



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

BRUNA PASTRELLO

**Otimização de um método cromatográfico de análise de pesticidas
organoclorados em amostras de peixe**

Bauru
2013

BRUNA PASTRELLO

Otimização de um método cromatográfico de análise de pesticidas organoclorados em amostras de peixe

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

Bauru

2012

Pastrello, B.

Otimização de um método cromatográfico de análise de
pesticidas organoclorados em amostras de peixes

73 f.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

Monografia (Graduação)– Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências, Bauru, 2013.

BRUNA PASTRELLO

**Otimização de um método cromatográfico de análise de
pesticidas organoclorados em amostras de peixe**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Manoel Lima de Menzes

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Prof. Dr. Luiz Carlos da Silva Filho

Bauru, dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais, meus avós e minha irmã que sempre acreditaram em mim e apesar de todos os percalços sempre estiveram ao meu lado nesses anos todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o verdadeiro norte e luz de minha vida, pela proteção e permissão de realizar esse sonho.

Agradeço aos meus pais, Waldir e Denise, aos quais sem eles hoje eu não estaria aqui, pelo apoio, pelas orações, e por tudo que puderam me dar até hoje, sei que isso foi o melhor que alguém poderia oferecer a outra pessoa.

Agradeço à minha irmã, Beatriz, que apesar de estarmos mais distantes do que gostaríamos, sempre estava disposta a me ouvir e dar boas risadas comigo.

Ao meu avô Rubens e minha avó Neuza, aos quais também sem eles, eu não estaria aqui, pelo incentivo aos estudos e ajuda nos momentos em que tudo parecia perdido.

Ao meu namorado e grande companheiro de todas as horas Rodrigo Garcia Toniato (Gatão), pelo apoio, pelo incentivo, pelo carinho, pelos momentos de descontração, pelas boas gargalhadas, por me ajudar a estudar, por me aguentar quando estava estressada e por estar sempre do meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes, que me deu uma oportunidade rara de se ver e me orientou por dois anos na iniciação e também nesse trabalho de conclusão de curso, pelos ensinamentos, pela paciência e pelas valiosas discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos, que sempre me ajudou muito e que não me deixou desistir em momento algum e também a todos os professores que enriqueceram e auxiliaram em minha formação, pelas discussões científicas e de vida.

Aos meus amigos que conheci durante a minha vida e que levarei pra sempre comigo nas boas recordações Gerson, Gustavo, Linkon, Regina, Fran, Nagila, Renatinha, Kamila, Eliene, Debora, Marcilene, Karla, Boshiro, Paulinha, Mayara, Aloisio, Giovanni, Marquinho, Renan, Viviane, Carol, Elaine, minha madrinha Cíntia e por todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, obrigado por tudo.

*“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde
os outros foram.”*

(Alexander Graham Bell)

Lista de Figuras

Figura 1. Movimento dos pesticidas no ecossistema.....	14
Figura 2. Estruturas representativas dos pesticidas organoclorados estudados nesse trabalho.....	17
Figura 3. Determinação da linearidade do detector ECD para os pesticidas estudados ($\mu\text{g.L}^{-1}$).....	45
Figura 4. Determinação da linearidade do método para os pesticidas estudados (ng g^{-1}).....	47
Figura 5. Cromatogramas obtido após a injeção de 1,0 μL de amostra a) <i>clean up</i> da amostra com filtro de seringa em PTFE, b) sem <i>clean up</i> da amostra com florisil.....	49
Figura 6. Cromatogramas sobrepostos com e sem filtro para comparação.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito...	36
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos empregados nas determinações dos pesticidas no presente trabalho.....	42
Tabela 3. Determinação dos limites de detecção para os pesticidas organoclorados.	46
Tabela 4. Determinação dos limites de detecção para os pesticidas organoclorados.	48
Tabela 5. Média das concentrações de Heptacloro encontradas nas amostras fortificadas.....	50
Tabela 6. Média das concentrações de Aldrin encontradas nas amostras fortificadas.....	51
Tabela 7. Média das concentrações de Endosulfan encontradas nas amostras fortificadas.....	52
Tabela 8. Média das concentrações de DDE encontradas nas amostras fortificadas..	53
Tabela 9. Média das concentrações de Endrin encontradas nas amostras fortificadas.....	54
Tabela 10. Média das concentrações de DDD encontradas nas amostras fortificadas.....	55
Tabela 11. Média das concentrações de DDT encontradas nas amostras fortificadas.....	56
Tabela 12. Determinação dos níveis de concentração de heptacloro em amostras de peixe.....	57
Tabela 13. Determinação dos níveis de concentração de aldrin em amostras de peixe.....	58
Tabela 14. Determinação dos níveis de concentração de endosulfan em amostras de peixe.....	59
Tabela 15. Determinação dos níveis de concentração de DDE em amostras de peixe.....	60
Tabela 16. Determinação dos níveis de concentração de endrin em amostras de peixe.....	61
Tabela 17. Determinação dos níveis de concentração de DDD em amostras de peixe.....	62
Tabela 18. Determinação dos níveis de concentração de DDT em amostras de peixe.....	63
Tabela 19. Quantidades médias encontradas em cada espécie de peixe.....	64

Lista de siglas

POPs – Produtos Orgânicos Persistentes

PCBs – Bifenilas Policloradas

DDT – Dicloro-fenil-tricloroetano

DDE – Dicloro-difenil-dicloroetileno

DDD – Dicloro-difenil-dicloroetano

EPA – Agência de Proteção Animal (EUA)

MDIC – Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio

LMR – Limites Máximos de Resíduos

ADI – Dose diária aceitável

ARfD/DAR – Dose de referência

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

ELL – Extração Líquido-Líquido

EFS – Extração em fase sólida

FR – Fase reversa

FN – Fase normal

TI – Troca iônica

PTFE – Politetrafluoretileno

FM – Fase móvel

FE – Fase estacionária

CG – Cromatografia gasosa

t_r – Tempo de retenção

ECD – Detector por captura de elétrons

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

ICH – International Conference on Harmonisation

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução.....	12
1.1. Pesticidas organoclorados e o meio ambiente	12
1.1.1. Algumas considerações sobre os pesticidas organoclorados (POPs)	14
1.2. Limites Máximo de Resíduos.....	17
1.3. Peixes de água doce	19
1.3.1. Aquicultura e piscicultura no Brasil.....	19
1.3.2. Peixes como biomonitor	20
1.3.3. Peixes de água doce vs peixe de água salgada	24
1.4. Métodos de extração	25
1.4.1. Extração com ultrassom.....	25
1.4.2. Extração líquido-líquido.....	26
1.4.3. Extração em fase sólida (EFS).....	27
1.4.3.1. Extração em discos.....	28
1.5. Cromatografia.....	29
1.6. Validação de método	32
1.6.1. Especificidade e seletividade	33
1.6.2. Função da resposta.....	33
1.6.3. Intervalo de trabalho.....	34
1.6.4. Linearidade.....	34
1.6.5. Sensibilidade	35
1.6.6. Exatidão	35
1.6.7. Precisão	36
1.6.8. Limite de detecção	38
1.6.9. Limite de quantificação.....	38
1.6.10. Robustez.....	39
2. Objetivos.....	40
3. Materiais e métodos.....	41
3.1. Materiais.....	41
3.1.1. Reagentes.....	41

3.1.2. Reavaliação da linearidade do detector e limite de detecção instrumental.....	41
3.1.3. Preparação das amostras de peixes	41
3.1.4. Determinação da linearidade e limite de detecção do método	41
3.1.5. Sistema de cromatografia gasosa	42
3.2. Métodos.....	43
3.2.1. Reavaliação do método de extração dos pesticidas em amostras de peixe fortificadas	43
3.2.2. Análise de amostras reais	44
4. Resultados e discussão	45
4.1. Reavaliação da linearidade do detector e limite de detecção do instrumento.....	45
4.2. Determinação da linearidade e limite de detecção do método	46
4.3. Avaliação da recuperação dos pesticidas em amostras de peixe fortificadas, com e sem o <i>clean up</i> das amostras em filtro de seringa de PTFE	48
4.4. Avaliação das recuperações dos pesticidas organoclorados presentes em amostras de peixe fortificadas.....	49
4.5. Análise de amostras reais	57
5. Conclusões	66
6. Referências.....	67

Resumo

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) incluem substâncias sintéticas pertencentes a diferentes funções orgânicas, dentre eles os pesticidas organoclorados (OCPs) que apresentam alta toxicidade aos seres humanos e animais, por serem os mais persistentes e bioacumuláveis. Desta forma o monitoramento biológico e ambiental se faz necessário, para que se tenha maior controle com relação a utilização irresponsável deste produtos. Embora haja várias metodologias analíticas relatadas na literatura especializada para efetuar as determinações destes pesticidas, estas apresentam algumas dificuldades, requerendo várias etapas para efetuar o *clean up* da amostra. O trabalho proposto objetivou otimizar uma nova metodologia analítica que permitiu efetuar a extração dos pesticidas organoclorados em tecidos de peixes, empregando a acetona como solvente, assistida por banho de ultrassom, tornando o método mais rápido e deixando as etapas posteriores para purificação da amostra menos onerosas. O limite de detecção para o instrumento variou de 0,1ppb a 0,05ppb, dependendo do pesticida de interesse e o limite de detecção do método variou entre 0,2ng/g_(peixe) a 0,01 ng/g_(peixe) dependendo do pesticida. Foram avaliadas as recuperações dos pesticidas em estudo em amostras fortificadas e os valores médios são apresentados da seguinte forma: Heptacloro=84,7±9,8%; Aldrin=87,3±3,5%; Endosulfan=101,4±8,6%; DDE=90,5±3,3%; Endrin=102,2±13,8%; DDD=92,1±19,9%; DDT=90,8±6,8%. As amostras reais apresentaram valores dentro do limite permitido pela legislação e baixos valores de erros

Palavras-chave: Pesticidas, organoclorados, ultrassom, peixes, extração

Abstract

Considering that persistent organic pollutants (POPs) including synthetic substances belonging to different organic functions, including organochlorine pesticides (OCPs), which are the most persistent and bioaccumulative, with high toxicity to humans and animals. Accordingly environmental and biological monitoring is necessary, in order to have greater control regarding the irresponsible use of these products. Though there are several analytical methodology reported in the literature to make determinations of this pesticide, they present some difficulties, requiring several steps to make the clean up of the sample. The proposed project aims to optimize a new analytical method that allows to perform the extraction of organochlorine pesticides in fish tissues, employing acetone as solvent assisted by ultrasound bath, making the method more quickly and not requiring further steps to purify the sample. Were analyzed the recoveries of pesticides in study in samples of *tilapia* average values: Heptachlor=84,7±9,8%; Aldrin=87,3±3,5%; Endosulfan=101,4±18,6%; DDE=90,5± 3,3%, Endrin=102,2±13,8%, DDD=92,1±19,9%; DDT=90,8±6,8%. The real samples showed values granted for our legislation and low values of error.

Keywords: Pesticides, organochlorine, ultrasound, fish, extraction.

1. Introdução

1.1. Pesticidas organoclorados e o meio ambiente

Os produtos químicos melhoram nossa qualidade de vida, mas alguns provocam importantes efeitos colaterais, prejudiciais à saúde humana e aos ecossistemas (Flores *et al*, 2004). Se por um lado os pesticidas permitem que a produção cresça, por outro lado causam problemas ao ambiente (solos, rios, lençóis freáticos, atmosfera), rompendo o ecossistema natural, ou principalmente, atingindo diretamente a saúde do ser humano. Da mesma forma, os Produtos Orgânicos Persistentes (POPs) representam uma classe de poluentes químicos que podem trazer sérias ameaças aos seres vivos e ao meio ambiente, quando expostos a eles (Zilgio, 2004). Isso porque possuem propriedades tóxicas, são resistentes à degradação, se bioacumulam, são transportados pelo ar, pela água e pelas espécies migratórias através das fronteiras internacionais e depositados distantes do local de sua liberação, onde se acumulam em ecossistemas terrestres e aquáticos (Duarte, 2002). Segundo Felix e colaboradores (2007) as características de persistência, lipossolubilidade e semi-volatilidade conferem a habilidade de resistir à degradação, bioacumularem, seres transportados a longas distancias e assim, devido às propriedades farmacológicas de suas moléculas, causarem efeitos adversos á saúde humana e ao meio ambiente. Além de que, esses compostos permanecem no meio ambiente por longos períodos de tempo resultando na bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (Felix *et al*, 2007).

