se por fazer toda a avaliação com uma mistura de ovos de jacaré-do-Pantanal, considerando as possibilidades de ocorrer efeito matriz.

**Tabela 18** – Recuperação, desvio padrão relativo, LOD e LOQ reportados em diferentes estudos que usaram ovos de animais silvestres ou de galinha

Referência	Nível de fortificação (ng g <sup>-1</sup> )	Espécie/analitos	R (%)	RSD (%)	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )
<b>Este estudo</b>	2,3 – 53,8	<i>Caiman yacare</i> / OCPs e PCBs	60 – 112	≤ 25	5,3 – 14,1	10,0 – 35,8
<b>69*</b>	NR	<i>Chelonia mydas</i> / POPs	30 – 96	< 20	< 0,010 <sup>a</sup>	NR
<b>72*</b>	10 – 250	<i>Larus michahellis</i> / PFCs	84 – 127	7 -14	0,09 – 0,30 <sup>a</sup>	NR
<b>73*</b>	NR	<i>Sturnus vulgaris</i> / OCPs, PCBs e PBDE	75 – 95	< 10	NR	0,2 – 1 <sup>a</sup>
<b>78*</b>	NR	<i>Caiman latirostris</i> / OCCs e OCPs	> 80	< 20	2,0 – 10,0 <sup>a</sup>	15,0 – 60,0 <sup>a</sup>
<b>79*</b>	NR	<i>Caiman latirostris</i> / OCPs and PCBS	NR	NR	2 – 10 <sup>a</sup>	15 – 60 <sup>a</sup>
<b>80*</b>	NR	<i>Crocodylus niloticus</i> / OCPs, PCBs, PFCs	71 – 115	NR	NR	0,010 – 0,064 <sup>b</sup>
<b>81*</b>	NR	<i>Crocodylus moreletii</i> / OCPs	NR	NR	0,42 <sup>a</sup>	NR
<b>82*</b>	NR	<i>Alligator mississippiensis</i> / PCBs	88	NR	NR	NR
<b>155</b>	10 – 200	Ovos de galinha / OCPs e PCBs	82 - 110	<8	<0,7 <sup>a</sup>	<2,3 <sup>a</sup>
<b>162</b>	NR	<i>Crocodylus moreletti</i> / OCPs	NR	NR	NR	NR
<b>163</b>	NR	<i>Pituophis melanoleucus</i> / OCPs	NR	NR	NR	NR
<b>164</b>	100	Ovos de galinha / OCPs	76 – 100	NR	4 – 5	NR
<b>165</b>	6 – 60	Ovos de galinha / OCPS	52 – 100	3,5 – 21,1	6 – 72	NR
<b>166</b>	50	Ovos de galinha / OCPs - PCBs	70 - 106	< 20	≤2,25 <sup>a</sup>	0,02 – 7,78 <sup>a</sup>

\* método de extração e detectores descritos na Tabela 2; R: Recuperação; RSD: desvio padrão relativo; NR: não reportado; <sup>a</sup>limite instrumental e/ou do método baseado na razão sinal-ruído do branco; <sup>b</sup>os autores não citam se é limite instrumental ou do método.

A exatidão, repetitividade (Tabela 19) e precisão intermediária (Tabela 20) mostraram valores de recuperação média entre 60 e 120 % com desvio padrão relativo entre 02 e 25 %, aceitáveis para amostras complexas<sup>6; 161</sup>.

**Tabela 19** – Recuperação relativa média e desvio padrão relativo para todos os analitos em mix ovos de *C. yacare* extraídos em três níveis de fortificação no mesmo dia (n = 10)<sup>a</sup>

Analitos	15,0 ng g <sup>-1</sup>		45,0 ng g <sup>-1</sup>		53,3 ng g <sup>-1</sup>	
	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
o,p'-DDD	70	10	78	05	71	13
o,p'-DDE	76	14	81	04	60	17
o,p'-DDT	89	20	81	15	75	19
p,p'-DDD	112	13	112	10	101	13
p,p'-DDE	97	09	85	12	73	19
β-endosulfan*	79	20	63	17	79	14
Endosulfan sulfato*	93	20	105	16	106	20
PCB 28	90	02	73	16	76	10
PCB 52**	103	18	101	22	105	25
PCB 101*	93	20	111	19	91	13
PCB 118	65	15	74	07	75	11
PCB 153	97	19	71	19	79	13
PCB 180	80	15	81	12	93	14

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e de injeção; R: recuperação; RSD: desvio padrão relativo; \* 1º nível de fortificação de 25 ng g<sup>-1</sup>; \*\* 1º nível de fortificação de 40 ng g<sup>-1</sup>

**Tabela 20** – Recuperação média e desvio padrão relativo para todos os analitos em mix de ovos de *C. yacare* fortificados com 45,0 ng g<sup>-1</sup> e extraídos em três dias diferentes (n = 10)<sup>a</sup>.

Analitos	1º dia		7º dia		14º dia	
	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
o,p'-DDD	78	05	85	20	80	08
o,p'-DDE	81	04	92	20	86	07
o,p'-DDT	81	15	70	20	66	18
p,p'-DDD	112	10	120	14	97	21
p,p'-DDE	85	12	69	20	96	09
β-endosulfan	70	19	82	13	81	18
Endosulfan sulfato	105	16	113	17	111	18
PCB 28	73	16	63	16	69	20
PCB 52	101	22	94	25	114	17
PCB 101	111	19	94	18	115	20
PCB 118	74	07	65	16	76	10
PCB 153	71	19	81	21	90	11
PCB 180	81	12	81	20	75	18

<sup>a</sup> n é a somatória das replicatas de amostras e de injeção; R: recuperação; RSD: desvio padrão relativo.

## 5.7 Aplicação do método

Todos os ovos de *C. yacare* foram separados por ano de coleta (2012 e 2013) e por sub-regiões (Poconé e Barão de Melgaço). Em cada grupo, os ovos (sem as cascas) foram homogeneizados em triturador de alimentos em inox, as misturas foram liofilizadas e congeladas até o momento de análise. A extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura foi aplicada utilizando as amostras liofilizadas. A quantificação através da equação da *curva extraída* foi realizada em triplicata de amostras testemunhas com triplicata de injeções. Os resultados são mostrados na Tabela 21. O metabólito do DDT, p,p'-DDE foi o composto detectado e quantificado em todas as amostras (51,3 - 78,1 ng g<sup>-1</sup>).

**Tabela 21** – Concentrações (ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado) encontradas nos ovos de jacaré-do-Pantanal analisadas (n = 9)<sup>a</sup>

Analito	Poconé		Barão de Melgaço	
	2012 (RSD)	2013 (RSD)	2012 (RSD)	2013 (RSD)
<b>o,p'-DDD</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>o,p'-DDE</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>o,p'-DDT</b>	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ
<b>p,p'-DDD</b>	< LOD	< LOQ	26,5 (20%)	23,6 (9%)
<b>p,p'-DDE</b>	78,1 (20%)	70,1 (10%)	51,3 (22%)	68,6 (11%)
<b>β-endosulfan</b>	< LOD	< LOD	40,8 (20%)	< LOQ
<b>Endosulfan sulfato</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>PCB 28</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>PCB 52</b>	< LOQ	44,9 (20%)	40,7 (20%)	36,0 (17%)
<b>PCB 101</b>	< LOD	24,6 (10%)	22,8 (10%)	33,6 (7%)
<b>PCB 118</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>PCB 153</b>	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ
<b>PCB 180</b>	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ

<sup>a</sup> soma do número de replicatas de amostras e replicatas de injeção

Como demonstrado anteriormente, o DDE é produto de degradação do DDT e possui maior persistência no ambiente, pois reações de degradação do DDE são mais difíceis. Portanto, sua presença pode indicar uma contaminação antiga por DDT na região do Pantanal. O metabólito p,p'-DDD foi quantificado em Barão de Melgaço (23,6 - 26,5 ng g<sup>-1</sup>). Outros OCPs também foram detectados porém em concentrações abaixo do limite de quantificação.

Os congêneres PCB 52 e PCB 101 foram quantificados nas duas regiões estudadas (22,8 – 44,9 ng g<sup>-1</sup>) e outros PCB foram detectados abaixo

do limite de quantificação. Apesar de não terem sido produzidos no Brasil, a presença de PCBs é proveniente do uso de equipamento elétricos (capacitores, transformadores) que possuíam estes compostos como isolantes elétricos (Ascarel<sup>MR</sup>) ou pela distribuição ambiental dos POPs que ocorre por processos naturais.

Apesar da soma total das concentrações de OCPs e PCBs por região, serem diferentes, em Barão de Melgaço (303,1 ng g<sup>-1</sup>) é maior que em Poconé (217,7 ng g<sup>-1</sup>), estes valores não são significativamente diferentes. Os locais de coleta em Barão de Melgaço foram próximos ao Rio Cuiabá. Este rio recebe efluentes e esgoto não tratado e pode receber uma carga maior de POPs, de fato a presença de pesticidas organoclorados têm sido relatada neste rio e seus afluentes<sup>56;57; 167; 168</sup>.

De acordo com Matter<sup>133</sup>, ovos de *A. mississippiensis* expostos a p,p'-DDE em concentração de 100 ng g<sup>-1</sup> de ovo causa a diminuição da taxa de eclosão e alterações morfológicas nas gônadas de filhotes machos. Neste trabalho p,p'-DDE foi detectado no intervalo entre 51,3 e 78,1 ng g<sup>-1</sup> de ovo liofilizado.

OCPs e PCBs foram detectados em ovos de *Caiman latirostris* (Argentina)<sup>78</sup> nos intervalos entre 7,1 - 30,1 ng g<sup>-1</sup> de lipídio (PCBs) e 54,5 - 98,1 (OCPs). Em ovos de *Crocodylus moreletii* (Belize)<sup>81</sup> p,p'-DDE, p,p'-DDT e p,p'-DDD foram detectados no intervalo entre 12 - 291,1 ng g<sup>-1</sup> de ovo. E, em *Alligator mississippiensis* (Estados Unidos)<sup>82</sup> PCBs foram detectados no intervalo entre 55,5 - 4667,0 ng g<sup>-1</sup> de lipídio. Neste trabalho, os OCPs e PCBs foram detectados em níveis similares aos encontrados em *C. latirostris* e em *C. moreletii*, contudo menores que os encontrados em *A. mississippiensis*.

