



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**Estudo e aplicação da dispersão da matriz em fase  
sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) para  
determinação de biocidas anti-incrustantes em tecidos  
de pescado**

---

**Augusto Alves Vieira**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2017**

# **Estudo e aplicação da dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) para determinação de biocidas anti-incrustantes em tecidos de pescado**

por

**Augusto Alves Vieira**

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

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2017

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Estudo e aplicação da dispersão da matriz em fase sólida  
assistida por vórtex (VA-MSPD) para determinação de  
biocidas anti-incrustantes em tecidos de pescado**

elaborada por

**Augusto Alves Vieira**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel – Orientador (Universidade Federal do Rio Grande - FURG - RS)

---

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi (Universidade Federal do Paraná - UFPR - PR)

---

Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (Universidade Federal do Rio Grande - FURG - RS)

---

Prof. Dra. Eliana Badiale Furlong (Universidade Federal do Rio Grande - FURG - RS)

Rio Grande, 31 de Janeiro de 2017

## AGRADECIMENTOS

---

---

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental** da Universidade Federal do Rio Grande pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo apoio financeiro.

A **Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior** pelo suporte financeiro (Edital Ciências do Mar nº 43/2013).

Ao Prof. Dr. **Ednei Gilberto Primel**, pela confiança cedida a minha pessoa ao me integrar ao seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, pelos ensinamentos compartilhados, pelo exemplo profissional e pela amizade, além das diversas oportunidades que permitiram meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. **Osmar Damian Prestes**, pelos ensinamentos passados em um curto período de tempo e por toda dedicação na busca de solucionar um dos grandes desafios deste trabalho.

Aos integrantes das bancas de Qualificação e Defesa, Prof. Dr. **Marco Tadeu Grassi**, Prof. Dr. **Manoel Leonardo Martins**, Prof. Dra. **Eliana Badiale Furlong** e as Dras. **Sergiane Souza Caldas** e **Larine Kupski**, pelas sugestões que aperfeiçoaram este trabalho e pela disponibilidade para fazê-las.

A todos os colegas e amigos do **Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais** que tive o prazer de conhecer, não só no período do Mestrado, mas no decorrer de toda a minha jornada acadêmica, pela parceria, auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos meus pais, **Marcelo Fernandez Vieira** e **Rosana Maciel**, por me ensinarem os valores fundamentais que ajudaram a construir o meu caráter, por apoiarem meus objetivos e por me proporcionarem todos os meios que permitiram que eu chegasse até aqui.

A **Sergiane Souza Caldas**, por todos os ensinamentos (não foram poucos), por todas as revisões deste e de muitos outros trabalhos, por me inspirar a ser um profissional cada vez melhor, por me mostrar que sempre se pode melhorar um pouco mais, por auxiliar e ser uma peça fundamental para conclusão deste trabalho e pela paciência, principalmente com meu “pensamento bem fundamentado” ou teimosia, como preferir. Além disto, por ser a melhor dupla de vôlei e pela grande amizade, tão grande que acabou ganhando o título de mãe Sergi. Muito obrigado!

Aos grandes amigos **Bruno Meira Soares** e **Éderson Rodrigues Pereira**, por acreditarem em mim, pelos conselhos dados, pelas discussões ricas em conhecimento onde aprendi muito, por ajudarem a desenvolver meu senso crítico e por todas as cervas compartilhadas.

Ao colega **Ronan Adler Tavella**, pelo seu comprometimento no auxílio das atividades experimentais deste trabalho e pela amizade.

Ao colega **Jahir-Antonio Batista Andrade**, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo conhecimento compartilhado e pela grande amizade que desenvolvemos neste período, que certamente fará falta nos próximos passos da minha jornada.

A colega **Larine Kupski**, por todo conhecimento compartilhado, pela ajuda na parte experimental deste trabalho, por todas as derrotas no vôlei, por todas as batatas que ganhei em apostas e pela amizade desenvolvida neste curto período de tempo.

Ao **Jean Lucas de Oliveira Arias**, pela amizade e ajuda desde a época da graduação.

A **Luana Gonçalves Sebastiany** por sempre me incentivar, tornar meus finais de semana mais divertidos, pelos conselhos dados e por ser uma pessoa incrível que tive a sorte de encontrar.

Aos amigos **Guilherme Estima Guimarães, Jeferson Adriano Severo Alves, Felipe Werle Vogel, Andrea Estima, Élvio Marchant, Márcio Nora Barbosa e Gabriel Hertzog** por mesmo não participarem diretamente do desenvolvimento deste trabalho me darem suporte e incentivo. Sou muito grato pela amizade de vocês e tenho grande admiração por todos.

*“O que sabemos é uma gota; o que não sabemos é um oceano.”*

*Isaac Newton*

## SUMÁRIO

---



---

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Biocidas</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Conceitos gerais .....	18
3.1.2 Busan/TCMTB .....	20
3.1.3 Clorotalonil .....	20
3.1.4 Diclofluanida .....	22
3.1.5 DCOIT.....	23
3.1.6 Diuron .....	24
3.1.7 Irgarol.....	25
<b>3.2 Legislação e controle</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Níveis ambientais</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Peixes</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5 Preparo de amostra</b> .....	<b>29</b>
3.5.1 Técnicas de preparo de amostra.....	29
3.5.2 Dispersão da matriz em fase sólida e suas modificações.....	32
<b>3.6 Cromatografia</b> .....	<b>33</b>
3.6.1 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas .....	33
3.6.2 Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (ECD) .....	33
<b>3.7 Validação de métodos cromatográficos</b> .....	<b>35</b>
3.7.1 Curva analítica e linearidade .....	35
3.7.2 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	35
3.7.3 Exatidão e Precisão .....	36
3.7.4 Efeito matriz .....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2 Materiais</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3 Solventes e reagentes</b> .....	<b>37</b>

<b>4.4</b>	<b>Seleção dos analitos</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Preparo das soluções analíticas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>Amostras de pescado</b> .....	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de biocidas</b> .....	<b>39</b>
4.7.1	Condições espectrométricas .....	39
<b>4.8</b>	<b>Avaliação da técnica de VA-MSPD para extração de irgarol e diuron em tecido de pescado e quantificação por LC-MS/MS</b> .....	<b>41</b>
4.8.1	Avaliação do suporte sólido para extração .....	41
4.8.2	Avaliação do solvente para extração.....	42
<b>4.9</b>	<b>Sistema cromatográfico GC-ECD para determinação de biocidas</b> .....	<b>42</b>
<b>4.10</b>	<b>Otimização da técnica de VA-MSPD para extração de clorotalonil, diclofluanida, DOCIT e TCMTB em tecido de pescado e quantificação por GC-ECD</b> .....	<b>44</b>
4.10.1	Avaliação do suporte sólido para extração .....	44
4.10.2	Avaliação do solvente para extração .....	44
4.10.3	Avaliação do tempo de fortificação .....	45
4.10.4	Avaliação da massa de amostra .....	45
4.10.5	Avaliação da acidificação do solvente extrator .....	45
4.10.6	Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD .....	45
4.10.7	Avaliação da liofilização como pré-tratamento da amostra .....	46
<b>4.11</b>	<b>Validação</b> .....	<b>46</b>
4.11.1	Curva analítica e linearidade.....	47
4.11.2	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	47
4.11.3	Exatidão e Precisão .....	47
4.11.4	Efeito Matriz .....	48
4.11.5	Aplicabilidade .....	48
4.11.6	Análise estatística .....	48
<b>5</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação da VA-MSPD para extração de irgarol e diuron</b> .....	<b>49</b>
5.1.1	Escolha do suporte sólido .....	49
5.1.2	Escolha do solvente.....	50
5.1.3	Uso de sal.....	51
5.1.4	Volume de solvente extrator.....	52
5.1.5	Validação do método empregando VA-MSPD e LC-MS/MS .....	52
5.1.6	Aplicação em diferentes espécies.....	53
5.1.7	Comparação com outros métodos de extração de biocidas em amostras de pescado .....	54
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da VA-MSPD para extração de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB</b> .....	<b>56</b>
5.2.1	Escolha do suporte sólido .....	58
5.2.2	Escolha do solvente extrator .....	59
5.2.3	Tempo de fortificação .....	60
5.2.4	Massa de amostra .....	61
5.2.5	Acidificação do solvente extrator.....	61
5.2.6	Planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> .....	62
5.2.7	Uso de tecido liofilizado .....	67



5.2.8	Validação do método empregando VA-MSPD e GC-ECD.....	68
5.2.9	Aplicação em diferentes espécies .....	72
5.2.10	Comparação com outros métodos para extração de agrotóxicos em amostras de pescado 74	
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cromatograma no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) nas melhores condições. Fase Móvel: acetonitrila:água ultrapura (52:48 v/v) 0,1% de ácido fórmico; coluna analítica XTerra C18 3,5  $\mu\text{m}$  (3,0 x 50 mm d.i.); vazão 0,4 mL  $\text{min}^{-1}$ . .....40
- Figura 2. Cromatograma no modo de íons totais (TIC) nas melhores condições cromatográficas. Fase Móvel: acetonitrila:água ultrapura (52:48 v/v) 0,1% de ácido fórmico; coluna analítica XTerra C18 3,5  $\mu\text{m}$  (3,0 x 50 mm d.i.); vazão 0,4 mL  $\text{min}^{-1}$ . .....41
- Figura 3. Cromatograma obtido para os biocidas em acetato de etila na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Gás de arraste:  $\text{H}_2$ ; coluna analítica Restek Rtx®-1 (100% dimetilpolisiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu\text{m}$ ; vazão 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ . .....43
- Figura 4. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes suportes sólidos na etapa de dispersão da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de suporte sólido, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de metanol, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9). .....50
- Figura 5. Recuperação para os analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  quando utilizado diferentes solventes. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de concha, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de solvente, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9). .....51
- Figura 6. Cromatogramas no modo SRM para os compostos clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB no branco, padrão no extrato e após a extração. ....57
- Figura 7. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes suportes sólidos na etapa de dispersão da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de suporte sólido, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....58
- Figura 8. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes solventes na etapa de extração da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de Solvente, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....59
- Figura 9. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  quando avaliado diferentes tempos de fortificação. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....60
- Figura 10. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  quando avaliado o uso de quantidades diferentes de amostra na VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de Acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....61
- Figura 11. Recuperação dos analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes concentrações de ácido acético no solvente extrator da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,2 g de amostra, 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de acetato de etila, 5

min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....	62
Figura 12. Gráfico Pareto de efeitos padronizados para clorotalonil e diclofluanida; variável R(%). .....	64
Figura 13. Gráfico Pareto de efeitos padronizados para DCOIT e TCMTB; variável R(%). .....	65
Figura 14. Recuperação dos analitos na concentração de 50 µg L <sup>-1</sup> quando avaliado o uso de tecido liofilizado. (Condições de extração: 0,2 g de amostra, 2,0 g de C18 <sub>R</sub> , 0,2 g de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 mL de Acetato de etila acidificado com 35 mmol L <sup>-1</sup> de ácido acético, 5 min de maceração, 9 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%. .....	67
Figura 15. Cromatogramas na concentração de 5-LOQ e nos extratos brancos da corvina (5-LOQ), tainha (10-LOQ) e pescada (10-LOQ) nas melhores condições. Gás de arraste: H <sub>2</sub> ; coluna analítica Restek Rtx®-1 (100% dimetilpolissiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm; vazão 1,5 mL min <sup>-1</sup> . .....	73
Figura 16. Superposição das curvas analíticas no solvente e nos extratos demonstrando o efeito matriz ao longo das curvas analíticas.....	94
Figura 17. Superposição das curvas analíticas obtidas por diluição de adição de padrão nas três espécies de peixe. ....	95

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas de alguns biocidas anti-incrustantes de 3ª geração. ....	19
Tabela 2. Compostos permitidos na formulação de tintas para embarcações < 25 m. ....	26
Tabela 3. Concentração Máxima Permissível (MPC) proposta pelas autoridades holandesas para o Irgarol 1051, Diuron e TCMTB. ....	27
Tabela 4. Concentrações de biocidas encontrados em diferentes regiões do globo para amostras de água do mar. ....	28
Tabela 5. Métodos desenvolvidos para extração de compostos orgânicos em tecido de pescado. ....	31
Tabela 6. Transições monitoradas, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção. ....	40
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> . ....	46
Tabela 8. Equação da reta e coeficiente de determinação obtido para cada composto quando feitos por calibração externa e calibração por superposição na matriz. ....	52
Tabela 9. Limites de quantificação (LOQ), coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ), exatidão R (%), repetibilidade (RSDr), precisão intermediária (RSDpi) e efeito matriz (EM). ....	53
Tabela 10. Exatidão R(%) e repetibilidade para as diferentes espécies de peixe testadas. ....	53
Tabela 11. Comparação entre o método de VA-MSPD proposto, frente a outros métodos para extração de biocidas em pescado. ....	55
Tabela 12. Valores para as recuperações observada nos experimentos e os erros relativos para cada analito na concentração de 50 µg L <sup>-1</sup> . ....	63
Tabela 13. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual. ....	66
Tabela 14. Equação da reta e coeficiente de determinação obtido para cada composto quando feito por calibração externa, calibração por superposição na matriz e por diluição de adição de padrão. ....	69
Tabela 15. Limites de quantificação do método (LOQ), coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ), exatidão R(%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi). ....	71
Tabela 16. Exatidão R(%) e RSD(%) para as diferentes espécies de peixe testadas. ....	72
Tabela 17. Comparação entre o método de VA-MSPD proposto, frente a outros métodos de extração de agrotóxicos em amostras de pescado e camarão. ....	75

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

---

---

1. AOAC, Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
2. APCI, ionização química a pressão atmosférica, do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*
3. CI, ionização química, do inglês, *chemical ionization*
4. DAD, detecção por arranjo de diodos, do inglês, *diode-array detection*
5. DSAC, diluição por adição de padrão, do inglês, *dilution standard addition calibration*
6. ECD, detector por captura de elétrons, do inglês, *electron capture detector*
7. EI, impacto de elétrons, do inglês, *electron ionization*
8. ESI, eletrospray, do inglês, *electrospray interface*
9. FDA, agência reguladora norteamericana de alimentos e medicamentos, do inglês, *U.S. Food and Drug Administration*
10. FTD, detector termiônico, do inglês, *flame thermionic detector*
11. GC, cromatografia gasosa, do inglês, *gas chromatography*
12. HPLC UV, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, do inglês, *high-performance liquid chromatography with detection by ultraviolet*
13. IMO, Organização Marítima Internacional, do inglês, *International Maritime Organization*
14. IT, aprisionador de ions, do inglês, *ion trap*
15.  $K_{oc}$ , coeficiente de partição octanol carbono, do inglês, *octanol carbono partition coefficient*
16.  $K_{ow}$ , coeficiente de partição octanol água, do inglês, *octanol water partition coefficient*
17. LC, cromatografia líquida, do inglês, *liquid chromatography*
18. LLE, extração líquido-líquido, do inglês, *liquid-liquid extraction*
19. MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês, *microwave assisted extraction*

20. MF-LPME, microextração em fase líquida com microfunil suportado, do inglês, *microfunnel-supported liquid-phase microextraction*
21. MPC, concentração máxima permitida, do inglês, *maximum permissible concentration*
22. MS, espectrometria de massa, do inglês, *mass spectrometry*
23. MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês, *matrix solid phase dispersion*
24. NCI, ionização no modo negativo, do inglês, *negative chemical ionization*
25. NPD, detecção de Nitrogênio-Fósforo, do inglês, *nitrogen-phosphorus selective detection*
26. PLE, extração com líquido pressurizado, do inglês, *pressure liquid extraction*
27. PPCPs, produtos de cuidado pessoal, do inglês, *pharmaceutical personal care products*
28. PS II, foto sistema II, do inglês, *photo system II*
29. SBSE, extração por barra sortiva com agitação, do inglês, *stir bar sorptive extraction*
30. SDME, microextração em gota suspensa, do inglês, *single drop microextraction*
31. SPE, extração em fase sólida, do inglês, *solid phase extraction*
32. SPME, microextração em fase sólida, do inglês, *solid phase microextraction*
33.  $t_{1/2}$ , tempo de meia vida
34. TBT, tributilestanho, do inglês, *tributyltin*
35. VA-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex, do inglês, *vortex assisted matrix solid phase dispersion*

## RESUMO

---

**Título: Estudo e aplicação da dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) para determinação de biocidas anti-incrustantes em tecidos de pescado**

Autor: Augusto Alves Vieira

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Co-orientadores: Dra. Sergiane Souza Caldas e Prof. Dr. Gilberto Fillmann

Este estudo teve como objetivo propor dois métodos de extração e determinação para seis biocidas anti-incrustantes (irgarol, diuron, clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB), em músculo de três espécies de pescado *Micropogonias furnieri*, *Mugil liza* e *Cynoscion guatucupa*. A extração foi feita por dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) com detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para irgarol e diuron e por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB. Após a seleção das melhores condições, irgarol e diuron foram extraídos empregando 0,5 g de concha de mexilhão, 0,5 g de sulfato de sódio e 5 mL de etanol. Clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB foram extraídos empregando 0,2 g de amostra, 2,0 g de C18, 0,2 g de sulfato de sódio e 5 mL de acetato de etila (35 mmol L<sup>-1</sup> ácido acético). Os métodos apresentaram recuperações na faixa de 69-125% com RSDs abaixo de 18%. Os LOQs obtidos para irgarol, diuron e clorotalonil foram 5, 50 e 125 ng g<sup>-1</sup> respectivamente, enquanto que, para diclofluanida, DCOIT e TCMTB foi de 625 ng g<sup>-1</sup>. O uso da VA-MSPD para extração de biocidas de 3ª geração foi proposto pela primeira vez, apresentando-se como uma alternativa promissora para extração destes em tecido de pescado, com as vantagens de ser rápido, simples e de baixo custo (baixo consumo de reagentes). Além disto, o uso de etanol (bio-solvente) e concha de mexilhão (suporte sólido de fontes renováveis) foram utilizados. Adicionalmente, este estudo é o primeiro estudo que visa a extração de DCOIT e TCMTB em amostras de pescado.

**Palavras Chaves:** Biocidas anti-incrustante; pescado; preparo de amostra.

## **ABSTRACT**

---

### **Title: Study and application of vortex assisted matrix solid phase dispersion (VA-MSPD) to determine biocides antifouling in fish tissue**

Author: Augusto Alves Vieira

Advisor: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Co-advisor: Dra. Sergiane Souza Caldas e Prof. Dr. Gilberto Fillmann

This study aims to propose two methods for the extraction of six common booster biocides (irgarol, diuron, chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT and TCMTB) from fish muscle samples of *Micropogonias furnieri*, *Mugil liza* and *Cynoscion guatucupa*. Extractions were carried out using vortex-assisted matrix solid phase dispersion (VA-MSPD) with detection by liquid chromatography tandem mass spectrometry for irgarol and diuron and gas chromatography with electron capture detector for chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT and TCMTB. After selection of the best extraction conditions, irgarol and diuron were extracted using 0.5 g mussel shell, 0.5 g sodium sulfate and 5 mL ethanol. Chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT and TCMTB were extracted using 0.2 g of sample, 2.0 g C18, 0.2 g sodium sulfate and 5 mL ethyl acetate (35 mmol L<sup>-1</sup> acetic acid). Analytical recoveries ranged from 69 to 125%, with RSD below 18%. LOQ values of irgarol, diuron and chlorothalonil were 5, 50 and 125 ng g<sup>-1</sup>, respectively, while for dichlofluanid, DCOIT and TCMTB was 625 ng g<sup>-1</sup>. The use of VA-MSPD for the extraction of booster biocides was proposed by the first time, showing to be a promising alternative for the extraction of booster biocides from fish tissues with the advantages of being fast, simple and inexpensive (low consumption of reagents). Besides, the use of greener reagents as ethanol (bio-solvent) and mussel shell (solid support from renewable source) is successfully proposed. This is the first study that aims to extract DCOIT and TCMTB in fish tissue.

**Keywords:** Antifouling biocides, fish, sample preparation.



# 1 INTRODUÇÃO

---

---

O termo incrustação marinha está relacionado com a acumulação indesejada de organismos, seja ela por microrganismos, plantas e/ou por animais nas superfícies externas de objetos naturais ou artificiais submergidos ou semi-submergidos em ambientes aquáticos. Tal processo biológico está presente em todos os ambientes marinhos e é um grave problema para a indústria naval, uma vez que, tais incrustações podem causar diferentes problemas como, por exemplo, corrosão do casco e aumento do consumo de combustível, que dependendo pode chegar a um aumento de 50%, devido o aumento da fricção entre o casco disforme do navio e a água (YEBRA *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2009; DAFFORN *et al.*, 2011).

Para evitar esses problemas, tintas contendo biocidas anti-incrustantes são utilizadas em cascos de embarcações. Dependendo do período histórico, bem como os compostos presentes nestas tintas anti-incrustantes, as mesmas podem ser classificadas em três gerações (CASTRO *et al.*, 2011). A primeira geração de tintas é composta por óxido de cobre e zinco, estes foram os primeiros biocidas utilizados regularmente por meados do século XX (FERNANDEZ e PINHEIRO, 2007). Devido a baixa durabilidade das tintas e certa tolerância de alguns organismos incrustantes, uma segunda geração a base de compostos organoestânicos foi desenvolvida (YEBRA *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2011).

Dentre os compostos utilizados nestas tintas estão os organoestânicos, principalmente o tributilestanho (TBT, do inglês, *tributyltin*), que desde os anos 70 foi amplamente utilizado como revestimento em cascos de embarcações cobrindo cerca de 70% da frota naval (GODOI *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2009). Entretanto, devido aos sérios impactos causados em organismos secundários como, por exemplo, decréscimo na produção de ostras (ALZIEU, 2000), inibição do crescimento de algumas microalgas (HUANG *et al.*, 1993) e o desenvolvimento de imposex (surgimento de caracteres sexuais masculinos em moluscos gastrópodes fêmeas) em alguns moluscos (COSTA *et al.*, 2008), a Organização Marítima Internacional (IMO, do inglês, *International Maritime Organization*) em 2003 adotou a convenção para o banimento do uso destes compostos nas tintas (IMO, 2008).

Desta forma, uma nova geração de biocidas começa a ser utilizada nas formulações das tintas. Dentre os biocidas anti-incrustantes empregados, podem ser citados clorotalonil, Busan (TCMTB), diclofluanida, diuron, irgarol, Sea-Nine (DCOIT), TCMS Piridina, tiram e trifetilbornano piridina. Na parte de compostos metálicos (orgânicos e inorgânicos), podemos

encontrar Cobre Piritiona, Maneb, Naftenato de Cobre, óxido cuproso, tiocianato de cobre, zinco Piritiona e ziram, onde estes são denominados biocidas de 3ª geração ou biocidas de reforço (*booster biocides*), uma vez que estes complementam a ação anti-incrustante de metais (tal como cobre e zinco), que sozinhos não são suficientemente eficientes para proteção dos cascos das embarcações (YEBRA *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2009).

O grande fluxo de embarcações, tanto comercial como de lazer, faz com que haja um grande aporte de compostos anti-incrustantes no ambiente aquático, trazendo alguns efeitos tóxicos para organismos não alvos (YEBRA *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2011). Um dos primeiros biocidas de terceira geração encontrado no ambiente foi o Irgarol (THOMAS e LANGFORD, 2009) com o passar dos anos, outros trabalhos também detectaram a presença deste, em águas marinhas (SCARLETT A., 1999; THOMAS *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2001). Assim, estes estudos sugerem que os biocidas de terceira geração também podem sofrer processos de acumulação, podendo assim causar efeitos tóxicos a biota do local (THOMAS e LANGFORD, 2009).

Dada à necessidade de se determinar estes compostos em diferentes matrizes, diferentes técnicas de extração são aplicadas. Para amostras de sedimento marinho métodos de extração como agitação mecânica (HAMWIJK *et al.*, 2005; HARINO *et al.*, 2005b), ultrassom (THOMAS *et al.*, 2000; MARTINEZ e BARCELÓ, 2001), Soxhlet (SCARLETT A., 1999; BISELLI *et al.*, 2000) e extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês, *microwave assisted extraction*) (CASSI *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012) são os mais frequentemente utilizadas. Para amostras de água os métodos de extração mais aplicados são extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *liquid-liquid extraction*) (VOULVOULIS *et al.*, 1999b; HALL *et al.*, 2009), extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid phase extraction*) (SAKKAS *et al.*, 2002; HARINO *et al.*, 2005b) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*) (PENALVER *et al.*, 1999; LAMBROPOULOU *et al.*, 2002). Dentre os métodos descritos para biota, na maioria dos estudos, a matriz utilizada são bivalves, e as técnicas de extração são sonicação e agitação mecânica com solvente (HARINO *et al.*, 2006; THOMAS e LANGFORD, 2009; TSANG *et al.*, 2009). Para a matriz pescado, foram publicados até o momento apenas dois artigos, onde as técnicas utilizadas são MAE (ALEJANDRO *et al.*, 2014) e agitação mecânica com solvente (KAONGA *et al.*, 2015a), ambas seguida de SPE para extração de irgarol e diuron em tecido de pescado.