A presença dos poluentes orgânicos persistentes no meio ambiente é uma das grandes questões da atualidade, tanto pelos seus efeitos comprovadamente adversos, quanto pelo fato de não respeitarem fronteiras (Duarte, 2002). Os seres humanos ficam expostos aos POPs através da alimentação, de acidentes e através da poluição ambiental. A maior parte da exposição humana, a esses compostos orgânicos, é atribuídas à rede de alimentação. A contaminação do leite, inclusive materno, com POP é um fenômeno mundial (Flores *et al*, 2004). A exposição ocupacional ou acidental a

alguns POPs revela-se muito preocupante para a saúde humana, principalmente por essas atividades de alto risco englobam a agricultura e a manipulação de resíduos perigosos. Entre os inúmeros efeitos dos POPs para a saúde estão uma ampla variedade de efeitos biológicos como os defeitos congênitos em seres humanos e em animais, o câncer, má-formação de humanos e animais de todo o mundo, alergias e hipersensibilidade, além de doenças do sistema nervoso e periférico. Supõe-se que as doenças reprodutivas sejam causadas por produtos químicos que rompem as funções endócrinas (Felix *et al*, 2007).

Mesmo presente em concentrações pequenas os POPs podem destruir, desorganizar ou interferir na rede hormonal dos seres humanos e dos animais (sistema endócrino). Dessa forma, esses destruidores endócrinos são responsáveis por uma série de efeitos, como o aumento da incidência de câncer de mama, da próstata e dos testículos, danos ao sistema nervoso, doenças do sistema imunológico (Flores *et al*, 2004, Duarte, 2002).

Na agricultura os inseticidas organoclorados foram amplamente utilizados, mas causaram danos irreversíveis ao meio ambiente, devido a sua persistência, alguns chegaram a permanecer no solo por mais de três décadas após a sua aplicação (Felix *et al*, 2007).

A contaminação do solo tem-se tornado uma das preocupações ambientais, uma vez que, geralmente, a contaminação interfere no ambiente global da área afetada (solo, águas superficiais e subterrâneas, ar, fauna e vegetação), podendo mesmo estar na origem de problemas de saúde pública (Flores *et al*, 2004, CETESB, 2006). Um solo contaminado, pode então ser um problema para o lençol freático, compromete a produção de alimentos e consequentemente o topo da cadeia alimentar, pelo fato de intoxicá-los (Felix *et al*, 2007).

Os pesticidas são um dos componentes que atingem o solo e o contaminam. Uma vez no solo, as moléculas dos pesticidas podem ser transportadas em grandes quantidades, pelas águas das chuvas. A lixiviação dos pesticidas, dependendo do perfil dos solos, pode causar a contaminação

de lençóis freáticos, cuja descontaminação apresenta grande dificuldade, e podem afetar os próprios cursos de água superficiais (Tomita e Beyruth, 2002). A Figura 1 mostra o movimento desses produtos em ecossistemas. A partir daí é possível observar a importância do solo, como via de propagação de poluentes, para o risco de poluição das águas, uma vez que tais produtos não tenham sido manejados corretamente (Felix *et al*, 2007).

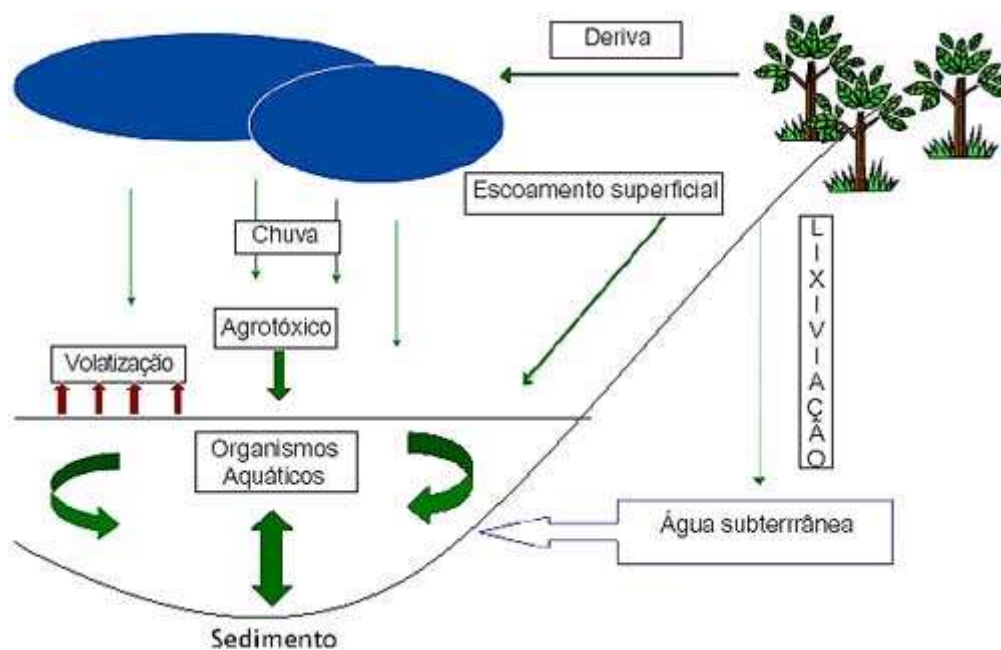


Figura 1. Movimento dos pesticidas no ecossistemas

1.1.1. Algumas considerações sobre os pesticidas organoclorados (POPs)

São conhecidos doze POPs: os pesticidas aldrin, dieldrin, endrin, clordano, DDT, heptacloro, mirex e toxafeno; os químicos de aplicação industrial (como as bifenilas policloradas PCBs) e hexaclorobenzeno; os resíduos ou subprodutos não intencionais (como as dioxinas e furanos). Tais poluentes podem ser encontrados nos seis continentes do mundo, mesmo em regiões onde nunca foram fabricados ou manipulados. Todavia, a maioria deles já foram banidos ou tiveram seu uso reduzido em boa parte do mundo.

O DDT (dicloro-fenil-tricloroetano) foi sintetizado pela primeira vez em 1874 por Othmar Zeidler, mas somente em 1939 Paul Müller descobriu suas propriedades inseticidas. No princípio, o DDT foi considerado um pesticida ideal devido à alta toxicidade para insetos, grande efeito residual e baixo custo financeiro. Pensou-se até que ele seria capaz de erradicar a malária de todo o planeta. Porém, com o tempo, os insetos passaram a desenvolver resistência a sua ação e seus impactos negativos no ambiente foram evidenciados. O DDT pode sofrer transformação por duas vias: uma oxidativa e outra redutiva (You *et al*, 1996). Na via oxidativa, a molécula do DDT perde o átomo de cloro e outro de hidrogênio transformando em DDE (dicloro-difenil-dicloroetileno). Já na via redutiva há apenas a perda de um átomo de cloro, com consequente formação do DDD (dicloro-difenil-dicloroetano). O DDD também possui certa toxicidade para insetos. Ao mesmo tempo apresenta-se menos tóxico para peixes que o DDT, sendo usado como inseticida nos casos em que tal característica tornava-se importante (Clark, 2001). Já o DDE é metabólito com baixa toxicidade para insetos, por isso não foi utilizado como pesticida. Também para animais de laboratório ele se apresenta muito menos tóxico do que o DDT. Em compensação é o composto do grupo encontrado em maior concentração nos organismos.

O grupo dos “drin” (aldrin, endrin, dieldrin e isodrin) são inseticidas fabricados em laboratórios que não ocorrem naturalmente no ambiente, sendo que suas misturas técnicas tem uma pureza de no mínimo 85%. O aldrin facilmente é degradado à dieldrin (mais resistente a biotransformação e à degradação abiótica), tanto em seres vivos como no meio ambiente. O uso dos drins foi banido em 1974 pelo EPA (Agência de Proteção Animal – EUA), sendo liberado somente para o combate contra cupins, porém, em 1987 foi banido para qualquer uso nos Estados Unidos. No Brasil, teve seu uso, comercialização e distribuição proibidos pela portaria 329, de dois de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura.(ATSDR). O endrin, um estereoisômero do dieldrin, foi utilizado em vários países como inseticida, rodenticida e avicida, sendo que seu uso declinou à medida que a resistência desenvolvida pelos insetos crescia,(Cipro, 2007).

O endosulfan é um inseticida de aplicação foliar nas culturas de algodão, café, cana-de-açúcar e soja. Devido ao seu caráter altamente tóxico, a Anvisa determinou em 2010 o banimento do ingrediente ativo endosulfan no Brasil. A resolução RDC nº 28, de 9 de agosto de 2010 estabelece que o endosulfan não poderá ser comercializado no Brasil, a partir de 31 de julho de 2013. A partir de 2011, o produto não poderia ser mais importado e a fabricação em território nacional será proibida a partir de 31 de julho de 2012, (ANVISA, 2011).

O heptacloro é metabolizado em solos, plantas e animais para heptacloro epóxido, que é mais estável em sistemas biológicos, além de cancerígeno. No solo de regiões temperadas o tempo de vida médio é de 0,7 a 2 anos. É provavelmente o POP mais ativo no Brasil, entre 1961 a 1982, 4,7 mil toneladas foram importadas, mas não se tem informação de existência de produção nacional. Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio (MDIC), entre 1989 a julho de 2003 o total importado foi de 1,7 mil toneladas (Almeida *et al*, 2007).

Dentre esses compostos foram escolhido sete para estudo em nosso trabalho, e são os mesmos listados abaixo (Figura 2 segue com as estruturas dos pesticidas escolhidos):

- p,p'-DDT
- p,p'-DDE
- p,p'-DDD
- Aldrin
- Endrin
- Heptacloro
- Endosulfan

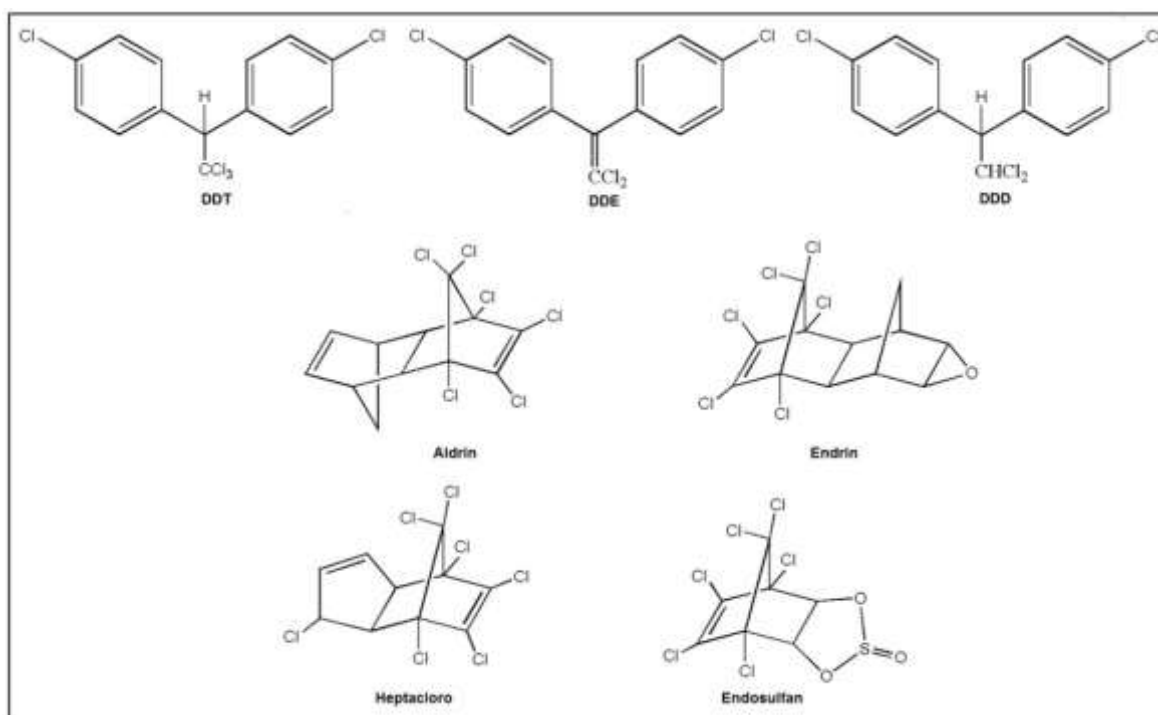


Figura 2. Estruturas representativas dos pesticidas organoclorados estudados nesse trabalho

Devido a todos esses fatores, uma serie de métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação desses produtos nos mais diferentes meio, desde água e solo até mesmo em animais marinhos, aves e mamíferos.