## 6 CONCLUSÕES

A ocorrência de OCPs e PCBs foi observada em ovos de *Caiman yacare* na região do Pantanal mato-grossense, em amostras coletadas em 2012 e 2013. Este é o primeiro registro de ocorrência de POPs em animais no Pantanal, não sendo possível a comparação dos níveis encontrados com outros estudos neste bioma.

O desenvolvimento deste trabalho foi pautado em um protocolo estatístico e analítico, raramente utilizado, visando garantir a sua confiabilidade analítica. Testes de exclusão de valores anômalos, de homocedasticidade e de análise de variâncias foram utilizados em todas as etapas analíticas. Os limites de detecção e de quantificação do método foram obtidos por parâmetros estatísticos a partir da *curva extraída*, possibilitando maior robustez e correções das perdas inerentes ao processo de extração.

O método de extração-sólido líquido com partição em baixa temperatura é um método de baixo custo e com uso recorrente em matrizes de origem vegetal. Para detecção de POPs em ovos de animais silvestres foi sua primeira aplicação. Esta aplicação foi possível com o auxílio da quimiometria que reduziu o número de experimentos durante a etapa de otimização do método e permitiu a determinação das melhores condições de extração.

Considerando que o método validado esteve dentro dos critérios aceitos pelo INMETRO e que crocodilianos historicamente têm sido utilizados como bioindicadores de contaminação por POPs, o uso dos ovos desta espécie como bioindicador é promissor. Porém, outros estudos são necessários, tais como estudo de bioacumulação em tecidos e/ou órgãos, estudo de transferência materna, determinação de POPs no material do ninho e monitoramento de água das regiões de coleta.

A detecção destes compostos em ovos de jacaré-do-Pantanal em habitat de pouca atividade agrícola e industrial indica a ampla distribuição destes poluentes e a possibilidade do uso de ovos desta espécie como bioindicador de background de POPs.



## REFERÊNCIAS

- 1 SPEAKE, B. K.; THOMPSON, M. B. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 127, n. 4, p. 453-467, 2000.
- 2 MORGAN, E.; BURTON, K. W.; CHURCH, P. A. Practical exploratory experimental designs. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 5, n. 4, p. 283-302, 1989.
- 3 IZGI, .; DEMIR, C.; GÜÇER, Ş. Application of factorial design for mercury determination by trapping and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 7, p. 971-977, 2000.
- 4 BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 13, n. 1, p. 1-45, 1951.
- 5 PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Why multivariate optimization? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- 6 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- 7 RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.
- 8 ASSINE, M. L.; SOARES, P. C. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**, v. 114, n. 1, p. 23-34, 2004.
- 9 ABDON, M. M. et al. Deforested area in the Pantanal biome until the year of 2002: relations with phytofisiognomy and counties limits. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 59, n. 1, p. 17-24, 2007.
- 10 SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 1703-1711, 1998.
- 11 SANTOS, S. A. **Caracterização dos recursos forrageiros nativos da sub-região de Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2001. 197 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univerisidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- 12 SEIDL, A. F.; SILVA, J. D. S. V. D.; MORAES, A. S. Cattle ranching and deforestation in the Brazilian Pantanal. **Ecological Economics**, v. 36, n. 3, p. 413-425, 2001.

- 13 PADOVANI, C. R.; CRUZ, M. L. L.; PADOVANI, S. L. A. Desmatamento do Pantanal brasileiro para o ano de 2000. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÍCIOS -ECONOMICOS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 8 p.
- 14 SIGNOR, C. A.; FERNANDES, I. M.; PENHA, J. O Pantanal e o sistema de pesquisa. In: FERNANDES, I. M.; SIGNOR, C. A. (Ed.). **Biodiversidade no Pantanal de Poconé**. Cuiabá: Centro de Pesquisa do Pantanal, 2010. cap. 1, p.196-202.
- 15 SILVA, M. P. D. et al. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Brazilian Journal of Botany**, v. 23, p. 143-152, 2000.
- 16 WANTZEN, K. M. et al. Towards a sustainable management concept for ecosystem services of the Pantanal wetland. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 8, n. 2-4, p. 115-138, 2008.
- 17 NUNES, A. P.; TIZIANEL, F. A. T.; TOMAS, W. M. **Aves ameaçadas ocorrentes no Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 46 p.
- 18 MOURÃO, G. et al. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. **Biological Conservation**, v. 92, n. 2, p. 175-183, 2000.
- 19 HARRIS, M. B. et al. Desafios para proteger o Pantanal brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 156-164, 2005.
- 20 OLIVEIRA, M. M. [Vegetação pantaneira]. 1 fotografia, color. 2013. Disponível em: <[http://www.oeco.org.br/noticias/27709-pantanal-um-ilustre-desconhecido-do-brasileiro?utm\\_source=newsletter\\_76&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=leia-em-o-eco](http://www.oeco.org.br/noticias/27709-pantanal-um-ilustre-desconhecido-do-brasileiro?utm_source=newsletter_76&utm_medium=email&utm_campaign=leia-em-o-eco)>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- 21 VERDADE, L. M. Biologia reprodutiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: LARRIERA, A.; VERDADE, L. M. (Ed.). **Conservación y manejo de los Crocodylia de America Latina**. Santa Fé: Fundación Banco Bica, 1995. v.1, p. 57-79.
- 22 SALVI-SAKAMOTO, L. L. **A chuva na Bacia do Alto Paraguai: contribuição ao estudo de aspectos das flutuações interanuais durante o século XX**. 2001. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Univerdidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- 23 FANTIN-CRUZ, I. et al. Dinâmica de inundação. In: FERNANDES, I. M.; SIGNOR, C. A. et al (Ed.). **Biodiversidade no Pantanal de Poconé**. Cuiabá: Centro de Pesquisa do Pantanal, 2010. cap. 02, p. 25-36.

24 LAABS, V. et al. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal Environmental Quality**, v. 31, n. 5, p. 1636-1648, 2002

25 LAABS, V. et al. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: an aquatic microcosm study under semi-field conditions. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 975-989, 2007.

26 VIEIRA, L. M.; GALDINO, S.; PADOVANI, C. R. Contaminação potencial do Pantanal por pesticidas na Bacia do Alto Taquari (MS). In: GALDINO, S. et al (Ed.). **Impactos ambientais e socioeconômicos na Bacia do Rio Taquari - Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. cap. 03, p. 71-86.

27 STOCKHOLM CONVENTION. **The 12 initial POPs the Stockholm Convention**. Vernier, 2008. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

28 STOCKHOLM CONVENTION. **What are the POPs?** Vernier, 2008. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

29 LOHMANN, R. et al. Global fate of POPs: current and future research directions. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 150-165, 2007.

30 BRASIL. Decreto nº 5472, de 20 de junho de 2005. Promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes, adotada, naquela cidade, em 22 de maio de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5472.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5472.htm)>. Acesso em: 24 jul. 2014.

31 GLOBAL MONITORING PLAN FOR PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS. **First regional monitoring report latin america and the caribbean region**. 2009. 81 p. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/GMP/UNEP-POPS-GMP-RMR-GRULAC.English.PDF>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

32 JONES, K. C.; DE VOOGT, P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environmental Pollution**, v. 100, n. 1/3, p. 209-221, 1999.

33 UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. 2003, Geneva. **Proceedings....** Geneva: IOMC, 2003. 257 p. Disponível em: <[http://www.chem.unep.ch/gmn/Files/popsmonprg\\_proc.pdf](http://www.chem.unep.ch/gmn/Files/popsmonprg_proc.pdf)>. Acesso em: 24 jul. 2014.

- 34 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 28, de 09 de agosto de 2010. Regulamento técnico para o ingrediente ativo endossulfam em decorrência da reavaliação toxicológica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 ago. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4af12d80474591dd9a38de3fbc4c6735/Decisão.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 24 jul 2014.
- 35 RAY, D. Organochlorine and pyrethroid insecticides. In: McQUEEN, C. A. (Ed.). **Comprehensive toxicology**. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2010. v. 13, cap. 26, p. 445-457.
- 36 D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 995-1002, 2002.
- 37 DALLA VILLA, R. et al. Dissipation of DDT in a heavily contaminated soil in Mato Grosso, Brazil. **Chemosphere**, v. 64, n. 4, p. 549-554, 2006
- 38 WEBER, J. et al. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 15, p. 2966-2984, 2010.
- 39 LI, Y. F.; MacDONALD, R. W. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. **Science of the Total Environment**, v. 342, n. 1-3, p. 87-106, 2005.
- 40 BOER, J. D. Polychlorinated biphenyls. In: KLEIBOHMER, W. (Ed.). **Environmental analysis**. New York: Elsevier, 2001. cap. 7, p. 237-262. (Handbook of analytical separations, v. 3)
- 41 JOHNSON, G. W. et al. Polychlorinated biphenyls. In: MORRISON, R. D.; MURPHY, B. L. (Ed.). **Environmental forensics**. Burlington: Academic Press, 2005. p. 187-225.
- 42 UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Polychlorinated biphenyls (PCBs): aroclor and other PCB mixtures**. 2013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/aroclor.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2014.
- 43 PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, v. 24, p. 390-398, 2001.
- 44 UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **PCBs cancer dose-response assessment and application to environmental mixtures**. Washington, DC. 1996. 83 p. (EPA/600/P-96/001) Disponível em: <<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/pcb.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