Como pode ser observado os métodos que vêm sendo empregados para biota demandam grande volume de solventes orgânicos, equipamentos caros, alto consumo de energia e alguns requerem equipamentos específicos para este fim. Em contra partida, a técnica de dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD, do inglês, *vortex*

*assisted matrix solid phase dispersion*), que traz como vantagem em relação às técnicas citadas anteriormente um baixo consumo de solvente, menor tempo de extração e menor custo, apresenta-se como uma técnica promissora, visto que, vem sendo aplicada com eficiência em diversos estudos utilizando pescado como matriz para análise de diferentes compostos (DUARTE *et al.*, 2013; ESCARRONE *et al.*, 2014; HERTZOG *et al.*, 2015).

Para que se tenha uma resposta adequada, além de um método de extração eficiente, métodos analíticos sensíveis e seletivos para quantificação destes compostos também são necessários. Dentre as técnicas para separar e quantificar os biocidas de terceira geração pode-se citar a cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*) acoplada a diferentes detectores como, por exemplo, detectores termiônico (FTD, do inglês, *flame thermionic detector*) (SAKKAS *et al.*, 2002), ou com detectores por captura de elétrons (ECD, do inglês, *electron capture detector*) (LAMBROPOULOU *et al.*, 2002). Embora, também existam trabalhos utilizando cromatografia líquida (LC, do inglês, *liquid chromatography*) acoplada a espectrometria de massas utilizando detector do tipo *ion trap* (IT) (DI LANDA *et al.*, 2009) e por quadrupolo simples ou triplo quadrupolo (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2008), que obtiveram êxito na quantificação de biocidas de terceira geração.

Tendo em vista que o preparo de amostra é uma etapa crucial no processo de quantificação de contaminantes em qualquer tipo de matriz (WEN *et al.*, 2014), é de grande importância o estudo e aprimoramento desta etapa para determinação de biocidas anti-incrustantes em tecidos de pescado uma vez que este tipo de alimento é amplamente consumido ao redor do mundo, além destes serem potenciais indicadores de contaminação ambiental (DÓREA, 2008).

## 2 OBJETIVOS

---

---

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar dois métodos utilizando a VA-MSPD seguida da determinação por LC-MS/MS e GC-ECD para extração e quantificação de seis biocidas anti-incrustantes em músculo de pescado.

### 2.1 Objetivos específicos

- ❖ Otimizar os parâmetros envolvidos na etapa da VA-MSPD, buscando o uso de suportes sólidos alternativos e o uso de solventes com menor toxicidade;
- ❖ Validar o método para determinação de biocidas anti-incrustantes em músculo de corvina (*Micropogonias furnieri*), avaliando limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica, linearidade, exatidão, precisão e o efeito de matriz;
- ❖ Demonstrar a aplicabilidade do método validado em outras espécies de peixe, tainha (*Mugil liza*) e pescada (*Cynoscion guatucupa*).

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

---

---

### 3.1 Biocidas

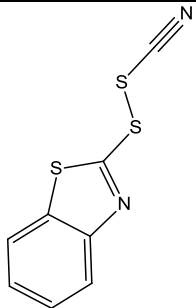
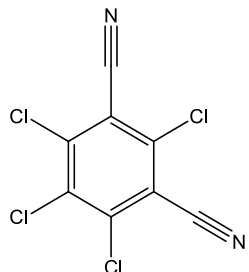
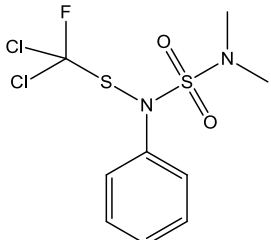
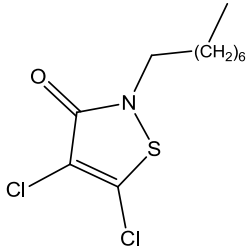
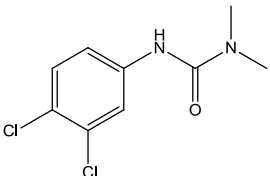
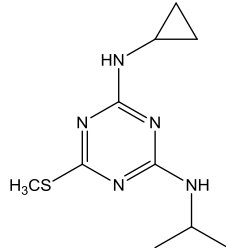
#### 3.1.1 Conceitos gerais

Biocidas são utilizados em diversas aplicações, entretanto suas funções mais difundidas são a preservação e desinfestação de superfícies, estando associados aos praguicidas, que são agentes químicos que protegem contra a biodegradação. Embora a necessidade dos biocidas ainda seja grande, seu uso nas últimas décadas tem sido restrito. A restrição destes compostos está relacionada a possíveis danos ao meio ambiente e a sua toxicidade (ROSSMOORE, 1995).

Os biocidas anti-incrustantes podem ser divididos em duas classes, os não metálicos e os metálicos. Neste trabalho, apenas serão estudados os biocidas pertencentes a classe dos não metálicos que incluem compostos com diferentes funções orgânicas como, por exemplo, benzotiazóis, compostos clorados, triazinas, entre outros (FERNANDEZ e PINHEIRO, 2007).

A seguir, na Tabela 1, estão representadas algumas características físico-químicas de alguns biocidas anti-incrustantes, assim como suas estruturas químicas.

**Tabela 1.** Principais propriedades físico-químicas de alguns biocidas anti-incrustantes de 3ª geração.

	Busan/TCMTB	Clorotalonil	Diclofluanida	DCOIT	Diuron	Irgarol
Estrutura						
M.M.	238,35	265,91	333,23	282,23	233,09	253,37
S.A.(mg L <sup>-1</sup> )	45	0,6	0,006	0,0065	36,4	7
Log K <sub>ow</sub>	3,3	2,64	3,7	2,85	2,85	3,95
P.E. (°C)	-	350,5	336,8	322,6	385,2	428

M.M.= massa molar; S.A. = solubilidade em água; P.E. = ponto de ebulição

### 3.1.2 Busan/TCMTB

O TCMTB [2-(tiocianato-metil) benzotiazol] é um composto orgânico pertencente ao grupo dos tiazóis. Este composto não está limitado a aplicações em tintas anti-incrustantes, e também pode ser utilizado como fungicida na preservação de madeira e na indústria de couro (VOULVOULIS *et al.*, 1999a).

Algumas propriedades físico-químicas deste composto podem ser observadas na Tabela 1. O tempo de meia vida no ambiente aquático é de 1,5 e 3,8 h e o principal meio de degradação do TCMTB é através da fotólise. O processo de fotólise do TCMTB gera majoritariamente o 2-mercaptobenzotiazol (MBT, pKa = 6,94) e em menor quantidade o benzotiazol (BT). Dada à rápida degradação deste composto, o seu metabólito majoritário, MBT, é de fundamental importância para estudos de toxicidade ambiental do TCMTB (SAKKAS *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por BROWNLEE *et al.* (1992) relata que o TCMTB sofre hidrólise e metilação em ambientes aquáticos, o que acaba dificultando a determinação do seu  $K_{oc}$  (coeficiente de partição octanol-carbono). Embora o principal meio de degradação deste composto seja através da fotólise, o mesmo também é degradado através da hidrólise, porém, de uma maneira mais lenta. A permanência do TCMTB no ambiente aquático quando não há processos paralelos de degradação por luz, está diretamente relacionado com o pH sendo assim, na faixa de 5-7 a meia vida do TCMB pode chegar a 35 d. Por outro lado, em pH 9, a hidrólise é favorecida e seu tempo de meia vida cai para 2-3 d (VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2001).

Com relação à toxicidade, o TCMTB atua como um inibidor da cadeia de transferência de elétrons a nível mitocondrial, assim como irgarol e diuron. Entretanto, em um estudo que avaliou a toxicidade em alga (*Selenastrum capricornutum*), crustáceo (*Daphnia magna*) e com uma bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*), o TCMTB apresentou toxicidade a todos os organismos citados (FERNÁNDEZ-ALBA *et al.*, 2002).

As técnicas analíticas comumente empregadas para esse composto em amostras ambientais são LC e GC acoplado a espectrometria de massas. Dentre as técnicas de preparo de amostra utilizadas se destacam agitação mecânica com solvente e extração em fase sólida (FERNANDEZ e PINHEIRO, 2007).

### 3.1.3 Clorotalonil

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrila) é um composto organoclorado pertencente ao grupo das isofaltonitrilas (Tabela 1). Devido ao seu amplo espectro de toxicidade como

fungicida, possui uma grande utilização na agricultura, e também é usado como agente biocida em tintas anti-incrustantes de terceira geração.

Estudos relatam que a degradação do clorotalonil em água marinha ocorre após quatro semanas, entretanto na presença de bactérias sua degradação ocorre mais rapidamente. Em um estudo realizado por WALKER *et al.* (1988), constatou-se que o tempo de degradação deste composto em água estuarina e de sedimento foi bem inferior, de 1,8 a 8 d (WALKER *et al.*, 1988; SAKKAS *et al.*, 2006). Devido a sua instabilidade frente à luz, quando na coluna d'água, o clorotalonil pode sofrer o processo de fotodegradação, assim, apresentando um tempo de meia vida de algumas horas (SAKKAS *et al.*, 2006).

A partição do clorotalonil na fase sedimentada ou em partículas suspensas é favorecido em um pH próximo a 8. Devido a isso, assim como sua alta degradabilidade frente à radiação UV e bactérias, poucos trabalhos têm encontrado esse composto na fase dissolvida, assim, sendo associado geralmente com um contaminante da fase sedimentada (ALBANIS *et al.*, 2002; VOULVOULIS, 2006).

Os principais produtos gerados na degradação do clorotalonil são a benzamida, cloro-1,3-dicianobenzeno, dicloro-1,3-dicianobenzeno e o tricloro-1,3-dicianobenzeno, entretanto os metabólitos provenientes da degradação do clorotalonil são dependentes do meio (água natural, água do mar ou sedimento) e da forma de degradação (fotólise ou degradação bacteriana) (SAKKAS *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Estudos mostram que a toxicidade do clorotalonil para os fungos se deve ao fato deste composto inibir a oxidação da glicose. Em relação aos peixes, estudos mostraram que espécies como o bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e galáxias manchado (*Galaxias truttaceus*) apresentam grande sensibilidade a esse composto, sendo que 29  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em um período de 96 h, suficiente para matar metade da população de todas as espécies descritas (DAVIES, 1985; GALLAGHER *et al.*, 1991).

As técnicas de preparo de amostra mais comumente utilizadas para extração de clorotalonil em diferentes tipos de água são a extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid phase extraction*), seguida da extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *liquid-liquid extraction*). Para sedimento, destaca-se a técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês, *microwave assisted extraction*) com uma mistura de acetona e hexano (1:1 v/v) (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Em relação à quantificação do clorotalonil, a técnica de GC é preferencialmente aplicada. Dentre as técnicas de GC mais utilizadas, pode-se citar a acoplada a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) e com detector por captura de elétrons (HERNANDO *et al.*, 2001; ALBANIS *et al.*, 2002; LAMBROPOULOU *et al.*, 2003). Entretanto, alguns trabalhos utilizam a técnica de LC geralmente acoplada a um MS e com



ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*) (FERRER e BARCELÓ, 1999; MARTÍNEZ *et al.*, 2000).

#### 3.1.4 Diclofluanida

A diclofluanida (N,N-dimetil-N'-fenil-N'-(diclorodiclorofluorometilo)sulfamida), é uma sulfamida podendo também, ser classificada como pertencente aos organoclorados. Este composto, devido ao seu elevado  $\text{LogK}_{ow}$  (Tabela 1) apresenta uma forte tendência a estar agregado ao material particulado ou associado ao sedimento, principalmente em pH próximo a 8 (VOULVOULIS, 2006).

A diclofluanida não é um composto estável na coluna d'água, tendo um tempo de meia vida de algumas horas. Seus produtos de degradação são a N,N-dimetil-N'-fenil-sulfonamida (DMSA), N-cloro-difluormetil-tio anilina, anilina e o diclorofluormetano. Entretanto, o mais importante destes compostos é o DMSA. A quantidade e o tempo para formação deste metabólito são dependentes de fatores como pH, concentração de bactérias na coluna d'água, quantidade de luz incidida e concentração de matéria orgânica, podendo esta última ser responsável por inibir ou acelerar o processo de degradação (SAKKAS *et al.*, 2001; VOULVOULIS, 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Segundo FERNÁNDEZ-ALBA *et al.* (2002), a diclofluanida pode apresentar efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Neste estudo, três organismos foram expostos a este composto, uma bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*), uma microalga (*Selenastrum capricornutum*) e um microcrustáceo (*Daphnia magna*), por um período de 12 min, 48 h e 72 h, onde a concentração necessária para matar metade da população ( $\text{EC}_{50}$ , do inglês, *toxicity end-point*) foi de 15,7; 1,33 e 21  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Em outro estudo, dirigido por BELLAS (2006) constatou-se que a diclofluanida, apresenta baixa toxicidade para larvas de *Mytilus edulis*, *Paracentrotus lividus* e *Ciona intestinalis* (BELLAS, 2006).

Pelo fato da diclofluanida estar mais associada ao sedimento, geralmente este composto não é encontrado na coluna d'água (VOULVOULIS, 2006). Entretanto, esse composto tem sido detectado em sedimentos provenientes da Grécia e da Espanha. Cabe destacar que as concentrações encontradas geralmente são maiores após uma época de grande fluxo de embarcações (ALBANIS *et al.*, 2002; SAKKAS *et al.*, 2002; VOULVOULIS, 2006).

A principal técnica de preparo de amostras para determinação de diclofluanida em diferentes tipos de água é a SPE, entretanto, outras técnicas como, por exemplo, LLE e a microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *single drop microextraction*) também têm sido utilizadas. Já para sedimentos as técnicas de MAE, agitação mecânica com solvente e uso de ultrassom se destacam (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

A quantificação de diclofluanida pode ser feita tanto por GC quanto por LC, entretanto quantificações utilizando a técnica de GC, acoplada a detectores mais seletivos como detector ECD ou MS por ionização química (CI, do inglês, *chemical ionization*) geram menores limites de detecção (HERNANDO *et al.*, 2006). Embora existam mais trabalhos utilizando a técnica de GC para quantificação de diclofluanida (PENALVER *et al.*, 1999; POCURULL *et al.*, 2000; LAMBROPOULOU *et al.*, 2003; HAMWIJK *et al.*, 2005), também existe trabalhos aplicando a LC-MS com fonte APCI para quantificação de diclofluanida (FERRER e BARCELÓ, 1999; MARTINEZ e BARCELÓ, 2001).

### 3.1.5 DCOIT

O Sea-nine 211 apresenta como princípio ativo o DCOIT (4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona), que é pertencente do grupo dos isotiazóis. Este composto, apresenta uma atividade elevada contra bactérias, fungos, algas e alguns invertebrados marinhos (CALLOW e WILLINGHAM, 1996). Como características químicas apresenta baixa solubilidade em água (Tabela 1) e uma rápida degradação no meio aquático (JACOBSON e WILLINGHAM, 2000; SAKKAS *et al.*, 2006). Tem uma forte estabilidade quando complexado com o sedimento, sendo assim, pouco acessível à biota (TAKAHASHI, 2009).

Após liberado no ambiente, o DCOIT, se degrada rapidamente (<1 d) tendo assim, o rompimento do seu anel, gerando uma redução de 4 a 5 em sua toxicidade. Por outro lado, sua estabilidade no ambiente pode aumentar quando introduzido no sedimento associado a partículas de tinta (THOMAS *et al.*, 2003). A principal forma de degradação deste composto é através de atividade bacteriana, uma vez que, sua degradação por esse meio ocorre 200 vezes mais rápida do que através de processos de fotólise (THOMAS *et al.*, 2003; SAKKAS *et al.*, 2006).

Devido às características do DCOIT, este pode ser considerado um dos biocidas de terceira geração mais ideal para utilização, uma vez que, este composto se degrada rapidamente no meio ambiente, tem uma rápida partição no ambiente (o que resulta em uma menor biodisponibilidade para organismo não-alvos), apresenta baixa toxicidade para outros organismos do ambiente aquático e mínima bioacumulação (JACOBSON e WILLINGHAM, 2000).

O DCOIT pode ser facilmente extraído de amostras de água utilizando como técnica de preparo de amostra a SPE, com cartuchos de C18 ou poliméricos (THOMAS e LANGFORD, 2009). Outras técnicas de extração para este composto em diferentes tipos de água também podem ser utilizadas, tais como, SDME (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2004) e SPME (LAMBROPOULOU *et al.*, 2002). Já para sedimentos, as técnicas que se destacam são o uso

de ultrassom (MARTINEZ e BARCELÓ, 2001), agitação mecânica com solvente (HARINO *et al.*, 2005b) e MAE (CASSI *et al.*, 2008).

O DCOIT apresenta a versatilidade de ser quantificado tanto por GC como por LC, pelo fato de possuir dois átomos de cloro em sua estrutura, a utilização de GC-ECD pode apresentar uma melhora na sensibilidade do método. Resultados satisfatórios também podem ser obtidos, utilizando as técnicas de GC e LC acopladas à espectrometria de massas com EI, APCI ou ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês, *eletrospray ionization*) (HERNANDO *et al.*, 2006; THOMAS e LANGFORD, 2009).

### 3.1.6 Diuron

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) é um herbicida comumente utilizado na agricultura e como biocida anti-incrustante (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004; ALEJANDRO *et al.*, 2014). Embora este composto seja utilizado na agricultura, seus níveis ambientais são maiores em água do mar do que em água doce, o que reforça sua ampla difusão como anti-incrustante (LAMOREE *et al.*, 2002; VOULVOULIS, 2006). Este composto é relativamente persistente no ambiente aquático e estável a processos de fotodegradação (CALLOW e WILLINGHAM, 1996), ao contrário de outros compostos como TCMTB, DCOIT, diclofluanida e clorotalonil, o diuron tem uma baixa tendência em se adsorver no sedimento (VOULVOULIS *et al.*, 2002).

Quando liberado no ambiente marinho, a degradação do diuron através de processos aeróbicos resulta na formação do 1-(3,4-diclorofenil)-3-dimetilureia (DCMPU, do inglês, *1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea*) e do 1-(3,4-diclorofenil) ureia (DCPU, do inglês, *1-(3,4-dichlorophenyl)urea*) e quando submetido a processos de degradação anaeróbicos pode gerar o 1-(3-clorofenil)-3,1-dimetilureia (CPDU, do inglês, *1-(3-chlorophenyl)-3,1-dimethylurea*) (THOMAS e LANGFORD, 2009).

A toxicidade do diuron é muito mais elevada para fitoplânctons e para macrófitas, ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ ), do que para outros organismos marinhos como zooplâncton e peixes. Isto ocorre, devido a sua atuação no sistema de transporte de elétrons da fotossíntese, onde, bloqueia o foto sistema II (PS II, do inglês, *photo system II*), que acaba gerando uma redução na captação de  $\text{CO}_2$  o que conseqüentemente vai gerar uma baixa na produção de carboidratos (FAI *et al.*, 2007; MOCHIDA e FUJII, 2009; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011b).

No que diz respeito à análise de diuron no ambiente, esse composto vem sendo analisado em diferentes matrizes, tais como diferentes tipos de água (FERRER e BARCELÓ, 1999; LAMOREE *et al.*, 2002; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2008), sedimento marinho (THOMAS *et al.*, 2000; MARTINEZ e BARCELÓ, 2001) e pescados (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; KAONGA *et al.*, 2015a). As técnicas de preparo de amostras utilizadas para extrair este

composto em diferentes tipos de matriz são LLE (VOULVOULIS *et al.*, 1999b), SPE (SAKKAS *et al.*, 2002), agitação mecânica (HARINO *et al.*, 2005b), sonicação (MARTINEZ e BARCELÓ, 2001), extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês, *pressure liquid extraction*) (COMBER *et al.*, 2002) e MAE (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O diuron é um composto termicamente instável, dado isto, sua análise por GC necessita de uma etapa de derivatização para que este composto se torne estável (HERNANDO *et al.*, 2006). Por outro lado, este composto apresenta uma boa resposta por LC com detectores de MS e embora saiba-se que herbicidas com grupamento ureia não tenham grande absorção por UV ou luz visível, existem alguns trabalhos que quantificam este composto por LC com detecção por arranjo de diodos (DAD, do inglês, *diode-array detection*) (HERNANDO *et al.*, 2006).

### 3.1.7 Irgarol

O irgarol (2-metiltio-4-*terc*-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um herbicida pertencente ao grupo das triazinas e assim como o diuron, é um dos biocidas anti-incrustante comumente utilizado (ALEJANDRO *et al.*, 2014). O primeiro trabalho a detectar este composto no ambiente foi conduzido por Cote d'Azur em 1993 no mediterrâneo da França (KONSTANTINOUS e ALBANIS, 2004; READMAN, 2006; CASTRO *et al.*, 2011). Este composto apresenta uma alta estabilidade, tanto em água do mar ( $t_{1/2}$  100 dias) quanto na doce ( $t_{1/2}$  200 dias) (CALLOW e WILLINGHAM, 1996; SCARLETT A., 1999). Esta persistência também pode ser observada no sedimento, uma vez que, o irgarol apresenta uma grande estabilidade mesmo em condições aeróbias (THOMAS *et al.*, 2003).

O principal produto de degradação do Irgarol é o M1 (2-metiltio-4-*terc*-butilamino-6-amino-s-triazina). Este composto pode ser formado através da n-desalquilação por processo de biodegradação (LIU *et al.*, 1997), fotodecomposição (KONSTANTINOUS e ALBANIS, 2004) ou hidrólise (LIU *et al.*, 1999), entretanto para que a hidrólise ocorra, deve-se ter presente mercúrio (Hg) como catalisador (ARAI *et al.*, 2009). Assim como o irgarol, o seu principal metabólito, M1, se apresenta altamente estável no ambiente aquático com  $t_{1/2}$  similar ao do irgarol (OKAMURA *et al.*, 2000). Outros metabólitos possíveis para o irgarol são o M2 (2-amino-propanal-4-*terc*-butilamino-6-metiltio-s-triazina) e o M3 (2,4(diamino-di-*terc*-butil)-6-metiltio-s-triazina) (LAM *et al.*, 2005).

Assim como o diuron, o irgarol é um composto que atua no PS II, sendo assim mais prejudicial para plânctons (FAI *et al.*, 2007; MOCHIDA e FUJII, 2009). Estudos sobre a toxicidade do M1 também tem sido conduzidos, sendo que, em geral, o irgarol apresenta uma toxicidade maior que o M1 para os organismos marinhos (OKAMURA *et al.*, 2000; GATIDOU *et al.*, 2007).

As técnicas de preparo de amostra utilizadas para a extração do irgarol e/ou seus metabólitos em diferentes tipos de amostras de água são LLE utilizando como solvente de extração diclorometano (VOULVOULIS *et al.*, 1999b; HALL *et al.*, 2009) e SPE (SAKKAS *et al.*, 2002; HARINO *et al.*, 2005a). Já para amostras de sedimento são utilizadas as técnicas de ultrassom com metanol (MARTINEZ e BARCELÓ, 2001) e com metanol/acetato de etila (THOMAS *et al.*, 2000) ou agitação mecânica (THOMAS *et al.*, 2000; HARINO *et al.*, 2005b). Também existem estudos avaliando a concentração de irgarol em tecido de pescado utilizando MAE como preparo de amostra seguida de SPE (ALEJANDRO *et al.*, 2014) e com a aplicação da agitação mecânica, também seguida de SPE (KAONGA *et al.*, 2015a).

O irgarol pode ser facilmente analisado por GC com detecção por MS ou com detecção de Nitrogênio-Fósforo (NPD, do inglês, *nitrogen-phosphorus selective detection*), e por LC-MS (SCARLETT A., 1999; VOULVOULIS *et al.*, 1999b; BISELLI *et al.*, 2000; LAMOREE *et al.*, 2002; GATIDOU *et al.*, 2007).

### 3.2 Legislação e controle

Depois do decreto da Comunidade Europeia em 1989, restringindo o uso de tributilestanho (TBT, do inglês, *tributyltin*) e com a criação de uma nova classe de tintas anti-incrustantes baseadas na utilização dos denominados *booster biocides*, uma nova legislação restringindo o uso de algum destes compostos entrou em vigor (Tabela 2).

**Tabela 2.** Compostos permitidos na formulação de tintas para embarcações < 25 m.

Composto	UK	França	Grécia	Espanha	Suécia	Dinamarca	Holanda
	*	**	**	**		***	***
Diuron	-	+	+	+	n.e.	-	-
Irgarol	-	+	+	+	-	-	+
Clorotalonil	-	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.
Diclofluanida	+	+	+	+	n.e.	n.e.	+
DCOIT	-	n.e.	n.e.	+	n.e.	+****	n.e.
TCMTB	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

\* Reino Unido; n.e. = não encontrado; + = permitido; - = proibido;

\*\* legislação muito limitada (a princípio, todos podem ser utilizados);

\*\*\* regulamentação em aberto;

\*\*\*\* produto aprovado, mas pouco utilizado.