1.2. Limites Máximo de Resíduos

Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) representam a máxima concentração de um resíduo de pesticidas (expresso em mg/kg) legalmente permitida nos produtos alimentares e para alimentação animal. Estes são baseados em dados obtidos através de boas práticas agrícolas. Os alimentos que obedecem aos respectivos LMRs são toxicologicamente aceitáveis. Quando os LMRs são excedidos é realizada uma comparação da exposição com a dose diária aceitável (ADI) e/ou a dose de referencia (ARfD/DAR) de forma a se conhecer se existem ou não possíveis danos crônicos ou agudos para a saúde (Brussel, 2008).

As diferenças existem nos limites máximos legalmente estabelecidos devem-se ao fato das práticas agrícolas diferem de país para país. Contudo, a maioria dos países mundiais segue os padrões internacionais da Comissão do *Codex Alimentarius* ou simplesmente designado como Codex fa FAO/OMS. Os teores máximos de resíduo do Codex são análogos aos LMR (designados por níveis de tolerância) estabelecidos nos Estados Unidos da América pela *Environmental Protection Agency* (EPA). As diferenças que se observam entre eles são devidas essencialmente ao uso de um grupo de dados diferentes e/ou de métodos diferentes para o controle das produções (Jongen, 2005).

Atualmente o LMR serve para regular o comércio internacional e, assim, minimizar a utilização errônea de pesticidas em culturas e produtos agrícolas. O agricultor não terá problemas nas exportações se cumprir escrupulosamente as instruções contidas nos rótulos dos pesticidas, uma vez que são indicadas claramente as doses, as concentrações, o número de aplicações e o intervalo de segurança do produto que garantem aqueles valores (Cunha, 2007).

No Brasil, os LMRs são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA – Instrução normativa de numero 17, de 29 de maio de 2013) a partir do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que é um programa federal de inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos, baseado em análise de risco, que visa monitorar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal e vegetal disponibilizados ao comércio e ao consumo. Este monitoramento oficial é realizado por meio da verificação da presença de níveis de resíduos e substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como resíduos de produtos veterinários, de agrotóxicos ou afins, e de contaminantes químicos, e que tem como um de seus principais objetivos o fornecimento de garantias de um sistema que provenha a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo

MERCOSUL, CODEX, OMC, e órgão auxiliares (FAO, OIE, WHO) (PNCRC, 2013).

O PNCRC Animal se constitui em uma ferramenta de “Gerenciamento de Risco” com o objetivo precípua de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas. O plano de amostragem do PNCRC/Animal segue a recomendação do *Codex Alimentarius*, sendo baseada em conceitos estatísticos de população, prevalência de ocorrências de violações e intervalo de confiança da amostragem (PNCRC/Animal, 2013).

1.3. Peixes de água doce

1.3.1. Aquicultura e piscicultura no Brasil

A piscicultura é uma atividade milenar com destaque em diversas regiões do mundo. No Brasil, a produção de peixes, ou piscicultura, tem apresentado um grande crescimento com destaque para a tilápia e alguns peixes nativos como o tambaqui, o pacu e mais recentemente o pirarucu.

Quando comparada aos outros segmentos de produção animal, a aquicultura ou o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes ostras, camarões, se destaca em nível mundial com 15,7% de crescimento médio entre 2007 e 2010, enquanto a taxa de crescimento do segmento de bovinos, frangos e suínos obtiveram queda de 8,6%, 9,2% e 12,9%, respectivamente.

Por sua vez, a pesca extrativa tem apresentado tendência de queda ou estagnação desde os anos 90. Com a exaustão do setor extrativo nas últimas décadas, o rápido crescimento da aquicultura tem sido a única forma de acompanhar esta crescente demanda do consumo de pescado no contexto mundial.

Segundo levantamento estatístico divulgado pelo ministério da pesca e aquicultura em 2010, a produção de peixes atingiu 60,2% de crescimento

apenas entre 2007 e 2009. Isoladamente, a produção de tilápias aumentou 105% em apenas sete anos (2003-2009) (SEBRAE, 2013).

Segundo dados de 2009 do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, o Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento para o desenvolvimento da aquicultura, constituído por 8400 km de costa marítima, 5500000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% da água disponível no planeta.

A expansão da aquicultura no Brasil destaca-se pela velocidade no aumento das áreas ocupadas pelas fazendas de cultivo e na modernização da tecnologia envolvida na pesca extrativa, onde os principais produtos são camarões, as lagostas, peixes congelados e frescos, responsáveis pelo fornecimento de proteína animal de qualidade para a mesa da população brasileira e mundial (MAPA-PNCRC, 2009).

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura as espécies mais cultivadas no sul e sudeste do Brasil são as tilápias, carpas, ostras e mexilhões. Nos parques aquícolas continentais, os peixes preferidos são a tilápia, pacu, tambaqui e Piratininga. Outras espécies devem fortalecer a aquicultura nacional nos próximos anos, como o pirarucu, proveniente da Amazônia, considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo, podendo alcançar até 10 quilos no primeiro ano de cultivo com rendimento de carcaça de aproximadamente de 50%. O Brasil possui cerca de 40 espécies de peixes de água doce com potencial para cultivo, entre outras marinhas. Estas espécies da fauna brasileira são o foco do estudo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pesca Aquicultura e Sistemas Agrícolas, criada em 2009, com o apoio do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013).

1.3.2. Peixes como biomonitor

Turing (1947) declarou que os peixes constituem um parâmetro muito útil do estado real de pureza de uma água. Nenhum copo d'água pode ser

considerado em condições satisfatórias se nele não viverem e proliferarem peixes (Rocha *et al*, 1985).

O termo bioacumulação refere-se à assimilação e retenção de agentes químicos presentes no ambiente através da via respiratória, dérmica ou digestiva, a partir de qualquer tipo de fonte do compartimento aquático, seja dissolvido, associado ao sedimento ou a outros organismos (Amyot, 1996).

A bioconcentração por sua vez, refere-se exclusivamente à acumulação a partir da fase aquosa e, a biomagnificação, à transferência de contaminantes de um nível trófico a outro, os quais tendem a exibir concentrações crescentes à medida que passam pra níveis mais elevados (Spacie *et al*, 1995).

Organismos capazes de acumular em seus tecidos estes elementos em altos níveis recebem o nome de biomonitores, e podem, por esta razão, serem usados no monitoramento da disponibilidade destes compostos em um ambiente particular (Wagner e Boman, 2003). Por meio destes, é possível quantificar a presença de contaminantes no ambiente, bem como obter informações a respeito da variação temporal e geográfica das concentrações destes elementos (Resgalla *et al*, 2008).

Muitos dos POPs apresentam alta toxicidade potencial, sendo, portanto, capazes de provocar efeitos adversos à biota quando presentes em concentrações elevadas (Dallinger e Rainbow, 1993), de tal forma que estes efeitos, tipos e intensidade, podem ser utilizados em estudos de biomonitoramento e assim oferecer respostas referentes à biodisponibilidade e concentrações destes agentes no meio (Ramos, 2012).

Em peixes, os elementos traços podem causar uma série de mudanças fisiológicas, incluindo inibição da atividade de enzimas, efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos, bem como induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, podendo levar o animal a estresse oxidativo (Karuzina e Archakov, 1994; Heath, 1995; Faverney, *et al*, 2001).

Os níveis acumulados, assim como a assimilação diferencial nos tecidos, dependem de fatores intrínsecos à espécie, como dieta, taxa metabólica, capacidade de depuração, bem como características ambientais as quais podem aumentar ou mesmo reduzir a disponibilidade destes elementos, incluindo tipo de sedimento, salinidade, temperatura, pH, teor de carbono orgânico, dentre outros fatores (Sprague, 1990; Buratini e Brandello, 2008).

Por meio da cadeia alimentar, esses alimentos podem ser transferidos ao homem, e assim como em outros organismos, causar danos à saúde (Goyer, 1991)

Os peixes têm sido considerados organismo extremamente útil para se medir os efeitos de efluentes agrícolas, municipais e industriais em ambientes aquáticos por pelas seguintes razões:

- Indicam os efeitos cumulativos de muitos tipos de distúrbios antropogênicos
- Interagem os efeitos de complexos e variados estressores em suas presas
- Fornecem um registro relativamente longo da duração de estresses ambientais
- Integram ampla escala das condições do habitat
- Sua identificação é relativamente simples até o nível de espécie
- Sua identificação oferece considerável informação adicional sobre seu ambiente
- São de grande interesse para pessoas preocupadas com as perdas na diversidade biológica (Ganasan e Hughes, 1998).

Além dos itens citados acima, tem sido salientado que os peixes são classes de animais aquáticos mais estudadas em imunologia e toxicologia devido ao interesse sobre o estado de saúde dos ecossistemas aquáticos em relação à poluição, e os peixes são úteis espécies-alvo quando do desenvolvimento de biomarcadores (são fáceis de se obter, há extenso conhecimento sobre eles e são de interesse econômico) (Wester *et al*, 1994).

A utilização de peixes em programas de monitoramento, testes de toxicidade em laboratório e como indicadores biológicos da qualidade dos ambientes aquáticos tem aumentado bastante nos últimos anos. O incremento do uso de peixes nesse tipo de programa ou estudos se deve principalmente ao fato dos ecossistemas aquáticos se constituírem em receptores de uma grande variedade de poluentes que são lançados direta ou indiretamente nos corpos d'água (Ferreira, 1992).

Um indicador biológico pode ser considerado como uma característica do ambiente que, quando medida, quantifica a magnitude do estresse, as características do habitat, o grau de exposição para o estressor ou o grau de resposta ecológica para o estressor (Hunsaker e Carpenter, 1990; Nicholson e Fryer, 2002). Organismos bioindicadores podem ser simplesmente definidos como respostas biológicas para estressores ambientais expressas em vários níveis da organização biológica, do nível biomolecular/bioquímico para o nível de população e comunidade (Adams, 1990). Vários autores estão concordando que o bioindicador ideal deveria ser sésil ou pelo menos sedentário na natureza (Phillips e Segar, 1986; Butler *et al*, 1971; Philips, 1980), porque a concentração de poluentes em animais que se movem em grandes distancias são uma função do espaço (onde eles têm estado) e do tempo (quanto tempo eles permanecem em cada área), e os dois efeitos não podem estar separados (Lopes e Malabarba 2007).

A seleção de espécies a serem usadas como bioindicadores requer a consideração de alguns fatores inter-relacionados. Isso inclui a regulação metabólica de poluentes nos bioindicadores 18. Para um organismo ser considerado um bom indicador biológico deve apresentar as seguintes características:

- Acumular substâncias tóxicas sem ser morto pelo nível de poluente encontrado.
- Ser sedentário, a fim de ser representativo na área estudada.
- Ser abundante na região de estudo.

- Ter vida suficientemente longa para que possa ser amostrado em várias fases do ano (se desejável).
- Apresentar um tamanho razoável.
- Ser de fácil amostragem e resistente o suficiente para viver em condições de laboratório (Bulter *et al*, 1971).

Bioindicadores podem ser definidos como uma característica quantificável de processos e funções bioquímicas, fisiológicas, toxicológicas ou ecológicas que têm sido correlacionadas ou casualmente ligadas a um ou mais níveis da organização biológica (organismo, população, comunidade ou ecossistema) (McCarty *et al*, 2002). Pode ser definida ainda como uma variação induzida por algum fator externo em componentes celulares ou bioquímicos ou ainda em processos, estruturas ou funções que são quantificáveis em um sistema biológico ou uma amostragem (Lopes e Malabarba 2007).

Mudanças que ocorrem ao nível de organismo, população e comunidade são mais usualmente referidas como “bioindicador” (Schlenk, 1999; Adams, 1999). Assim sendo, tem-se sugerido o termo biomarcador para discutir efeitos relacionados ao nível organismo e o termo bioindicador para os efeitos quantitativos ao nível de população ou comunidade (Peakall, 1992).