- 45 LJUNGGREN, S. A. et al. Persistent organic pollutants distribution in lipoprotein fractions in relation to cardiovascular disease and cancer. **Environment International**, v. 65, p. 93-99, 2014.
- 46 COCCO, P. On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 379-402, 2002.
- 47 FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, p. 6-16, 2010.
- 48 KELCE, W. R. et al. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. **Nature**, v. 375, n. 6532, p. 581-585, 1995.
- 49 KESTER, M. H. et al. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1897-1900, 2000.
- 50 BAILEY, R. A. et al. Haloorganics and pesticides. In: BAILEY, R. A. (Ed.). **Chemistry of the environment**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002. cap. 7, p. 223-293.
- 51 BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação de fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- 52 CASARA, K. P. et al. Environmental dynamics of pesticides in the drainage area of the São Lourenço River headwaters, Mato Grosso State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1719-1731, 2012.
- 53 RIBEIRO, A. C. A. et al. Pesticide residues in surface waters at the headwaters of São Lourenço River-MT, Brazil: validation of a method using solid-phase extraction and liquid chromatography. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 284-290, 2013.
- 54 MIRANDA, K. et al. Pesticide residues in river sediments from the Pantanal Wetland, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 43, n. 8, p. 717-722, 2008.
- 55 POSSAVATZ, J. et al. Pesticide residue in bottom sediment in the Cuiabá river watershed, Mato Grosso, Brazil. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 1, p. 83-96, 2014.
- 56 MARASCHIM, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

57 CUNHA, M. L. F. **Determinação de resíduos de pesticidas em sedimentos dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense por CG/EM**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

58 MARKERT, B. A. et al. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: MARKER, T. B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Ed.). **Bioindicators & biomonitoring: principles, concepts and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2003. cap. 1, p. 03-39. (Trace metals and other contaminants in the environment, v. 6)

59 VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

60 FRÄNZLE, O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: MARKER, T. B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Ed.). **Bioindicators & biomonitoring: principles, concepts and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2003. cap. 2, p. 41-84. (Trace metals and other contaminants in the environment, v. 6)

61 VAN DEN STEEN, E. et al. Maternal transfer of organochlorines and brominated flame retardants in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 69-75, 2009.

62 BARGAR, T. A.; SCOTT, G. I.; COBB, G. P. Maternal transfer of contaminants: case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn chickens (*Gallus domesticus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 61-67, 2001.

63 STEWART, K. R. et al. Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermodochelys coriacea*) confirms maternal transfer. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 7, p. 1396-1409, 2011.

64 VAN DE MERWE, J. P. et al. Persistent organic pollutants in the green sea turtle *Chelonia mydas*: nesting population variation, maternal transfer, and effects on development. **Marine Ecology Progress Series**, v. 403, p. 269-278, 2010.

65 RAUSCHENBERGER, R. H. et al. Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in eggs through maternal exposure in *Alligator mississippiensis*. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2/5, p. 851-856, 2004.

66 CRAIN, D. A.; GUILLETTE L. J. Jr. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1/4, p. 77-86, 1998.

67 COBB, G. P.; WOOD, P. D. PCB concentrations in eggs and chorioallantoic membranes of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Cape Romain National Wildlife Refuge. **Chemosphere**, v. 34, n. 3, p. 539-549, 1997.

68 ALAVA, J. J. et al. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. **Science of the Total Environment**, v. 367, n. 1, p. 170-181, 2006.

69 MERWE, J. et al. Analysing persistent organic pollutants in eggs, blood and tissue of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 6/7, p. 1719-1731, 2009.

70 BRAUNE, B. M. et al. Levels and trends of organochlorines and brominated flame retardants in Ivory Gull eggs from the Canadian Arctic, 1976 to 2004. **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 403-417, 2007.

71 LEAT, E. H. K. et al. Effects of environmental exposure and diet on levels of persistent organic pollutants (POPs) in eggs of a top predator in the North Atlantic in 1980 and 2008. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 5, p. 1222-1228, 2011.

72 VICENTE, J. et al. Distribution of perfluorinated compounds in Yellow-legged gull eggs (*Larus michahellis*) from the Iberian Peninsula. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 468-475, 2012.

73 EENS, M. et al. Can starling eggs be useful as a biomonitoring tool to study organohalogenated contaminants on a worldwide scale? **Environment International**, v. 51, p. 141-149, 2013.

74 MEDVEDEV, N.; MARKOVA, L. Residues of chlorinated pesticides in the eggs of Karelian birds, 1989-90. **Environmental Pollution**, v. 87, n. 1, p. 65-70, 1995.

75 MORALES, L. et al. Persistent organic pollutants in gull eggs of two species (*Larus michahellis* and *Larus audouinii*) from the Ebro delta Natural Park. **Chemosphere**, v. 88, n. 11, p. 1306-1316, 2012.

76 CHEN, D. et al. Flame retardants in eggs of four gull species (Laridae) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 1-9, 2012.

77 BARÓN, E. et al. Bioaccumulation and biomagnification of emerging and classical flame retardants in bird eggs of 14 species from Doñana Natural Space and surrounding areas (South-western Spain). **Environment International**, v. 68, p. 118-126, 2014.

78 STOKER, C. et al. Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. **Chemosphere**, v. 84, n. 3, p. 311-317, 2011.

79 STOKER, C. et al. The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 191-195, 2013.

80 BOUWMAN, H. et al. Chlorinated, brominated, and fluorinated organic pollutants in Nile crocodile eggs from the Kruger National Park, South Africa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 393-402, 2014.

81 WU, T. H. et al. Organochlorine contaminants in complete clutches of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 1, p. 151-157, 2006.

82 COBB, G. P.; HOULIS, P. D.; BARGAR, T. A. Polychlorinated biphenyl occurrence in American alligators (*Alligator mississippiensis*) from Louisiana and South Carolina. **Environmental Pollution**, v. 118, n. 1, p. 1-4, 2002.

83 VAN DER HOFF, G. R. et al. Determination of organochlorine compounds in fatty matrices application of rapid off-line normal-phase liquid chromatographic clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1/2, p. 487-496, 1996.

84 MUIR, D.; SVERKO, E. Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 769-789, 2006.

85 PINHO, G. P. D. et al. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010.

86 DARDENGO, R. P. et al. Pesticide residues analysis in potatoes by gas chromatography. **Brazilian Journal Analytical Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 136-142, 2011.

87 GFRERER, M.; LANKMAYR, E. DDT degradation during enhanced solid-liquid extractions: a consideration. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 1, p. 117-125, 2005.

88 VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with the low temperature partition technique (LLE-LTP) for pyrethroids in water and GC analysis. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007

89 LI, L. et al. Determination of organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD. **Chromatographia**, v. 66, n. 7/8, p. 625-629, 2007.



- 90 GOULART, S. M. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.
- 91 CHEN, S. et al. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1297-1300, 2009.
- 92 GOULART, S. M. et al. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1/2, p. 41-47, 2010.
- 93 MARTHE, D. D. B. et al. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.
- 94 PINHO, G. P. de et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307-1311, 2010.
- 95 MAGALHÃES, E. J. et al. Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 118-124, 2012.
- 96 RÜBENSAM, G. et al. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 55-60, 2013.
- 97 RIEDER, A. et al. Relações biométricas de jacarés (*Caiman crocodilus yacare*) criados em sistemas de cativeiro, Cáceres, Alto Pantanal, Mato Grosso, Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS AQUÁTICOS - ECONÔMICOS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 7 p. Disponível em: <[http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/aspectos/pdf/bioticos/640RB\\_Rieder\\_1\\_OKVisto.pdf](http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/aspectos/pdf/bioticos/640RB_Rieder_1_OKVisto.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2014.
- 98 SANTOS, S. A. **Dieta e nutrição de crocodilianos**. Corumbá: Embrapa - CPAP, 1997. 59 p.
- 99 ARAUJO, M. S. et al. *Caiman crocodilus yacare* plasma kininogen detection. **Immunopharmacology**, v. 32, n. 1/3, p. 82-84, 1996.
- 100 ARAUJO, M. S. et al. Preliminary characterization of a Kazal-type serine protease inhibitor from *Caiman crocodilus yacare* plasma. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1/3, p. 179-183, 1999.

- 101 MOURÃO, G. et al. Size structure of illegally harvested and surviving caiman *Caiman crocodilus yacare* in Pantanal, Brazil. **Biological Conservation**, v. 75, n. 3, p. 261-265, 1996.
- 102 CASTRO, M. L. de; SILVA, J. A. L. Mathematical modelling of the Ibera *Caiman yacare*. **Ecological Modelling**, v. 186, n. 1, p. 99-109, 2005.
- 103 VICENTE NETO, J. et al. Fatty acid profiles in meat from Caiman yacare (*Caiman crocodilus yacare*) raised in the wild or in captivity. **Meat Science**, v. 85, n. 4, p. 752-758, 2010.
- 104 LOPES FILHO, J. F. et al. Sorption isotherms of alligator's meat (*Caiman crocodilus yacare*). **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 2, p. 201-206, 2002.
- 105 FURTADO FILHO, O. V. et al. Selected oxidative stress markers in a South American crocodylian species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1/2, p. 241-254, 2007.
- 106 VIEIRA, L. M. et al. Mercury and methyl mercury ratios in caimans (*Caiman crocodilus yacare*) from the Pantanal area, Brazil. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 2, p. 280-287, 2011.
- 107 CAMPOS, Z. et al. Growth of *Caiman crocodilus yacare* in the brazilian pantanal. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- 108 CATTO, J. B.; AMATO, J. F. R. Digenetic trematodes (Cryptogonimidae, Acanthostominae) parasites of the Caiman, *Caiman crocodilus yacare* (Reptilia, Crocodylia) from the Pantanal Mato-grossense, Brazil, with the description of a new species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 435-440, 1993.
- 109 CATTO, J. B.; AMATO, J. F. R. Two new species of Pseudotelorchis (Digenea, Telorchidae), parasites of the Caiman, *Caiman crocodilus yacare* (Reptilia, Crocodylia) from the Pantanal Mato-Grossense, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 561-566, 1993.
- 110 ROMANELLI, P. F.; CASERI, R.; LOPES FILHO, J. F. Processamento da carne do jacaré do pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). **Food Science and Technology**, v. 22, p. 70-75, 2002.
- 111 TELIS, V. R. N. et al. Salting kinetics and salt diffusivities in farmed Pantanal caiman muscle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 529-535, 2003.
- 112 MORAIS, C. S. N. et al. Mortadella sausage manufactured with *Caiman yacare* (*Caiman crocodilus yacare*) meat, pork backfat, and soybean oil. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 403-411, 2013.