Embora exista esta legislação, muitas vezes, a legislação não é bem clara sobre o uso destes compostos. Como pode ser observado para França, Grécia e Espanha onde a princípio

o uso de todos é permitido ou como na Suécia, onde embora só seja permitido o uso de irgarol, na há nada especificado para os outros compostos (READMAN *et al.*, 2002; THOMAS e BROOKS, 2010).

Dado que os biocidas podem apresentar risco para o meio ambiente, algumas autoridades ambientais de diferentes países propuseram legislações que estabelecem limites máximos de resíduos em água, solo e sedimento. Uma das principais legislações utilizada como referência a nível mundial é a proposta pelas autoridades holandesas (*Ducht authorities*), que é baseada nos limites de risco nos compartimentos ambientais (VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN, 2004). A seguir, na Tabela 3, estão descritos os valores de Concentração Máxima Permissível (MPC, do inglês, *Maximum Permissible Concentration*) no ambiente para alguns biocidas.

**Tabela 3.** Concentração Máxima Permissível (MPC) proposta pelas autoridades holandesas para o Irgarol 1051, Diuron e TCMTB.

Biocida	MPC na água (ng L <sup>-1</sup> )	MPC no sedimento (ng g <sup>-1</sup> )
Irgarol	24	1,4
Diuron	430	9,0
TCMTB	380	n.e

n.e: não estabelecido

### 3.3 Níveis ambientais

O irgarol é um dos compostos anti-incrustantes mais detectados ao redor do mundo (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013b), isto pode ser atribuído a sua grande estabilidade na coluna d'água, cerca de 100 a 350 d (THOMAS *et al.*, 2002). A concentração deste composto no ambiente varia de 5-4800 ng L<sup>-1</sup>, sendo a última o maior valor já reportado para este composto (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013b).

Outro biocida amplamente utilizado é o diuron, sua estabilidade é comparável a do irgarol, podendo apresentar estabilidade na coluna d'água de 43 a 2180 dias (THOMAS *et al.*, 2002; SALEH *et al.*, 2016). Estes compostos têm sido detectados em amostras de água em locais como França, Estados Unidos, Reino Unido, Japão, China e Brasil (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentrações de biocidas encontrados em diferentes regiões do globo para amostras de água do mar.

Lugar	Ano da coleta	Composto	Maior concentração detectada	Referência
Panamá	2016	Diuron Irgarol	70 ng L <sup>-1</sup> 5 ng g L <sup>-1</sup>	(BATISTA-ANDRADE <i>et al.</i> , 2016)
Brasil	2014	Diuron Irgarol	20,9 ng L <sup>-1</sup> 6,2 ng L <sup>-1</sup>	(DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 2014)
Brasil	2010-2011	Diuron Irgarol	7800 ng L <sup>-1</sup> 4800 ng L <sup>-1</sup>	(DINIZ, 2011)
EUA	2013	Diuron Irgarol	68 ng L <sup>-1</sup> 254 ng L <sup>-1</sup>	(SAPOZHNIKOVA <i>et al.</i> , 2013a)
Japão	2014	Diuron Irgarol	2180 ng L <sup>-1</sup> 1070 ng L <sup>-1</sup>	(KAONGA <i>et al.</i> , 2015b)
Japão	2010	DCOIT	11000 ng L <sup>-1</sup>	(MOCHIDA <i>et al.</i> , 2015)
Grécia	1999-2000	Clorotalonil Diclofluanida Irgarol DCOIT	37 ng L <sup>-1</sup> 138 ng L <sup>-1</sup> 41 ng L <sup>-1</sup> 49 ng L <sup>-1</sup>	(SAKKAS <i>et al.</i> , 2002)

Outros biocidas como clorotalonil, diclofluanida e DCOIT são menos frequentes, entretanto existem estudos que detectam estes compostos em amostras de água (Tabela 4).

### 3.4 Peixes

Os peixes são considerados uma fonte de alimento de grande importância nutricional, uma vez que, estes são fornecedores de um importante ácido graxo poliinsaturado, o ômega-3, além de ser fonte de proteínas de alta qualidade (DAVIGLUS *et al.*, 2002; LICHTENSTEIN *et al.*, 2006). Segundo estudos, o consumo de 57 g por semana está relacionado à redução na probabilidade de morte súbita e doenças arteriais em adultos (DAVIGLUS *et al.*, 2002; LICHTENSTEIN *et al.*, 2006).

Os peixes são seres filtradores e por este fato, tendem a acumular contaminantes presentes no seu habitat, principalmente quando estes contaminantes possuem características de serem persistente no meio ambiente ( $\text{LogK}_{ow} > 3$ ;  $t_{1/2} > 50$  dias), sendo assim, estes podem

ser indicadores ambientais de contaminação em ambiente aquático (GOKSØYR, 1995; DÓREA, 2008; THOMAS e BROOKS, 2010).

Segundo Dórea (2008) é importante conhecer os riscos tóxicos que os compostos xenobióticos podem causar aos peixes, uma vez que, estes são de grande importância nutricional para os seres humanos, mas ao mesmo tempo são potenciais meios de contaminação, principalmente quando os peixes possuem hábitos demersais (peixes de fundo, geralmente em associação com o substrato), estando geralmente associados ao substrato ou fundo rochoso com uma alimentação baseada em pequenos vermes, moluscos, algas e algumas vezes restos de outros peixes e ou detritos vegetais como é o caso da corvina (*Micropogonias furnieri*) da tainha (*Mugil liza*) e da pescada (*Cynoscion guatucupa*) (DÓREA, 2008).

### 3.5 Preparo de amostra

Dentre as etapas envolvidas em um processo analítico como amostragem, preparo de amostra, separação, detecção e análise dos dados, o preparo de amostra é a etapa que consome maior tempo em todo o procedimento, cerca de 80% do tempo total e, além disso, gera um grande volume de resíduos (CHEN *et al.*, 2008). Devido a isto, a Química Analítica tem voltado os esforços para a busca de métodos que demandem menores tempos de extração, menor exposição do analista, o uso de menores quantidades de solventes ou uso de solventes menos agressivos ao ambiente e mais baratos (WEN *et al.*, 2014).

O objetivo do preparo de amostra é isolar o(s) composto(s) de interesse em um extrato livre de compostos que possam interferir na detecção, quando necessário pré-concentrar ou transformá-los para que se adequem à análise (CHEN *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2014; WEN *et al.*, 2014). Por isto, o preparo de amostra também é tido com uma das etapas mais críticas do procedimento analítico, uma vez que, esta etapa influencia em todas as etapas posteriores para confirmação e quantificação dos analitos (CHEN *et al.*, 2008).

No processo de isolamento do(s) analito(s) deve-se obter um extrato final límpido, relativamente livre de impurezas que possam interferir na quantificação do(s) composto(s) desejado(s) ou danificar o equipamento. Essa etapa de limpeza também conhecida como *clean up* pode ser realizada concomitantemente com o processo extração ou posterior a ele (RIDGWAY *et al.*, 2007; HELALEH *et al.*, 2012).

#### 3.5.1 Técnicas de preparo de amostra

Técnicas de preparo de amostras como as desenvolvidas por Mills (1963), Becker (1971), Luke (1975), Specht e Tilkes (1980) são consideradas tradicionais, servindo assim, como técnicas de comparação para o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra para extração de compostos orgânicos. Além destas, técnicas como extração tipo



Soxhlet, extração por ultrassom, extração por fluido supercrítico e MAE são consideradas técnicas de referência, para órgãos como a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*), FDA, ou com uma maior difusão na literatura, para extração de contaminantes orgânicos em diferentes matrizes (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; NIELSEN, 2010). A seguir, serão enunciadas vantagens e desvantagens de algumas técnicas de preparo de amostras.

Como primeira técnica a ser enunciada, tem-se o Soxhlet, que apresenta vantagens como não necessitar de filtração, não ser dependente da matriz, ser robusta e ser considerada uma técnica de referência. As desvantagens são extrações longas (24-48 h) grandes quantidades de solvente (300-500 mL) e em alguns casos a necessidade de evaporação. Em seguida, a extração por ultrassom apresenta vantagens como não possuir limitação quanto ao tipo de amostra, apresenta baixos tempos de extração (10-45 min) e grandes quantidades de amostra (2-30 g). Como desvantagens apresenta um grande consumo de solventes (100-300 mL) e necessita posterior evaporação. A extração por fluido supercrítico, apresenta como vantagens extrações rápidas (30-75 min), baixo uso de solvente (5-10 mL) e ser uma técnica que atende os preceitos da química verde. Como desvantagem, apresenta um alto custo e equipamentos sofisticados, baixa quantidade de amostra, existe limitações na escolha da matriz e aplicabilidade limitada. Por último, a extração assistida por micro-ondas traz como vantagens a não necessidade de se filtrar a amostra, rápidas extrações (20-30 min), baixo consumo de solventes (30 mL) e grandes quantidades de amostra (2-20 g). Como desvantagens, podemos citar a necessidade da utilização de solventes polares, uma etapa de *limpeza* e a possibilidade de ocorrer à degradação dos analitos (KOU e MITRA, 2003).

Em contrapartida, novos métodos vêm sendo desenvolvidos baseados em técnicas como QuEChERS (QuEChERS, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Saffety*), MSPD, SPE, Micro Extração em Fase Sólida e Extração Sortiva com Barra de Agitação, que são passíveis de modificações como, por exemplo, diminuição no volume de solvente e capacidade de utilização de materiais de fontes renováveis (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2011; HERTZOG *et al.*, 2015; ROMBALDI *et al.*, 2015). A seguir, na Tabela 5 estão apresentados alguns métodos, principalmente baseados na MSPD, que tem sido aplicado para extração de diferentes contaminantes em tecidos de pescado.

**Tabela 5.** Métodos desenvolvidos para extração de compostos orgânicos em tecido de pescado.

Amostra	Analitos	Técnica de extração	Características	Técnica de Quantificação	Desempenho Analítico	Ref.
Tecido de pescado	18 agrotóxicos	QuEChERS	15 mL MeCN	LC-MS/MS	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ): 0,17 – 11 R(%): 70 – 101	(ROCHA <i>et al.</i> , 2015)
Tecido de pescado	5 compostos diclorados	MSPD	20 mL hexano	GC-MS	LOQ (pg g <sup>-1</sup> ): 0,009 – 0,015 R(%): 73 – 98	(CHEN <i>et al.</i> , 2014)
Tecido de pescado	26 agrotóxicos clorados	MSPD	20 mL diclorometano: hexano	GC-MS	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ): 0,29 – 3,4 R(%): 68 – 107	(HELA e PAPADOPOULOS, 2013)
Tecido de pescado	7 agrotóxicos	VA-MSPD	5 mL MeCN	GC-MS	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ): 130 – 1250 R(%): 56 – 107	(CALDAS <i>et al.</i> , 2013a)
Tecido de pescado	8 agrotóxicos	MSPD	7 mL MeCN	LC-MS	LOD (ng g <sup>-1</sup> ): 4,7 – 6,5 R(%): 85 – 118	(CARRO <i>et al.</i> , 2012)

### 3.5.2 Dispersão da matriz em fase sólida e suas modificações

A técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês, *matrix solid phase dispersion*) foi desenvolvida por BARKER *et al.* (1989) para extração de drogas de tecido bovino. Após seu desenvolvimento, um grande número de trabalhos vem utilizando esta técnica no preparo da amostra para extração de compostos de diferentes classes nas mais diversas amostras (sólidas e semissólidas) (CAPRIOTTI *et al.*, 2015).

O princípio desta técnica se baseia na quebra/dispersão da estrutura física da amostra com um suporte sólido apropriado com o auxílio de um pistilo e um gral. Este processo de homogeneização promove um aumento na superfície de contato para que o solvente interaja e extraia o(s) analito(s), além de, em alguns casos promover a limpeza da amostra (HERTZOG *et al.*, 2015; ZIARRUSTA *et al.*, 2015). Além do processo de extração e limpeza na mesma etapa, a MSPD se tornou popular por sua viabilidade e versatilidade (ZIARRUSTA *et al.*, 2015).

Devido à versatilidade da MSPD diferentes modificações vêm sendo propostas para esta técnica, onde a principal está associada à etapa da escolha do suporte sólido (CAPRIOTTI *et al.*, 2015). Dentro da busca de novos suportes sólidos podem ser citados estudos que visam a utilização de materiais de fontes renováveis e consequentemente ambientalmente amigáveis, como observado no estudo de Rombaldi *et al.*, (2015) onde a concha de mexilhão foi utilizada como suporte sólido para extração de agrotóxicos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês, *Pharmaceutical Personal Care Products*) de tecidos de mexilhão (ROMBALDI *et al.*, 2015). Outros estudos que podem ser citados são os de Hertzog *et al.* (2015) e Villaverde-de-Sáa *et al.* (2012) que utilizaram terra de diatomácea na etapa de dispersão da amostra de pescado para extração de fármacos e em amostras de moluscos para a extração de perfluorados, respectivamente (VILLAVERDE-DE-SÁA *et al.*, 2012; HERTZOG *et al.*, 2015).

Como a etapa de dispersão não é considerada uma etapa de extração, subsequente a esta etapa, é necessário se efetuar um processo de extração, originalmente feito por SPE (BARKER *et al.*, 1989). Com o passar dos anos novas propostas para esta etapa foram estudadas, tais como, a utilização de ultrassom (banho ou sonda) e a utilização do vórtex (SEBASTIÀ *et al.*, 2010; BARFI *et al.*, 2013; CALDAS *et al.*, 2013b). A utilização do vórtex na etapa de extração traz vantagens como aumento na interação solvente e amostra, menor tempo de extração, menores desvios devido a não necessidade de se empacotar os cartuchos e reduções no custo, uma vez que, não é necessário nenhum aparato de custo elevado (CALDAS *et al.*, 2013a; ESCARRONE *et al.*, 2014; HERTZOG *et al.*, 2015).

No que diz respeito à escolha do solvente de extração, uma vez que, este tem grande influência no processo de extração (BARKER, 2007), diferentes solventes vem sendo

aplicados, tais como, metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN), acetato de etila, e hexano (CAPRIOTTI *et al.*, 2013; CAPRIOTTI *et al.*, 2015).

### 3.6 Cromatografia

#### 3.6.1 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma potente ferramenta que possui aplicação em diferentes setores como na área da química, medicina, agricultura e meio ambiente (SKOOG, 2006; LANÇAS, 2009).

Dentre os detectores frequentemente utilizados em combinação com a LC, pode-se dizer que a detecção por MS é a mais versátil e potente técnica de detecção de compostos orgânicos em nível de traços. Um dos grandes desafios do acoplamento entre a LC e a MS foi contornado pelo desenvolvimento de uma interface capaz de operar a pressão atmosférica (denominadas API, do inglês, *atmospheric pressure ionization*), uma vez que, para uma substância gerar resposta no MS, ela precisa ser ionizada (LANÇAS, 2009).

Podem-se citar dois tipos de interfaces que operam eficientemente a pressão atmosférica, a ESI, onde um spray é gerado com auxílio de uma corrente elétrica, e a APCI onde, uma espécie química é gerada para ionizar a espécie a ser analisada. A grande vantagem do uso da ESI é a capacidade que esta tem em ionizar compostos sensíveis à temperatura como, por exemplo, agrotóxicos, fármacos e produtos de cuidado pessoal sem que haja degradação, uma vez que este processo ocorre em solução (ARDREY, 2003).

Dentro dos analisadores de massas mais comumente utilizados estão os magnéticos e eletrostáticos, quadropolos lineares, quadropolos *ion trap*, e tempo de voo. Cabe destacar, que o analisador de massas mais popular é o quadropolo linear. Tal difusão está associada a sua simplicidade e baixo custo frente aos demais aqui citados. Além disto, este proporciona boa linearidade em análises quantitativas e facilidade para ser entendido e operado (LANÇAS, 2013). Posteriormente a passagem dos íons pelo analisador de massas, a detecção é feita por uma multiplicadora de elétrons (COLLINS, 2006).

#### 3.6.2 Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (ECD)

A técnica de detecção por captura de elétrons ECD, combinada com cromatografia gasosa foi inicialmente introduzida em meados de 1960 (LOVELOCK e LIPSKY, 1960). Devido a sua alta sensibilidade e seletividade, associada principalmente a compostos halogenados, esta técnica tem se consolidado como uma importante ferramenta na quantificação de agrotóxicos (KREJČI e DRESSLER, 1970; RIVERO *et al.*, 2016; TÖLGYESSY *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016).

O princípio desta técnica está associada à liberação de elétrons através de uma fonte radioativa de  $^3\text{H}$  ou  $^{63}\text{Ni}$ . Após a liberação dos elétrons, os mesmos são coletados por um

anodo, gerando assim, corrente, que é amplificada por um eletrômetro gerando a linha de base (SKOOG, 2006).

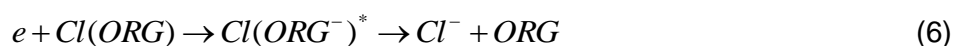
### 3.6.2.1 Mecanismos de detecção do ECD

As respostas obtidas no detector são baseadas na eletronegatividade dos compostos eluídos, em outras palavras, na sua capacidade de capturar elétrons. Tal capacidade está relacionada com a estabilidade que as moléculas ou átomos terão após a aquisição da carga negativa, sendo assim, a estabilidade está diretamente relacionada com a configuração eletrônica dos mesmos. Se uma molécula ou átomo, envolvido na captura de elétron possuir a camada de valência completamente preenchida, sua capacidade em capturar elétrons será baixa, enquanto que, quando o mesmo possuir sua camada de valência altamente preenchida, com apenas uma vacância, sua capacidade em capturar elétrons e manter-se estável será alta (ŠEVČÍK, 1976).

O mecanismo de captura de elétrons está fortemente ligado à energia com que os elétrons se chocam, segundo, o processo de termalização. Tal processo consiste na gradual perda de energia do gás de arraste, que é dependente do tipo de partícula emitida e do gás de arraste utilizado (mono ou diatômico). A seguir, estão descritas as reações envolvidas neste processo, tanto para formação do estado ionizado (Equação 2), quanto para o estado excitado, embora, a formação de estados excitados em moléculas diatômicas seja pouco favorecido (Equação 3) (ŠEVČÍK, 1976).



No detector, devido ao grande número de elétrons com diferentes energias, existem duas formas de ionizações possíveis, a ionização direta (Equação 4) e a por captura de elétrons (Equação 5 e 6) (ŠEVČÍK, 1976).



### 3.6.2.2 Seletividade e sensibilidade do ECD

A seletividade e sensibilidade do ECD estão diretamente ligadas às quantidades de substâncias eluídas e da eletronegatividade das mesmas, uma vez que, este tipo de detector

responde apenas a moléculas ou átomos com uma determinada afinidade por elétrons, tal sensibilidade pode ser acrescida quando fornecida uma maior voltagem no detector (ŠEVČÍK, 1976).

### 3.7 Validação de métodos cromatográficos

A validação de um método analítico, nada mais é do que comprovar experimentalmente com o auxílio de ferramentas estatísticas, que o método proposto atende as exigências para exercer a função para o qual ele foi desenvolvido, sempre atendendo os parâmetros de confiabilidade (SANTE, 2015).

A validação visa, sempre que possível, minimizar os erros referentes a fatores que tornem as respostas inexatas ou imprecisas (LANÇAS, 2009). As figuras de méritos, como são denominados os parâmetros de validação, frequentemente utilizadas em processos de validação são seletividade, curva analítica, faixa de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão e exatidão (SANTE, 2015).

#### 3.7.1 Curva analítica e linearidade

Para se quantificar um determinado composto, é necessário se conhecer a relação entre a concentração e a resposta instrumental gerada pelo mesmo. Tal relação pode ser obtida através da curva analítica. Por meio de uma operação matemática de regressão linear (Equação 7), obtém-se os coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ) (INMETRO, 2011).

$$y = ax + b \quad (7)$$

Onde:

$y$  = resposta (área do pico);

$x$  = concentração;

$a$  = inclinação da curva (sensibilidade);

$b$  = intersecção com o eixo  $x$ .

#### 3.7.2 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Os valores de LOD e LOQ são estipulados com o intuito de se informar a menor quantidade de massa que um composto pode ser detectado para o LOD, e quantificado com exatidão e precisão aceitáveis para o LOQ. Uma das formas para se estipular estes valores é através do método de sinal/ruído. De tal forma, quando a relação entre a altura do pico a meia base e o ruído instrumental for de três vezes temos o valor para o LOD, quando a mesma relação for de 10 vezes teremos o LOQ (INMETRO, 2011).

### 3.7.3 Exatidão e Precisão

Exatidão refere-se ao grau de aproximação que a resposta está em relação ao valor real, enquanto que, a precisão é a representação numérica da aproximação entre as medidas de uma mesma grandeza (CHANG, 2009). Uma das formas de se calcular a exatidão é através do ensaio de recuperação, onde é feita uma adição do(s) analito(s) em uma amostra branco, a mesma é submetida ao processo de extração e a resposta é comparada com um padrão. Para se afirmar que o procedimento é exato, as recuperações devem estar em uma faixa entre 70-120% com o desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *relative standard deviation*)  $\leq 20\%$  (SANTE, 2015).

### 3.7.4 Efeito matriz

O efeito matriz (EM) é ocasionado quando coextrativos competem na etapa de introdução no sistema cromatográfico, separação, ionização e detecção dos analitos. Tal competição pode ocasionar um enriquecimento ou uma supressão do sinal. Esse efeito pode ser corrigido quando se faz adição de padrão no extrato (*matrix matched*). Outras formas de se corrigir este efeito são através da adição padrão e da calibração por diluição de adição padrão (ECONOMOU *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2016). Segundo o documento do SANTE n° 12571 de 2015, um efeito matriz de  $\pm 20\%$  está dentro dos padrões aceitáveis e é considerado baixo (SANTE, 2015).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Instrumentação

- Destilador de Nitrogênio Tecnal modelo TE-036/1 (Brasil);
- Bloco digestor Gerhardt modelo Kjeldatherm (Alemanha);
- Balança Analítica Bioprecisa modelo FA2104N (Brasil);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis<sup>®</sup> Q222T (Brasil);
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (EUA) equipado com amostrador automático, bomba quartenária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass Quatro<sup>®</sup> Micro<sup>™</sup> API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra C18 3,5 µm (3,0 x 50 mm d.i.) (EUA);
- Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons Shimadzu modelo GC2010 e coluna Restek Rtx<sup>®</sup>-1 (100% dimetilpolissiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm tamanho de partícula;
- Sistema de Purificação de água modelo Milli-Q Direct-Q UV3<sup>®</sup> Millipore (EUA);
- Vórtex modelo Certomat<sup>®</sup> MV-B. Braun. (Brasil).

### 4.2 Materiais

- Extrator Soxhelt J45/50 Satelit modelo HS384MCO (Brasil);
- Frascos de vidro (*vial*) com capacidade para 2 mL;
- Frascos de vidro âmbar com capacidade para 10 e 50 mL;
- Gral e pistilo de porcelana Chiarott e Unilab (Brasil);
- Kit filtração para fase móvel Millipore (Alemanha);
- Tubo de vidro borossilicato Amitel (Brasil);
- Tubos de polipropileno (50 e 15 mL de capacidade) – Sarstedt (Alemanha);
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas calibradas, béquer, etc.)

### 4.3 Solventes e reagentes

- Água ultrapura, purificada em Milli-Q Direct-Q UV3<sup>®</sup> Millipore;
- C18 – Strata C18-E (50 µm, 65 Å) Phenomenex (EUA);



- Concha de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) (obtido no Instituto de Oceanografia e modificada no LACOM da Escola de Química e Alimentos da FURG);
- Detergente neutro Extran<sup>®</sup> Merck (Brasil);
- Éter de petróleo P.A. Vetec (Brasil);
- Florisil J.T. Baker (EUA);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS White Martins (Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza White Martins (Brasil);
- Metanol, acetonitrila e etanol grau HPLC J.T. Baker (EUA);
- Padrões analíticos de pureza mínima 99%: clorotalonil, DCOIT, diclofluanida, diuron, irgarol e TCMTB;
- Quitosana de média massa molecular Sigma-Aldrich (Brasil);
- Sulfato de magnésio anidro J.T. Baker (EUA);
- Terra diatomácea (Celite 545) 99% pureza, diâmetro de partícula 62-76 µm, ProQuimios (Brasil);
- Hexano P.A. Macron (Brasil).

#### **4.4 Seleção dos analitos**

Os analitos para este estudo foram previamente selecionados por um projeto de maior porte intitulado ciências de mar número 43/2013 financiado pela CAPES, sendo eles irgarol, diuron, clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB.

#### **4.5 Preparo das soluções analíticas**

As soluções analíticas estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), foram preparadas pela dissolução do padrão sólido de cada composto em solvente adequado. As soluções, então, foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A partir da diluição, com metanol (grau HPLC) das soluções estoques de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas soluções trabalho na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de cada substância.