1.3.3. Peixes de água doce vs peixe de água salgada

Considera-se que o perfil lipídico constitui a principal diferença entre os peixes de água doce e os peixes marinhos, mas existem algumas espécies de peixes de água doce que são especialmente ricas em ácidos graxos n-3. Porém isso também pode variar dependendo de sua localização geográfica (Averina e Kutyrev, 2011). Apesar de alguns peixes de água doce possuírem conteúdos importantes de ácidos graxos poli-insaturados, observa-se que no geral, muitos peixes selvagens de origem marinha possuem particularmente altas taxas de ácidos graxos poli-insaturados n-3 e baixos teores de n-6.

Alguns autores (Sargent *et al*, 2002; Ahlgren *et al*, 1993) dizem que os peixes de água doce têm maior capacidade que os peixes marinhos para

alongar e desnaturar os ácidos graxos curtos sintetizados por algas ou plantas (para a formação de ácido eicosapentaenoico e docosaexaenoico). Esta característica poderia constituir um fator adaptativo, originado pela disponibilidade de fontes de ácidos graxos altamente insaturados que no meio marinho seria superior que nos ambientes de água doce. Por exemplo, foi demonstrado que a truta arco-íris é muito mais efetiva (em comparação com alguns peixes marinhos) na conversão do tipo 18:3 n-3 aos ácidos graxos eicosapentaenoico e docosaexaenoico (Segura, 2012).

1.4. Métodos de extração

1.4.1. Extração com ultrassom

O estudo das ondas ultrassônicas sobre sistemas químicos é denominado Sonoquímica e a aplicação dessas ondas de Sonicação. A ciência do ultrassom pode ser dividida em duas áreas: alta potência e baixa potência. As de alta potência (1W a milhares de $W\ cm^{-2}$) causam permanente mudança física e química por que produzem cavitação.

A cavitação consiste na propagação de ondas sonoras no meio reacional originando uma variação de pressão o que origina a formação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido, momentos de compressão e descompressão alternados e micro fluxos de líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Envolve três estágios: 1) formação e núcleos de cavitação (formação de bolhas de ar próximas das superfícies irregulares de pequenas partículas sólidas presentes); 2) crescimento das bolhas e 3) violenta explosão.

Um aparelho gerador de ondas ultrassônicas é o banho, onde o gerador de frequência é preso diretamente no fundo da cuba e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, e assim há muita dispersão de energia ultrassônica e conseqüentemente menor influência nos sistemas

reacionais. A energia ultrassônica é produzida por uma cerâmica pizoelétrica disposta entre duas chapas metálicas (transdutor pizoelétrico).

Dentre as vantagens do uso do ultrassom para a preparação de amostras destacam-se: a redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagentes, seletividade, favorecimento de reações, que normalmente não ocorrem em condições normais e na simplificação de sistemas reacionais o que implica na redução de custos (Barboza e Serra, 1992).

1.4.2. Extração líquido-líquido

Na extração líquido-líquido (ELL) ocorre à partição da amostra entre das fases miscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão de fases e do número de extrações.

A ELL apresenta as vantagens de ser simples e pode utilizar vários solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica. Por outro lado, a técnica apresenta uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito, impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer à formação de emulsões, o que resulta em consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; pode ocorrer adsorção dos analitos na vidraria, decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração; o processo é suscetível a erros, e relativamente difícil automação. Apesar dessas desvantagens, a ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (Queiroz *et al*, 2001).

1.4.3. Extração em fase sólida (EFS)

A extração em fase sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presente em matrizes complexas. A EFS emprega cartuchos recheados de sorventes e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia em coluna. Em geral, os procedimentos de EFS contêm 5 etapas: a) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis, b) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra, c) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes, d) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, e) eluição e coleta do analito.

Atualmente um grande número de sorventes está disponível comercialmente. Em geral, os materiais de recheio, empregados para EFS, são similares aos usados em cromatografia líquida. Dependendo do solvente de condicionamento e de eluição, os grupos mais frequentemente utilizados como sorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em 3 categorias: 1) fase reversa (FR) quando o sorvente é menos polar que o solvente de eluição, 2) fase normal (FN) quando o solvente é menos polar que o sorvente e 3) troca iônica (TI).

Para aumentar a seletividade da extração, os sorventes podem ser combinados das seguintes maneiras:

- 1) Dentro de um mesmo cartucho de extração, usando as chamadas fases mistas com vários grupos funcionais de características diferentes ligados ao mesmo suporte;
- 2) Fazendo sucessivas extrações com cartuchos de diferentes recheios, passando o material eluído do primeiro cartucho para o segundo;
- 3) Recheando o mesmo cartucho com diferentes sorventes, em camadas, resultando em coluna de extração tipo sanduíche.

Os recentes desenvolvimentos em EFS têm sido direcionados para a síntese de sorventes mais seletivos e para novas configurações cromatográficas (Queiroz *et al*, 2001).

1.4.3.1. Extração em discos

O segundo formato de EFS mais utilizado depois do cartucho é o disco (ou membrana carregada de partícula). Nesse tipo de EFS, as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibrilas de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro.

A extração de discos foi originalmente introduzida para extração de trações de materiais orgânicos em água. O diâmetro do disco é escolhido de acordo com o volume da amostra. Diâmetros de 25 a 47 mm são particularmente úteis na análise de urina, pois volumes relativamente grandes podem ser extraídos (10 a 50 mL). Diâmetros menores são usados para determinação de drogas em plasma ou soro, onde a evaporação do efluente não é aconselhável.

Os discos possuem uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição, ausência de caminhos preferenciais, maior capacidade para o analito, melhor repetibilidade e reprodutibilidade, vazões mais altas e menores volumes de eluentes para a dessorção. O melhor desempenho dos discos é devido ao tamanho menor de partícula, que proporciona uma transferência de massa mais rápida. Uma das desvantagens do uso de discos é que a etapa de condicionamento é mais crítica. Diferente da EFS em cartuchos, a secagem do disco deve ser evitada, pois devido a grande área superficial, uma interface água/ar, é formada facilmente, resultando em um decréscimo das recuperações. Da mesma forma que os cartuchos, os poros dos discos podem ser obstruídos quando se extrai amostras contendo uma concentração relativamente alta de macromoléculas ou de material particulado. Assim, é aconselhável filtrar as amostras aquosas antes da extração ou usar pré-filtros inertes.

Para aumentar a seletividade ou a capacidade dos discos, pode utilizar a técnica de empilhamento. Empilhando vários discos de mesmo sorvente irá aumentar a capacidade e se os sorventes forem diferentes, tem-se a retenção de compostos com características diferentes (Queiroz *et al*, 2001).

1.5. Cromatografia

A cromatografia é um método físico e químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato. Durante a passagem da fase móvel (FM) sobre a fase estacionária (FE), os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes. (Collins *et al*, 2006)

O sistema utilizado nesse trabalho é de cromatografia gasosa (CG), onde a fase móvel é um gás, e a fase estacionária poderá ser tanto um sólido quanto um líquido disperso sobre um suporte inerte. (Grob, 1995)

A fase estacionária é acondicionada em tubo (usualmente vidro ou metal) denominado coluna, através do qual o gás de arraste (a fase móvel) irá fluir. A amostra é introduzida na coluna através de um injetor, onde o gás de arraste irá fluir e carregar a amostra. O componente da amostra cuja afinidade pela fase estacionária for maior ficará retido por mais tempo do que aquele cuja interação com a fase estacionária é menor. Conectando-se um detector à saída da coluna, a ordem de eluição e a eficiência da separação são constatadas através do cromatograma registrado. (Leite, 1998)

As características fundamentais de um sistema de CG são: retenção, seletividade, eficiência e resolução. (Grob, 1995)

- **Retenção e seletividade:** Na CG, o parâmetro de retenção é o tempo de retenção, t_r . Ele é definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o máximo do pico cromatográfico. Porém, mesmo que a

substância não interagisse de forma alguma com a FE, o seu tempo de retenção não será nulo, pois transcorreria algum tempo entre a sua injeção e a sua passagem pelo detector. Esse tempo corresponde ao tempo que o gás de arraste demora a percorrer a coluna, e é denominado tempo de retenção não retido (ou tempo morto). O parâmetro que realmente reflete as características físico-químicas de retenção de um determinado composto é o tempo de retenção descontado do tempo morto, chamado de tempo de retenção ajustado.

A seletividade é a capacidade de um sistema diferenciar dois compostos.

- **Gás de arraste:** sua função é levar os constituintes da amostra do ponto de injeção até o detector, passando pela coluna onde a separação irá ocorrer. Idealmente, deve apresentar as seguintes características: não interagir com a fase estacionária nem com os componentes da amostra, ser de baixo custo, ser adequado ao detector em uso. Porém, do ponto de vista prático, esse conjunto de condições não é fácil de ser encontrado. O gás de arraste usualmente escolhido a partir da sua compatibilidade com o detector, pois alguns detectores trabalham melhor quando se usam determinados gases. Os gases mais empregados são H_2 , He e N_2 e a vazão do gás de arraste deve ser controlada, permanecendo constante durante a análise.
- **Injeção:** a obtenção de sinais reprodutíveis em cromatografia a gás é altamente dependente da forma de introduzir-se a amostra na coluna. Idealmente, a amostra deveria ser injetada instantaneamente, o que não tem sido possível até o momento com nenhum dos métodos de injeção conhecidos (seringas, válvulas, injetores automáticos, etc). A escolha apropriada das condições de injeção (tais como volume de amostra, temperatura do injetor e tipo de injeção) depende do estado físico da amostra.

Amostras sólidas podem ser dissolvidas em um solvente adequado. O injetor deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos

componentes da amostra, para que a amostra se volatilize completa e instantaneamente e seja carregada para a coluna. Porém, deve-se evitar a temperatura excessivamente alta, para evitar a decomposição da amostra.

- **Coluna:** é a mais importante parte do sistema cromatográfico, uma vez que é onde a separação irá ocorrer. A escolha da coluna apropriada para uma dada separação determina a eficiência de separação e quantificação que podem ser alcançadas com o sistema CG. Entre os diferentes parâmetros a serem considerados quanto à escolha da coluna, dois devem ser destacados: a fase estacionária (o suporte e a natureza da fase) e as características do material onde será acondicionada (comprimento, diâmetro, etc). As dimensões ideais de uma coluna devem ser determinadas pelo propósito do experimento e a eficiência desejada na separação. (Leite, 1998)

As colunas cromatográficas podem ser classificadas de três formas: convencionais ou clássicas (diâmetros internos acima de 2mm), semicapilares (diâmetros internos entre 0,5 a 1mm) e capilares (diâmetros internos menores que 0,5mm).

Até o presente momento, a cromatografia gás capilar é ainda o método mais frequentemente empregado para a separação e quantificação de contaminantes orgânicos halogenados, em amostras ambientais (Santos e Galceran, 2002)

- **Detectores:** A função do detector em um sistema cromatográfico é acusar a presença e medir a quantidade de cada componente no efluente da coluna. (Leite, 1998)

Detectores seletivos são os mais comumente usados na análise de resíduos de pesticidas. Dentre esses detectores está o detector por captura de elétrons (ECD), que é amplamente utilizado. O ECD apresenta alta sensibilidade (da ordem de ppb), principalmente para compostos halogenados. Entretanto, o ECD não é verdadeiramente um detector específico de elemento, pois responde a vários outros compostos com S, NO₂ e C=O conjugado.

O ECD opera pela ionização do gás carreador por uma fonte radioativa, separando os elétrons em baixa velocidade. Esta ionização resulta em uma corrente de “background” (linha de base). Quando os compostos halogenados passam pelo detector, certa quantidade de elétrons livres é capturada, resultando em um decréscimo da corrente. Este decréscimo é indicado como um sinal transiente (pico) no registrador. A fonte de radiação utilizada, ^{63}Ni , oferece várias vantagens, devido a suas altas temperaturas de operação com menores problemas de contaminação. (Hammarstrand, métodos_extração_1)

Dentre as diversas características desejáveis de um bom detector, as principais são: sensibilidade elevada, baixo nível de ruído, resposta eficiente, ampla faixa de linearidade, menor quantidade mínima detectável possível. (Leite, 1998)

- **Aquisição e Registro de Sinal:** Existem vários equipamentos de aquisição e controle de dados. Os integradores eletrônicos, além de representarem o cromatograma, permitem ainda o registro do tempo de retenção, altura e área dos picos. Atualmente, os integradores foram substituídos por computadores, que com auxílio de um software e operação adequada, pode fornecer resultados mais confiáveis.