113 HOFFMANN, F. L.; ROMANELLI, P. F. Análise microbiológica da carne de jacaré-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). **Food Science and Technology**, v. 18, p. 258-264, 1998.

114 MOURA, W. L. de; OLIVEIRA, L. W.; EGAMI, M. I. Aspectos ultraestructurales de trombocitos, eosinofilos y heterofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 15, p. 201-208, 1997.

115 WALDEMAR OLIVEIRA, L. et al. Características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 16, p. 245-254, 1998.

116 MOURA, W. L. D. et al. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, 1999. DOI 10.1590/S1413-95961999000100009

117 LARRIERA, A. et al. Allometry of reproduction in wild broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). **Journal of Herpetology**, v. 38, n. 2, p. 301-304, 2004.

118 VERDADE, L. M. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 431-435, 2001.

119 LARSEN, R. E. et al. Broad-nosed (*Caiman latirostris*) semen collection, evaluation, and maintenance in diluents. In: CROCODILES. Gland: IUCN, 1992. v. 1, p. 270-276.

120 BASSETTI, L. A. B. et al. Comportamento de termorregulação em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) adultos em cativeiro. In: REUNIÓN REGIONAL DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE DEL GRUPO DE ESPECIALISTAS EN CROCODILOS, 2005, Santa Fe. **Proceedings...** Santa Fe, 2005. p. 330-340. Disponível em: <<http://www.exoticpetcenter.com.br/fileupload/vanessa/jacare.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

121 MOURÃO, G.; CAMPOS, Z. M. S. Biologia reprodutiva de jacaré-do-papo-amarelo no rio Paraná, Brasil. **Comunicado Técnico**, n. 33, 2004. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT33.pdf>>. Acesso em: 24 de jun. 2014.

122 COUTINHO, M. et al. Ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de jacaré-do-pantanal, *Caiman crocodilus yacare*. **Comunicado Técnico**, n. 51, 2005. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT51.pdf>>. Acesso em: 24 de jun. 2014.

123 FERGUSON, M. W. J. Reproductive biology and embryology of the crocodylians. In: GANS, C.; BILLET, F. (Ed.). **Biology of the Reptilia**. New York: Wiley, 1985. v.14, cap. 5, p. 331-491.

- 124 CAMPOS, Z. M. D. S. Efeito do habitat na fecundidade das fêmeas, sobrevivência e razão sexual dos ovos de acarés-do-pantanal. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 52, 52 p., 2003. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/BP42.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2014.
- 125 IUNGMAN, J.; PIÑA, C. I.; SIROSKI, P. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). **Genesis**, v. 46, n. 8, p. 401-417, 2008.
- 126 LANG, J. W.; ANDREWS, H.; WHITAKER, R. Sex determination and sex ratios in *Crocodylus palustris*. **American Zoologist**, v. 29, n. 3, p. 935-952, 1989.
- 127 BOGGS, A. S. P. et al. Endocrine disruption of reproduction in reptiles. In: DAVID, O. N.; KRISTIN, H. L. (Ed.). **Hormones and reproduction of vertebrates**. London: Academic Press, 2011. cap. 14, p. 373-396.
- 128 CREWS, D.; BERGERON, J. M.; MCLACHLAN, J. A. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. **Environmental Health Perspective**, v. 103, p. 73-77, 1995. Suplemento 7.
- 129 GUILLETTE, L. J. et al. Alligators and endocrine disrupting contaminants: a current perspective. **American Zoologist**, v. 40, n. 3, p. 438-452, 2000.
- 130 CRAIN, D. A. et al. Cellular bioavailability of natural hormones and environmental contaminants as a function of serum and cytosolic binding factors. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n. 1/2, p. 261-273, 1998.
- 131 MILNES, M. R. et al. Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in *Alligator mississippiensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 257-263, 2005.
- 132 CRAIN, D. A. et al. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. **Environmental Health Perspective**, v. 105, n. 5, p. 528-533, 1997.
- 133 MATTER, J. M. et al. Development and implementation of endocrine biomarkers of exposure and effects in American alligators (*Alligator mississippiensis*). **Chemosphere**, v. 37, n. 9/12, p. 1905-1914, 1998.
- 134 VONIER, P. M. et al. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. **Environmental Health Perspective**, v. 104, n. 12, p. 1318-1322, 1996.
- 135 ARNOLD, S. F. et al. In vitro synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals. **Environmental Health Perspective**, v. 105, p. 615-618, 1997. Suplemento 3.

- 136 GUILLETTE, L. J. et al. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspective**, v. 102, n. 8, p. 680-688, 1994.
- 137 GUILLETTE, L. J. et al. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 32-42, 1996.
- 138 GUILLETTE, L. J. et al. Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. **Environmental Health Perspective**, v. 103, p. 31-36, 1995. Suplemento 4.
- 139 WOODWARD, A. R. et al. Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. **Florida Scientist**, v. 56, n. 1, p. 52-63, 1993.
- 140 RAUSCHENBERGER, R. H. et al. Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in American alligators. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 15, p. 5559-5563, 2007.
- 141 WOODWARD, A. et al. Abnormal alligators and organochlorine pesticides in Lake Apopka, Florida. In: ELLIOTT, J. E. et al. (Ed.). **Wildlife ecotoxicology**. New York: Springer, 2011. v. 3, cap. 5, p. 153-187.
- 142 CONROW, R. et al. Restoration of Lake Apopka's orth Shore Marsh: high hopes, tough times, and persistent progress. In: ELLIOTT, J. E. et al. (Ed.). **Wildlife ecotoxicology**. New York: Springer, 2011. v. 3, cap. 6, p. 189-211.
- 143 LAWRENCE, J. (Ed.). AOAC official method 960.39: In: HORWITZ, W. **Official methods of analysis AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC Internacional, 2006. cap. 39, p. 2, ref. 39.1.05.
- 144 VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F.; AUGUSTO, F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**, 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>> Acesso em 24 jun. 2014.
- 145 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6th ed. London: Pearson Education, 2010. 278 p.
- 146 FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1/2, p. 2-14, 2007.
- 147 PISHGAR-KOMLEH, S. H. et al. Application of response surface methodology for optimization of picker-husker harvesting losses in corn seed. **Iranica Journal of Energy & Environment**, v. 3, n. 2, p. 134-142, 2012.

- 148 SILVA, C. P. da; EMÍDIO, E. S.; MARCHI, M. R. R. UV filters in water samples: experimental design on the SPE optimization followed by GC-MS/MS analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1433-1441, 2013.
- 149 PORTUGAL, L. A. et al. Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 87, n. 1, p. 77-80, 2007.
- 150 PEREIRA FILHO, E. R.; PEREIRA, F. M. V.; LEMOS, S. G. Introducing factorial design concepts using experiments with multi-colored chocolates. **The Chemical Educator**, v. 14, n. 5, p. 200-203, 2009.
- 151 CUNICO, M. W. M. et al. Factorial desing: a valuable statistic tool to define experimental parameters applied in scientific research. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.
- 152 SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. Response surface methodology. In: STEPHEN, D. B. et al. (Ed.). **Comprehensive chemometrics**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 345-390.
- 153 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2003. 36 p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: <[http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao\\_inmetro.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf)>. Acesso em 24 jun. 2014.
- 154 BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O método das adições padrão aplicado à análise cromatográfica quantitativa de fenóis em águas residuais. **Química Nova**, v. 11, n. 2, p. 288-291, 1988.
- 155 VALSAMAKI, V. I. et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. **Analytica Chimica Acta**, v. 573/574, p. 195-201, 2006.
- 156 ROWE, J. W. et al. Lipid provisioning of turtle eggs and hatchlings: total lipid, phospholipid, triacylglycerol and triacylglycerol fatty acids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 2, p. 323-330, 1995.
- 157 WILHOFT, D. C. Eggs and hatchling components of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 84, n. 3, p. 483-486, 1986.
- 158 BERGEN, B. J.; NELSON, W. G.; PRUELL, R. J. Comparison of nonplanar and coplanar PCB congener partitioning in seawater and bioaccumulation in blue mussels (*Mytilus edulis*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1552-8618, 1996.

- 159 PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.
- 160 RAYNE, S.; FOREST, K. pK(a) values of the monohydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs), polybrominated biphenyls (OH-PBBs), polychlorinated diphenyl ethers (OH-PCDEs), and polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). **Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 45, n. 11, p. 1322-1346, 2010.
- 161 BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 18-29, 2003.
- 162 WU, T. H. et al. Organochlorine contaminants in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize. **Chemosphere**, v. 40, n. 6, p. 671-678, 2000.
- 163 CAÑAS, J. E.; ANDERSON, T. A. Organochlorine contaminants in eggs: the influence of contaminated nest material. **Chemosphere**, v. 47, n. 6, p. 585-589, 2002.
- 164 AHMAD, R.; SALEM, N. M.; ESTAITIEH, H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. **Chemosphere**, v. 78, n. 6, p. 667-671, 2010.
- 165 WIGFIELD, Y. Y. et al. Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of twenty-two organochlorine pesticides from eggs. **Chemosphere**, v. 32, n. 5, p. 841-847, 1996.
- 166 BOLAÑOS, P. P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in the quantification-confirmation of pesticides and polychlorinated biphenyls in eggs at trace levels. **Journal of Chromatography A**, v. 1167, n. 1, p. 9-17, 2007.
- 167 MIRANDA, K.; DORES, E. F. G. C.; CALHEIROS, D. F. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio: validação do método analítico e análise de amostras de sedimento de rios formadores do Pantanal Mato-grossense. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS HÍDRICOS DO NORTE E CENTRO-OESTE, 1., 2007, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: [s.n.], 2007, 17 p.
- 168 DE SENA, A. **Organochlorine pesticides in the Pantanal: a qualitative and semi-quantitative water analysis**. 2013. 65 f. Thesis (Bachelor of Science in Biology) - College of William and Mary, Williamsburg, 2013.