Com isso, duas soluções trabalho na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas, uma contendo a mistura de irgarol, diuron e diuron-d6 (M2) e a outra, contendo clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB (M4). As diluições da solução trabalho com etanol para M2 e acetato de etila para M4, foram preparadas diariamente para o estudo e validação do método.

#### **4.6 Amostras de pescado**

Amostras de corvina (*Micropogonias furnieri*) foram escolhidas para o desenvolvimento dos métodos, uma vez que tal espécie possui hábitos de peixes demersais e uma alimentação que varia de pequenos vermes associados ao sedimento a pequenos peixes ou restos de

peixes. Além disto, esta espécie está presente desde o centro-oeste ao sudoeste do atlântico. Devido a tais características, esta, pode ser uma espécie com potencial para bioindicador de contaminação por compostos orgânicos na região costeira desde o Uruguai, até a Península do Yucatã (ISAAC, 1988).

As amostras de filé de cada espécie foram adquiridas no mercado local de Rio Grande – RS, Brasil. Após aquisição, as amostras foram levadas ao laboratório onde foram submetidas a um processo de moagem, posteriormente as amostras foram enroladas em folha de alumínio e armazenadas em freezer a -18 °C. Durante o desenvolvimento do método as amostras foram artificialmente contaminadas numa concentração de 50 µg L<sup>-1</sup> para cada analito.

A caracterização dos músculos de pescado foi conduzida de acordo com os métodos da Association of Official Analytical Chemists International- AOAC (HORWITZ e HORWITZ, 2000). O teor de umidade foi determinado por gravimetria com secagem em estufa a 105°C de acordo com o método n° 935.29. Os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo o método 920.85 e os níveis proteicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl utilizando um fator de conversão de 6,25 de acordo com o método 920.87.

#### **4.7 Sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de biocidas**

As determinações de irgarol e diuron foram feitas empregando LC-MS/MS, uma vez que este sistema traz vantagens como alta seletividade e quando empregado o monitoramento de reações múltiplas (SRM, do inglês, *selected reaction monitoring*), problemas causados por co-eluição são minimizadas. Além disso, pelo fato de somente estar sendo registrado o sinal de interesse, o ruído instrumental é baixo, assim, gerando um aumento na razão sinal/ruído (s/n), melhorando a detectabilidade (CALDAS, 2015).

As condições cromatográficas foram baseadas em um estudo, descrito por Dominguez et al., (2014) onde, foi utilizado acetonitrila:água ultrapura (52:48 v/v) com 0,1% de ácido fórmico, coluna analítica XTerra C18 3,5 µm (3,0 x 50 mm d.i.) e uma vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup> sendo o tempo de análise de cinco minutos.

Os solventes utilizados foram filtrados em uma membrana 0,45 µm em sistema de filtração a vácuo Millipore e sonicados em um banho de ultrassom durante 16 minutos para remoção de bolhas.

##### **4.7.1 Condições espectrométricas**

As condições espectrométricas utilizadas neste estudo foram baseadas em um estudo de DOMINGUEZ *et al.* (2014), sendo elas, 100 °C para temperatura da fonte e de 350 °C para temperatura de dessolvatação e ionização no modo positivo. As transições (m/z) de quantificação e confirmação, voltagem do cone (v) e energia de colisão (eV) estão descritas na

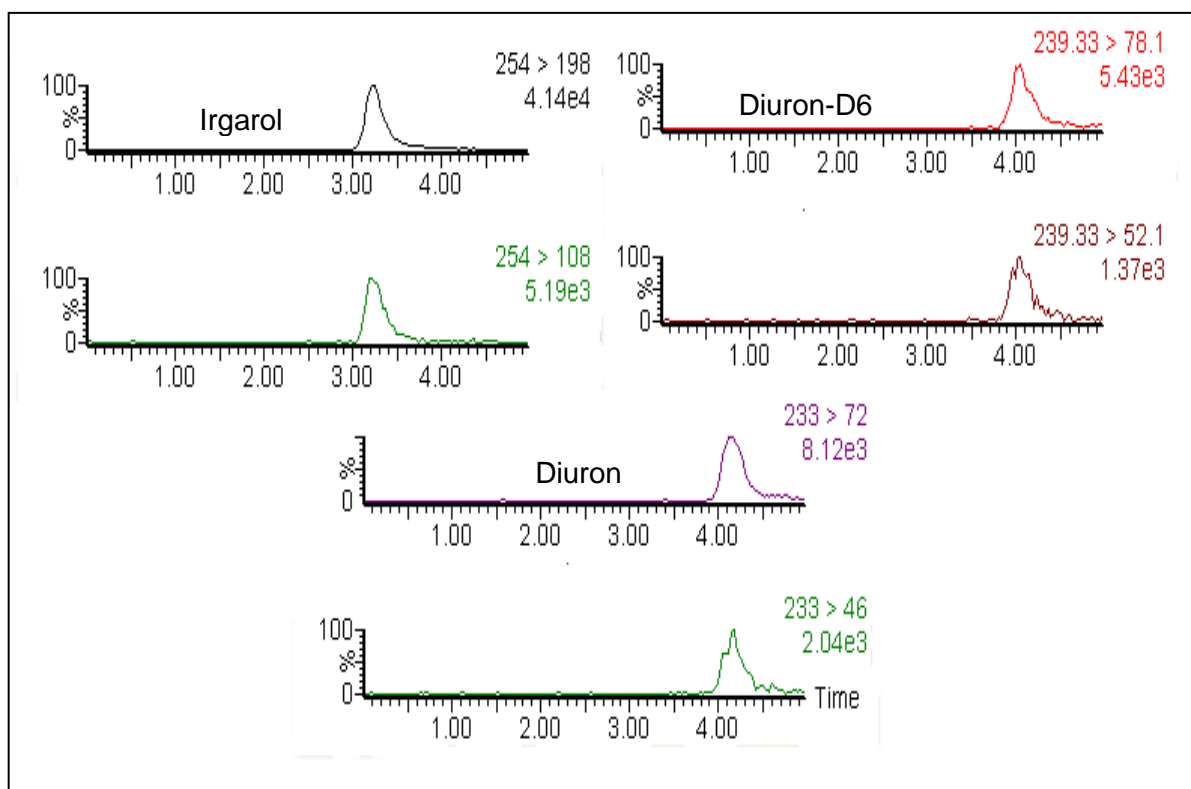
Tabela 6. Os cromatogramas obtidos no modo SRM e no modo TIC (do inglês, total ion chromatogram) podem ser observadas na Figura 1 e 2.

**Tabela 6.** Transições monitoradas, voltagem do cone, energia de colisão e tempo de retenção.

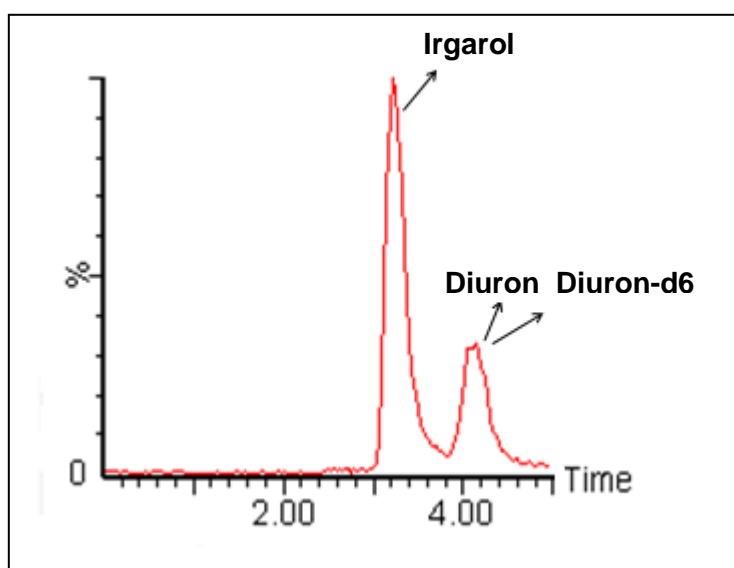
Analito	Tempo de retenção (min)	Transição de quantificação (m/z)	Energia de colisão (eV)	Transição de identificação (m/z)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Irgarol	3,20	253,7>198	19	253,87>108	30	30
Diuron	4,23	232,97>72	20	232,97>160	25	28
Diuron-d6*	4,02	239,33>78,1	17	239,33>52,1	15	29

\* surrogate

**Figura 1.** Cromatograma no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) nas melhores condições. Fase Móvel: acetonitrila:água ultrapura (52:48 v/v) 0,1% de ácido fórmico; coluna analítica XTerra C18 3,5 µm (3,0 x 50 mm d.i.); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Cromatograma no modo de íons totais (TIC) nas melhores condições cromatográficas. Fase Móvel: acetonitrila:água ultrapura (52:48 v/v) 0,1% de ácido fórmico; coluna analítica XTerra C18 3,5 µm (3,0 x 50 mm d.i.); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>.



#### 4.8 Avaliação da técnica de VA-MSPD para extração de irgarol e diuron em tecido de pescado e quantificação por LC-MS/MS

Tendo como objetivo a melhor performance da técnica de MSPD assistida por vórtex, parâmetros como tipo de suporte sólido e tipo de solvente foram avaliados.

As condições de extração iniciais foram baseadas em um estudo validado por Hertzog et al., (2015), o qual consiste na maceração durante 5 minutos de 0,5 g de amostra (músculo de corvina *in natura*); 0,5 g de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 0,5 g terra diatomácea, seguida da extração com 5 mL de metanol (MeOH) e agitação em vórtex durante 1 minuto e centrifugação por 10 minutos a 10179 xg. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi retirada e analisada por LC-MS/MS.

##### 4.8.1 Avaliação do suporte sólido para extração

Foram testados oito suporte sólidos diferentes, além do não uso de suporte sólido. Dentre os suportes testados estão C18 e Oasis HLB reutilizado que são suportes sólidos com uma fase lipofílica ligada, tendo assim, uma maior afinidade por compostos lipofílicos. Dentro dos suportes sólidos com características inorgânicas foram testados o uso de alumina, sílica e florisil.(CAPRIOTTI *et al.*, 2010). Por fim, quitosana, concha de mexilhão, terra diatomácea foram selecionados na classe dos suportes de fontes renováveis (HERTZOG *et al.*, 2015; ROMBALDI *et al.*, 2015).

#### 4.8.2 Avaliação do solvente para extração

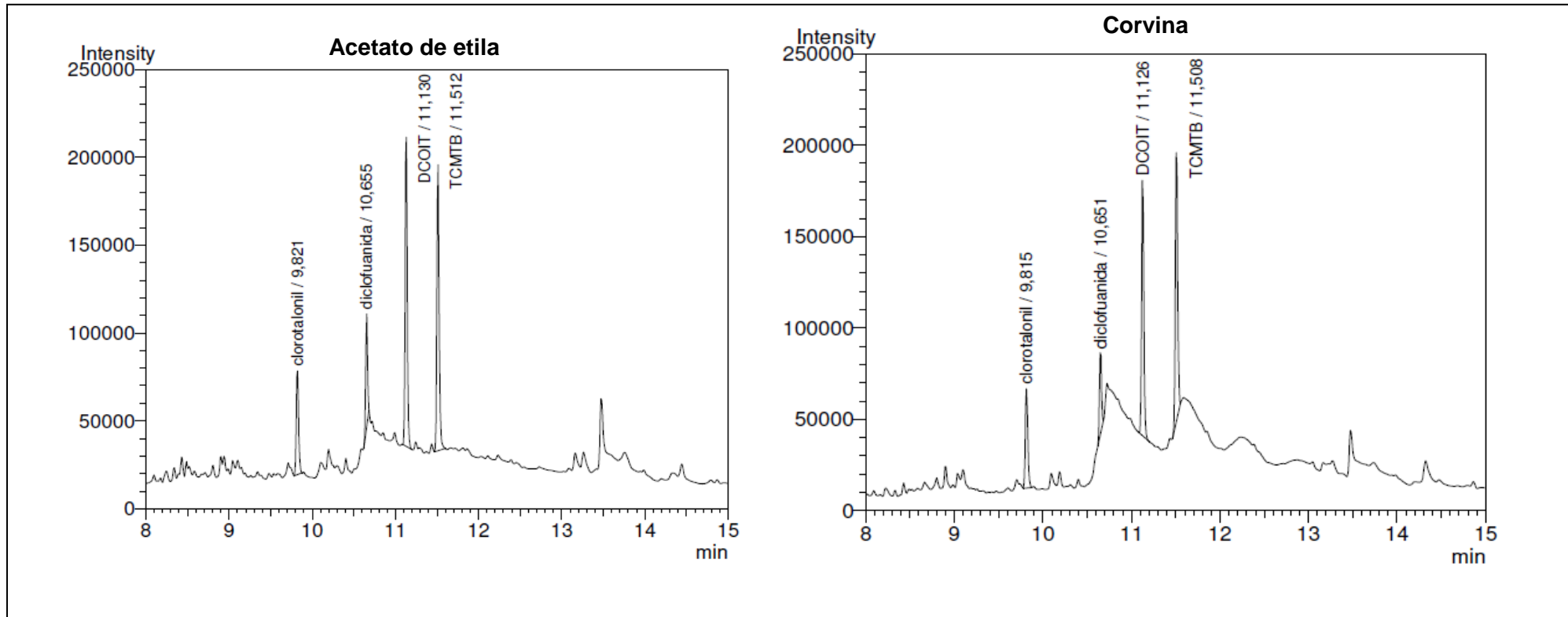
Visando a melhor condição para extração, foram testados os solventes acetonitrila (MeCN), acetona, hexano, acetato de etila, tetrahidrofurano (THF), MeOH 35 mmol L<sup>-1</sup> ác. acético, etanol (EtOH), e MeOH.

As condições empregadas para este estudo foram 0,5 g de amostra, 0,5 g de concha de mexilhão, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de solvente, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.9 Sistema cromatográfico GC-ECD para determinação de biocidas

As condições cromatográficas para a separação de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB foram baseadas em um estudo de SAKKAS *et al.* (2002), sendo elas, 300 °C para temperatura do detector, corrente de 1,5 nA, temperatura de injeção 250 °C, vazão da coluna (Restek Rtx<sup>®</sup>-1 (100% dimetilpolissiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm tamanho de partícula) de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, gás de arraste H<sub>2</sub> e fonte de radiação <sup>63</sup>Ni. O programa de aquecimento do forno foi de 80 °C (3 min), seguido de um aumento para 290 °C (13 min) com uma taxa de 21 °C min<sup>-1</sup> totalizando 16 minutos de tempo total de análise. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 3

**Figura 3.** Cromatograma obtido para os biocidas em acetato de etila na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Gás de arraste:  $\text{H}_2$ ; coluna analítica Restek Rtx®-1 (100% dimetilpolissiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu\text{m}$ ; vazão 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ .



#### 4.10 Otimização da técnica de VA-MSPD para extração de clorotalonil, diclofluanida, DOCIT e TCMTB em tecido de pescado e quantificação por GC-ECD

Assim como no desenvolvimento do primeiro método, buscando a melhor eficiência de extração para a MSPD assistida por vórtex, parâmetros como tipo de suporte sólido e tipo de solvente foram avaliados. Posterior à escolha do suporte sólido e do solvente mais adequado, foi feito um planejamento experimental para se avaliar a influencia da massa de suporte sólido, de sal e o tempo de extração no vórtex, assim, alcançando a condição ótima para o método.

##### 4.10.1 Avaliação do suporte sólido para extração

Três suportes sólidos com diferentes propriedades foram testados para extração de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB de tecido de pescado, são eles C18 reutilizado (C18<sub>R</sub>), alumina e quitosana. Tal escolha se deve ao fato destes suportes estarem incluídos em três classes distintas de suporte sólido. Onde, o C18 é um suporte sólido de fase reversa, tendo, assim, mais afinidade por compostos com um carácter mais lipofílico. Por outro lado, a alumina é considerada um suporte sólido mais abrasivo e de fase normal consecutivamente, mais polar. Por último, a quitosana, entra no contexto do uso de suportes sólidos alternativos, sendo um suporte com grupos aminas passíveis de interação com a amostra (CAPRIOTTI *et al.*, 2010; HERTZOG *et al.*, 2015).

As condições empregadas para este estudo foram 0,5 g de amostra (músculo de corvina *in natura* fortificado com mistura dos analitos na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup>), 0,5 g de suporte sólido, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

##### 4.10.2 Avaliação do solvente para extração

Buscando o solvente mais adequado para extração, acetato de etila com e sem adição de ácido acético 35 mmol L<sup>-1</sup>, uma mistura de acetonitrila:acetona (50:50 v/v) e acetona foram testados.

As condições empregadas para este estudo foram 0,5 g de amostra, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de solvente, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.10.3 Avaliação do tempo de fortificação

Com a intenção de se avaliar a interação dos compostos com a matriz e a estabilidade dos mesmos em um determinado intervalo de tempo, testes avaliando a recuperação de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB nos tempos de fortificação de 0 h, 0,5 h, 1 h, 24 h, 48 h e 168 h foram avaliados. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -18 °C e abrigadas da luz. Concomitantemente, um padrão no extrato na mesma concentração para controle foi submetido às mesmas condições. Para esta etapa as condições fixadas foram 0,5 g de amostra, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.10.4 Avaliação da massa de amostra

Com a intenção de se avaliar a influência da quantidade de massa de amostra na resposta dos analitos, foram conduzidos testes utilizando 0,2; 0,5 e 1,0 g de amostra. Onde, as condições fixadas para este ensaio foram 0,5 h de interação após a fortificação, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.10.5 Avaliação da acidificação do solvente extrator

Fatores como dissociação, solvatação e estabilidade de alguns compostos podem ser afetados dependendo da faixa de pH, sendo este, um importante parâmetro no desenvolvimento de um método. Deste modo, foram conduzidos testes avaliando a influencia da adição de 35 mmol L<sup>-1</sup> e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético, além da não adição do mesmo. Neste ensaio as condições fixadas foram 0,5 h de interação após a fortificação, 0,5 g de amostra, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 minutos na etapa de homogeneização e 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.10.6 Avaliação das principais variáveis na extração pela MSPD

Tendo em vista observar os efeitos das variáveis quantitativas, massa de suporte sólido, massa de sal e tempo de extração, um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi aplicado.

As condições empregadas para este estudo foram 0,5 (-1); 1,25 (0) e 2,0 g (+1) de C18<sub>R</sub>, 0,2 (-1); 0,35 (0) e 0,5 g (+1) de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 (-1); 5 (0) e 9 minutos (+1) de agitação em vórtex,

5 mL de acetato de etila 35 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,2 g de massa de amostra e 5 minutos na etapa de homogeneização. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10179 xg e uma alíquota foi retirada para análise.



As variáveis foram avaliadas em dois níveis (+1 e -1), mais o ponto central (0), conforme descrito na Tabela 7. Nesta etapa a resposta dos analitos em termos de recuperação foi utilizada para análise estatística.

**Tabela 7.** Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$ .

Tratamento	A(g)	B(g)	C(min)
1	-1(0,5)	-1(0,2)	-1(1)
2	1(2,0)	-1(0,2)	-1(1)
3	-1(0,5)	1(0,5)	-1(1)
4	1(2,0)	1(0,5)	-1(1)
5	-1(0,5)	-1(0,2)	1(9)
6	1(2,0)	-1(0,2)	1(9)
7	-1(0,5)	1(0,5)	1(9)
8	1(2,0)	1(0,5)	1(9)
9	0(1,25)	0(0,35)	0(5)
10	0(1,25)	0(0,35)	0(5)
11	0(1,25)	0(0,35)	0(5)

A= massa de suporte sólido; B= massa de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; C= tempo de extração em vórtex.

#### 4.10.7 Avaliação da liofilização como pré-tratamento da amostra

O processo de liofilização é comumente utilizado para conservação de amostras biológicas e/ou secagem da mesma sem que haja degradação de compostos voláteis e termicamente instáveis. Tal procedimento é também amplamente utilizado na preservação de amostras com possível contaminação por metilmercúrio, tributilestano e seus produtos de degradação, onde dependendo da forma de armazenagem os compostos presentes na amostra são mantidos estáveis por um período de 44 meses (DIAZ *et al.*, 1996; MORABITO *et al.*, 1999; SCHMIDT, 2011; ELJARRAT, 2012). Sendo assim, foi avaliado o uso de 0,2 g de amostra *in natura* e 0,2 g liofilizada. As condições fixadas para este ensaio foram 0,5 h de interação após a fortificação, 0,2 g de amostra (músculo de corvina *in natura*), 2,0 g de  $\text{C}_{18}\text{R}$ , 0,2 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de acetato de etila acidificado com  $35 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético, 5 minutos na etapa de homogeneização e 9 minutos de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a  $10179 \text{ xg}$  e uma alíquota foi retirada para análise.

#### 4.11 Validação

Os métodos foram validados seguindo parâmetros preconizados pelos guias da INMETRO, (2011) e pela SANTE, (2015). Os parâmetros avaliados neste estudo foram LOD e LOQ, curva analítica, linearidade, precisão, exatidão e o EM (INMETRO, 2011; SANTE, 2015).

#### 4.11.1 Curva analítica e linearidade

Com o intuito de verificar a linearidade proveniente das respostas instrumentais dos compostos estudados, foi construída curva analítica nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50; 100 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , preparadas em EtOH para diuron e irgarol e injetadas no LC-MS/MS. Para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB, foram construídas curvas analíticas contendo as concentrações de 5,0; 10; 20; 25; 50; 100; 125; 250 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  preparadas em acetato de etila e injetadas no GC-ECD.

Posteriormente, as mesmas curvas foram preparadas no extrato proveniente da extração de músculo de pescado, a fim de avaliar-se o efeito matriz. Além das curvas preparadas no extrato, curvas analíticas preparadas pela diluição de adição de padrão (DSAC) foram preparadas. As curvas analíticas por DSAC foram preparadas através da fortificação da amostra na maior concentração da curva para cada analito. O extrato obtido foi utilizado para preparar os demais pontos da curva por diluição (MARTINS *et al.*, 2016). Todas as injeções foram feitas em triplicata, tanto no LC-MS/MS quanto no GC-ECD. Com o auxílio do software Masslynx V4.1 e do Microsoft Excel® 2010 foram obtidas a linearidade do método e instrumental através dos dados de regressão linear e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para irgarol e diuron. Para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB a linearidade tanto instrumental quanto a do método foi obtida através dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos no software Microsoft Excel® 2010.

#### 4.11.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O método utilizado para se determinar o LOD e o LOQ do instrumento ( $\text{LOD}_i$  e  $\text{LOQ}_i$ ) foi o do sinal/ruído, sendo assim, uma razão de 3 e 10 vezes foi utilizada para o LOD e o LOQ respectivamente. O LOQ do método ( $\text{LOQ}_m$ ) foi obtido experimentalmente, sendo assim, amostras foram fortificadas considerando o  $\text{LOQ}_i$ . Os valores para o  $\text{LOQ}_m$  foram considerados como verdadeiros quando a amostra ao ser fortificada nestas concentrações apresentou concentrações entre 70 e 120% com RSD menor ou igual a 20% (SANTE, 2015).

#### 4.11.3 Exatidão e Precisão

Conforme recomendado pelo INMETRO e pelo SANTE (2015), a exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação. Sendo assim, amostras de filé de pescado foram fortificadas com diuron e irgarol em 3 diferentes níveis LOQ, 5-LOQ e 10-LOQ. Além disso, diuron deuterado foi utilizado como *surrogate* com uma concentração equivalente a concentração do diuron em cada nível. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e injetado 3 vezes ( $n=9$ ). A precisão foi determinada através da repetibilidade (RSD<sub>r</sub>) e da precisão intermediária (RSD<sub>pi</sub>). A repetibilidade foi determinada utilizando o RSD dos experimentos feitos no ensaio de exatidão e a precisão intermediária foi avaliada através da repetição do mesmo experimento

em outro dia. Para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB, a exatidão foi avaliada através da fortificação do filé de pescado liofilizado em três níveis LOQ, 5-LOQ e 10-LOQ. Cada nível de fortificação foi extraído 3 vezes (n=9). A precisão e a precisão intermediária e a repetibilidade foram avaliadas igualmente aos ensaios para irgarol e diuron.

#### 4.11.4 Efeito Matriz

A avaliação do efeito de matriz foi obtida através da comparação entre a inclinação das curvas preparadas no solvente e no extrato da MSPD proveniente do branco da matriz. O efeito observado é apresentado em porcentagem onde, quando o valor é positivo existe um enriquecimento do sinal e quando o valor é negativo existe uma supressão do mesmo, como descrito na Equação 8 (ECONOMOU *et al.*, 2009).

$$ME(\%) = 100 \times \left( \frac{S_m}{S_s} - 1 \right) \quad (8)$$

Onde  $S_s$  é a inclinação da curva no solvente e  $S_m$  é a inclinação da curva na matriz, considerando que  $ME(\%) = 0\%$  indica nenhum efeito de matriz.