1.6. Validação de método

A validação é um termo considerado não específico, uma vez que diversas definições são descritas na literatura. Um determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Assim sendo, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta de dados experimentais) e a validação. Essa última deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder, ou seja, a validação tem como objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para seu propósito (Walsh, 1999). A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas,

inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (Brito *et al*, 2003).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e definem critérios que devem ser seguidos em seu desenvolvimento (Hubert *et al*, 1999; Feinberg e Raguenes, 1999; Pereira, 2000). Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem Especificidade e Seletividade, Função da Resposta, Intervalo de Trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Robustez (Brito, 2003).

1.6.1. Especificidade e seletividade

O termo especificidade é muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade e define a capacidade do método de detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias (Bressolle, *et al*, 1996; Validation, 1995; Brito, 2001).

Em análises cromatográficas a especificidade pode ser estabelecida pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores, por exemplo, uma maneira de se avaliar esse parâmetro consiste na adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo (Bressolle, *et al*, 1996).

1.6.2. Função da resposta

O gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, equação da regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada dos calibradores (soluções-padrão). Assim, torna-se necessário o uso de número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido (Bressolle, *et al*, 1996, MacDonald, 1999; Brito, 2001; Validation 1996). A suposição clássica do gráfico de calibração é que a resposta instrumental y está linearmente relacionada com a concentração x .

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (Currie e Svehla, 1994). No caso, considera-se:

$R=1 \rightarrow$ Correlação perfeita

$0,91 < R < 0,99 \rightarrow$ Correlação fortíssima

$0,61 < R < 0,90 \rightarrow$ Correlação forte

$0,31 < R < 0,60 \rightarrow$ Correlação média

$0,01 < R < 0,30 \rightarrow$ Correlação fraca

$R=\text{zero} \rightarrow$ correlação nula (Brito *et al*, 2003)

Embora sempre se busque obter uma relação entre a propriedade a ser medida e a concentração ou quantidade do analito pode-se também admitir relação não-linear em casos de análises eletroquímicas utilizando-se eletrodos de íon seletivo ou biossensores (Amarante *et al*, 2001).

1.6.3. Intervalo de trabalho

O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método (Brito, 2001; Validation, 1996). Geralmente, faz-se o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que se deseja estudar) e depois determinam se a relação sinal vs concentração é linear (Brito, 2003).

1.6.4. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico (Brito, 2001; Validation, 1996, Amarante *et al*, 2001, Subberud e Astrom, 1998), que não deve ser estatisticamente diferente de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é

necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um coeficiente angular diferente de zero (Brito *et al*, 2003).

1.6.5. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (Amarante *et al*, 2001). Sob o ponto de vista prática, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico (Currie, 1999; Causon, 1997).

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção (LD) (Amarante *et al*, 2001).

1.6.6. Exatidão

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (Francotte *et al*, 1996; Brito, 2001; Amarante *et al*, 2001; González *et al*, 1999; Wesley *et al*, 1991; ISO, 1994), constitui a chave para o propósito da validação. Os principais métodos propostos para o estudo da exatidão, são baseados no uso de material de referencia certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referencia, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos (González *et al*, 1999).

Os ensaios de recuperação constituem o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo (Validation, 1996; González *et al*, 1999). O erro sistemático ocorre pela perda da substancia devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas

imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros) (Brito *et al*, 2003).

O estudo da recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Por sim, calcula-se quantidade percentual recuperada pelo processo (Causon, 1997).

1.6.7. Precisão

O parâmetro de avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente é expressa em forma de desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas (Hubert, 1999; Stubberud e Astrom, 1998).

Para análise de resíduos de pesticidas (Thier e Zerumer, 1987), por exemplo, consideram-se aceitáveis coeficientes de variação de até 20%. Segundo Wood (1999), o coeficiente de variação (ou desvio padrão relativo) está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, definido pela equação:

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5\log C)}, \text{ na qual } C \text{ é a concentração do analito}$$

Desse modo, substituindo-se os níveis de concentração nessa equação obtêm-se os valores de CV apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito

Concentração do analito (g/L)	Coeficiente de variação
1	2
10^{-1}	2,8
10^{-2}	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutividade (ISSO, 1994; Hubert *et al*, 1999; Causon, 1997; Brito, 2001; Validation, 1996). A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. Repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios (Brito, 2001; Validation, 1996), pode ser avaliada com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste (Validation, 1996). A precisão intermediária expressa às variações no mesmo laboratório que envolve diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros (Brito, 2001; Validation, 1996). Tal termo tem sido pouco empregado e esses testes não são comumente citados na literatura. A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias (Validation, 1996). O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável para cada nível de concentração conforme apresentado na Tabela x.

1.6.8. Limite de detecção

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção (LD) (Brito, 2001; Validation, 1996; Currie, 1999; Analytical, 1987; Currie e Horwitz, 1994, Huber, 1998).

Os LDs podem ser definidos em termos de desvio-padrão de medidas do branco, quando se desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços. Sendo, o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito (Amarante, 2002; Analytical, 1987; Amarante *et al*, 2001). O limite de detecção também pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (Brito *et al*, 2003).

O sinal/ruído podem ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado (Brito, 2001; Validation, 1996; Huber, 1998).

No processo estatístico, ainda são considerados todos os efeitos a que o método está sujeito como variações do branco e variações da amostra fortificada no menor nível (Brito *et al*, 2003).

1.6.9. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é definido como as menores concentrações do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisões aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (Analytical, 1987; Currie e Horwitz, 1994; Long e Winefordner, 1983; Huber, 1998; Brito, 2001, Validation, 1996; Currie, 1999) . Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos.

O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser quantificado (Analytical, 1987; Brito, 2001, Validation, 1996).

De acordo com o procedimento estatístico utilizado para análise de resíduos de pesticidas, o LQ corresponde ao menor nível de fortificação estudado (Validation, 1996; Amarante, 2002; Thier e Zeumer, 1987). A recuperação pode variar entre 70 e 120%, com coeficiente de variação de até 20% (Brito *et al*, 2003).

1.6.10. Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação de sua dependência durante o uso normal (Maroto *et al*, 1999; Nijhuis, 1999; Heyden *et al*, 1999)

A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos de alterações em diferentes variáveis do método. No caso de métodos cromatográficos, as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, temperatura e fluxo, entre outras (Maroto *et al*, 1999; Nijhuis, 1999).

Os testes de robustez, em geral, servem para indicar fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório (Heyden *et al*, 1999).

2. Objetivos

Considerando-se a toxicidade dos pesticidas organoclorados e a necessidade de efetuar o monitoramento ambiental periodicamente, empregando o peixe como biomonitor, o estudo tem como objetivos:

- ✓ À otimização de um método analítico para efetuar a separação e identificação dos pesticidas organoclorados (Aldrin, DDT, DDE, DDD, Endrin, Endosulfan e Heptacloro) , empregando a técnica de cromatografia gasosa, equipada com detector de captura de elétrons;
- ✓ Efetuar a reavaliação das recuperações dos pesticidas nas amostras de peixe fortificadas devido a problemas de reparo no aparelho de Cromatografia Gasosa (CG);
- ✓ Efetuar a validação do método.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Hexano, acetato de etila, acetona, acetonitrila e hexano (grau HPLC), foram adquiridos da Mallinckrodt Backer Inc. (Kentucky, USA). Os padrões de pesticidas organoclorados foram adquiridos da AccuStandart, (New Haven, USA). Filtro de seringa em PTFE (25mmx0,45µm) adquiridos junto à Allcrom.

3.1.2. Reavaliação da linearidade do detector e limite de detecção instrumental

Sabendo-se os tempos de retenção de cada componente (determinado com a injeção de cada padrão separadamente), preparou-se uma solução Mixer-7 onde todos os componentes encontravam-se em concentrações de 125µg.L⁻¹. A curva de calibração foi efetuada a partir de diluições 1:1 até a determinação do valor em que não havia mais a detecção de pico cromatográfico (método visual). Estas soluções foram mantidas sob-refrigeração a -4 °C.

3.1.3. Preparação das amostras de peixes

As amostras de filé de tilápia foram adquiridas junto ao supermercado próximo a Universidade. Primeiramente triturou-se o filé em liquidificador até a obtenção de uma massa homogênea. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento de sua utilização.

3.1.4. Determinação da linearidade e limite de detecção do método

As amostras de peixe já trituradas e homogeneizadas foram fortificadas com uma concentração conhecida e a partir da amostra padrão e após a

extração, a mesma solução foi diluída em 1:1 até a determinação do valor em que não havia mais a detecção de pico cromatográfico (método visual).

3.1.5. Sistema de cromatografia gasosa

Para efetuar as determinações dos pesticidas foi empregado um sistema de cromatografia gasosa (CG), equipado com *autosample*, detector de captura de elétrons (ECD), uma coluna ZB-1 (30m x 0,25mm DI x 0,25µm), conectada a um *guard column*, com 5 metros de comprimento por 0,53 mm de DI e um injetor Split/splitless, modelo *Clarus 600*, adquirido junto a Perkin Elmer. Os parâmetros cromatográficos utilizados nas determinações estão na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos empregados nas determinações dos pesticidas no presente trabalho

Parâmetros cromatográficos	
Equipamento	CG – <i>Clarus 600</i> , <i>Perkin Elmer</i>
Coluna capilar	ZB-1
Gás de arraste	Nitrogênio (1,3ml.min ⁻¹)
Modo de injeção	Split 1:20
Volume de injeção	1µL
Detector	ECD com make up 30ml/min
Temperatura do detector	300°C
Temperatura do injetor	250°C
Temperatura do forno	200°C/2min, 5°C/min até 220°C/0,1min, 30°C min até 260°C/1,6min
Tempo final de análise	8,3 min

3.2. Métodos

3.2.1. Reavaliação do método de extração dos pesticidas em amostras de peixe fortificadas

Cinco gramas da amostra de peixe, previamente triturado foram transferidas para um frasco de 100 mL com tampa, seguido pela adição de volumes conhecidos de soluções-padrão de pesticidas organoclorados, obtendo concentrações de aproximadamente 1ng/g_(peixe), 1,6 ng/g_(peixe), 2 ng/g_(peixe), 3 ng/g_(peixe), variando dependendo da quantidade de massa de peixe pesada anteriormente. Aos frascos contendo as amostras de peixe fortificadas foram adicionados 10 mL de uma mistura de solventes compostas por hexano : acetato_de_etila : acetona (45:45:10 v/v) e, submetidos ao banho de ultrassom por 15 minutos. Retirou-se o frasco do banho de ultrassom e transferiu-se o seu conteúdo para um tubo de centrifuga e colocou-se o mesmo em centrífuga por 10 minutos a uma velocidade de rotação de 4000rpm. Transferiu-se o líquido sobrenadante (fase orgânica) com auxílio de uma pipeta de Pasteur a um béquer de 50mL. Submeteu-se o líquido a uma evaporação em capela, com fluxo laminar de ar. Ao resíduo obtido (± 3 mL de água), adicionou-se 4,0mL de acetato de etila e, transferiu-se para um tubo de centrifuga. Após agitação vigorosa por 30 segundos, o mesmo foi centrifugado por 10 minutos a uma velocidade de rotação de 4000rpm. Transferiu-se o líquido sobrenadante (fase orgânica) para um béquer com auxílio de uma pipeta de Pasteur, seguido pela evaporação em capela, com fluxo laminar de ar, até a completa evaporação do solvente orgânico. Ao resíduo foi adicionado 2,0mL de hexano PA e transferiu-se para um filtro de seringa de PTFE (Allcrom).

3.2.2. Análise de amostras reais

Cinco gramas dos seguintes peixes previamente triturados foram transferidos para um frasco de 100 ml com tampa:

- Bagre
- Corvina
- Mandiuvá
- Taquara
- Porquinho
- Tilápia

O mesmo procedimento foi realizado para a análise de traços dos pesticidas, como descrito no item 4.2.1.