## **ANEXOS**



## ANEXO A – Artigo publicado no Microchemical Journal

Microchemical Journal 114 (2014) 266–272



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/microc](http://www.elsevier.com/locate/microc)

## Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in *Caiman yacare* eggs



Demétrio A. Sousa<sup>a,b</sup>, Renato M. Gonçalves<sup>b</sup>, Fernanda F. Heleno<sup>c</sup>,  
 Maria Eliana L.R. de Queiroz<sup>c</sup>, Mary Rosa R. de Marchi<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Mato Grosso, IFMT, Cáceres, MT, Brazil

<sup>b</sup> Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 October 2013

Received in revised form 22 January 2014

Accepted 25 January 2014

Available online 4 February 2014

#### Keywords:

Factorial designs

Multivariate analysis

Solid–liquid extraction

Low-temperature part

### ABSTRACT

This paper presents the optimization of a method based on solid–liquid extraction followed by low-temperature partition (SLE-LTP) for the determination of persistent organic pollutants (organochlorinated pesticides and PCBs) in the eggs of the Pantanal caiman (*Caiman yacare*). The chemometric approach included a  $2^4$  factorial design and a triplicate central point. The extractor solvent volume (8–10 mL), vortexing time (1–5 min), centrifugation time (5–15 min) and freezing time (4–12 h) were the variables considered and were tested at three levels, including triplicate tests at the central point. The evaluated response was the average recovery for all the analytes. The data showed the extractor volume and the vortex time to be the main factors that affect recovery. The optimized method includes 12 mL of extractor solvent, 5 min of vortexing time, 5 min of centrifugation time and 12 h of freezing time. Under these conditions the average recovery was 61% with a precision expressed as relative standard deviation (RSD) of 15% for sample with  $22.5 \text{ ng g}^{-1}$  of sample. A GC-ECD was used for the determination of POPs. The experimental design was an important statistical tool for defining the experimental parameters in the use of this method for the extraction of organochlorine pesticides and PCBs.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In 2001, the United Nations for the Environment Protection (UNEP) selected a group of twelve chemical compounds (or a class of compounds) as the most important pollutants for global monitoring, the so called persistent organic pollutants (POPs) [1]. These compounds have a wide range of effects on living organisms, including cancer, allergies, hypersensitivity, and nervous and reproductive disorders. POPs are widely used in agriculture and industry. Furthermore, POPs are unintentionally released from many anthropogenic activities around the world and are characterized by their persistence in several environmental areas, bioaccumulation and potential for long-range transport. Nine additional compounds have been added to the original list of POPs, and all of the 21 compounds are halogenated compounds.

The Latin America Regional Report on POPs monitoring [2] noted that in this global region there are insufficient data on POPs in the environment. The report also noted that some of the existing data are not quality controlled, and because of this lack of quality control, the data

cannot be considered in the global scenario. The generation of data for the occurrence of POPs and their dispersion with high analytical reliability remains a critical issue for Latin America.

An organism (or part of an organism) used for the qualitative assessment of the environment can be termed a bioindicator [3]. The choice of bioindicators should depend upon the environment-specific information to be studied and the ecological characteristics of the species occurring at the site [4]. The use of eggs of wild animals as POP bioindicators, e.g., gulls [5–7], turtles [8–10] and crocodilians [11–13], has been reported. Organochlorinated pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) are persistent organic pollutants, resistant to degradation, found at higher concentrations at higher levels in the food chain, bioaccumulating, toxic to wildlife [14] and can occur via maternal transfer [15]. The use of bioindicators may facilitate the study of the occurrence of these compounds in the environment, particularly in areas of environmental conservation such as the Pantanal biome.

The Pantanal is located in the border area between Paraguay, Bolivia and Brazil. The major portion of this area, approximately 150,000 km<sup>2</sup>, belongs to Brazil, in the Brazilian states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. The Pantanal is considered the largest continuous floodplain in the world [16], encompassing approximately 70% of the total area [17]. The floodpulse, caused by seasonal rainfall patterns, is the main factor contributing to the biodiversity and ecological processes of the

\* Corresponding author at: Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry, UNESP – Univ. Estadual Paulista, P.O. Box 355, Araraquara, SP 14800-900, Brazil. Tel.: +55 16 3301 9610.

E-mail addresses: [mssqam@iq.unesp.br](mailto:mssqam@iq.unesp.br), [marymarchi@gmail.com](mailto:marymarchi@gmail.com) (M.R.R. de Marchi).

Pantanal [18]. The Pantanal is a large refuge for species that are critically endangered in the rest of Brazil, for example, the jabiru stork (*Jabiru mycteria*), hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*), bare-faced curassow (*Crax fasciolata*) [19], marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) and pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) [20]. The economic use of the Pantanal should therefore be sustainable, and governments should prevent the emergence of industrial activity around this unique wetland. Low-intensity cattle ranching and ecotourism have been the main economic activities in the Pantanal in recent years [21].

However, because it is a flood plain inundated by the waters of the High Paraguay Hydrographic Basin, the river waters that flood the region carry a variety of organic compounds, including POPs [22,23]. Reptiles with temperature-dependent sex determination and oviparity can be a good bioindicator for studying POPs in the environment [24,25]. The *Caiman yacare* is an abundant generalist species, at the top of the food chain and with seasonal reproduction [20]. The eggs can therefore be an interesting bioindicator for POPs.

Solid–liquid extraction followed by low-temperature partitioning (SLE-LTP) is a simple and low-cost method, allowing both extraction and cleanup in one step. The use of SLE-LTP has been reported for the extraction of pyrethroids and organophosphates from fresh and processed foods [26,27], but no application of this method for the extraction of POPs or for samples with a high fat content was found in the literature. SLE-LTP basically comprises four different factors: addition of an extractor solvent, vortex homogenization, centrifugation and freezing for phase separation. To optimize this method, the effects of these factors on the extraction of POPs were established.

Factorial design is useful when several factors are examined simultaneously. Factorial design is used to calculate the main effects and the interactions between the factors with a reduction in the number of experiments required for optimization.

A univariate optimization or single-factor design evaluates the effects of varying single factors on the response. Thus, each factor is analyzed separately. Each level of factor analyzed has a different treatment, where the treatment is an incentive for the observation of the effects in an experimental situation [28]. This method has the disadvantage of requiring a large amount of time to analyze the effect of each variable and the lack of analysis of the interactions between all variables.

In chromatography the multivariate statistical methods can be used which require the user to supply minimum and maximum values for each factor that defines the experimental domain to be investigated during the optimization procedure [29].

Factorial design and response surface methodology have advantages over the univariate methods in that these methods are used not only to find the optimum but can also be used to examine how factors interact and which conditions are the most crucial. Factorial design and response surface methodology tend to provide a considerably better idea of the overall effect of the experimental conditions [29–32]. The experimental design has been used to optimize SLE-LTP or LLE-LTP (liquid–liquid extraction with low-temperature partitioning) for pesticide determination in tomatoes [26], water [33,34], potatoes [27] and benzodiazepine determination in human urine [35].

No available studies evaluate the main effects and interactions of SLE-LTP on the determination of POPs in a complex matrix. The aim of this work was therefore to optimize the SLE-LTP conditions for the determination of OCs and PCBs in Pantanal caiman eggs using factorial design. The factors and effects studied were the quantity of extracting solvent, vortexing time, centrifugation time and freezing time.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and chemicals

Analytical standards of *o,p'*-DDE (CAS n<sup>o</sup>. 3424-82-6), *p,p'*-DDE (CAS no. 72-55-9), *o,p'*-DDD (CAS no. 53-19-0), *p,p'*-DDD (CAS no. 72-54-8),

*o,p'*-DDT (CAS no. 789-02-6),  $\alpha$ -endosulfan (CAS no. 959-98-8),  $\beta$ -endosulfan (CAS n<sup>o</sup>. 33213-65-9) and endosulfan sulfate (CAS no. 1031-07-8), with purities between 97 and 99.5%, were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Germany). A standard solution containing a mixture of PCBs, including the congeners 28 (CAS no. 7012-37-5), 52 (CAS no. 35693-99-3), 101 (CAS no. 37680-73-2) and 180 (CAS no. 35065-29-3) at 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  in cyclohexane, was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Germany). The surrogate 1,2,4,5-tetrabromobenzene – TBB (97.0%, CAS no. 636-28-2) – was obtained from Sigma-Aldrich (USA). The internal standard PCB 209 (CAS no. 2051-24-3) at 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  in cyclohexane was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Germany). Acetonitrile (J.T. Baker, USA), ethyl acetate and isooctane (Mallinckrodt Chemicals, USA) of HPLC grade and anhydrous sodium sulfate (Synth, Brazil) of analytical reagent grade were used as received.

Stock solutions were prepared separately in isooctane for each analyte in concentrations between 20 and 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A solution containing all analytes at 500 ng  $\text{mL}^{-1}$  was prepared from the stock solutions. All solutions were stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. SLE-LTP

To determine the best conditions for the extraction of OCs and PCBs, a mixture containing two eggs from each nest ( $n = 15$ ) was prepared. The mixture was homogenized in a mixer and lyophilized. Lyophilized eggs (2.0 g) were fortified with 90  $\mu\text{L}$  of OCs and PCBs from the 500 ng  $\text{mL}^{-1}$  solution (the working solution) and 20  $\mu\text{L}$  of TBB at 750 ng  $\text{mL}^{-1}$ , vortexed and left to stand for 2 h at room temperature. Ultrapure water (4.0 mL) and a defined volume of extractor solvent (acetonitrile:ethyl acetate) were added before this step. The samples were then homogenized in a vortex blender, centrifuged at 2500 rpm and frozen at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After freezing, the liquid phase was filtered through glass wool fiber with 2.0 g of anhydrous sodium sulfate that had previously been conditioned with 500  $\mu\text{L}$  of extractor solvent at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The frozen solid phase was washed three times with 500  $\mu\text{L}$  of extractor solvent at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The solvent was evaporated under  $\text{N}_2$  and the residue was recovered with 1.5 mL of isooctane and analyzed by GC-ECD (gas chromatography with an electron capture detector). An internal standard (95  $\mu\text{L}$  of PCB 209 at 80 ng  $\text{mL}^{-1}$ ) was added with isooctane in the recovery stage.