#### 4.11.5 Aplicabilidade

Com a finalidade de se avaliar a robustez do método, o mesmo, foi aplicado em mais duas espécies de peixe, tainha (*Mugil liza*) e pescada (*Cynoscion guatucupa*). O filé destas amostras foi adquirido no mercado local da cidade de Rio Grande – RS, Brasil. Posteriormente a aquisição, as amostras foram levadas ao laboratório para um processo de moagem e liofilização quando necessário. As amostras foram embaladas em papel alumínio, colocadas em embalagens plásticas de polietileno e armazenadas em freezer a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.11.6 Análise estatística

As análises estatísticas feitas na otimização do método, com um nível de confiança de 95% foram feitas com auxílio do software Statistica 5.0 Portable.

## 5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

---

### 5.1 Avaliação da VA-MSPD para extração de irgarol e diuron

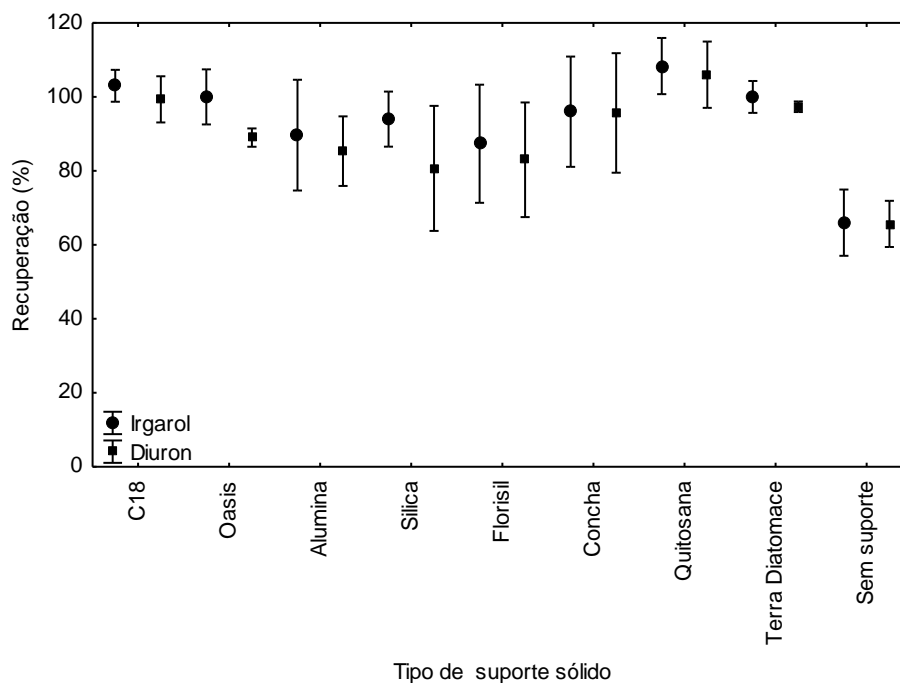
As condições iniciais empregadas para o estudo da utilização da VA-MSPD, para a extração de irgarol e diuron foram baseadas em estudo prévio desenvolvido e validado para extração de fármacos em tecido de pescado (HERTZOG *et al.*, 2015). Com o intuito de alcançar as maiores recuperações para irgarol e diuron em músculo de pescado, parâmetros como suporte sólido, solvente extrator e a influência de sal foram avaliados sequencialmente, onde a melhor condição foi fixada e utilizada na etapa seguinte, estabelecendo como resposta os valores de recuperação.

#### 5.1.1 Escolha do suporte sólido

A escolha do suporte sólido é um dos fatores mais importantes a ser avaliado no desenvolvimento de um procedimento utilizando a MSPD (BARKER, 2007). Dependendo da escolha do suporte sólido, o mecanismo da quebra da estrutura física da amostra pode ser afetado e não ocorrer da mesma maneira que a inicialmente descrita para C18 (BARKER *et al.*, 1989; CAPRIOTTI *et al.*, 2010). Portanto, 0,5 g de C18, quitosana, concha de mexilhão, terra diatomácea, alumina, sílica, florissil e Oasis HLB reutilizado foram testados. Além disso, um teste sem o uso de suporte sólido foi avaliado.

A seguir, na Figura 4, são apresentados os resultados em recuperação, avaliados na análise estatística ANOVA, não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre concha de mexilhão, C18 reutilizado, Oasis HLB reutilizado, terra diatomácea e quitosana, onde todos demonstraram ser eficientes na ruptura da estrutura física da amostra. Como esperado, o uso de C18 gerou maiores recuperações, o que pode ser explicado devido as suas propriedades. Adsorventes com uma fase quimicamente ligada (C8, C18), não atuam apenas como abrasivos, mas também como dispersores. Assim, quando esses suportes são utilizados, os mesmos promovem a completa dispersão da amostra, e dos analitos lipofílicos, facilitando a transferência dos analitos para o solvente (BARKER, 2000). Entretanto, outros suportes como concha de mexilhão, terra diatomácea, quitosana e Oasis HLB reutilizado também forneceram resultados satisfatórios, com recuperações acima de 97%.

**Figura 4.** Recuperação dos analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes suportes sólidos na etapa de dispersão da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de suporte sólido, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de metanol, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a  $10179 \text{ xg}$ ). Barras de erro indicam RSD (%) ( $n=9$ ).



Por outro lado, alumina, sílica, florisil e a não utilização de suporte sólido geraram recuperações inferiores e não apresentaram diferença significativa entre si.

Dada à possibilidade de se escolher diversos suportes sólidos, concha de mexilhão foi escolhida como suporte sólido mais apropriado devido ao fato deste material ser tão eficiente quanto C18 e quitosana, ser obtido de fontes renováveis, ser biodegradável, apresentar um baixo custo, além de já ter sido utilizado em outros estudos para determinação de compostos orgânicos (ROMBALDI *et al.*, 2015).

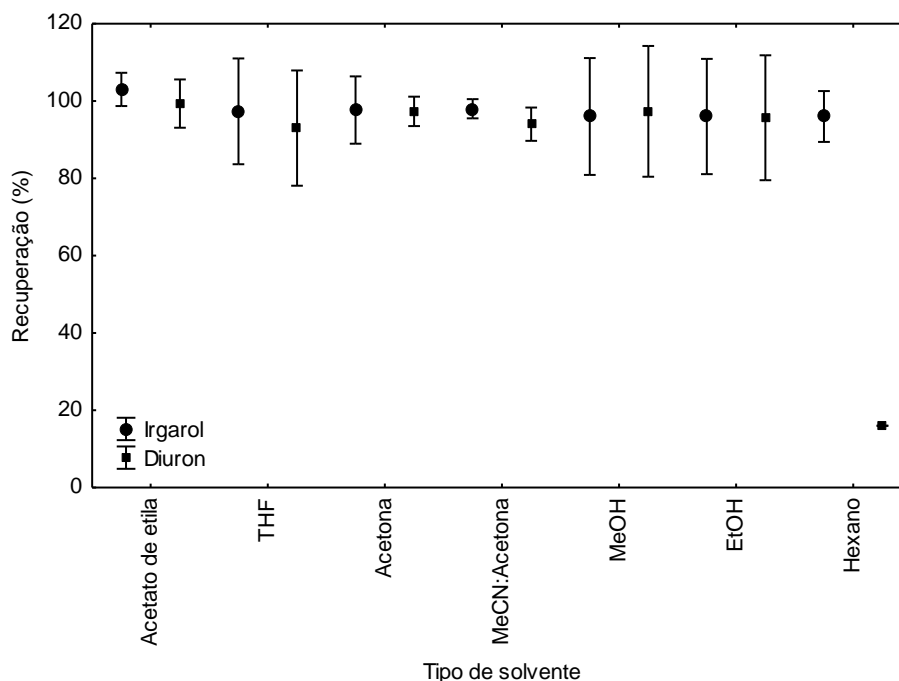
#### 5.1.2 Escolha do solvente

Os solventes avaliados na etapa de extração no procedimento de VA-MSPD, foram MeCN:acetona (1:1 v/v), acetona, hexano, acetato de etila, MeOH com  $35 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético, MeOH, tetrahidrofurano (THF) e EtOH.

Como pode ser observado na Figura 5, praticamente todos os solventes testados apresentaram boas recuperações para os analitos, com uma recuperação média de 96%.

Quando testado hexano, o mesmo demonstrou baixas recuperações para diuron. Irgarol e diuron apresentam coeficientes de partição octanol-água ( $\text{Log}k_{ow}$ ) diferentes 3,95 e 2,85 respectivamente. Este fato pode explicar a baixa recuperação para diuron quando utilizado hexano, uma vez que diuron é mais polar que irgarol.

**Figura 5.** Recuperação para os analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  quando utilizado diferentes solventes. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de concha, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de solvente, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a  $10179 \text{ xg}$ ). Barras de erro indicam RSD (%) ( $n=9$ ).



Uma das metas da Química Analítica Verde é reduzir a quantidade de resíduo gerada na etapa de preparo de amostra, além disso, reduzir ou se possível evitar o uso de solventes tóxicos ao meio ambiente e para os seres humanos (WELCH *et al.*, 2010).

Dentre os solventes testados, EtOH traz algumas vantagens. Sua produção ocorre através da fermentação de materiais ricos em açúcares, por exemplo, cereais. Com isto, requer uma menor energia para ser produzido em contraste com outros solventes utilizados neste estudo (JESSOP, 2011; CHEMAT *et al.*, 2012). Além disso, EtOH é um solvente completamente biodegradável e pode ser obtido em grande escala com elevada pureza (CHEMAT *et al.*, 2012). Ademais, quando EtOH é comparado com outros solventes como MeOH, acetona, MeCN e acetato de etila seus efeitos deletérios para a saúde humana são menos pronunciados (CAPELLO *et al.*, 2007).

Neste contexto, e considerando as propriedades físico-químicas dos compostos, EtOH foi escolhido como solvente extrator mais adequado.

### 5.1.3 Uso de sal

A adição de sal pode afetar a solubilidade dos analitos na fase aquosa, assim, podendo causar um aumento na recuperação. Assim, promove uma melhora na mobilidade dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (HERTZOG *et al.*, 2015).

De maneira geral, estudos que tem como matriz, amostras de tecido biológico, utilizam sais como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{MgSO}_4$  (WANG *et al.*, 2010). Especialmente no caso de estudos com músculo de pescado, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tem sido eficientemente empregado na etapa de extração por MSPD quando utilizado 0,5 g de amostra (ESCARRONE *et al.*, 2014; HERTZOG *et al.*, 2015). Baseado na revisão bibliográfica, 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  foram escolhidos para futuras etapas.

#### 5.1.4 Volume de solvente extrator

O volume de solvente extrator foi fixado em 5 mL, uma vez que, este volume é usualmente utilizado para extração de contaminantes orgânicos em matrizes biológicas, como descrito em muitos trabalhos (DUARTE *et al.*, 2013; ESCARRONE *et al.*, 2014; HERTZOG *et al.*, 2015). Além do mais, quando utilizado 5 mL de solvente extrator, as recuperações obtidas ficaram acima de 70%, sendo esta, uma faixa aceitável para recuperação de compostos orgânicos a nível traço (SANTE, 2015).

#### 5.1.5 Validação do método empregando VA-MSPD e LC-MS/MS

A linearidade (curvas padrão em EtOH e no branco da VA-MSPD) foi avaliada na faixa de 0,5 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para irgarol e na faixa de 5 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para diuron. Todas as curvas apresentaram um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior do que 0,999 (APÊNDICE A)(Tabela 8).

**Tabela 8.** Equação da reta e coeficiente de determinação obtido para cada composto quando feitos por calibração externa e calibração por superposição na matriz.

Analitos	Curva analítica no solvente (EtOH)		Curva analítica na matriz (filé)	
	Equação da reta	$R^2$	Equação da reta	$R^2$
Irgarol	$y = 1619649,3x - 468,2$	0,999	$y = 1617616,7x + 86,9$	0,999
Diuron	$y = 1619649,3x - 468,2$	0,999	$y = 52560x - 112$	0,999
Diuron-d6	$y = 34395x - 42$	0,999	$y = 32767x - 100,9$	0,999

Os valores de LOD do método foram de 0,0015 e 0,015  $\mu\text{g g}^{-1}$  para irgarol e diuron respectivamente, enquanto que, os LOQs foram de 0,005 e 0,05  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente.

Cabe destacar que, os LOQs alcançados pelo método proposto são comparáveis a outros estudos (GATIDOU *et al.*, 2004; KAONGA *et al.*, 2015a). Além disto, o método alcançou LOQs na faixa de concentração que foi detectada em pescados contaminados com irgarol e diuron, na Ilha de Seto, Japão (KAONGA *et al.*, 2015a).

Para avaliar a exatidão, amostras de *Micropogonias furnieri* foram fortificadas com um mistura padrão de irgarol e diuron em três níveis de concentração LOQ, 5-LOQ e 10-LOQ. Posteriormente, as amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração. Os resultados obtidos foram expressos em termo de recuperação, onde, a faixa de recuperação variou entre 87 e 105%, com RSD menores que 10%. Para avaliar a precisão intermediária (RSDpi), os mesmos experimentos foram conduzidos em um outro dia. Recuperações superiores a 83%, com RSD inferiores a 15%. Todos os resultados da etapa de validação estão descritos na Tabela 9 e estão de acordo com parâmetros estabelecidos pelo guia de validação SANTE (SANTE, 2015).

**Tabela 9.** Limites de quantificação (LOQ), coeficientes de determinação ( $R^2$ ), exatidão R (%), repetibilidade (RSDr), precisão intermediária (RSDpi) e efeito matriz (EM).

Analito	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	R (%)			RSDr (%)			RSDpi (%)			EM (%)
			LOQ	5- LOQ	10- LOQ	LOQ	5- LOQ	10- LOQ	LOQ	5- LOQ	10- LOQ	
Irgarol	5	0,999	103	87	105	6	6	2	15	15	10	-0,1
Diuron	50	0,999	90	87	103	10	3	4	6	15	15	-4,0

O efeito matriz foi avaliado pela comparação entre as inclinações das curvas de calibração no solvente (EtOH) e no branco da matriz (*matrix-matched*). O efeito matriz para os analitos ficou em uma faixa inferior a 5%, assim, podendo ser considerado um efeito de matriz aceitável para utilização da curva no solvente, conforme descrito por Economou (ECONOMOU *et al.*, 2009).

#### 5.1.6 Aplicação em diferentes espécies

Após a validação do método, o mesmo foi aplicado em outras duas espécies de peixe, *Mugil liza* e *Cynoscion guatucupa* a fim de, se avaliar a aplicabilidade. Sendo assim, as amostras foram fortificadas em três níveis LOQ, 5-LOQ e 10-LOQ, conforme pode ser observado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Exatidão R(%) e repetibilidade para as diferentes espécies de peixe testadas.

Analitos	Corvina ( <i>Micropogonias furnieri</i> )			Tainha ( <i>Mugil liza</i> )			Pescada ( <i>Cynoscion guatucupa</i> )		
	R (%)±RSD (%)			R (%)±RSD (%)			R (%)±RSD (%)		
	LOQ	5-LOQ	10-LOQ	LOQ	5-LOQ	10-LOQ	LOQ	5-LOQ	10-LOQ
Irgarol	103±6	87±6	105±2	88±9	110±5	101±4	83±6	120±3	107±1
Diuron	90±10	87±3	103±4	81±10	104±8	93±5	81±7	85±3	91±3



O método aplicado proporcionou resultados de recuperação acima de 81%, e RSD inferiores a 15% em todas as amostras. Após a validação para todas as espécies em estudo, o método proposto foi aplicado nas amostras de músculo e nenhum resíduo de irgarol e diuron foi encontrado.

#### 5.1.7 Comparação com outros métodos de extração de biocidas em amostras de pescado

Na Tabela 11, é apresentada uma comparação do método proposto frente a outros com o mesmo fim (ALEJANDRO *et al.*, 2014; KAONGA *et al.*, 2015a).

**Tabela 11.** Comparação entre o método de VA-MSPD proposto, frente a outros métodos para extração de biocidas em pescado.

Amostra	Analito	Técnica de extração	Características	Técnica de quantificação	Performance analítica	Efeito matriz	Referência
Tecido de pescado	Irgarol 1051 e Diuron	MAE-SPE	10 mL MeOH (MAE) 2 mL MeOH (SPE)	LC MS/MS	R(%) 74,4-97,9% RSD 2,8-7,8% LOQ: 0,34-0,44 ng g <sup>-1</sup>	17-28%	(ALEJANDRO <i>et al.</i> , 2014)
Sedimento, organismos marinhos e água	Irgarol 1051 e Diuron	Agitação mecânica SPE	25 mL MeCN 40 mL hexano:MeCN (1:1 v/v) eluição com 5 mL diclorometano	HPLC-UV	R(%) 75-78% RSD 5-6% LOQ: 0,6-1,4 ng g <sup>-1</sup>	não avaliado	(KAONGA <i>et al.</i> , 2015a)
Tecido de pescado	Irgarol 1051 e Diuron	VA-MSPD	5 mL EtOH 0,5 g concha	LC-MS/MS	R(%) 81-110% RSD < 15% LOQ: 5-50 ng g <sup>-1</sup>	< 10%	Método proposto

MAE = extração assistida por micro-ondas; SPE = extração em fase sólida

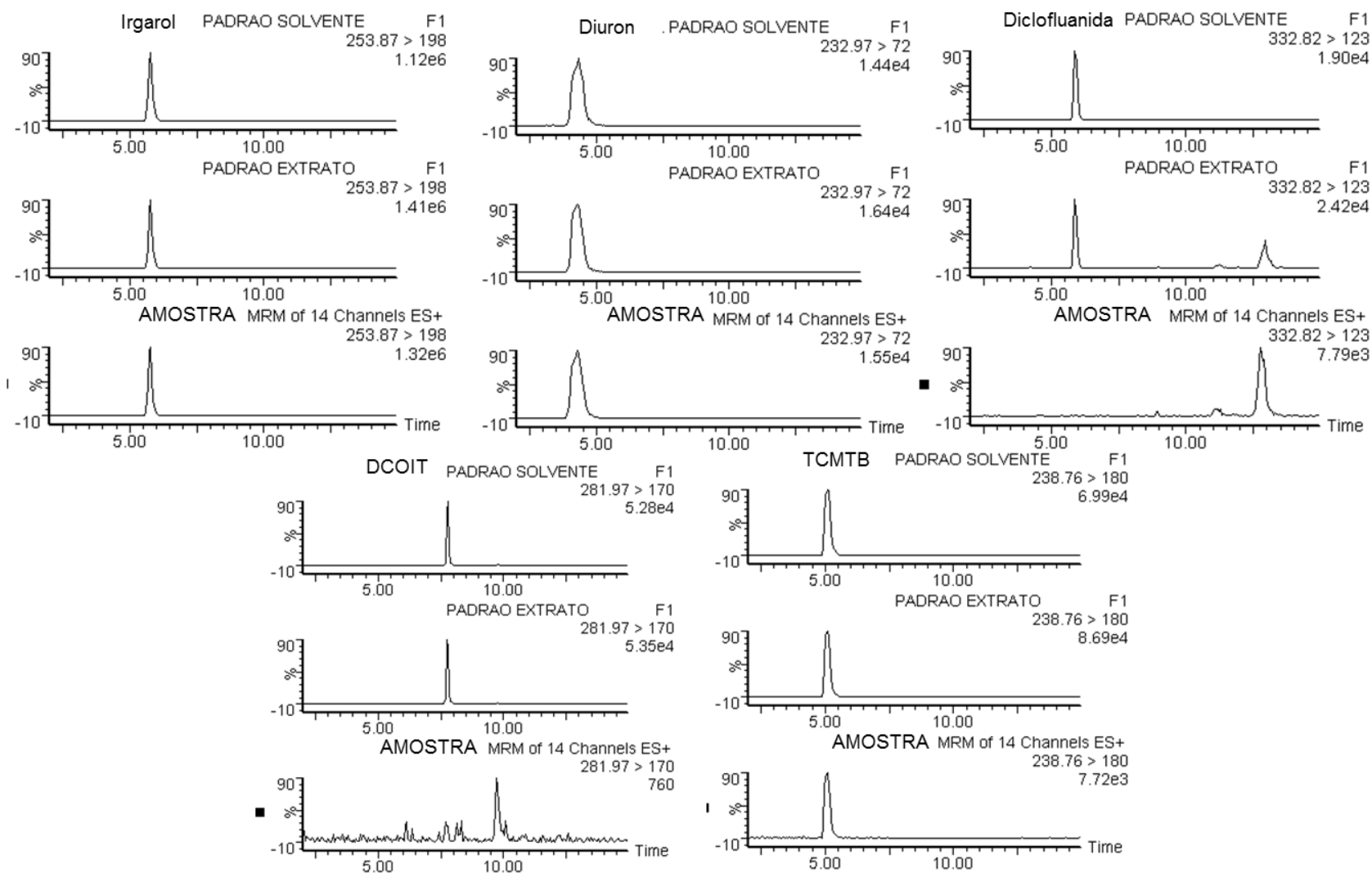
LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; HPLC-UV = cromatografia líquida de alta eficiência UV/Vis

O método proposto apresenta vantagens como, um menor consumo de solventes orgânicos, utiliza um solvente extrator de baixa toxicidade e utiliza materiais de fontes renováveis, demanda um menor tempo na etapa de extração e menor exposição do analista. Além disto, obtiveram-se faixas aceitáveis de recuperação e de RSD com um baixo efeito matriz. Cabe destacar que os LOQs obtidos pelo método proposto são superiores aos obtidos por ALEJANDRO *et al.* (2014) e KAONGA *et al.* (2015a). Tal desvantagem pode ser facilmente contornada se aplicada uma etapa de pré-concentração como SPE ou evaporação, por rota evaporação ou nitrogênio (N<sub>2</sub>) conforme aplicado por (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2004; ALEJANDRO *et al.*, 2014; KAONGA *et al.*, 2015a).

## **5.2 Avaliação da VA-MSPD para extração de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB**

No desenvolvimento do método para irgarol e diuron, observou-se que clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB não apresentavam resposta após a extração. Entretanto, os mesmos apresentavam resposta quando no padrão no solvente e no extrato (Figura 6). Uma possível explicação para este comportamento pode ser atribuída à interação dos compostos citados com constituintes da matriz, provavelmente proteínas, desta forma acarretando em uma modificação dos analitos. Sendo assim, considerando a alta seletividade da técnica de GC-ECD para analitos halogenados e a garantia de que todos os constituintes do extrato chegam ao detector, decidiu-se utilizar a técnica de GC-ECD para quantificação de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB.

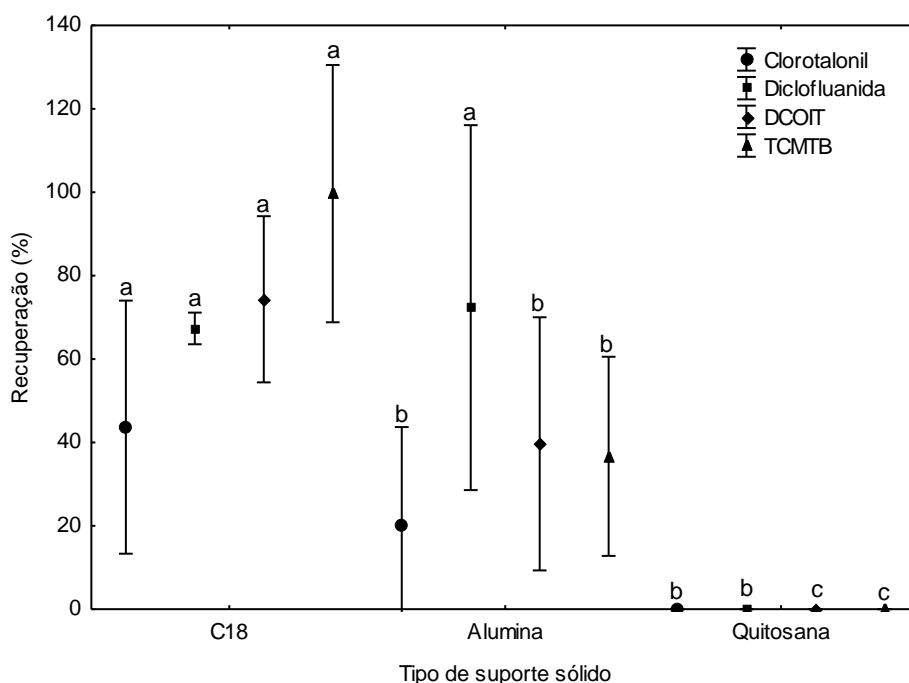
**Figura 6.** Cromatogramas no modo SRM para os compostos clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB no branco, padrão no extrato e após a extração.