4. Resultados e discussão

4.1. Reavaliação da linearidade do detector e limite de detecção do instrumento

Para a determinação da linearidade do detector foram injetadas concentrações decrescentes do padrão misto dos pesticidas; heptacloro, aldrin, endosulfan, DDE, endrin, DDD e DDT. A Figura 3 apresenta a linearidade do detector, o qual apresentou coeficientes de correlação (r^2) entre 0,99803 e 0,99975, para os referidos pesticidas, indicando que a resposta do detector aos padrões foi linear na faixa de concentração analisada, 62,5 a 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

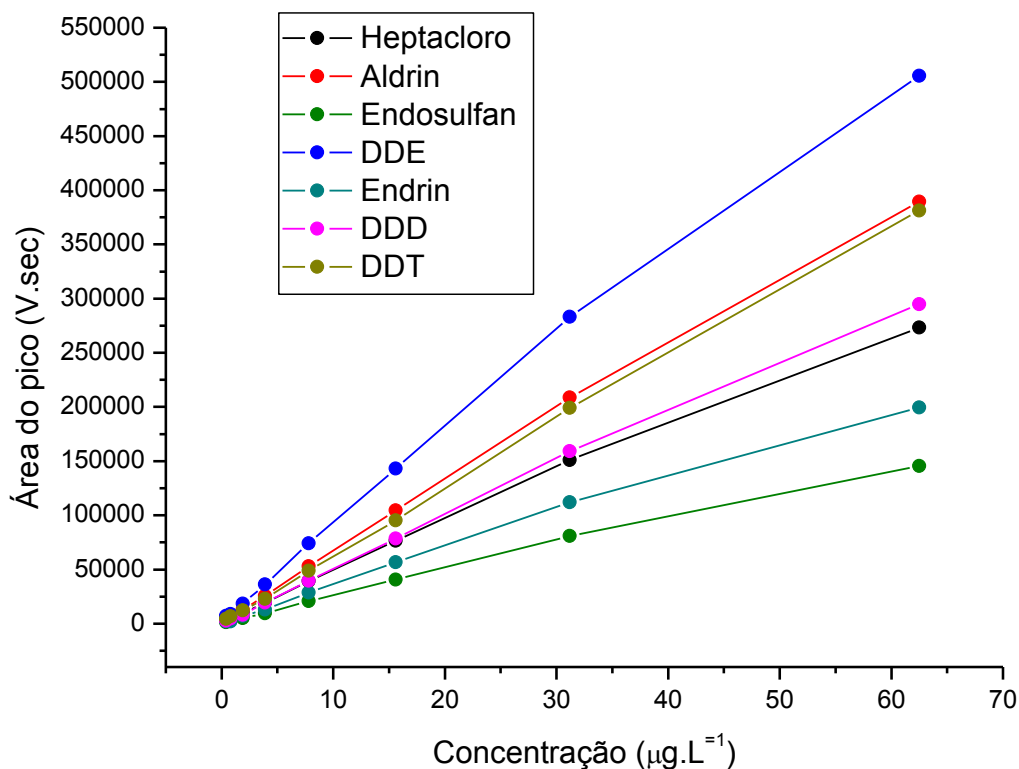


Figura 3. Determinação da linearidade do detector ECD para os pesticidas estudados ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

Foi observado que a abaixo da concentração de $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ nenhum composto apresentou pico cromatográfico e, assim sendo determinou-se o limite de detecção instrumental para cada pesticida organoclorado, como pode ser observado na Tabela 3.

A linearidade dos compostos ficou entre 0,4 e 62,5 e assim sendo a curva de calibração foi construída entre estas concentrações.

Tabela 3. Determinação dos limites de detecção para os pesticidas organoclorados

Pesticida Organoclorado	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aldrin	0,1
DDD	0,1
DDE	0,1
DDT	0,05
Endosulfan	0,05
Endrin	0,1
Heptacloro	0,05

Segundo RIBANI, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) podem ser determinados de duas formas: método visual e da relação sinal ruído. Neste trabalho empregou o método visual, para determinar o limite de detecção.

4.2. Determinação da linearidade e limite de detecção do método

Para a determinação da linearidade do método preparou-se amostras fortificadas na concentração de $6\text{ng g}^{-1}_{(\text{peixe})}$ a partir do padrão misto dos pesticidas heptacloro, aldrin, endosulfan, DDE, endrin, DDD e DDT. Após a extração dos referidos pesticidas realizou-se diluições 1:1 e injetado no

sistema de cromatografia gasosa até que não houvesse mais a detecção de picos cromatográficos.

A Figura 4 apresenta a linearidade do detector, o qual apresentou coeficientes de correlação (r^2) entre 0,98365 e 0,99860, para os referidos pesticidas, indicando que a resposta do detector aos padrões foi linear dependendo da faixa de concentração que o mesmo se encontrava. As faixas de concentração podem ser observadas na Tabela 4.

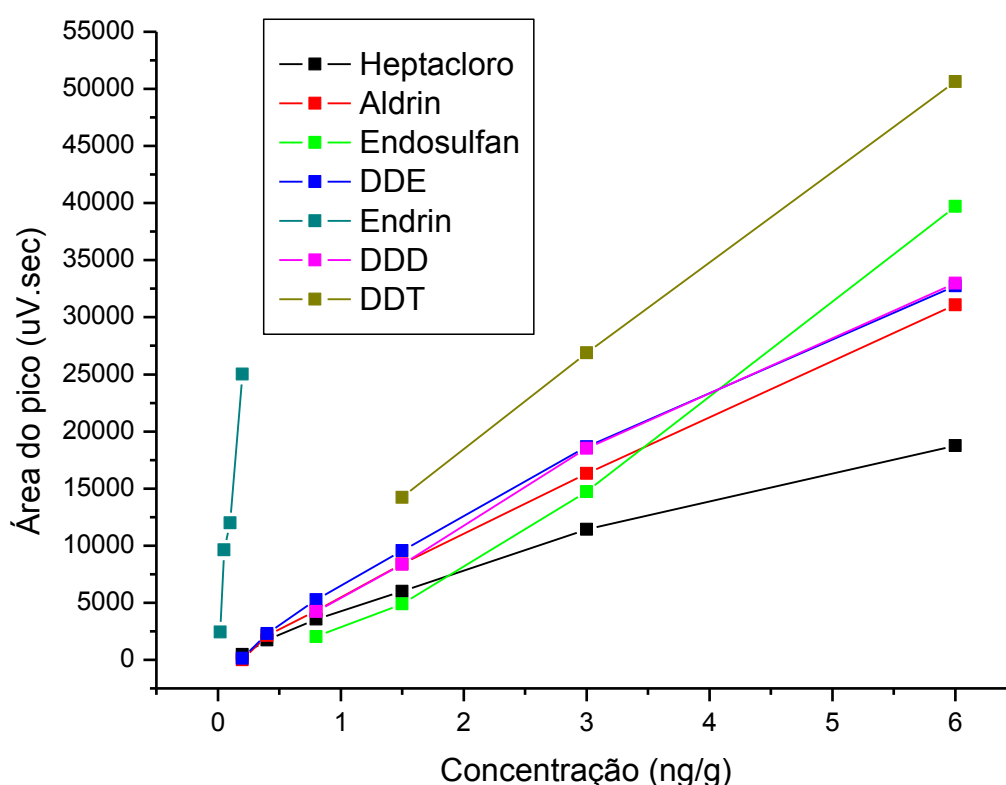


Figura 4. Determinação da linearidade do método para os pesticidas estudados (ng g^{-1}).

Foi observado que a abaixo da concentração de $0,01 \text{ ng g}^{-1}$ nenhum composto apresentou pico cromatográfico e, assim sendo determinou-se o limite de detecção do método e faixa linear para cada pesticida organoclorado, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação dos limites de detecção para os pesticidas organoclorados

Pesticida Organoclorado	Limite de detecção (ng g⁻¹)	Faixa linear (ng g⁻¹)
Aldrin	0,02	6 – 0,04
DDD	0,02	6 – 0,04
DDE	0,01	6 – 0,02
DDT	0,02	6 – 0,04
Endosulfan	0,02	6 – 0,04
Endrin	0,01	0,2 – 0,02
Heptacloro	0,01	6 – 0,02

4.3. Avaliação da recuperação dos pesticidas em amostras de peixe fortificadas, com e sem o *clean up* das amostras em filtro de seringa de PTFE

Para os ensaios eluiu-se uma solução padrão em filtro de seringa em PTFE, pois o mesmo apresenta certa seletividade para efetuar o *clean up* da amostra, retendo impurezas, o que pode ser observado nos cromatogramas, na Figura 5, e na sobreposição dos dois referidos cromatogramas (Figura 6) que não houve retenção de nenhum composto de interesse da matriz.

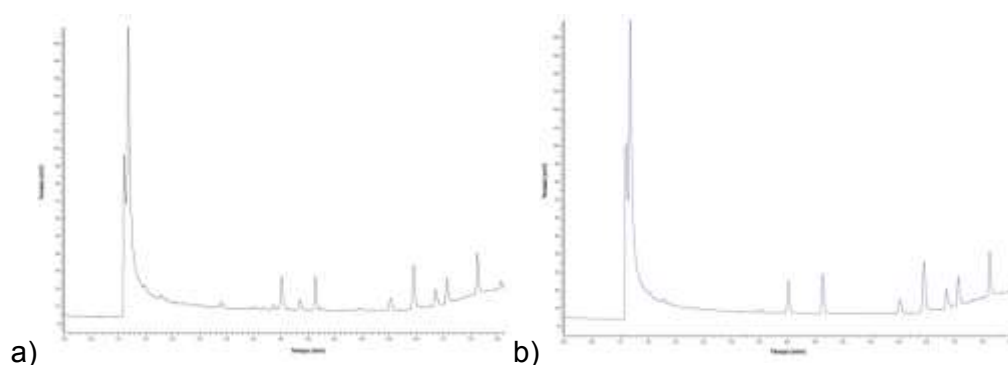


Figura 5. Cromatogramas obtido após a injeção de 1,0 µL de amostra a) *clean up* da amostra com filtro de seringa em PTFE, b) sem *clean up* da amostra com florisil.

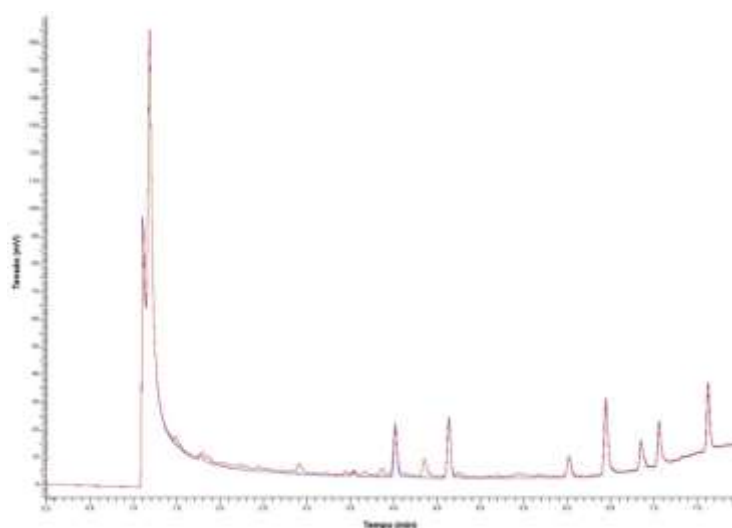


Figura 6. Cromatogramas sobrepostos com e sem filtro para comparação

Assim sendo, observou-se a eficiência do filtro de seringa em PTFE para a limpeza da amostra, como pode ser observado em cromatogramas com poucos ruídos e que não retinha os compostos de interesse, e selecionou-se o referido filtro de seringa para o *clean up* da amostra.

4.4. Avaliação das recuperações dos pesticidas organoclorados presentes em amostras de peixe fortificadas

O emprego do solvente hexano : acetato_de_etila : acetona (45:45:10 v/v) na extração dos pesticidas presentes nas amostras de peixes, mostrou-se eficiente, considerando-se que esta têm uma baixa tensão superficial o que possibilitou a absorção deste solvente nos tecidos. A polaridade da acetona também é uma propriedade muito importante, pois está é solúvel em água bem como os pesticidas. Outro fenômeno observado foi a baixa capacidade da acetona em extrair gorduras dos tecidos das amostras de músculo de peixe, facilitando o *clean up* da amostra.

De acordo com as Tabelas 5 a 11, as recuperações obtidas para os pesticidas organoclorados foram executadas em 5 níveis, sendo uma amostra

controle (branco) e cinco níveis de concentração de fortificação, como pode ser observado nas respectivas Tabelas. As recuperações médias obtidas para os pesticidas organoclorados apresentaram-se entre 84,68 a 102,2% (m/m), com CV entre 3,3 a 19,9%.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$, (RIBANI, 2004).