### 2.3. Apparatus

The GC-ECD system consisted of a Varian 450 gas chromatograph (from Varian Instruments, USA) equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  ECD system. The split/splitless injector operated in the splitless mode with the split closed for 0.5 min. The injector and detector temperatures were set at 240 and 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. The carrier gas was  $\text{N}_2$  at a flow rate of 0.7  $\text{mL min}^{-1}$  for the ECD column. The makeup gas was  $\text{N}_2$  at a flow rate of 29  $\text{mL min}^{-1}$ . A ZB-5 ms column (Phenomenex, USA) 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  with a guard column (10 m  $\times$  0.25 mm) was used. The column temperature program was as follows: initial temperature of 160  $^{\circ}\text{C}$  (held for 1 min), 3  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  until 214  $^{\circ}\text{C}$  (held for 2 min), 0.8  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 220  $^{\circ}\text{C}$  (held for 1 min), and finally 220 to 290  $^{\circ}\text{C}$  at 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (held for 10 min at 290  $^{\circ}\text{C}$ ). The injected sample volume was 1  $\mu\text{L}$  using the automatic injector.

### 2.4. Experimental design and data analysis

To avoid an exhaustive number of assays, the first optimization step consisted of the use of a  $2^4$  full factorial design with three replicates at the central point. The four factors chosen included the extractor solvent volume, vortexing time, centrifugation time and freezing time. A total of 19 treatments were analyzed for the optimization based on the experimental design (Table 1). The replicates at the center point have two main objectives: provide a measure of pure error and stabilize the variance of the predicted response [29]. Experiments were randomized to



**Table 1**  
Variables, levels and design matrix of the 2<sup>4</sup> factorial design used to optimize the SLE-LTP procedure.

Experiments (run order)	ES <sup>b</sup> (mL)		VT <sup>c</sup> (min)		CT <sup>d</sup> (min)		FT <sup>e</sup> (h)	
	Real	Code	Real	Code	Real	Code	Real	Code
1 (16)	12	+	5	+	15	+	12	+
2 (8)	12	+	5	+	15	+	4	–
3 (7)	12	+	5	+	5	–	12	+
4 (3)	12	+	5	+	5	–	4	–
5 (19)	12	+	1	–	15	+	12	+
6 (14)	12	+	1	–	15	+	4	–
7 (17)	12	+	1	–	5	–	12	+
8 (12)	12	+	1	–	5	–	4	–
9 (11)	8	–	5	+	15	+	12	+
10 (6)	8	–	5	+	15	+	4	–
11 (15)	8	–	5	+	5	–	12	+
12 (13)	8	–	5	+	5	–	4	–
13 (18)	8	–	1	–	15	+	12	+
14 (5)	8	–	1	–	15	+	4	–
15 (10)	8	–	1	–	5	–	12	+
16 (4)	8	–	1	–	5	–	4	–
17 <sup>a</sup> (1)	10	0	2	0	10	0	6	0
18 <sup>a</sup> (2)	10	0	2	0	10	0	6	0
19 <sup>a</sup> (9)	10	0	2	0	10	0	6	0

<sup>a</sup> Central point.

<sup>b</sup> Extractor solvent (6.5:1.5 acetonitrile:ethyl acetate).

<sup>c</sup> Vortexing time.

<sup>d</sup> Centrifugation time.

<sup>e</sup> Freezing time.

minimize the effect of unexplained variability in the actual responses due to extraneous factors [36].

The recovery for each analyte was determined by comparison between the chromatographic area obtained for the spiked samples after extraction and the area for the control sample extract fortified with the analytes just before injection. In both cases, the concentration for each analyte corresponded to 22.5 ng g<sup>-1</sup> of sample. The factorial design was evaluated from the normalized recovery responses (R<sub>n</sub>) obtained in each of the 19 experiments (results provided in Table 2). The responses were calculated with Eq. (1) [37,38]:

$$R_n = \sum [R_x / R_{x(\max)}] \quad (1)$$

where x is the analyte identity (PCB 28; PCB 52; o,p'-DDE; PCB 101;  $\alpha$ -endosulfan; p,p'-DDE; o,p'-DDD;  $\beta$ -endosulfan; p,p'-DDD; o,p'-DDT; endosulfan sulfate and PCB 180), R<sub>x</sub> is the recovery obtained for compound x, and R<sub>x(max)</sub> is the maximum recovery for compound x in all 19 factorial design experiments.

The experimental data were processed using Microsoft Excel 2007® and GNU-Octave 2.1.72. The effects and influences of the levels of each factor were determined according to Cunico et al. [39].

The significance of the effects was determined by an analysis of variance and using Student's *t*-test significance levels for *n* – 1 degrees of freedom with a statistical significance of 0.05. This value represents the probability of the effect of a factor being due solely to random error. Thus, if the effect is larger than *t*-critical, the effect of the

**Table 2**  
The recoveries obtained for the GC/ECD after each SLE-LTP test with the normalized responses obtained for each experiment.

Run	Design matrix					Recovery/%											Normalized response <sup>d</sup>
	ES	VT	FT	CT	PCB 28	PCB 52	o,p'-DDE	PCB 101	A ENDOS <sup>a</sup>	p,p'-DDE	o,p'-DDD	B ENDOS <sup>b</sup>	p,p'-DDD	o,p'-DDT	ENDOS SULF <sup>c</sup>	PCB 180	
1	+	+	+	+	31	96	12	23	110	55	11	17	13	45	52	5.54	
2	+	+	+	–	41	100	40	36	119	80	62	95	60	39	97	38	10.24
3	+	+	–	+	42	116	38	18	112	77	57	76	63	42	81	55	9.86
4	+	+	–	–	21	54	22	14	71	40	29	42	44	20	91	8	5.67
5	+	–	+	+	12	105	16	5	88	44	25	36	28	17	50	19	4.99
6	+	–	+	–	37	107	31	25	96	86	55	73	55	46	94	70	9.89
7	+	–	–	+	25	97	21	15	102	58	35	48	40	28	59	36	6.81
8	+	–	–	–	21	124	41	12	119	92	33	62	43	31	64	37	8.14
9	–	+	+	+	17	96	9	11	104	45	8	11	11	7	24	36	4.04
10	–	+	+	–	21	107	9	11	119	52	9	14	12	8	24	46	4.63
11	–	+	–	+	17	94	22	2	95	47	33	50	38	20	75	18	5.98
12	–	+	–	–	11	79	15	4	81	41	23	37	25	14	35	16	4.33
13	–	–	+	+	19	126	22	12	108	60	36	57	39	23	52	41	6.88
14	–	–	+	–	18	90	23	4	95	55	35	52	36	23	54	26	6.09
15	–	–	–	+	20	94	28	8	94	55	38	57	42	23	64	17	6.52
16	–	–	–	–	16	165	21	78	90	48	27	39	26	18	39	7	6.32
17C	0	0	0	0	30	80	48	22	75	58	46	65	50	30	93	12	7.91
18C	0	0	0	0	18	103	18	2	124	84	27	35	34	25	59	18	6.24
19C	0	0	0	0	25	16	41	18	24	58	40	56	47	27	64	10	6.15

<sup>a</sup>  $\alpha$ -Endosulfan.

<sup>b</sup>  $\beta$ -Endosulfan.

<sup>c</sup> Sulfate endosulfan.

<sup>d</sup> Normalized responses obtained using Eq. (1).

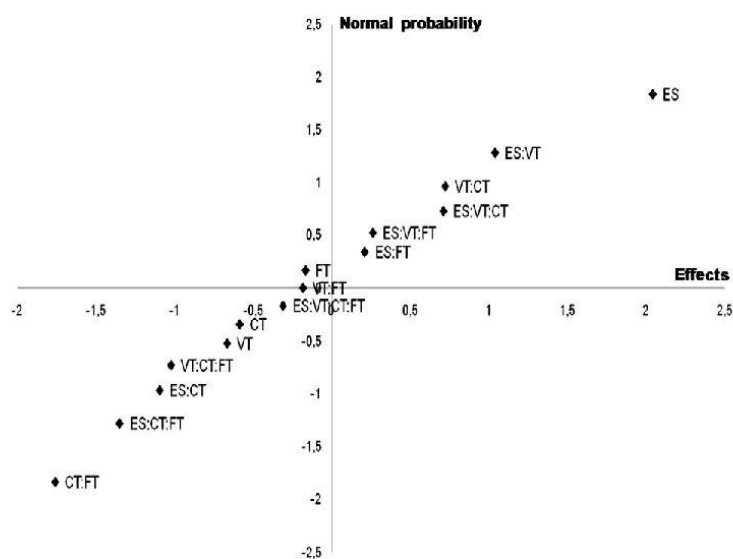


Fig. 1. Normal probability vs. effects. ES: extractor solvent (6.5:1.5 acetonitrile:ethyl acetate); VT: vortexing time; CT: centrifugation time; FT: freezing time.

corresponding factor is significant. The effects and significance of the variables in the SLE-LTP were evaluated using Pareto charts [40].

More experiments can be performed in addition to those of the factorial design and the results can be used to determine a quadratic response surface for the significant effects [41].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Recovery results

The recoveries varied between 2% (PCB 101) and 165% (PCB 52). Due to the difficulty of working with individual recoveries to optimize a multiresidue analysis, we opted to calculate the effect from the normalized response. The recovery results for each analyte obtained in the experiments and normalized response for each experiment are shown in Table 2.

The PCBs can have minor recoveries because they are nonplanar congeners, with octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) slightly

smaller than the planar congeners, DDT, DDD and DDE, whose extraction is difficult with acetonitrile through  $\pi$  interactions [42].

#### 3.2. Effect results

The extractor solvent produced the largest positive effect (+ 2.04) and 2nd-order interaction, between centrifugation time and freezer time produced the greatest negative effect (− 1.76). The main effect for freezer time was virtually nil. The other effects between + 1.0385 (2nd-order interaction extractor solvent and vortexing time) and − 1.3518 (3rd-order interaction extractor solvent, freezing time and centrifugation time) are possibly noise.

From these data, we constructed a normal probability plot (Fig. 1), where it can be noted that the factor producing the most positive effect is the extractor solvent. The signals in the middle of the graph are noise and do not produce significant effects.