### 5.2.1 Escolha do suporte sólido

Como já mencionado, o suporte sólido apresenta grande influência na extração dos compostos, uma vez que, este é responsável pela quebra da estrutura física da amostra e por consequência, disponibilização dos analitos para serem extraídos com um solvente adequado (BARKER, 2007). Sendo assim, três suportes sólidos foram avaliados, sendo eles C18<sub>R</sub>, alumina e quitosana, conforme pode ser observado na Figura 7. Cabe destacar que nesta etapa as injeções foram feitas manualmente, o que justifica os RSDs elevados.

**Figura 7.** Recuperação dos analitos na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup> utilizando diferentes suportes sólidos na etapa de dispersão da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de suporte sólido, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.



Dentre os suportes sólidos testados, o que apresentou melhores recuperações foi o teste com C18<sub>R</sub>. Sendo os valores estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) para todos os compostos com exceção da diclofluanida. Tal comportamento pode ser explicado devido ao fato de que o C18 possui grupos com características lipofílicas que acabam interagindo com a fase mais apolar da amostra e por consequência disponibilizando os analitos para serem extraídos, por consequência fornece extratos mais livre de interferências (CAPRIOTTI *et al.*, 2010). Por outro lado, quando alumina e quitosana foram avaliados como possíveis suportes sólidos, suas respostas foram estatisticamente diferentes e inferiores ao C18<sub>R</sub>.

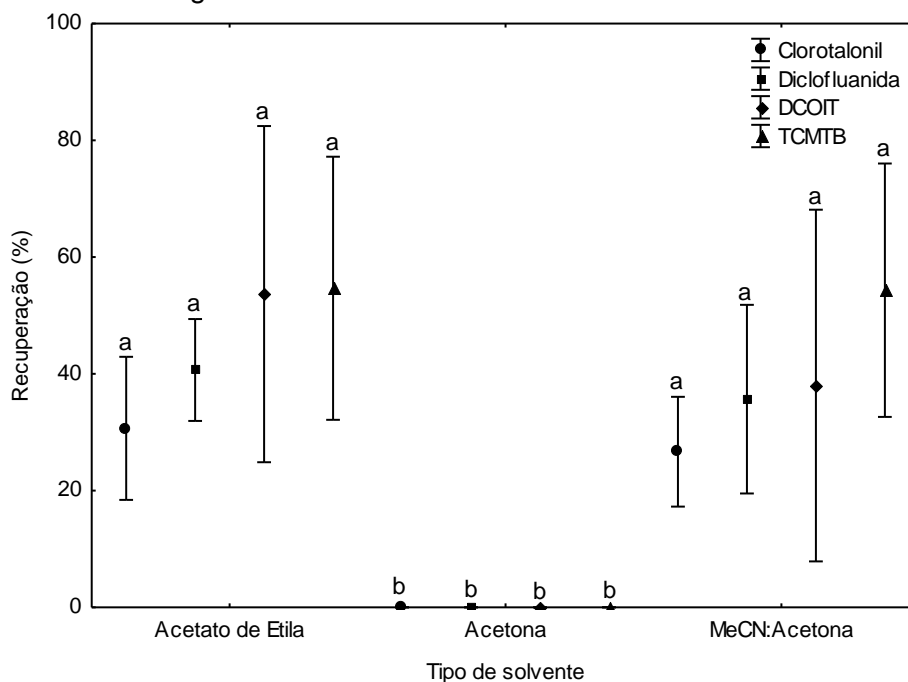
As recuperações inferiores provenientes dos testes com alumina podem ser explicadas pelas características inorgânicas deste material, uma vez que, as interações entre analitos

mais apolares e os constituintes da amostra (lipofílicos), pode ser desfavorecida, sendo assim os analitos podem não estar suficientemente disponíveis para extração (BARKER, 2000; CAPRIOTTI *et al.*, 2010). A falta de resposta quando utilizado quitosana, pode estar associada por uma possível interação entre os grupos amino da quitosana, base de Lewis, com grupos eletrofílicos dos analitos como, por exemplo, halogênios (MORRISON e BOYD, 1994; DOTTO *et al.*, 2012). Sendo assim, C18<sub>R</sub> foi selecionado para testes futuros.

### 5.2.2 Escolha do solvente extrator

Quando se trata de extração de contaminantes orgânicos em amostras biológicas, uma gama de solventes ou misturas dos mesmos pode ser aplicada (FERNANDEZ-ALBA, 2004). Embora a VA-MSPD não tenha restrições quanto à escolha do solvente, se torna necessário escolher solventes que sejam compatíveis com a técnica de quantificação escolhida para que não seja necessária uma etapa de evaporação e ressuspensão, principalmente quando se utiliza cromatografia gasosa, uma vez que, a presença de água nos extratos acarreta em diversos problemas (KUHN, 2002). Sendo assim, o uso de acetato de etila, acetona e uma mistura de MeCN:acetona (50:50 v/v) foram avaliadas neste estudo. Os resultados podem ser observados na Figura 8.

**Figura 8.** Recuperação dos analitos na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup> utilizando diferentes solventes na etapa de extração da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de Solvente, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.

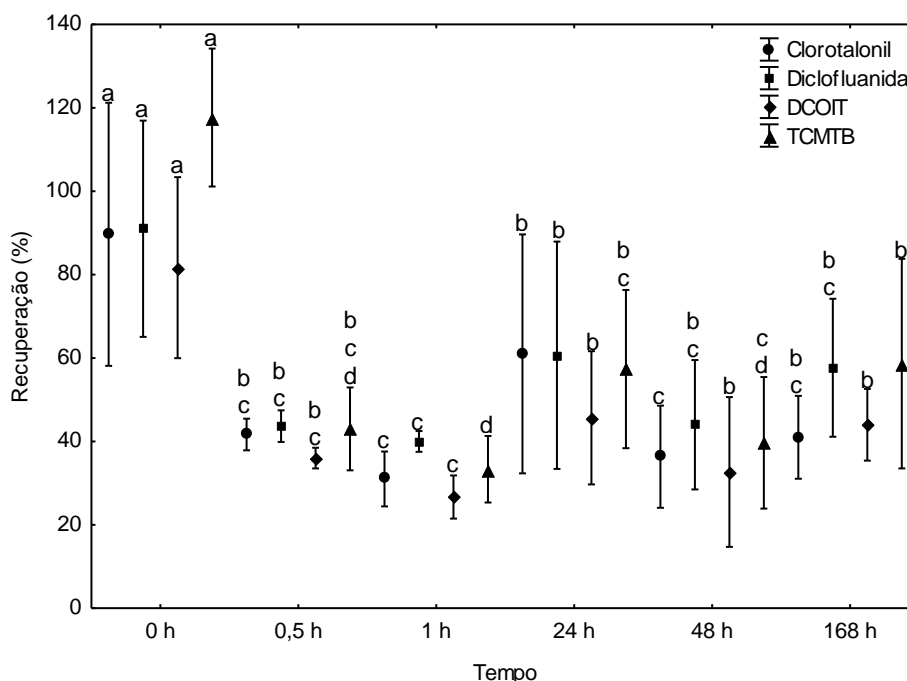


Dentre os solventes testados, acetato de etila e a mistura MeCN:acetona mostraram ser mais adequados para a extração dos analitos. O uso de acetato de etila traz vantagens como, uma baixa solubilidade em água quando comparado com MeCN e acetona, e a pouca quantidade de água que pode estar presente é facilmente removida com o uso de um sal com efeito secante (FERNANDEZ-ALBA, 2004). Além disto, acetato de etila é menos tóxico que MeCN e mais apolar dentre os solventes testados, assim, favorecendo a extração de compostos mais lipofílicos (FERNANDEZ-ALBA, 2004).

### 5.2.3 Tempo de fortificação

A seguir, na Figura 9, pode ser observada a interação dos compostos em estudo com relação ao tempo de fortificação.

**Figura 9.** Recuperação dos analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  quando avaliado diferentes tempos de fortificação. (Condições de extração: 0,5 g de amostra, 0,5 g de C18<sub>R</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.



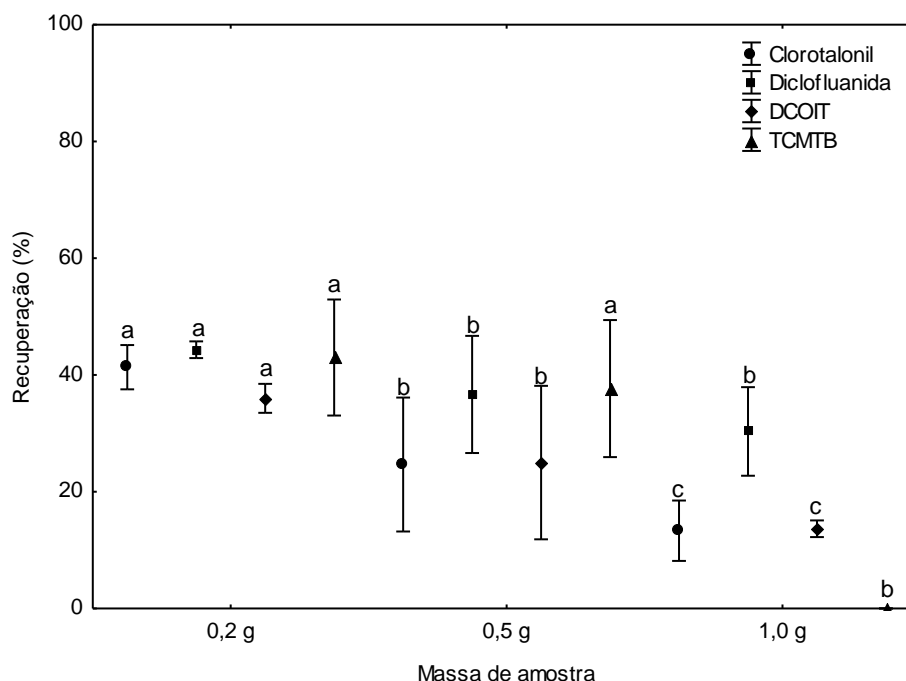
Conforme observado na Figura 8, as maiores recuperações são alcançadas quando a extração é feita logo após a fortificação. Após 0,5 h de fortificação até uma semana as recuperações caem para uma faixa de 26 a 61%. Tal queda na recuperação pode ser um indício de uma possível interação entre os analitos e a matriz proteica da amostra. Embora exista uma diferença significativa entre os experimentos a partir de 0,5 h, essa diferença pode estar mais associada às variações da técnica e a injeção manual do que a degradação e/ou adsorção dos analitos a matriz, sendo assim, o tempo de fortificação escolhido foi de 0,5 h,

uma vez que este tempo é suficiente para que haja uma interação significativa entre a amostra e os analitos.

#### 5.2.4 Massa de amostra

A seguir, na Figura 10, pode-se observar que as melhores recuperações foram alcançadas quando uma menor massa de amostra (0,2 g) foi utilizada e quando há um aumento na quantidade de amostra as recuperações diminuem, principalmente para TCMTB. Isto pode estar associado devido a quantidade de coextrativos, uma vez que, os constituintes da matriz podem estar interferindo na recuperação dos analitos.

**Figura 10.** Recuperação dos analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  quando avaliado o uso de quantidades diferentes de amostra na VA-MSPD. (Condições de extração: 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de Acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.



Embora a escolha da menor massa traga algumas desvantagens como um aumento no LOQ, menores quantidades de amostra traz vantagens como, por exemplo, menor resíduo gerado e vantagem quando o método é aplicado em outros tecidos que não estão presentes em grandes quantidades como fígado, brânquias e estômago.

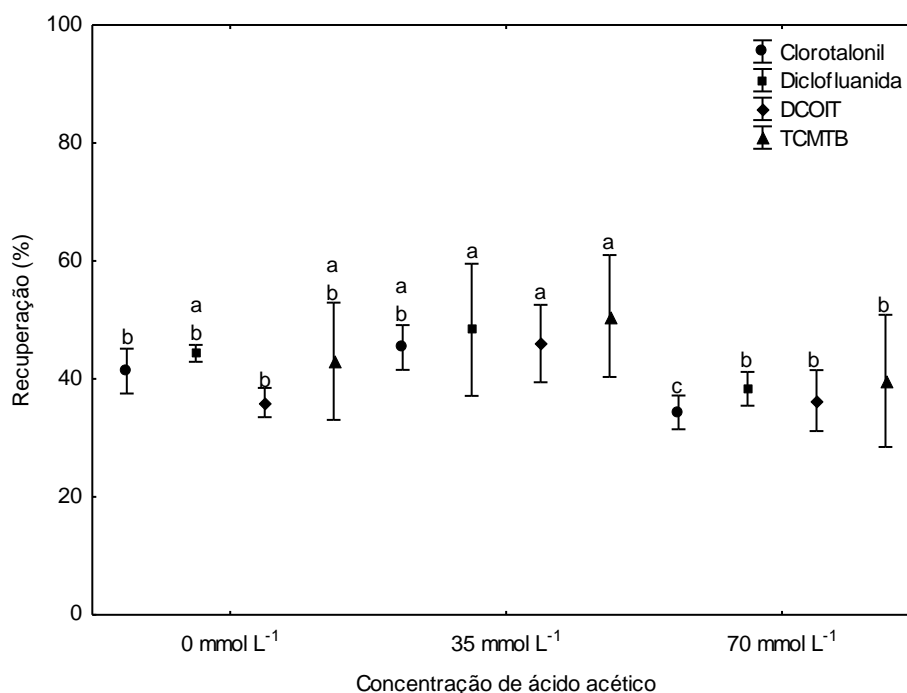
#### 5.2.5 Acidificação do solvente extrator

Como pode ser observado na Figura 11, as melhores recuperações foram atingidas quando se utilizou  $35 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético. Embora, não haja uma diferença significativa entre o não uso de ácido acético e  $35 \text{ mmol L}^{-1}$  do mesmo para clorotalonil, diclofluanida e



TCMTB, há um aumento na recuperação do DCOIT. Provavelmente, tal efeito pode estar associado ao fato de um pH mais baixo favorecer a presença da forma molecular do mesmo ou por estabiliza-lo, sendo assim favorecendo a partição na fase orgânica (FERNANDEZ-ALBA, 2004).

**Figura 11.** Recuperação dos analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  utilizando diferentes concentrações de ácido acético no solvente extrator da VA-MSPD. (Condições de extração: 0,2 g de amostra, 0,5 g de  $\text{C18}_R$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mL de acetato de etila, 5 min de maceração, 1 min de vórtex, 5 min a  $10179 \text{ xg}$ ). Barras de erro indicam RSD (%) ( $n=9$ ); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.



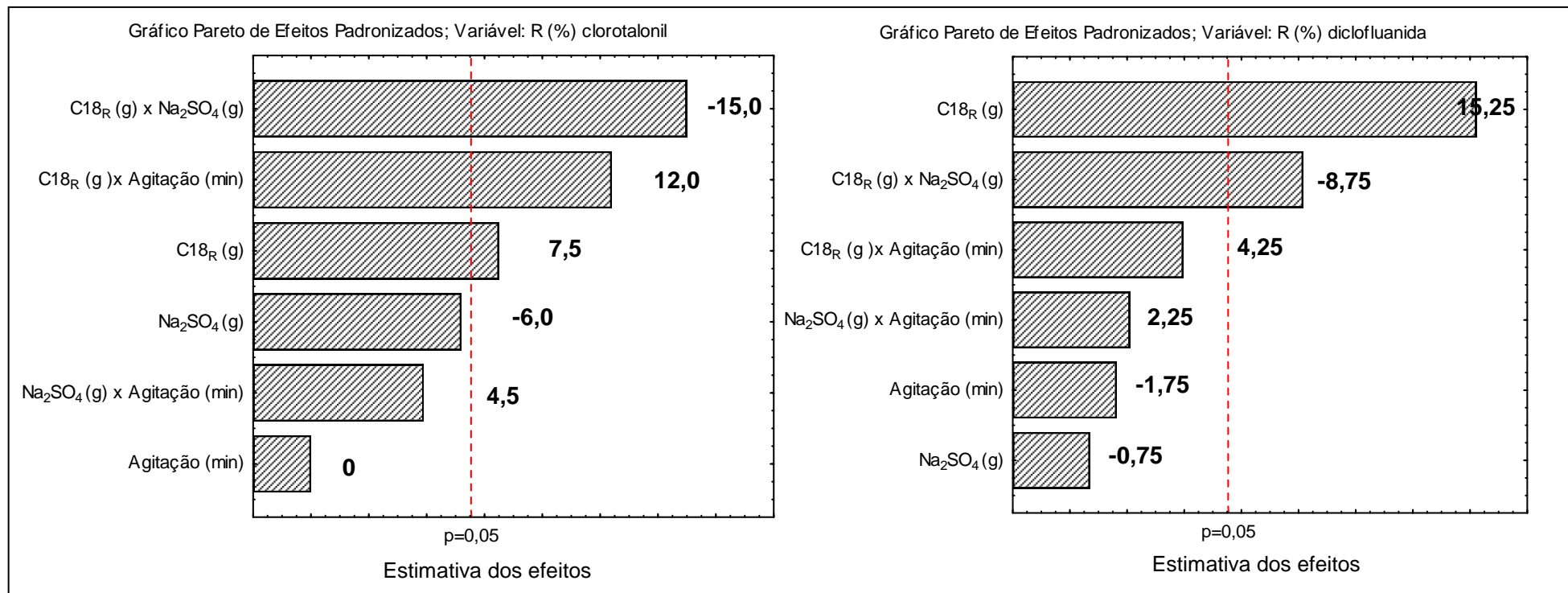
### 5.2.6 Planejamento fatorial completo $2^3$

Após a definição de  $\text{C18}_R$  como suporte sólido, acetato de etila acidificado com  $35 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético como solvente extrator, o uso de 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como sal secante, 0,2 g de massa de amostra e um tempo de fortificação de 0,5 h, através de testes univariados, um planejamento fatorial completo  $2^3$  foi conduzido para se averiguar a influência das variáveis massa de suporte sólido, massa de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e tempo de agitação na recuperação dos analitos (Item 4.10.6). Conforme observado na Tabela 12 as recuperações para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB variaram na faixa de 17-52%, 22-52%, 27-46% e 30-60%, respectivamente.

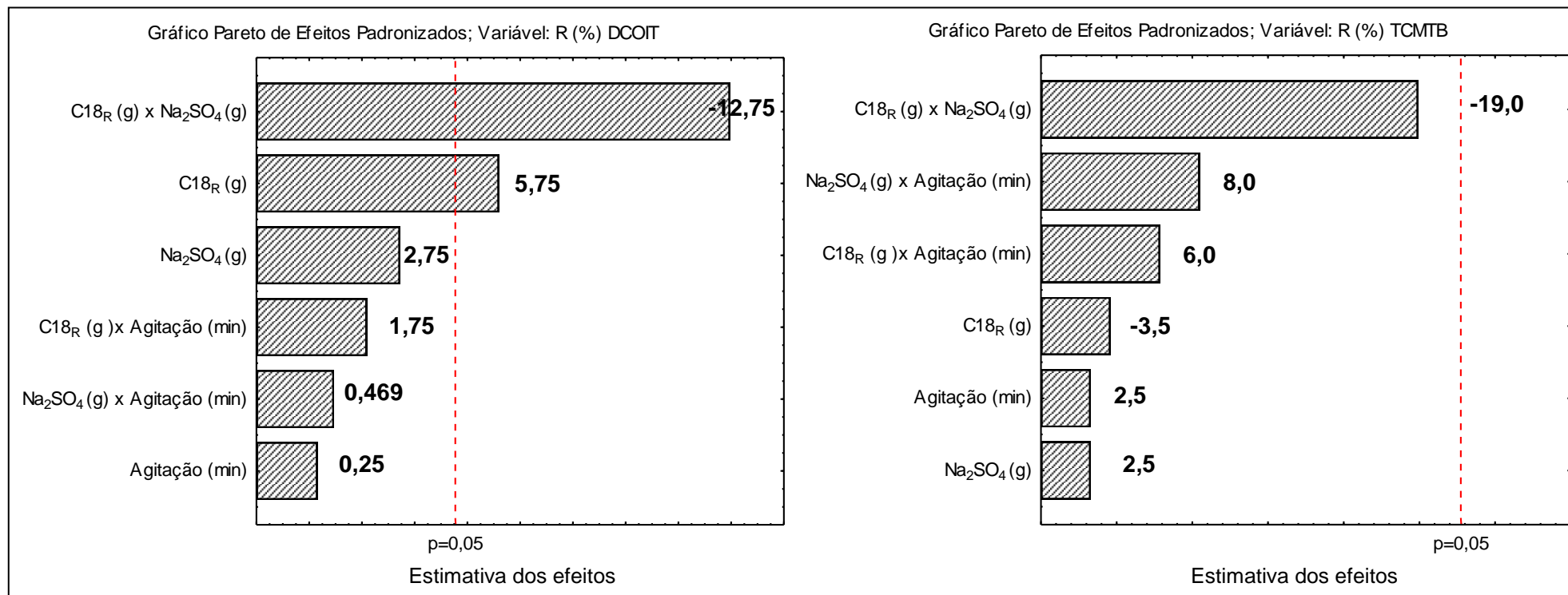
**Tabela 12.** Valores para as recuperações observada nos experimentos e os erros relativos para cada analito na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Ensaio	Clorotalonil		Diclofluanida		DCOIT		TCMTB	
	R (%)	Erro relativo (%)	R (%)	Erro relativo (%)	R (%)	Erro relativo (%)	R (%)	Erro relativo (%)
1	34	9	32	20	28	-2	50	27
2	44	6	50	1	46	-2	51	-8
3	38	-5	36	5	44	7	55	0
4	19	-8	40	-3	34	1	35	-4
5	17	-11	22	-16	27	-7	30	-19
6	52	-3	52	4	46	-2	60	8
7	31	10	34	-0.4	42	2	68	18
8	35	7	43	5	38	11	43	15
9	36	8	36	-4	39	3	42	-9
10	28	-19	34	-11	34	-11	33	-39
11	31	-7	35	-7	37	-2	38	-21

A análise dos efeitos para  $\text{C18}_R$  (g)( $X_1$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (g)( $X_2$ ), Agitação (min)( $X_3$ ) e suas combinações sobre a recuperação dos analitos mostrou que para a variável massa de suporte sólido, quando se passa do nível -1 para +1 se observa um ganho na resposta de todos os analitos com exceção do TCMTB, onde esta variável não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ). Foi possível observar também, que a interação entre massa de suporte sólido e massa de sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) apresenta um efeito negativo, ou seja, a variação simultânea do nível -1 para o +1 de ambas variáveis ( $X$  e  $y$ ) causa uma redução na recuperação de todos os analitos com exceção do TCMTB. Por outro lado, a interação, para as variáveis massa de suporte sólido e tempo de agitação, se observa um efeito positivo de 12% na recuperação para o clorotalonil (Figura 12 e 13).

**Figura 12.** Gráfico Pareto de efeitos padronizados para clorotalonil e diclofluanida; variável R(%).

**Figura 13.** Gráfico Pareto de efeitos padronizados para DCOIT e TCMTB; variável R(%).



Para a verificação do modelo matemático foi realizada a ANOVA (teste F de Fisher), considerando somente os efeitos significativos. Os modelos (Equações 9-12) são preditivos, uma vez que os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram maiores que os valores de  $F_{\text{tabelado}}$  em todos os casos (Tabela 13), e significativos com coeficientes de regressão de 0,92 para clorotalonil, 0,87 para diclofluanida, 0,90 para DCOIT, com exceção do TCMTB ( $r = 0,50$ ).