Tabela 5. Média das concentrações de Heptacloro encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,18	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	1,77	1,78	0,25	70,8
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	3,29	2,88	0,37	92,9
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	4,61	3,95	0,44	89,6
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	7,05	5,84	0,14	85,4
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					84,68
Desvio padrão das recuperações					9,75

Tabela 6. Média das concentrações de Aldrin encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,67	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	1,17	1,03	0,12	88,0
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	2,82	2,32	0,23	82,2
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	3,93	3,56	0,09	90,5
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	6,45	5,03	0,15	88,3
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					87,25
Desvio padrão das recuperações					3,55

Tabela 7. Média das concentrações de Endosulfan encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,11	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	1,07	0,87	0,14	90,9
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	1,73	1,88	0,21	108,3
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	2,29	2,25	0,54	97,9
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	2,69	2,92	0,08	108,5
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					101,4
Desvio padrão das recuperações					8,57

Tabela 8. Média das concentrações de DDE encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,24	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	3,61	1,33	0,23	44,8
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	2,67	2,47	0,15	93,6
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	4,20	2,25	0,11	90,9
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	6,19	2,92	0,28	87,0
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					90,5
Desvio padrão das recuperações					3,32

Tabela 9. Média das concentrações de Endrin encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	---	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	0,55	---	---	---
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	1,99	1,71	0,29	85,9
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	4,19	5,14	0,25	122,8
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	6,11	5,97	0,15	97,8
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					102,2
Desvio padrão das recuperações					18,8

Tabela 10. Média das concentrações de DDD encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,44	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	4,81	3,14	0,67	71,5
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	2,62	2,89	0,48	110
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	5,96	4,67	0,53	78,4
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	7,53	8,17	1,1	108,4
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					92,1
Desvio padrão das recuperações					19,9

Tabela 11. Média das concentrações de DDT encontradas nas amostras fortificadas

Amostra	Massa de peixe(g)	Média de quantidades adicionadas (ng g ⁻¹)	Média das Determinações (ng g ⁻¹)	Desvio padrão Relativo às determinações (ng g ⁻¹)	Recuperações encontradas (%)
Bco-1	5,013	0	0,79	---	---
Bco-2	5,033				
Bco-3	5,030				
5-a	5,040	4,99	4,68	1,32	93,6
5-b	5,020				
5-c	5,019				
8-a	5,030	5,08	4,19	0,77	82,5
8-b	5,020				
8-c	5,012				
10-a	5,031	7,42	6,59	0,10	88,8
10-b	5,011				
10-c	5,003				
15-a	5,024	9,69	8,74	0,96	98,4
15-b	5,022				
15-c	5,021				
Média das recuperações					90,8
Desvio padrão das recuperações					6,8

De acordo com os resultados de recuperações apresentados, pode se inferir que os mesmos são excelentes para todos os pesticidas organoclorados estudados. Comparando-se com os resultados apresentados no ultimo relatório, os valores de recuperações foram maiores, isto ocorreu devido a realização do reparo no equipamento de cromatografia gasosa. Assim sendo, comparando-se com os resultados anteriormente obtidos o método atual encontra-se otimizado e confiável.

4.5. Análise de amostras reais

Após apresentação dos bons valores de recuperação, realizou-se a análise das amostras reais, com 6 tipos de peixes e, cujo os resultados são apresentados nas Tabelas 12 a 18.

Tabela 12. Determinação dos níveis de concentração de heptacloro em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	-	-	0,0208	0,0080
Bagre-2	5,006	0,0640	0,0128		
Bagre-3	5,025	0,1450	0,0289		
Corvina-1	5,001	0,0788	0,0158	0,0299	0,0142
Corvina-2	5,005	0,0334	-		
Corvina-3	5,037	0,2226	0,0442		
Taguara-1	5,028	0,4894	0,0973	0,1073	0,0108
Taguara-2	5,003	0,6120	0,1223		
Taguara-3	5,008	0,5122	0,1023		
Mandiuva-1	5,026	4,7600	-	0,1975	0,0579
Mandiuva-2	5,025	1,2834	0,2554		
Mandiuva-3	5,017	0,7004	0,1396		
Porquinho-1	5,031	0,0048	-	0,2927	0,1649
Porquinho-2	5,011	0,6402	0,1278		
Porquinho-3	5,025	2,2998	0,4577		
Tilápia-1	5,008	-	-	-	-
Tilápia-2	5,002	-	-		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 13. Determinação dos níveis de concentração de aldrin em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ngg^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	0,3272	0,0653	0,0706	0,00528
Bagre-2	5,006	0,3798	0,0759		
Bagre-3	5,025	-	-		
Corvina-1	5,001	-	-	0,0647	0,01034
Corvina-2	5,005	0,3754	0,0750		
Corvina-3	5,037	0,2736	0,0543		
Taguara-1	5,028	0,2712	0,0539	0,0874	0,03349
Taguara-2	5,003	-	-		
Taguara-3	5,008	0,6056	0,1209		
Mandiuva-1	5,026	-	-	0,1366	0,04994
Mandiuva-2	5,025	0,9372	0,1865		
Mandiuva-3	5,017	0,4346	0,0866		
Porquinho-1	5,031	0,4722	0,0939	0,1076	0,01374
Porquinho-2	5,011	0,6080	0,1213		
Porquinho-3	5,025	-	-		
Tilápia-1	5,008	-	-	-	-
Tilápia-2	5,002	-	-		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 14. Determinação dos níveis de concentração de endosulfan em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	-	-	-	-
Bagre-2	5,006	-	-		
Bagre-3	5,025	-	-		
Corvina-1	5,001	-	-	-	-
Corvina-2	5,005	-	-		
Corvina-3	5,037	-	-		
Taguara-1	5,028	-	-	-	-
Taguara-2	5,003	-	-		
Taguara-3	5,008	-	-		
Mandiuva-1	5,026	0,1392	-	-	-
Mandiuva-2	5,025	-	-		
Mandiuva-3	5,017	-	-		
Porquinho-1	5,031	0,1778	0,0353	0,0495	0,0142
Porquinho-2	5,011	0,3192	0,0637		
Porquinho-3	5,025	-	-		
Tilápia-1	5,008	-	-	-	-
Tilápia-2	5,002	-	-		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 15. Determinação dos níveis de concentração de DDE em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	0,6274	0,1252	0,0909	0,0250
Bagre-2	5,006	0,3316	0,0662		
Bagre-3	5,025	0,4078	0,0812		
Corvina-1	5,001	5,9488	1,1895	1,2100	0,0553
Corvina-2	5,005	6,4342	1,2856		
Corvina-3	5,037	5,8166	1,1548		
Taguara-1	5,028	0,0256	0,0051	0,0052	0,00007
Taguara-2	5,003	0,0262	0,0052		
Taguara-3	5,008	0,2256	-		
Mandiuva-1	5,026	0,7520	0,1496	0,2272	0,0589
Mandiuva-2	5,025	1,4692	0,2924		
Mandiuva-3	5,017	1,2014	0,2395		
Porquinho-1	5,031	4,4788	0,8902	0,8840	0,0062
Porquinho-2	5,011	4,3988	0,8778		
Porquinho-3	5,025	-	-		
Tilápia-1	5,008	0,2933	0,1171	0,1182	0,0011
Tilápia-2	5,002	0,2984	0,1193		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 16. Determinação dos níveis de concentração de endrin em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	0,6030	0,1204	0,1941	0,0737
Bagre-2	5,006	0,2358	-		
Bagre-3	5,025	1,3456	0,2678		
Corvina-1	5,001	0,6306	0,1261	0,1937	0,0625
Corvina-2	5,005	0,8918	0,1782		
Corvina-3	5,037	1,3946	0,2769		
Taguara-1	5,028	1,4018	0,2788	0,2741	0,0047
Taguara-2	5,003	6,5156	-		
Taguara-3	5,008	1,3492	0,2694		
Mandiuva-1	5,026	-	-	-	-
Mandiuva-2	5,025	1,1714	-		
Mandiuva-3	5,017	-	-		
Porquinho-1	5,031	-	-	-	-
Porquinho-2	5,011	-	-		
Porquinho-3	5,025	13,3172	-		
Tilápia-1	5,008	-	-	-	-
Tilápia-2	5,002	-	-		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 17. Determinação dos níveis de concentração de DDD em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	0,6242	-	-	-
Bagre-2	5,006	-	-		
Bagre-3	5,025	-	-		
Corvina-1	5,001	0,2710	0,0542	0,0562	0,00197
Corvina-2	5,005	0,5266	-		
Corvina-3	5,037	0,2928	0,0581		
Taguara-1	5,028	5,9266	-	0,1287	0,03447
Taguara-2	5,003	0,8164	0,1632		
Taguara-3	5,008	0,4720	0,0942		
Mandiuva-1	5,026	-	-	-	-
Mandiuva-2	5,025	-	-		
Mandiuva-3	5,017	0,6668	-		
Porquinho-1	5,031	-	-	-	-
Porquinho-2	5,011	-	-		
Porquinho-3	5,025	12,0824	-		
Tilápia-1	5,008	-	-	-	-
Tilápia-2	5,002	-	-		
Tilápia-3	5,008	-	-		

Tabela 18. Determinação dos níveis de concentração de DDT em amostras de peixe.

Amostra	Massa de peixe	Valores encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores encontrados (ng g^{-1})	Média	Desvio-padrão
Bagre-1	5,010	0,1620	0,0323	0,0370	0,0047
Bagre-2	5,006	0,7314	-		
Bagre-3	5,025	0,2092	0,0416		
Corvina-1	5,001	1,0470	0,2094	0,1352	0,0537
Corvina-2	5,005	0,4192	0,0838		
Corvina-3	5,037	0,5670	0,1126		
Taguara-1	5,028	0,6204	0,1234	0,1118	0,0220
Taguara-2	5,003	0,6560	0,1311		
Taguara-3	5,008	0,4056	0,0810		
Mandiuva-1	5,026	20,3348	-	0,7225	0,1885
Mandiuva-2	5,025	4,5776	0,9110		
Mandiuva-3	5,017	2,6794	0,5341		
Porquinho-1	5,031	0,5228	0,1039	0,0955	0,0084
Porquinho-2	5,011	0,2498	-		
Porquinho-3	5,025	0,4378	0,0871		
Tilápia-1	5,008	0,4385	0,1751	0,1375	0,0339
Tilápia-2	5,002	0,2324	0,0929		
Tilápia-3	5,008	0,3618	0,1444		

A partir dos resultados obtidos, foi possível a compilação dos resultados das quantidades médias de pesticidas encontrados em cada espécie de peixe se encontra na Tabela 19.

Tabela 19. Quantidades médias encontradas em cada espécie de peixe

Quantidades médias de pesticidas encontrados (em ng g⁻¹_(peixe))							
Amostras	Heptacloro	Aldrin	Endosulfan	DDE	Endrin	DDD	DDT
Bagre	0,021± 0,008	0,071± 0,052	-	0,091± 0,025	0,194± 0,073	-	0,037± 0,005
Corvina	0,030± 0,014	0,065± 0,010	-	1,210± 0,055	0,193± 0,063	0,056± 0,002	0,135± 0,054
Taguara	0,107± 0,011	0,087± 0,033	-	0,005± 0,0007	0,274± 0,005	0,129± 0,034	0,111± 0,022
Mandiuva	0,197± 0,058	0,137± 0,049	-	0,227± 0,059	-	-	0,723± 0,188
Porquinho	0,293± 0,165	0,107± 0,014	0,049± 0,014	0,884± 0,006	-	-	0,096± 0,008
Tilápia	-	-	-	0,118± 0,002	-	-	0,138± 0,034

Os resultados nos permitem inferir que os peixes bagre e tilápia foram os que apresentaram menores valores de contaminação de pesticidas organoclorados. O valor de DDE no peixe corvina foram os maiores valores de contaminação encontrado seguido do valor de DDT no peixe mandiuva, e esses dois pesticidas foram encontrados em todas as amostras de peixe analisadas. O DDE também apresentou os menores valores de erro das análises. O pesticida endosulfan foi o menos encontrado, sendo apenas detectado em amostras de peixe porquinho.

O peixe com menor contaminação foi a tilápia, isso pode ser justificado pelo fato desse tipo de peixe ser um grande atrativo para a aquicultura e criação dos peixes em ambiente controlado o que ajuda a reduzir

contaminações na água dos mesmos. Uma vez que os outros não são tradicionalmente peixes de cultivo e sim de pesca extrativa diretamente do rio, e esses sim nos mostram a qualidade da água e o abuso da utilização desses pesticidas na agricultura.