After reorganization, the original data were re-allocated. Consequently, the design was reduced from a  $2^4$  matrix (with 16 experiments without replicates) to a  $2^3$  complete factorial matrix, now with each combination of experiments having two replicates. In this case, it was possible to calculate the experimental error and the error for each effect, as previously demonstrated and shown in Table 3.

Using the replicates, it is possible to calculate the experimental variance (3.12) and the experimental error (1.76). The calculated values of the variance for each effect and the error for each effect were 0.78 and 0.88, respectively.

The t-critical can be calculated with 8 degrees of freedom:  $0.88 \times 2.31$  (t-value with a 95% confidence level). The calculated t-critical was 2.04. The effects and significance of the variables in the SLE-LTP system were evaluated using Pareto charts (Fig. 2). The only significant effect was extractor solvent, but each effect can be analyzed separately before constructing the response surface.

#### 3.3. Main effects

The proposed SLE-LTP proposed has four distinct stages: addition of extractor solvent (ES), agitation (VT), centrifugation (CT) and freezing (FT).

Table 3  
 $2^3$  complete factorial design matrix obtained after removal of the column "FT" from "Factor" in Table 2.

EXP <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	VT <sup>c</sup>	CT <sup>d</sup>	$\bar{x}_i$	$s_m^2$	n	$v_i$
1	+	+	+	7.70	9.35	2	1
2	−	−	−	6.20	0.03	2	1
3	+	−	−	9.02	1.52	2	1
4	−	+	−	7.95	10.45	2	1
5	−	+	+	5.01	1.88	2	1
6	−	−	+	6.70	0.07	2	1
7	+	−	+	5.90	1.64	2	1
8	−	+	−	4.48	0.05	2	1

$\bar{x}_i$ : corresponds to the averages of normalized response;  $s_m^2$ : variance of each experiment; n: number of replicates performed for each experiment;  $v_i$ : number of replicates performed for each experiment ( $n - 1$ ).

<sup>a</sup> Experiments.

<sup>b</sup> Extractor solvent.

<sup>c</sup> Vortexing time.

<sup>d</sup> Centrifugation time.

The major positive effect was the ES (2.04), i.e., to improve the efficiency of the extraction, the volume of extractor solvent should be 12 mL, as expected, because the higher the amount of solvent, the greater will be the solubilization of analytes.

The FT as a main factor has no influence on the extraction, possibly because the system reaches equilibrium after freezing and partitioning.

The higher the VT the more effective the extraction. However, this factor, as a main effect, has a slightly negative effect, but the effect is not significant. However, VT has a significant positive effect on the 2nd-order interactions, as explained below.

### 3.4. 2nd-order interactions

The 2nd-order interactions exhibit a positive effect from the interactions between ES:VT (1.04) and VT:CT (0.72). The extraction is more efficient with a volume of 12 mL of extractor solvent, a vortexing time of 5 min and a centrifugation time of 15 min.

The largest negative interaction of all of the effects was observed in the interaction between CT:FT (−1.76). These factors should therefore be run on opposite levels: for example, shorter centrifugation time (5 min) and longer freezing time (12 h).

### 3.5. 3rd-order interactions

The interactions of three factors when compared with the interactions of ES:VT:FT (0.26) and ES:VT:CT (0.71) show a reduction of the effect when the associated factor is the freezing time.

The interactions between freezing time and centrifugation time always have a negative effect, namely, −1.35 and −1.02 for interactions ES:CT:FT and VT:CT:FT, respectively. This suggests that the higher freezing time associated with higher centrifugation time results in the large negative effect on the SLE-LPT process.

### 3.6. 4th-order interactions

When all factors are associated at their highest level, the effect is slightly negative (−0.31) due to the interaction between the maximum levels of freezing time and centrifugation time, as shown previously.

### 3.7. Response surface

The experimental results were subjected to Student's *t*-test and were considered significant, with the main effect being the volume of solvent (2.04). The effect of the 2nd-order for the interaction between centrifugation time and freezing time was the most negative effect (−1.76), not significant but a high negative effect. Therefore it is considered important to construct the response surface.

The interpretation can be facilitated with the support of a response surface (Fig. 3) constructed from all experiments (considering only the volume of the solvent and vortexing time as important factors), which resulted in four different experiments with four values of replicates, and the triplicate central point, in which the responses obtained for all the experiments in terms of levels and factors studied are represented. The response was assessed as a function of the main, quadratic and interaction effects of the vortexing time and extractor solvent.

Therefore, the factors that contributed to better extraction of the analytes were the highest volume of extractor solvent and longer duration of vortexing. Considering the negative effect of the interaction between centrifugation time and freezing time, these factors should be executed on opposite levels. For continuation of the work, we opted for a shorter centrifugation time and longer freezing time because their opposite interactions were not considered significant.

The optimized method includes 12 mL of extractor solvent, 5 min of vortexing time, 5 min of centrifugation time and 12 h of freezing time. Under these conditions, the average recovery was 61% with a 15% RSD for 22.5 ng g<sup>−1</sup> of sample. In this study, was verified that the SLE-LTP method, a rapid and economical method for cleanup and extraction in one step that efficiently extracts organophosphates and pyrethroids, can also be promising for the extraction of organochlorine compounds from a complex matrix.

## 4. Conclusions

The method of optimization by factorial design helps us to determine the factors that have the most significant effects on the response and how the effect of one factor may interact with another factor.

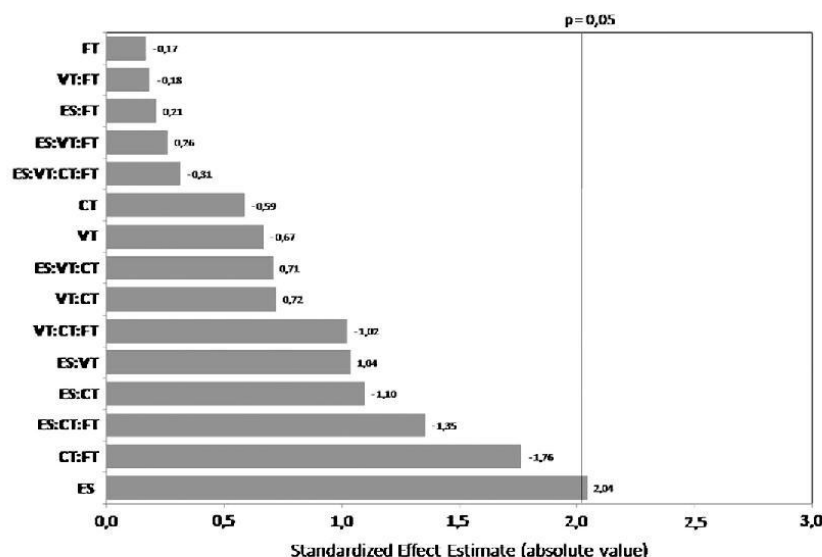


Fig. 2. Pareto charts for SLE-LPT system. ES: extractor solvent (6.5:1.5 acetonitrile:ethyl acetate); VT: vortexing time; CT: centrifugation time; FT: freezing time.



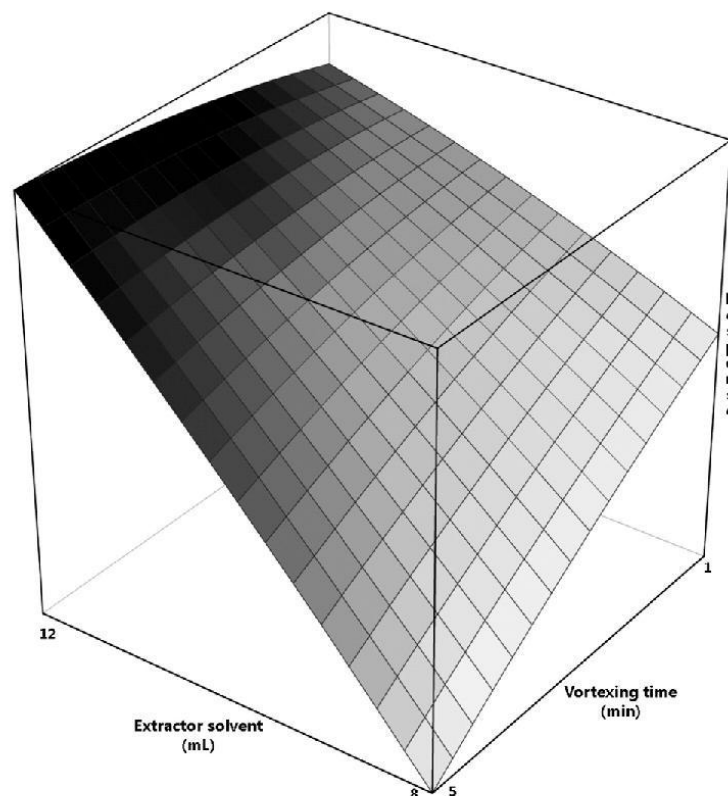


Fig. 3. Response surface for the proposed planning. ES: extractor solvent; VT: vortexing time.

We highlight the difficulty for the analysis of nonpolar analytes in lipophilic samples, which presents a great variability of substances due to sample complexity. However, chemometrics shows itself prominently in environmental studies because chemometrics is used as a helper tool without limitations to optimization of the experiments.

Without the factorial design, it would not be possible to determine which factors are significant for the extraction or how the interactions of different factors could influence the process. With a multivariate optimization system, it can be verified, with a reduced number of experiments, what the best conditions are for ESL-PBT for the extraction of organochlorine compounds from the eggs of the Pantanal caiman.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the FAPESP (Fundação de Apoio a Ciência, Tecnologia e Educação) for financial support and fellowships, Dr. Vitor M. Aleixo and Piuval Lodge (Poconé – MT) for help in the field work.