**Tabela 13.** Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.

Fonte de variação	Clorotalonil					Diclofluanida				
	SQ	GL	MQ	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}$	SQ	GL	MQ	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}$
Regressão	922,5	4	230,6	16,7	4,53	615,21	2	307,6	27,22	4,46
Resíduo	83,1	6	13,8			90,29	8	11,3		
Total	1005,6	10				708,5	10			

Fonte de variação	DCOIT					TCMTB				
	SQ	GL	MQ	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}$	SQ	GL	MQ	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}$
Regressão	391,27	2	195,6	36,2	4,46	722	1	722	9,08	4,46
Resíduo	42,93	8	5,4			714,9	9	79,43		
Total	434,2	10				1436,9	10			

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática;  $F_{\text{cal}}$ : valor de F calculado;  $F_{\text{tab}}$ : valor de F tabelado.

$$Y_{\text{Clorotalonil}} = 33,2 + 3,75x_1 - 3x_2 - 7,5x_1x_2 + 6x_1x_3 \quad (9)$$

$$Y_{\text{Diclofluanida}} = 37,6 + 7,62x_1 - 4,37x_1x_2 \quad (10)$$

$$Y_{\text{DCOIT}} = 37,7 + 2,87x_1 - 6,37x_1x_2 \quad (11)$$

$$Y_{\text{TCMTB}} = 45,9 - 9,5x_1x_2 \quad (12)$$

$$\text{Erro relativo} = ((Y - \hat{Y})/Y) * 100 \quad (13)$$

onde: Y = resposta experimental

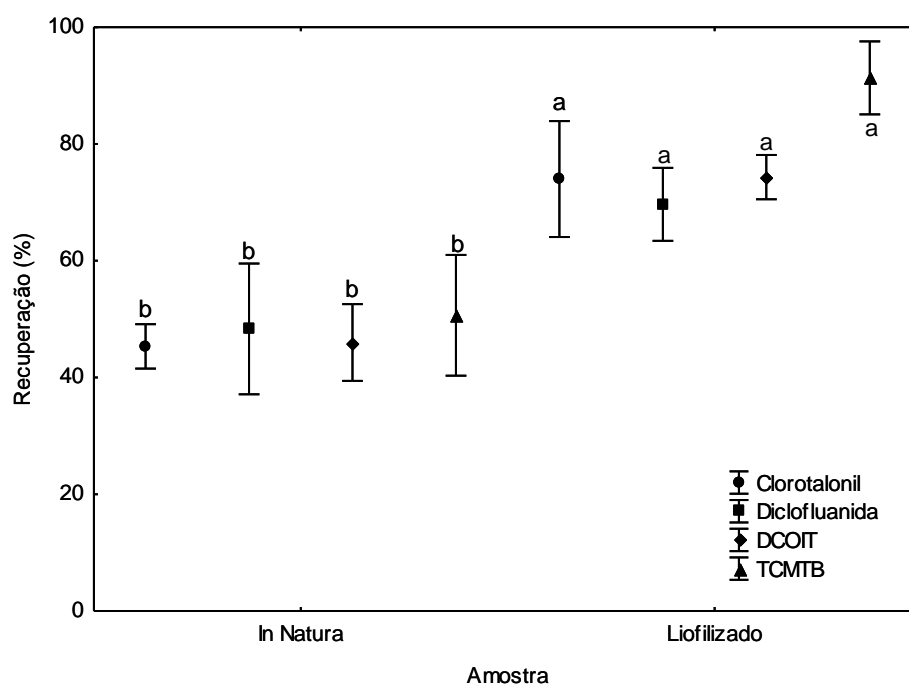
$\hat{Y}$  = resposta prevista pelo modelo

Os modelos obtidos foram utilizados para a determinação do erro relativo de cada ensaio (Equação 13), utilizando as variáveis codificadas. Os valores obtidos para os diferentes ensaios foram inferiores a 20%, com exceção do TCMTB onde o maior erro relativo foi de 39% (Tabela 12). Com base nestes dados, e buscando escolher o ensaio com um menor erro relativo, o ensaio 6, que consiste no uso de 2,0 g de C18<sub>R</sub>, 0,2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e um tempo de extração de 9 min, foi escolhido para as próximas etapas do estudo.

### 5.2.7 Uso de tecido liofilizado

Conforme observado na Figura 14, quando se utilizou tecido liofilizado, as recuperações para os analitos em estudo foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ), do que quando utilizado tecido *in natura*.

**Figura 14.** Recuperação dos analitos na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  quando avaliado o uso de tecido liofilizado. (Condições de extração: 0,2 g de amostra, 2,0 g de C18<sub>R</sub>, 0,2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mL de Acetato de etila acidificado com 35 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético, 5 min de maceração, 9 min de vórtex, 5 min a 10179 xg). Barras de erro indicam RSD (%) (n=9); letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de 5%.



Uma possível explicação para o tecido liofilizado ter apresentado melhores respostas pode estar relacionada ao fato da liofilização causar desnaturação das proteínas, devido a estresses como baixa na temperatura, formação de cristais de gelo e aumento da força iônica. Além de mudanças no pH e remoção de água da camada de hidratação de proteína o que permite que aumente a permeabilidade do solvente na amostra. Além disto, pode acabar danificando a estrutura secundária da proteína e deste modo, pode diminuir a disponibilidade de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e grupos sulfidril (-SH) ou até adicionar grupos hidroxilas (-OH) que conforme citado em estudos de (GALLAGHER *et al.* (1991); DOTTO *et al.* (2012); HOFF *et al.* (2012)) podem interagir com os grupos eletrofílicos dos analitos. Com base nestes conceitos e nas respostas obtidas, o uso de tecido liofilizado foi selecionado para as próximas etapas do estudo.

### 5.2.8 Validação do método empregando VA-MSPD e GC-ECD

Testes de linearidade foram conduzidos (curvas padrão em acetato de etila, no branco da VA-MSPD e por diluição de adição de padrão), na faixa de 0,005 – 0,1 mg L<sup>-1</sup> para clorotalonil e 0,025 – 0,5 mg L<sup>-1</sup> para diclofluanida, DCOIT e TCMTB, em todos os casos as curvas de calibração apresentaram coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) superiores a 0,999 (APÊNDICE B)(Tabela 14). Para este estudo o uso de curva analítica preparada por diluição de adição de padrão foi escolhida.

**Tabela 14.** Equação da reta e coeficiente de determinação obtido para cada composto quando feito por calibração externa, calibração por superposição na matriz e por diluição de adição de padrão.

Analitos	Curva analítica no solvente (acetato de etila:ácido acético 35 mmol L <sup>-1</sup> )		Curva analítica na matriz (filé de <i>Micropogonias furnieri</i> )		Curva analítica por diluição de adição de padrão	
	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Clorotalonil	$y = 2527631x - 1556$	0,999	$y = 3193412x + 2918$	0,992	$y = 2246508x + 4630$	0,999
Diclofluanida	$y = 945013x + 13710$	0,999	$y = 1272976x + 7448$	0,992	$y = 895660x + 10702$	0,999
DCOIT	$y = 3092704x + 6741$	0,999	$y = 3363895x + 2369$	0,992	$y = 2670610x + 9122$	0,999
TCMTB	$y = 2578533x - 44101$	0,999	$y = 3224757x - 35756$	0,991	$y = 2494382x - 10048$	0,999



Os valores de LOD do método foram de 38 ng g<sup>-1</sup> para clorotalonil e 190 ng g<sup>-1</sup> para diclofluanida, DCOIT e TCMTB. Já os valores de LOQ alcançados são 125 ng g<sup>-1</sup> para clorotalonil e 625 ng g<sup>-1</sup> para diclofluanida, DCOIT e TCMTB. Considerando que a presença destes analitos em amostras biológicas ocorre em níveis traços, os limites do método são aceitáveis. Por outro lado, não foi encontrado na literatura disponível método para comparação dos LOQs para DCOIT e TCMTB. Para diclofluanida existe apenas trabalho, onde o LOQ empregando a técnica de extração dispersiva em fase sólida e filtração em vial e determinação por LC-MS/MS foi inferior a 5 ng g<sup>-1</sup> para amostras de camarão. Já para a clorotalonil, há apenas um trabalho que alcança LOQ de 1 ng g<sup>-1</sup> pela técnica de extração assistida por ultrassom e determinação por GC-ECD. Cabe destacar que os valores de LOQ do método proposto podem ser facilmente reduzidos se for utilizada uma técnica de pré-concentração como utilizada em muitos trabalhos (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2004; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016).

Com o intuito de se avaliar exatidão, amostras de corvina (*Micropogonias furnieri*) liofilizadas foram fortificadas com uma mistura de padrão, contendo clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB, em três níveis LOQ, 5-LOQ e 10-LOQ. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração. Assim, foram obtidas recuperações entre 69 e 125%, com RSD < 15%. A precisão intermediária (RSD<sub>pi</sub>) foi avaliada da mesma forma nos níveis LOQ e 5-LOQ, porém, em outro dia. As recuperações alcançadas foram superiores a 70% com RSD < 18%. Os dados descritos na Tabela 15 e estão de acordo com parâmetros estabelecidos pelo guia de validação SANTE (SANTE, 2015).

**Tabela 15.** Limites de quantificação do método (LOQ), coeficientes de determinação ( $R^2$ ), exatidão R(%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi).

Analitos	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	R(%)			RSDr (%)			RSDpi (%)	
			LOQ	5-LOQ	10-LOQ	LOQ	5-LOQ	10-LOQ	LOQ	5-LOQ
Clorotalonil	125	0,999	76	76	87	14	6	4	13	10
Diclofluanida	625	0,999	108	69	85	8	6	6	8	17
DCOIT	625	0,999	91	69	80	6	5	5	6	14
TCMTB	625	0,999	125	77	89	7	7	6	5	15

### 5.2.9 Aplicação em diferentes espécies

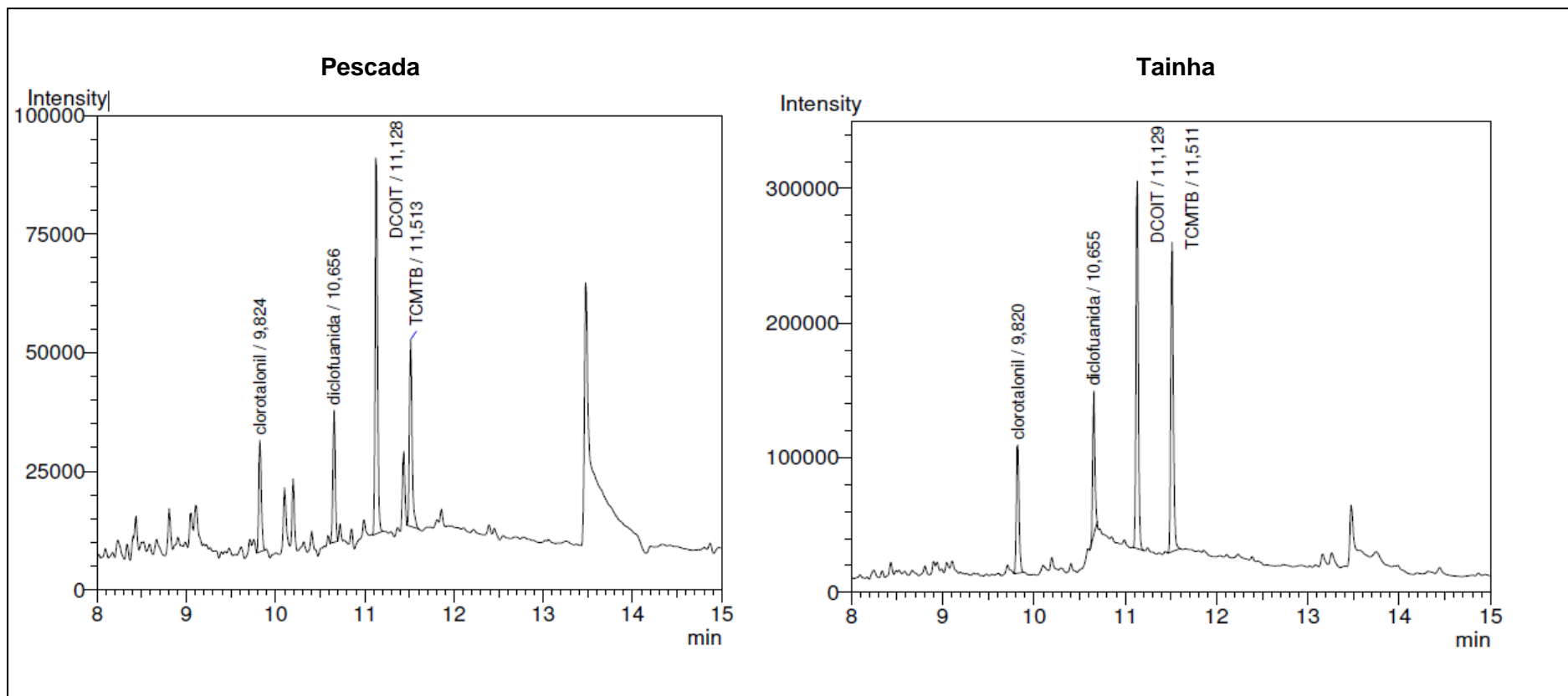
Após a validação o método foi aplicado em mais duas espécies de peixe, Tainha (*Mugil liza*) e Pescada (*Cynoscion guatucupa*), com a intenção de se avaliar a aplicabilidade. Sendo assim, as amostras foram fortificadas em um nível (10-LOQ) e submetidas ao processo de extração, conforme pode ser observado na Tabela 16 (Figura 15).

O método proposto apresentou resultados satisfatórios, recuperações superiores a 60% com RSD inferiores a 18%. Após a validação para todas as espécies em estudo, o método foi aplicado em amostras de músculo, nenhum resíduo de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB foi detectado.

**Tabela 16.** Exatidão R(%) e RSD(%) para as diferentes espécies de peixe testadas.

Analitos	<i>Mugil liza</i>	<i>Cynoscion guatucupa</i>
	10-LOQ	10-LOQ
	R(%)±RSD(%)	R(%)±RSD(%)
Clorotalonil	77±9	84±7
Diclofluanida	72±12	78±8
DCOIT	70±11	73±11
TCMTB	65±14	60±17

**Figura 15.** Cromatogramas na concentração de 5-LOQ e nos extratos brancos da corvina (5-LOQ), tainha (10-LOQ) e pescada (10-LOQ) nas melhores condições. Gás de arraste: H<sub>2</sub>; coluna analítica Restek Rtx®-1 (100% dimetilpolisiloxano) 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm; vazão 1,5 mL min<sup>-1</sup>.



#### 5.2.10 Comparação com outros métodos para extração de agrotóxicos em amostras de pescado

No que diz respeito à determinação de biocidas em amostras biológicas, poucos estudos são encontrados na literatura e os que são encontrados são baseados em métodos que foram desenvolvidos para sedimento. Como pode ser observado, os métodos desenvolvidos por Kaonga, 2015 e Alejandro, 2014, que desenvolveram métodos para extração de irgarol e diuron em músculo de pescado, utilizam extração por agitação mecânica e extração assistida por micro-ondas respectivamente (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; ALEJANDRO *et al.*, 2014; KAONGA *et al.*, 2015a). Existem alguns métodos para extração de pesticidas em tecido de pescado ou camarão que incluem clorotalonil e diclofluanida (SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016). Entretanto, a extração de clorotalonil e diclofluanida em amostras biológicas nem sempre alcança níveis satisfatórios de recuperação e/ou baixos desvios, como pode ser observado no estudo dirigido por Han *et al.*, 2014 e 2016, onde as recuperações para clorotalonil foram de 12 e 14% com desvios (RSD) superiores a  $\pm 20\%$  e para diclofluanida em camarão dependendo da técnica de detecção a recuperação obtida foi de 9 e 84% com RSD superiores a  $\pm 27\%$  (HAN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016).

Em contrapartida, técnicas envolvendo a quantificação de DCOIT e TCMTB em tecidos de pescado não foram encontrados até o momento na literatura disponível. Para tais compostos, os métodos desenvolvidos geralmente englobam matrizes como água (STEEN *et al.*, 2004; LA CARBONA *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011a) e sedimento (MARTINEZ e BARCELÓ, 2001; CASSI *et al.*, 2008; SAPOZHNIKOVA *et al.*, 2013b).

A seguir na Tabela 14, podem-se observar os métodos de preparo de amostra para amostras de pescado ou similares que possuem compostos com características similares aos compostos deste estudo. Com base nos dados descritos na Tabela 17, podemos observar que o método proposto utiliza uma menor quantidade de solvente, um menor tempo de extração, causa menos exposição ao analista, além de utilizar um solvente menos agressivo ao meio ambiente (FERNANDEZ-ALBA, 2004). Além disto, o método proposto atingiu recuperações superiores a 70% com RSD inferiores a  $\pm 20\%$ .

**Tabela 17.** Comparação entre o método de VA-MSPD proposto, frente a outros métodos de extração de agrotóxicos em amostras de pescado e camarão.

Amostra	Analito	Técnica de extração	Etapa de pré-concentração	Características	Técnica de quantificação	Performance analítica	Referência
Pescado <i>In natura</i>	Agrotóxicos	Ultrassom	SPE	20 mL hexano	GC-ECD	R (%) 70-108% RSD 5-17% <sup>b</sup> LOQ: 0,33-0,69 ng g <sup>-1</sup>	(SAPOZHNIKOV A <i>et al.</i> , 2004)
Camarão	Agrotóxicos	d-SPE com filtração <i>in-vial</i>	-	10 mL MeCN	<sup>a</sup> LPGC-MS	R (%) 70-115% RSD < 17% LOQ: >16,5 ng g <sup>-1</sup>	(HAN <i>et al.</i> , 2014)
Pescado <i>In natura</i>	Agrotóxicos	QuEChERS	-	10 mL MeCN	<sup>a</sup> LPGC-MS	R (%) 12-101% RSD 3-44% <sup>b</sup> LOQ: 16,5-33,0 ng g <sup>-1</sup>	(HAN <i>et al.</i> , 2016)
Pescado <i>In natura</i>	Biocidas	VA-MSPD	-	5 mL acetato de etila 35 mmol L <sup>-1</sup> ácido acético  2,0 g C18 <sub>R</sub>	GC-ECD	R (%) 69-125% RSD < 18% <sup>b</sup> LOQ: 125-625 ng g <sup>-1</sup>	Método proposto

a = Low pressure gas chromatography mass spectrometry (LPGC-MS)

b = Faixa de LOQ

## 6 CONCLUSÕES

---

---

A partir dos resultados obtidos, pode se concluir que a VA-MSPD demonstrou ser uma técnica versátil e eficiente para extração de seis biocidas em músculo de pescado com quantificação por diferentes técnicas.

Os procedimentos propostos, baseados na VA-MSPD com detecção por LC-MS/MS e por GC-ECD apresentaram valores para as figuras de mérito dentro dos parâmetros estipulados por guias de validação para extração de biocidas em tecido de pescado, demonstrando exatidão (60-125%) e precisão (RSD<18%), e com LOQs na faixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , comparável a trabalhos com o mesmo objetivo, além de ser aplicável em outras espécies de pescados.

Além disto, para um dos métodos, foi proposto o uso de concha de mexilhão como suporte sólido e de um bio-solvente (etanol) como solvente extrator, que são materiais biodegradáveis e obtidos de fontes renováveis, gerando então resíduos de fácil disposição, menor exposição do analista e o uso de reagentes atóxicos.

O método para clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB que utiliza C18<sub>R</sub> (2,0 g), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g) e acetato de etila 35 mmol L<sup>-1</sup> ácido acético (5 mL), embora não traga o uso de matérias alternativos para extração dos compostos, utiliza C18<sub>R</sub>, o que é uma vantagem para a redução de resíduos. Adicionalmente, é o primeiro método para extração de DCOIT e TCMTB em tecido de pescado, além de alcançar recuperações superiores a 70% para clorotalonil e diclofluanida, que são reconhecidos como compostos de grande dificuldade de extração em amostras biológicas de origem animal.

Em relação à robustez dos métodos, ambos são aplicáveis a pescado com uma composição de lipídeos e proteína na faixa de 0,6-4,0% e 70-80% respectivamente. Por fim, os métodos propostos constituem uma importante e inovadora ferramenta, uma vez que é a primeira aplicação da VA-MSPD para extração de biocidas em tecido de pescado, sendo capaz de ser utilizada no monitoramento de contaminação de peixes gerando dados sobre a presença destes compostos no ambiente.

## 7 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

---

---

Todos os resíduos gerados no decorrer deste trabalho foram recolhidos, transferidos para recipientes de vidro âmbar, rotulados de acordo com as normas da Escola de Química e Alimentos e armazenados para posterior recolhimento e tratamento por empresa contratada pela Universidade Federal do Rio Grande.



## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

---

Como sugestões futuras estão à aplicação do método proposto em estudos de tóxico cinética, a adição de uma etapa de pré-concentração e o estudo da interação entre clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB e proteínas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

ALBANIS, T. A. et al. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. **Chemosphere**, v. 48, n. 2002, p. 475-485, 2002.

ALEJANDRO, F. B. et al. Development and Application of a Microwave-Assisted Extraction and LC/MS/MS Methodology to the Determination of Antifouling Booster Biocides in Sea Mulletts (*Mugil cephalus*) Organisms. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 197-204, 2014.

ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1, p. 99-102, 2000. ISSN 0048-9697.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003. ISSN 1060-3271.

ARAI, T. et al. **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Springer, 2009.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0470862173.

BARFI, B. et al. Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers. **Journal of Chromatography A**, v. 1311, p. 30-40, 10/11/ 2013. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313013472> >.

BARKER, S. A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1, p. 63-68, 2000. ISSN 0021-9673.

\_\_\_\_\_. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 2, p. 151-162, 2007. ISSN 0165-022X.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residue from tissues by solidphase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

BATISTA-ANDRADE, J. A. et al. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. **Marine Pollution Bulletin**, v. 112, n. 1-2, p. 415-419, 11/15/ 2016. ISSN 0025-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X16306233> >.

BELLAS, J. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 367, n. 2, p. 573-585, 2006. ISSN 0048-9697.

BISELLI, S. et al. Concentrations of the antifouling compound Irgarol 1051 and of organotins in water and sediments of German North and Baltic Sea marinas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 233-243, 2000. ISSN 0025-326X.

BROWNLIE, B. G. et al. Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole and related benzothiazoles. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1153-1168, 1992. ISSN 1552-8618.

CALDAS, S. S. **Desenvolvimento de métodos baseados na DLLME com demulsificante água para determinação multiresíduo de agrotóxicos e fármacos e produtos de cuidado pessoal em amostras de água**. 2015. PPGQA, FURG, Rio Grande,

CALDAS, S. S. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013a. ISSN 0039-9140.

CALDAS, S. S. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 8/15/ 2013b. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013002038> >.

CALLOW, M. E.; WILLINGHAM, G. L. Degradation of antifouling biocides. **Biofouling**, v. 10, n. 1-3, p. 239-249, 1996/09/01 1996. ISSN 0892-7014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/08927019609386283> >.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBUHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007. ISSN 1463-9262. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B617536H> >.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186-193, 2015. ISSN 0165-9936.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2521-2532, 2010. ISSN 0021-9673.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 53-66, 2// 2013. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993612003111> >.

CARRO, A. M. et al. Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 35, n. 21, p. 2866-2874, 2012. ISSN 1615-9314.

CASSI, R.; TOLOSA, I.; DE MORA, S. A survey of antifoulants in sediments from Ports and Marinas along the French Mediterranean coast. **Marine pollution bulletin**, v. 56, n. 11, p. 1943-1948, 2008. ISSN 0025-326X.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CHANG, R. **Química geral**. AMGH Editora, 2009. ISBN 8563308173.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.

CHEN, C.-L.; TSAI, D.-Y.; DING, W.-H. Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of Dieldrin compounds in marketed fish. **Food chemistry**, v. 164, p. 286-292, 2014. ISSN 0308-8146.

CHEN, D.; HU, B.; HUANG, C. Chitosan modified ordered mesoporous silica as micro-column packing materials for on-line flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination of trace heavy metals in environmental water samples. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 491-497, 4/30/ 2009. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008008679> >.

CHEN, Y. et al. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 3/14/ 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307017700> >.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. . **Fundamentos de cromatografia**. . 2006.

COMBER, S.; GARDNER, M.; BOXALL, A. Survey of four marine antifoulant constituents (copper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 3, p. 417-425, 2002.

COSTA, M. B. D. et al. First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822)(Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 56, n. 2, p. 145-148, 2008. ISSN 1679-8759.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 453-465, 2011. ISSN 0025-326X.

DAVIES, P. E. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. II. Glutathione conjugates and protein binding. **Aquatic Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 265-275, 1985/12/01 1985. ISSN 0166-445X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X8590044X> >.

DAVIGLUS, M.; SHEESHKA, J.; MURKIN, E. Health benefits from eating fish. **Comments on Toxicology**, v. 8, n. 4-6, p. 345-374, 2002. ISSN 0886-5140.

DI LANDA, G. et al. Assessment of the potential ecological risks posed by antifouling booster biocides to the marine ecosystem of the Gulf of Napoli (Italy). **Water, air, and soil pollution**, v. 200, n. 1-4, p. 305-321, 2009. ISSN 0049-6979.

DIAZ, A. M. C.; LORENZO-FERREIRA, R.; CELA-TORRIJOS, R. Validation and quality control of methylmercury determinations by means of capillary electrophoresis. **Microchimica Acta**, v. 123, n. 1-4, p. 73-86, 1996. ISSN 0026-3672.

DINIZ, L. G. R. **Identificação de resíduos de irgarol em amostras de água da região portuária de São Luís, MA, e avaliação da toxicidade aguda e crônica do algicida frente a organismos aquáticos.** 2011. 76 Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão.

DOMINGUEZ, L. A. E. et al. The influence of salinity and matrix effect in the determination of antifouling biocides in estuarine waters of Patos Lagoon (southern Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1302-1310, 2014. ISSN 0103-5053. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532014000700020&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532014000700020&nrm=iso)>.

DÓREA, J. G. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: human health considerations. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1, p. 93-114, 2008. ISSN 0048-9697.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L.; PINTO, L. A. Kinetics and mechanism of tartrazine adsorption onto chitin and chitosan. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 19, p. 6862-6868, 2012. ISSN 0888-5885.

DUARTE, F. A. et al. Assessment of Modified Matrix Solid-Phase Dispersion as Sample Preparation for the Determination of CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> and Hg<sup>2+</sup> in Fish. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 10, p. 5015-5022, 2013. ISSN 0003-2700.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009. ISSN 0021-9673.