Pela legislação brasileira, o limite de referencia para pesticidas organoclorados em musculo de pescado é de $15\mu\text{g kg}^{-1}$ ou 15ng g^{-1} , pela instrução normativa nº 17, de 29 de maio de 2013 (MAPA). Assim sendo, todas as amostras nesse trabalho apresentaram valores em conformidade com a legislação. Porém, em termos de peixes para exportação nem todos iriam estar enquadrados para essa função uma vez que algumas instituições, como por exemplo, a EU Pesticides data base esse limite cai para $01, \text{ng g}^{-1}$.

5. Conclusões

O referido trabalho permitiu otimizar um método analítico para efetuar as determinações dos pesticidas organoclorados estudados, em diferentes amostras de peixe de água doce reduzindo custos com o *clean up* da matriz.

Os valores de recuperação obtidos apresentaram-se dentro da faixa de linearidade do instrumento e do método e assim sendo os resultados da amostra real estão em concordância com o método.

A maior variedade de pesticidas encontradas em amostra de peixe foi para a espécie taguara e o maior valor encontrado para um pesticida específico foi para a espécie de peixe corvina. Os menores valores de pesticidas com menores variedade de pesticidas diferentes foi para a espécie tilápia, uma vez que a mesma é geralmente cultivada em ambientes controlados, o que diminui o significativamente a contaminação da mesma por produtos geralmente utilizados em áreas agrícolas. O pesticida que foi menos encontrado nas amostras reais foi o endosulfan, apresentando-se em apenas nas amostras de peixe da espécie porquinho.

Desta forma o novo método analítico cromatográfico otimizado mostrou-se simples, rápido preciso, sensível e custo relativamente menor, quando comparado com métodos analíticos relatados na literatura.

6. Referências

- ADAMS, S. M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. **American Fisheries Society Symposium**. v.8, p.1-8, 1990.
- ADAMS, S. M. Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. **Human and Ecological Risk Assessment**. n. 9(1), p. 17-35, 2003.
- AHLGREN, G.; BLOMQVIST, P. BORERG, M.; GUSTAFFSON, I. B. Fatty acido content of the dorsal muscle – an indicator of fat quality in freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 45, p. 131-157, 1993.
- ALMEIDA, F.V. *et al.* Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química nova**, v.30, n.8, p.1976-1985, 2007.
- AMARANTE, O. P *et al.* Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisa**., v. 12, p. 116-131, 2001.
- AMARANTE, O. P. de. Determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal do Maranhão**, São Luís, 2002.
- AMYOT, M., *et al.* Total metals burdens in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus*: contribution of various body parts and influence of gut contents. **Freshwater Biology**, v. 35, n. 2, p. 363-373, 1996.
- ANALYTICAL methods committee (Royal Society of Chemistry). **Analyst**, v.112, p 199-204, 1987.
- AVERINA, E. S.; KUTYREV, I. A. Perspectives of using of marine and freshwater hydrobionts oils for development of drug delivery systems. **Biotechnology Advances**, 2011.
- ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Legislacao+de+Agrotoxicos+Componentes+e+Afins>> Acesso em 27/08/2012.
- ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry. Division of toxicology information branch. **Toxicological profiles**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp> >. Acesso em 27/08/2012.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom(l): influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v. 5, n.4, p.302-317, 1992.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal Chromatography. B**, v.686, p.3-10, 1996.

BRITO, N. M. Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), **Universidade Estadual Paulista**, São Paulo 2001.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUSSEL. Commission Staff Working Document - Monitoring of Pesticides Residues in Products of Plant Origin. **Commission of the European Communities Press**. European Union. 40p, 2008.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A., 2006. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (2 ed.). Ecotoxicologia aquática, princípios e aplicações. **São Carlos: Rima**, 2008.

BUTLER, P. A., *et al.* Monitoring organisms. In: Food and Agricultural Organisation. Technical Conference on Marine Pollution and its Effects on Living Resources and Fishing, Rome, 1970. Supplement 1: Methods of detection, measurement and monitoring of pollutants in the marine environment. London, Ed. by M. Ruivo, **Fishing News (Books) Ltd**. 1971.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, 175-180, 1997.

CETESB–COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Áreas contaminadas. Disponível em:<<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>>. Acesso em: 29 de outubro de 2013.

CIPRO, C.V.Z. Ocorrência de compostos organoclorados em *Euphasia superba* e em novos gorados de piguins do gênero *Pygoscelis*. Dissertação de mestrado. **Universidade de São Paulo**, 110p, 2007.

CLARK, R.B. Marine Pollution, 5ª ed, **Oxford University Press**, 172p, 2001.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. 1ª ed, Campinas. **Editora UNICAMP**, 453 p. 2006.

CUNHA, S. Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. Tese de Doutorado. **Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**. 394p, 2007.

CURRIE, L.; HORWITZ, W. IUPAC recommendations for defining and measuring detection and quantification limits. **Analysis Magazine**, v. 22, n. 5, p. M24-M26, 1994.

CURRIE, L. A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure & Applied Chemistry**., v. 66, n. 3, p. 595-908, 1994.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 105-126, 1999.

DALLINGER, R.; RAINBOW, P.S. Ecotoxicology of metals in invertebrates. Chelsea, **Lewis publishers**, 461p, 1993.

DUARTE, M. A. I. Poluentes Orgânicos Persistentes. Rio de Janeiro, Monografia (Especialização) Escola Politécnica da Universidade do Brasil, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 40p, 2002.

EU Database, disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage&CFID=469974&CFTOKEN=16932405&jsessionid=0904e9ec62a6d0079acc554ca4014723463bTR> acesso em 04/10/2013.

FAVERNEY, C. R. *et al.* Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 65-76, 2001.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a tandardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**., v. 391, p. 239-252, 1999.

FERREIRA, M. F. N. Avaliação da toxicidade dos efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Pólo Petroquímico do Sul sobre a morfogênese de larvas de *Pimephales promelas* Rafinesque, **Rio Grande: FURG**, 1820p, 1992.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um Problema de saúde pública. **Ambient society**, v. 7, p. 111-124, 2004.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77-80, 1996.

GANASAN, V.; HUGHES, R. M. Application of an index of biological integrity (IBI) to fish assemblages of the rivers Khan and Kshipra (Madhya Pradesh), India. **Freshwater Biology**, v. 40, p. 367-383, 1998.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

WESLEY, R. J.; POCKLINGTON, D.; WALKER, R. F. Analytical quality assurance: a review. **Analyst**, v. 116, p. 975-990, 1991.

GOYER R. A. Toxic effects of metals — lead. In: AMDUR, M. O.; DULL, J.; KLAASSEN, C.D. eds. Casareh and Doull's toxicology — the basic science of poisons. 4ª ed. New York: **Pergamon Press**, p. 639–646, 1991.

GROB, R. L. Modern Practice of Gas Chromatography. 3 ed. New York: **John Wiley & Sons**, 888p, 1995.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology., 2.ed. **CRC Press, Lewis Publishers**, 342p, 1995.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, p. 96-105, 1998.

HUBERT, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

HUNSAKER, C. T.; CARPENTER, D. E. Environmental monitoring and assessment program: ecological indicators. Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, **Research Triangle Park**, NC., 1990.

ISO. International Standards Organization. (ISO 5725): accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Gêneve, 1994. Part 1-4, 6.

JONGEN, W. Improving the safety on fresh fruit and vegetables. **CRC Press**. Netherlands. 639p, 2005.

KARUZINA, I.; ARCHAKOV, A. I. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monooxygenase reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, p.73-97, 1994.

KLAASSEN, C.D. eds. Casareh and Doull's toxicology — the basic science of poisons. 4^a ed. New York: **Pergamon Press**, p. 639–646, 1991.

LEITE, F. Validação em Análise Química. 3 ed. Campinas SP: **Editora Átomo**, 224p, 1998.

LOPES, F. F.; MALABARBA, L. R. Revisão de alguns aspectos da assembleia de peixes utilizados em programas de monitoramento ambiental. **Vittale**, Rio Grande, n. 19(1), p. 45-48, 2007.

NICHOLSON, M.; FRYER, R. Developing effective environmental indicators – does a new dog need old tricks? **Marine Pollution Bulletin**, n. 45, v. 53-61, 2002.

PNCRC, 2013 – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/pncrc>> acesso em 03/11/2013.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa Nº17, de 29 de maio de 2013, disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013\(FINAL\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013(FINAL).pdf)> acesso em 3 de novembro de 2013.

MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F. X. Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 173-185, 1999.

MCCARTY, L. S.; POWER, M.; MUNKITTRICK, K. R. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**. n.8(1), p.159-164, 2002.

MCDONALD, R. D. The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 149-158 1999.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura, disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>> acesso em 03/11/2013.

NIJHUIS, A.; KNAAP, H. C. M. Van der; JONG, S. de; VANDEGINSTE, B. G. M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. **Analytica Chimica. Acta**, v. 391, p. 187-202, 1999.

PEAKALL, D. Animal biomarkers as pollution indicators. London, **Chapman & Hall**. 1992.

PEREIRA, D. M. C.; ARCOS, M. A. S. V.; AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A. Comparação de métodos dicromatométricos para determinação de ferro total em minérios de ferro. **Anais Associação Brasileira Química.**, v. 49, n. 4, p. 198-203, 2000.

PHILLIPS, D. J. H. Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. London, **Applied Science**, 1980.

PHILLIPS, D. J. H.; SEGAR D. A. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. **Marine Pollution Bulletin**, n. 17(1), p.10-17, 1986.

PNCRC, 2009 – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/miolo_ANIMAL_BAIXA.pdf> acesso em 03/11/2013.

PNCRC/Animal, 2013 - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal, disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>> acesso em 03/10/2013.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RESGALLA, JR. C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. O mexilhão *Perna perna*(L.): Biologia, Ecologia e Aplicações. Rio de Janeiro: **Interciência**, 324p, 2008.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, A. A., PEREIRA, D. N., PÁUDA, H. B. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da represa Billings, São Paulo (Brasil), **Revista Saúde Pública**, n. 19, p. 401-410, 1985.

SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. The application of gas chromatography to environmental analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, n.9-10, p.672-685, 2002.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The lipids In: Fish Nutrition, 3.ed. Maryland Heights/MO: **Elsevier Science**, cap. 4, p.181-257, 2002.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, n.39(1-12), p. 48-53, 1999.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, disponível em: <<http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/Sebrae%202014/Idéias%20de%20negocios/Agronegocios%2020Pscicultura%20%20Criacao%20de%20Peixes01.pdf>> acesso em 02 de novembro de 2013.

SEGURA, J. G. Extração e caracterização de óleos de resíduos de peixes de água doce. Dissertação de mestado. Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos, **Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 97p, 2012.

SPACIE, A.; MCCARTY, L. S.; RAND, G. M. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**, p. 493-521, 1995.

SPRAGUE, J. B. Aquatic Toxicology. In: SCHRENCH, C. B.; MOYLE, P. B. (Eds).Methods for Fish Biology. **American Fisheries Society**. Bethesda, Maryland, USA, 1990.

STUBBERUD, K. P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **Journal of Chromatography. A.**, v. 826, p. 95-102, 1998.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. Manual of pesticide analysis. New York: **Verlag Chemie**, p. 37-41, 1987.

TOMITA, R. Y. e BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente Aquático. **O Biológico** n. 64, p.135-142, 2002.

TURING, H. D. Pollution, v.2, London, British, **Field Sport Society**, 1947.

VAN DER HEYDEN, Y. *et al.* Determination of system suitability limits with a robustness test. **Journal of Chromatography A.**, v. 845, p. 145-154, 1999.

VALIDATION of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH, 1995. 5 p. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). (CPMP/ICH/381/95).

WAGNER, A.; BOMAN, J. Biomonitoring of trace elements in Vietnamese freshwater mussels. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, p. 1125-1132, 2003.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.616-623, 1999.

WESTER, P. W.; VETHAAK, A. D.; VAN MUISWIINKEL W. B. Fish as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology**, n. 86, p.213-232, 1994.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends of Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

YOU, G. *et al.* Anaerobic DDT transformation: enhancement by application of surfactants and low oxidation reduction potential. **Chemosphere**, v.32, p.2269-2284, 1996.

ZIGLIO, L.; COMEGNA, M. A. Segurança Química no Brasil: As Convenções de Roterdã e Estocolmo. **Estudos Geográficos**, v. 2, p. 47-55, 2004.