#### References

- [1] The 12 initial POPs, <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx2013>(Available).
- [2] Global monitoring plan for persistent organic pollutants. First regional monitoring report Latin America and the Caribbean Region. Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Geneva, 2009.
- [3] B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment, in: B.A. Markert,

- A.M. Breure, H.G. Zechmeister (Eds.), Trace Metals and other Contaminants in the Environment, 6, Elsevier, 2003, pp. 3–39.
- [4] R. van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2003) 57–149.
- [5] J. Vicente, A. Bertolero, J. Meyer, P. Viana, S. Lacorte, Distribution of perfluorinated compounds in yellow-legged gull eggs (*Larus michahellis*) from the Iberian Peninsula, *Sci. Total Environ.* 416 (2012) 468–475.
- [6] L. Morales, M.G. Martrat, J. Olmos, J. Parera, J. Vicente, A. Bertolero, M. Ábalos, S. Lacorte, F.J. Santos, E. Abad, Persistent organic pollutants in gull eggs of two species (*Larus michahellis* and *Larus audouinii*) from the Ebro Delta Natural Park, *Chemosphere* 88 (2012) 1306–1316.
- [7] D. Chen, R.J. Letcher, N.M. Burgess, L. Champoux, J.E. Elliott, C.E. Hebert, P. Martin, M. Wayland, D.V. Chip Weseloh, L. Wilson, Flame retardants in eggs of four gull species (*Lariidae*) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada, *Environ. Pollut.* 168 (2012) 1–9.
- [8] L.M. Komoroske, R.L. Lewison, J.A. Seminoff, D.D. Deheyn, P.H. Dutton, Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA, *Chemosphere* 84 (2011) 544–552.
- [9] M. Camacho, O.P. Luzardo, L.D. Boada, L.F. López Jurado, M. Medina, M. Zumbado, J. Orós, Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles, *Sci. Total Environ.* 458–460 (2013) 283–289.
- [10] K.R. Stewart, J.M. Keller, R. Templeton, J.R. Kucklick, C. Johnson, Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 1396–1409.
- [11] C. Stoker, P.M. Beldomenico, V.L. Bosquiazzo, M.A. Zayas, F. Rey, H. Rodriguez, M. Munoz-de-Toro, E.H. Luque, Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 156 (2008) 603–612.
- [12] F. Rey, M. González, M.A. Zayas, C. Stoker, M. Durando, E.H. Luque, M. Muñoz-de-Toro, Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 162 (2009) 286–292.
- [13] P.M. Beldomenico, F. Rey, W.S. Prado, J.C. Villarreal, M. Munoz-de-Toro, E.H. Luque, In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases

- hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68 (2007) 246–251.
- [14] The POPs, Available <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx?2013>.
- [15] R.H. Rauschenberger, J.J. Wiebe, J.E. Buckland, J.T. Smith, M.S. Sepúlveda, T.S. Gross, Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in eggs through maternal exposure in *Alligator mississippiensis*, *Mar. Environ. Res.* 58 (2004) 851–856.
- [16] C.A. Souza, J.L. Lani, J.B. Sousa, Origem e evolução do pantanal mata-grossense, VI Regional Conference on Geomorphology, Goiânia (GO), 2006.
- [17] C.R. Padovani, Dinâmica espaço-temporal das inundações do pantanal, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. (174 pp.).
- [18] K.M. Wantzen, C.N. da Cunha, W.J. Junk, P. Girard, O.C. Rossetto, J.M. Penha, E.G. Couto, M. Becker, G. Priante, W.M. Tomas, S.A. Santos, J. Marta, I. Domingos, F. Sonoda, M. Curvo, C. Calilil, Towards a sustainable management concept for ecosystem services of the Pantanal wetland, *Ecohydrol. Hydrobiol.* 8 (2008) 115–138.
- [19] A.P. Nunes, F.A.T. Tiziane, W.M. Tomas, Aves ameaçadas ocorrentes no Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá, 2006. (47 pp.).
- [20] G. Mourão, M. Coutinho, R. Mauro, Z. Campos, W. Tomás, W. Magnusson, Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil, *Biol. Conserv.* 92 (2000) 175–183.
- [21] W.J. Junk, C.N.d. Cunha, Pantanal: a large South American wetland at a crossroads, *Ecol. Eng.* 24 (2005) 391–401.
- [22] V. Laabs, W. Amelung, A.A. Pinto, M. Wantzen, C.J. da Silva, W. Zech, Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil, *J. Environ. Qual.* 31 (2002) 1636–1648.
- [23] L.M. Vieira, S. Galdino, C.R. Padovani, in: S. Galdino, L.M. Vieira, L.A. Pellegrini (Eds.), *Impactos Ambientais e Socioeconômicos na Bacia do Rio Taquari – Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá, 2006. (71 pp.).
- [24] D.A. Crain, L.J. Guillette Jr., Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption, *Anim. Reprod. Sci.* 53 (1998) 77–86.
- [25] M.J. Amaral, R.C. Bicho, M.A. Carretero, J.C. Sanchez-Hernandez, A.M.R. Faustino, A.M.V.M. Soares, R.M. Mann, The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: part 2 – biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards, *Chemosphere* 87 (2012) 765–774.
- [26] G.P. Pinho, A.A. Neves, M.E.L.R. Queiroz, F.O. Silvério, Pesticide determination in tomatoes by solid–liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography, *Food Chem.* 121 (2010) 251–256.
- [27] R.P. Dardengo, S.M. Goulart, A.A. Neves, C. Reis, L. Zambolim, M.E.L.R.d. Queiroz, Pesticide residues analysis in potatoes by gas chromatography, *Br. J. Anal. Chem.* 1 (2011) 136–142.
- [28] E. Morgan, K.W. Burton, P.A. Church, Practical exploratory experimental designs, *Chemometr. Intell. Lab. S.* 5 (1989) 283–302.
- [29] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. da Silva, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. de Andrade, M.C. Breitkreitz, I.C.S.F. Jardim, B.B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 2–14.
- [30] B. Izgi, C. Demir, Ş. Güçer, Application of factorial design for mercury determination by trapping and graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 55 (2000) 971–977.
- [31] G.E.P. Box, K.B. Wilson, On the experimental attainment of optimum conditions, *J. Roy. Stat. Soc. Biol. Met.* 13 (1951) 1–45.
- [32] P. Peralta-Zamora, J.L.d. Morais, N. Nagata, Why multivariate optimization? *Eng. Sanit. Ambient.* 10 (2005) 106–110.
- [33] S.M. Goulart, R.D. Alves, A.A. Neves, J.H. de Queiroz, T.C. de Assis, M.E.L.R. de Queiroz, Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water, *Anal. Chim. Acta.* 671 (2010) 41–47.
- [34] H.P. Vieira, A.A. Neves, M.E.L.R.d. Queiroz, Optimization and validation of liquid–liquid extraction with the low temperature partition technique (LLE-LTP) for pyrethroids in water and GC analysis, *Quim. Nova* 30 (2007) 535–540.
- [35] E.J. Magalhães, R. Augusti, M.E.L.R. de Queiroz, J.C.C. da Silva, R.J.C.F. Afonso, Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid–liquid extraction with low temperature partitioning and LC–HRMS, *Am. J. Anal. Chem.* 3 (2012) 118–124.
- [36] S.H. Pishgar-Komleh, A. Keyhani, M.R. Mostofi-Sarkari, A. Jafari, Application of response surface methodology for optimization of picker-husker harvesting losses in corn seed, *Iran. J. Energy Environ.* 3 (2012) 134–142.
- [37] C.P. da Silva, E.S. Emídio, M.R.R. Marchi, UV filters in water samples; experimental design on the SPE optimization followed by GC–MS/MS analysis, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 1433–1441.
- [38] L.A. Portugal, H.S. Ferreira, W.N.L. dos Santos, S.L.C. Ferreira, Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 87 (2007) 77–80.
- [39] M.W.M. Cunico, M.M. Cunico, O.G. Miguel, S.F. Zawadzki, P. Peralta-Zamora, N. Volpato, Factorial design: a valuable statistic tool to define experimental parameters applied in scientific research, *Visão Acadêmica* 9 (2008) 23–32.
- [40] E.R. Pereira-Filho, F.M.V. Pereira, S.G. Lemos, Introducing factorial design concepts using experiments with multi-colored chocolates, *Chem. Educ.* 14 (2009) 200–203.
- [41] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, (Editors-in-Chief) in: D.B. Stephen, T. Romá, W. Beata (Eds.), *Response Surface Methodology, Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009. (345 pp.).
- [42] B.J. Bergen, W.G. Nelson, R.J. Pruell, Comparison of nonplanar and coplanar PCB congener partitioning in seawater and bioaccumulation in blue mussels (*Mytilus edulis*), *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 1552–8618.



## ANEXO B – Autorização do SISBIO para coleta dos ovos



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 27347-2	<b>Data da Emissão:</b> 22/05/2013 10:17	<b>Data para Revalidação*:</b> 21/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Demétrio de Abreu Sousa	CPF: 700.578.691-20
Título do Projeto: Ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos de jacaré-do-Pantanal (Caiman crocodilus yacare).	
Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia	CNPJ: 10.784.782/0001-50

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análise bromatológica de acordo com AOAC	02/2011	04/2011
2	Levantamento de dados da distribuição de ninhos no Pantanal em cada ano corrente	02/2011	12/2014
3	Coleta dos ovos nas regiões selecionadas	02/2011	12/2014
4	Otimização e validação de método para análise em ovos	03/2011	04/2012
5	Testes biológicos	03/2011	12/2013
6	Análise das amostras	05/2012	12/2014
7	Tratamento dos dados	01/2014	06/2014
8	Redação e submissão de artigos científicos	07/2014	10/2014

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosprosperção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CACERES	MT	Fazendas particulares que desenvolvem o sistema ranching	Fora de UC Federal
2	POGONE	MT	Fazendas particulares que desenvolvem o sistema ranching	Fora de UC Federal
3	BARAO DE MELGACO	MT	Fazendas particulares que desenvolvem o sistema ranching	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 43755729**



Página 1/3





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 27347-2	<b>Data da Emissão:</b> 22/05/2013 10:17	<b>Data para Revalidação*:</b> 21/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Demétrio de Abreu Sousa	CPF: 700.578.691-20
Título do Projeto: Ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em ovos de jacaré-do-Pantanal (Caiman crocodilus yacare).	
Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia	CNPJ: 10.784.782/0001-50

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caiman crocodilus yacare

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Ovos
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia	Laboratório de Bromatologia
2	Universidade Estadual Paulista	Laboratório de Química Analítica / Ambiental

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 43755729**



Página 2/3