ELJARRAT, E. Methodologies for Sample Preservation and Stabilization. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Academic Press, Oxford**, p. 31-49, 2012.

ESCARRONE, A. L. V. et al. A vortex-assisted MSPD method for triclosan extraction from fish tissues with determination by LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 6, n. 20, p. 8306-8313, 2014. ISSN 1759-9660

1759-9679.

FAI, P. B.; GRANT, A.; REID, B. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1520-1531, 2007. ISSN 1552-8618.

FERNANDEZ-ALBA, A. R. **COMPREHENSIVE ANALYTICAL CHEMISTRY: Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues.** Elsevier, 2004. ISBN 0080454402.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. et al. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, n. 2, p. 303-312, 4/8/2002. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002000375>>.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal Environment and Health**, v. 1, n. 3, 2007.

FERRER, I.; BARCELÓ, D. Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 854, n. 1, p. 197-206, 1999. ISSN 0021-9673.

GALLAGHER, E. P.; KEDDERIS, G. L.; DI GIULIO, R. T. Glutathione S-transferase-mediated chlorothalonil metabolism in liver and gill subcellular fractions of channel catfish. **Biochemical pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 139-145, 1991. ISSN 0006-2952.

GATIDOU, G. et al. Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography–diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 505, n. 1, p. 153-159, 3/3/ 2004. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267003004124> >.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S.; ZHOU, J. L. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. **Environment international**, v. 33, n. 1, p. 70-77, 2007. ISSN 0160-4120.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 708-716, 2003. ISSN 0100-4042.

GOKSØYR, A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. In: DEGEN, G. H.; SEILER, J. P., et al (Ed.). **Toxicology in Transition: Proceedings of the 1994 EUROTOX Congress Meeting Held in Basel, Switzerland, August 21–24, 1994**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p.80-95. ISBN 978-3-642-79451-3.

HALL, L. W. et al. Ecological risk of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal California marinas and reference areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 702-710, 2009.

HAMWIJK, C. et al. Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. **Chemosphere**, v. 60, n. 9, p. 1316-1324, 2005. ISSN 0045-6535.

HAN, L. et al. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17-29, 6/3/ 2016. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316304927> >.

HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. **Analytica Chimica Acta**, v. 827, p. 40-46, 5/27/ 2014. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014003973> >.

HARINO, H. et al. Degradation of antifouling booster biocides in water. **Journal Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 1, p. 33-38, 2005a.

HARINO, H. et al. Monitoring of Antifouling Booster Biocides in Water and Sediment from the Port of Osaka, Japan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 303-310, 2005/04/01 2005b. ISSN 0090-4341. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0084-2>>.

HARINO, H. et al. Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 51, n. 3, p. 400-407, 2006. ISSN 0090-4341.

HELA, D. G.; PAPADOPOULOS, V. D. Estimating uncertainty in matrix solid phase extraction methodology for the determination of chlorinated compounds in fish. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 15, p. 1676-1697, 2013. ISSN 0306-7319.

HELALEH, M. I. H.; AL-RASHDAN, A.; IBTISAM, A. Simultaneous analysis of organochlorinated pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from marine samples using automated pressurized liquid extraction (PLE) and Power Prep™ clean-up. **Talanta**, v. 94, p. 44-49, 5/30/2012. ISSN 0039-9140. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914012001488>>.

HERNANDO, M. et al. Evaluation of antifouling booster biocides in marine water and sediments based on mass spectrometric techniques. In: (Ed.). **Antifouling Paint Biocides**: Springer, 2006. p.121-153. ISBN 3540314040.

HERNANDO, M. D. et al. Determination of traces of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1, p. 103-111, 2001. ISSN 0021-9673.

HERTZOG, G. I. et al. Study of vortex assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. no prelo, 2015.

HOFF, R. B. et al. Characterization and estimation of sulfaquinoxaline metabolites in animal tissues using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, n. 9, p. 2822-2830, 2012.

HORWITZ, W.; HORWITZ, W. **Official methods of analysis of AOAC International**. 2000. ISBN 0935584544.

HUANG, G. et al. Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. **Applied organometallic chemistry**, v. 7, n. 6, p. 373-380, 1993. ISSN 1099-0739.

IMO. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. <http://www.imo.org/>, 2008. Disponível em: <<http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-on-the-Control-of-Harmful-Anti-fouling-Systems-on-Ships-%28AFS%29.aspx>>. Acesso em: 10/07.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2011. Disponível em: < [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf) >. Acesso em: 9/5/2016.

ISAAC, V. J. **Synopsis of biological data on the whitemouth croaker: *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823)**. Food & Agriculture Org., 1988. ISBN 925102703X.

JACOBSON, A. H.; WILLINGHAM, G. L. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1, p. 103-110, 2000. ISSN 0048-9697.

JESSOP, P. G. Searching for green solvents. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1391-1398, 2011.

KAONGA, C. C.; TAKEDA, K.; SAKUGAWA, H. Antifouling agents and Fenitrothion contamination in seawater, sediment, plankton, fish and selected marine animals from the Seto Inland Sea, Japan. **Geochemical Journal**, v. 49, n. 1, p. 23-37, 2015a. ISSN 0016-7002.

\_\_\_\_\_. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion contamination for a river passing through an agricultural and urban area in Higashi Hiroshima City, Japan. **Science of The Total Environment**, v. 518–519, p. 450-458, 6/15/ 2015b. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715002880> >.

KONSTANTINOU, I.; ALBANIS, T. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 235-248, 2004. ISSN 0160-4120.

KOU, D.; MITRA, S. Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**, p. 139, 2003.

KREJČI, M.; DRESSLER, M. Selective detectors in gas chromatography. **Chromatographic Reviews**, v. 13, n. 1, p. 1-59, 1970/01/01 1970. ISSN 0009-5907. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009590770800059> >.

KUHN, E. R. Water Injections in GC-How Wet Can You Get? **LC GC NORTH AMERICA**, v. 20, n. 5, p. 474-478, 2002. ISSN 1527-5949.

LA CARBONA, S. et al. Efficacy and environmental acceptability of two ballast water treatment chemicals and an alkylamine based-biocide. **Science of the total environment**, v. 409, n. 2, p. 247-255, 2010. ISSN 0048-9697.

LAM, K.-H. et al. Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. **Environmental pollution**, v. 136, n. 2, p. 221-230, 2005. ISSN 0269-7491.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Application of solvent microextraction in a single drop for the determination of new antifouling agents in waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1, p. 17-23, 2004. ISSN 0021-9673.



LAMBROPOULOU, D. A.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Analysis of antifouling biocides Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in environmental water samples using solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 952, n. 1, p. 215-227, 2002. ISSN 0021-9673.

\_\_\_\_\_. Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1010, n. 1, p. 1-8, 2003. ISSN 0021-9673.

LAMOREE, M. et al. Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. **Journal of Chromatography A**, v. 970, n. 1, p. 183-190, 2002. ISSN 0021-9673.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. **Campinas, São Paulo**, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27-46, 2013.

LICHTENSTEIN, A. H. et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006 A scientific statement from the American Heart Association nutrition committee. **Circulation**, v. 114, n. 1, p. 82-96, 2006. ISSN 0009-7322.

LIU, D. et al. Transformation of the new antifouling compound Irgarol 1051 by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 31, n. 9, p. 2363-2369, 1997. ISSN 0043-1354.

LIU, D. et al. Mercuric chloride-catalyzed hydrolysis of the new antifouling compound irgarol 1051. **Water Research**, v. 33, n. 1, p. 155-163, 1999. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135498001869> >.

LOVELOCK, J.; LIPSKY, S. Electron Affinity Spectroscopy—A New Method for the Identification of Functional Groups in Chemical Compounds Separated by Gas Chromatography1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, n. 2, p. 431-433, 1960. ISSN 0002-7863.

LU, L. C.; WANG, C. I.; SYE, W. F. Applications of chitosan beads and porous crab shell powder for the removal of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in water solution. **Carbohydrate polymers**, v. 83, n. 4, p. 1984-1989, 2011. ISSN 0144-8617.

MARTINEZ, K.; BARCELÓ, D. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC–APCI–MS. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 370, n. 7, p. 940-945, 2001. ISSN 0937-0633.

MARTÍNEZ, K.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 879, n. 1, p. 27-37, 2000. ISSN 0021-9673.

MARTINEZ, K. et al. Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. **Environmental technology**, v. 22, n. 5, p. 543-552, 2001. ISSN 0959-3330.

MARTINS, M. L. et al. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84-91, 2016. ISSN 0021-9673.

MOCHIDA, K.; FUJII, K. Toxicity in plankton and fish. In: (Ed.). **Ecotoxicology of antifouling biocides**: Springer, 2009. p.364-382. ISBN 4431857087.

MOCHIDA, K. et al. Spatial analysis of 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (Sea-Nine 211) concentrations and probabilistic risk to marine organisms in Hiroshima Bay, Japan. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 233-240, 2015. ISSN 0269-7491.

MORABITO, R. et al. A new mussel certified reference material (CRM 477) for the quality control of butyltin determination in the marine environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 1, n. 1, p. 75-82, 1999.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Organic chemistry. **Allyn and Bacon, Inc., Boston**, v. 451, 1994.

MUKHERJEE, A.; RAO, K. V.; RAMESH, U. S. Predicted concentrations of biocides from antifouling paints in Visakhapatnam Harbour. **Journal Environmental Management**, v. 90 Suppl 1, p. S51-9, Feb 2009. ISSN 0301-4797 (Print)

0301-4797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976852> >.

NIELSEN, S. S. **Food analysis**. Springer, 2010. ISBN 1441914773.

OKAMURA, H. et al. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. **Water Research**, v. 34, n. 14, p. 3523-3530, 2000. ISSN 0043-1354.

PAN, J. et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 3/7/ 2014. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014000634> >.

PENALVER, A. et al. Solid-phase microextraction of the antifouling Irgarol 1051 and the fungicides dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 839, n. 1, p. 253-260, 1999. ISSN 0021-9673.

POCURULL, E. et al. Trace determination of antifouling compounds by on-line solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1, p. 361-368, 2000. ISSN 0021-9673.

READMAN, J. et al. Assessment of antifouling agents in coastal environments (ACE)—Final scientific and technical report (MAS3-CT98-0178). **Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK**, 2002.

READMAN, J. W. Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: KONSTANTINOU, I. K. (Ed.). **Antifouling Paint Biocides**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.1-15. ISBN 978-3-540-32844-5.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1–2, p. 36-53, 6/15/ 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730700218X> >.

RIVERO, A. et al. Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. **Talanta**, v. 153, p. 17-22, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84960923737&partnerID=40&md5=23b90465b660767d4eafdb58bfb5cf7f> >.

ROCHA, A. A. et al. Monitoring of Pesticide Residues in Surface and Subsurface Waters, Sediments, and Fish in Center-Pivot Irrigation Areas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2269-2278, 2015. ISSN 0103-5053. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532015001102269&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532015001102269&nrm=iso) >.

ROMBALDI, C. et al. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4805-4814, 2015. ISSN 1618-2642.

ROSSMOORE, H. W. Biocides for metalworking lubricants and hydraulic fluids. In: (Ed.). **Handbook of Biocide and Preservative Use**: Springer, 1995. p.133-184. ISBN 9401045917.

SAKKAS, V. A.; KONSTANTINOY, I. K.; ALBANIS, T. A. Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 930, n. 1, p. 135-144, 2001. ISSN 0021-9673.

\_\_\_\_\_. Photochemical fate of organic booster biocides in the aquatic environment. In: (Ed.). **Antifouling Paint Biocides**: Springer, 2006. p.171-200. ISBN 3540314040.

SAKKAS, V. A. et al. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, n. 5, p. 327-332, 2002. ISSN 0944-1344.

SALEH, A. et al. Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf. **Marine pollution bulletin**, v. 105, n. 1, p. 367-372, 2016. ISSN 0025-326X.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á. et al. Probabilistic risk assessment of common booster biocides in surface waters of the harbours of Gran Canaria (Spain). **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 5, p. 985-991, 2011a. ISSN 0025-326X.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. **Chemosphere**, v. 82, n. 1, p. 96-102, 2011b. ISSN 0045-6535.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Analytical methods for the determination of common booster biocides in marine samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 521-533, 2012. ISSN 1895-1066

1644-3624.

SANTE. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2015. Disponível em: < [http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant\\_pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf) >. Acesso em: 8/2/2016.

SAPOZHNIKOVA, Y.; BAWARDI, O.; SCHLENK, D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. **Chemosphere**, v. 55, n. 6, p. 797-809, 5// 2004. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504000062> >.

SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Antifouling biocides in water and sediments from California marinas. **Marine pollution bulletin**, v. 69, n. 1, p. 189-194, 2013a. ISSN 0025-326X.

\_\_\_\_\_. Antifouling biocides in water and sediments from California marinas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1–2, p. 189-194, 4/15/ 2013b. ISSN 0025-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13000544> >.

SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Distribution of antifouling biocides in California marinas. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 9, p. 1069-1075, 2008.

SAPOZHNIKOVA, Y. et al. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. **Chemosphere**, v. 60, n. 2, p. 196-205, 7// 2005. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505000731> >.

SCARLETT A., D. P., FILEMAN T. W., MORRIS R. J. Occurrence of the antifouling herbicide, irgarol 1051, within coastal-water seagrasses from Queensland Australia **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 8, p. 687-691, 1999.

SCHMIDT, L. Avaliação do comportamento de espécies de mercúrio em peixes após diferentes métodos de cocção. **PPGQ, UFSM, Santa Maria**, 2011.

SEBASTIÀ, N. et al. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2609-2612, 2010. ISSN 0021-8561.

ŠEVČÍK, J. **Detectors in gas chromatography**. Elsevier Scientific Publishing Company, 1976. ISBN 008085804X.

SKOOG, D. A. **Fundamentals of analytical chemistry**. Grupo Editorial Norma, 2006. ISBN 0030355230.

STEEN, R. J. et al. Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in a Danish Harbor. **Chemosphere**, v. 57, n. 6, p. 513-521, 2004. ISSN 0045-6535.

TAKAHASHI, K. Release rate of biocides from antifouling paints. In: (Ed.). **Ecotoxicology of antifouling biocides**: Springer, 2009. p.3-22. ISBN 4431857087.

THOMAS, K. V.; BLAKE, S. J.; WALDOCK, M. J. Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 739-745, 2000. ISSN 0025-326X.

THOMAS, K. V.; BROOKS, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling**, v. 26, n. 1, p. 73-88, Jan 2010. ISSN 1029-2454 (Electronic)

0892-7014 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390558> >.

THOMAS, K. V.; LANGFORD, K. H. The analysis of antifouling paint biocides in water, sediment and biota. In: (Ed.). **Ecotoxicology of Antifouling Biocides**, 2009. p.311-327.

THOMAS, K. V. et al. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. **Environmental Pollution**, v. 123, n. 1, p. 153-161, 2003. ISSN 0269-7491.

THOMAS, K. V.; MCHUGH, M.; WALDOCK, M. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 293, n. 1, p. 117-127, 2002. ISSN 0048-9697.

TÖLGYESSY, P.; MIHÁLIKOVÁ, Z.; MATULOVÁ, M. Determination of Selected Chlorinated Priority Substances in Fish using QuEChERS Method with Dual dSPE Clean-up and Gas Chromatography. **Chromatographia**, p. 1-8, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84982300210&partnerID=40&md5=ce2458a6aeb18bba7bb48d3d45736657> >.

TSANG, V. W.-H.; LEI, N.-Y.; LAM, M. H.-W. Determination of Irgarol-1051 and its related s-triazine species in coastal sediments and mussel tissues by HPLC–ESI-MS/MS. **Marine pollution bulletin**, v. 58, n. 10, p. 1462-1471, 2009. ISSN 0025-326X.

VAN WEZEL, A.; VAN VLAARDINGEN, P. Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for antifouling substances. **RIVM report**, v. 601, n. 501, p. 008, 2001.

VAN WEZEL, A. P.; VAN VLAARDINGEN, P. Environmental risk limits for antifouling substances. **Aquatic toxicology**, v. 66, n. 4, p. 427-444, 2004. ISSN 0166-445X.

VILLAVERDE-DE-SÁA, E. et al. Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 1, p. 509-518, 2012. ISSN 1618-2642.

VOULVOULIS; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Alternative antifouling biocides. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 135-143, 1999a. ISSN 1099-0739. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199903\)13:3<135::AID-AOC831>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199903)13:3<135::AID-AOC831>3.0.CO;2-G) >.

VOULVOULIS, N. Antifouling paint booster biocides: occurrence and partitioning in water and sediments. In: (Ed.). **Antifouling paint biocides**: Springer, 2006. p.155-170. ISBN 3540314040.

VOULVOULIS, N.; SCRIMSHAW, M.; LESTER, J. Analytical method development for the determination of four biocides used in antifouling paints in estuarine waters and sediments by gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 50, n. 5-6, p. 353-357, 1999b. ISSN 0009-5893.

\_\_\_\_\_. Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment. **Marine Environmental Research**, v. 53, n. 1, p. 1-16, 2002. ISSN 0141-1136.

WALKER, W. W. et al. Biological and abiotic degradation of xenobiotic compounds in in vitro estuarine water and sediment/water systems. **Chemosphere**, v. 17, n. 12, p. 2255-2270, // 1988. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0045653588901397> >.

WANG, P. et al. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. **Anal Chim Acta**, v. 663, n. 1, p. 43-8, Mar 17 2010. ISSN 1873-4324 (Electronic)

0003-2670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172095> >.

WELCH, C. J. et al. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667-680, 2010. ISSN 0165-9936.

WEN, Y. et al. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26-41, 2014. ISSN 0165-9936.

WU, M. et al. Polydopamine-based immobilization of a hydrazone covalent organic framework for headspace solid-phase microextraction of pyrethroids in vegetables and fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 34-41, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84979518489&partnerID=40&md5=737d00f09fedddeecc3c053bfeb79f45> >.

YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 50, n. 2, p. 75-104, 2004. ISSN 03009440.

ZIARRUSTA, H. et al. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, p. 18-30, 2015. ISSN 0021-9673.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

---

---

### TRABALHOS EM ANAIS DE CONGRESSOS:

- BATISTA-ANDRADE, J. A.; Vieira, A. A.; CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G.. **ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS ANTI- INCRUSTANTES EM SEDIMENTOS MARINHOS** - 18º Encontro Nacional de Química Analítica 2016 (Florianópolis);
- ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; BATISTA-ANDRADE, J. A.; Vieira, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.. **USO DE QUITOSANA NA ETAPA DE LIMPEZA DO MÉTODO QuEChERS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE LEITE** - 18º Encontro Nacional de Química Analítica 2016 (Florianópolis);
- ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; BATISTA-ANDRADE, J. A.; Vieira, A. A.; GEHRKE, V. R.; CAMARGO, E. R.; PRIMEL, E. G.. **DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE S-METOLACLORO E METOLACLORO-OA EMPREGANDO FILTRAÇÃO-DILUIÇÃO-INJEÇÃO, SPE E LC-MS/MS** - Encontro Nacional de Química Analítica 2016 (Florianópolis).
- Vieira, A. A.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V.; FILLMANN, G.; PRIMEL, E. G. . **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES EM TECIDO DE PEIXE** - 18º Encontro Nacional de Química Analítica 2016 (Florianópolis);
- Vieira, A. A.; CALDAS, SERGIANE S.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.. **ESTUDO E APLICAÇÃO DA DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA (MSPD) PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES EM TECIDOS DE PEIXE** - VII Encontro de Pós-Graduação, 2015 (Rio Grande).
- Porto, A. M.; Schneider A.; Vieira, A. A.; Caldas, S. S.; Marube, L. C.; Primel, E. G.; **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA** – 25º Congresso de Iniciação Científica 2016 (Rio Grande).

**ARTIGO SUBMETIDO:**

Augusto A. Vieira, Sergiane S. Caldas, Ana Laura Venquiaruti Escarrone, Jean Lucas de Oliveira Arias, Ednei Gilberto Primel - **Bio-solvents and alternative solid supports applied to vortex-assisted MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue** - Journal of Chromatography A (submetido em 8/11/16)

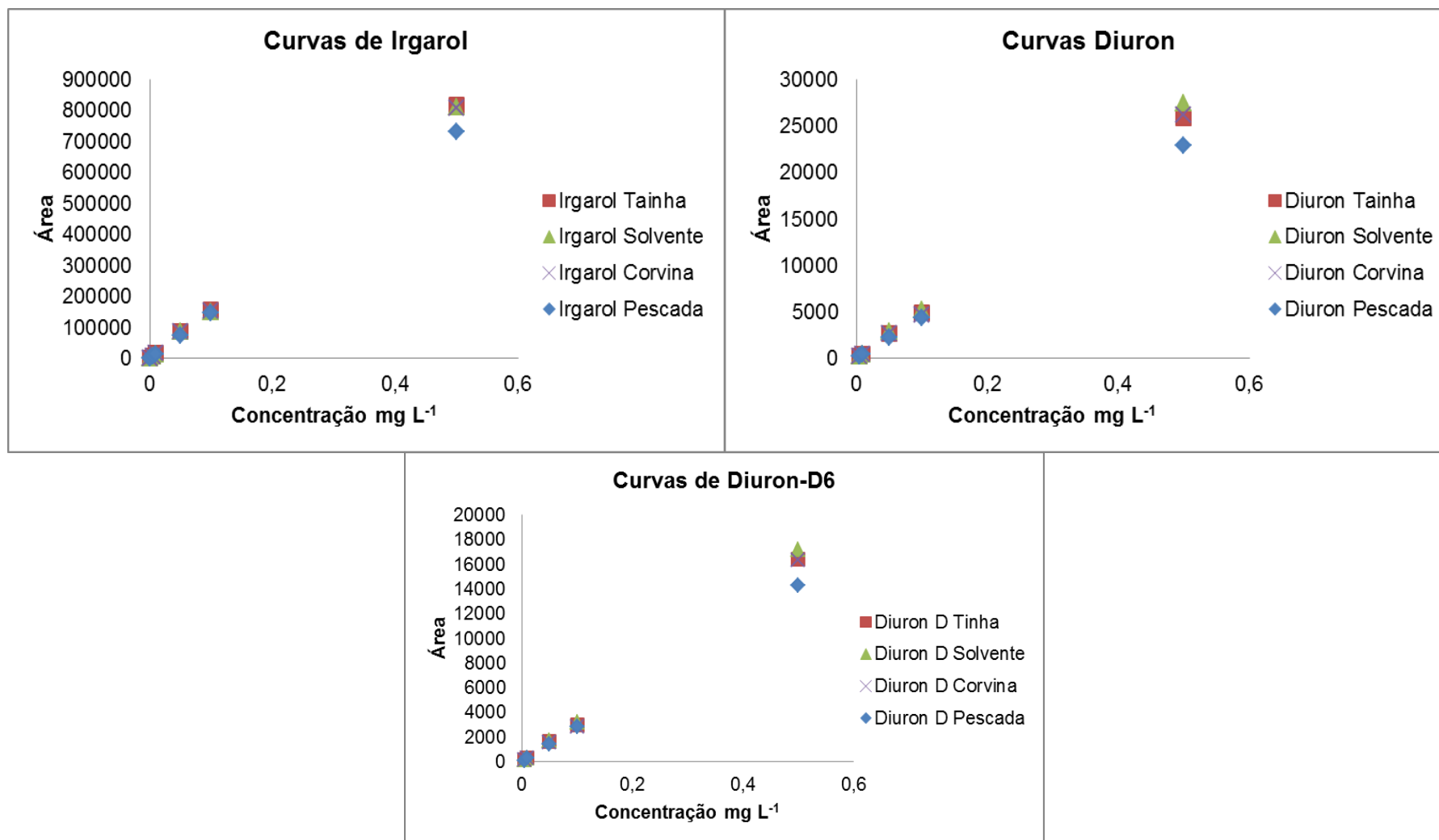
**Abstract**

This study aims at introducing an environmentally friendly procedure for the extraction of two common booster biocides, Irgarol 1051 and Diuron, from fish muscle samples of *Micropogonias furnieri*, *Mugil liza* and *Cynoscion guatucupa* by vortex-assisted matrix solid phase dispersion (VA-MSPD) with detection by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Different types of solid supports and solvents, besides the influence of salt, were evaluated. Best results were obtained when 0.5 g mussel shell, 0.5 g sodium sulfate and 5 mL ethanol were used. Analytical recoveries ranged from 81 to 110%, with RSD below 10%. LOQ values of irgarol and diuron were 50 and 5 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The method under investigation has shown to be a promising alternative to extracting booster biocides from fish tissues with low consumption of reagents and the use of biodegradable reagents. Besides, this is the first study that applies VA-MSPD to the extraction of booster biocides from fish tissues.



## APÊNDICE A

Figura 16. Superposição das curvas analíticas no solvente e nos extratos demonstrando o efeito matriz ao longo das curvas analíticas.



## APÊNDICE B

**Figura 17.** Superposição das curvas analíticas obtidas por diluição de adição de padrão nas três espécies de peixe.

