



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS
EM FILÉ DE PEIXE UTILIZANDO QuEChERS
MODIFICADO E GC-(TQ)MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Scariot Munaretto

Santa Maria – RS, Brasil

2012

DETERMINAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM FILÉ DE
PEIXE UTILIZANDO QuEChERS MODIFICADO E GC-(TQ)MS/MS

Juliana Scariot Munaretto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM FILÉ DE
PEIXE UTILIZANDO QuEChERS MODIFICADO E GC-(TQ)MS/MS**

elaborado por
Juliana Scariot Munaretto

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Carin Von Mühlen
Universidade Feevale

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012

Dedico esse trabalho em especial a minha mãe, a qual sempre me apoiou em todos os momentos, e aos meus tios Alexandre, Maria e Irma que sempre torceram por mim e me fizeram ver que vale a pena.

Obrigada por tudo!
AMO VOCÊS DEMAIS!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Renato Zanella pela orientação, pelo aprendizado e a pela oportunidade dada para participar do grupo LARP.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, pela co-orientação, pelo apoio e incentivo na realização desse trabalho.

Aos meus colegas do LARP que me apoiaram e se dispuseram a me ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Em especial ao Manoel Leonardo Martins pela paciência, pelos ensinamentos, pelo apoio e interesse demonstrado ao tema do meu trabalho.

Aos meus mais que colegas, mas sim amigos verdadeiros por toda a ajuda oferecida, pelos conselhos, pela paciência e pela disposição. Giovana sempre esforçada e disposta a trabalhar nos finais de semana, amiga para todos os momentos. Débora e Danieli amigas especiais desde que cheguei em Santa Maria, vocês dispensam comentários. Lucila pela dedicação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Filipe, Tiele, Magali, Mariela e Mariele por toda a ajuda oferecida. A vocês, MUITO OBRIGADA!

Aos meus amigos que estão longe, mas que em vários momentos foram muito importantes durante essa etapa da minha vida, mesmo longe vocês sabem o quanto são especiais e o quanto agradeço a ajuda, o apoio e todo o incentivo oferecido. Amizade que a distância não consegue apagar!

À minha mãe que sempre torceu por mim, me apoiou, me incentivou, me aconselhou, o meu sincero agradecimento. Você é a pessoa mais importante na minha vida!

Aos meus tios, que de mesmo modo que minha mãe, sempre estiveram presentes em todos os momentos apoiando todas as minhas decisões. Meu agradecimento eterno a vocês, amo vocês!

À Rita, minha pseudo mãe em Santa Maria, minha conselheira em todos os momentos, muito obrigada.

À minha banca de qualificação, Prof. Dr. Renato, Profa. Dra. Martha e ao Dr. Manoel pelas contribuições realizadas para esse trabalho, sendo as mesmas de grande importância.

À minha banca de defesa, Prof. Dra Carin von Mühlen, Prof. Dra Vânia Lucia Loro e Prof. Dr. Renato Zanella pelas contribuições e sugestões a fim de engrandecer esse trabalho.

À todos os demais familiares e amigos que de alguma forma torceram por mim e me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, os quais contribuíram para minha formação.

Aos secretários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela gentileza e atenção dispensadas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido e pela bolsa de mestrado.

À Deus pela força e proteção. Tudo é possível, basta ter fé e acreditar. Porque no final, tudo dá certo!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EM FILÉ DE PEIXE UTILIZANDO QuEChERS MODIFICADO E GC-(TQ)MS/MS

Autora: Juliana Scariot Munaretto
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012

Compostos conhecidos como disruptores endócrinos (DEs), tais como agrotóxicos, alquilfenóis, hormônios, dentre outras classes de substâncias são responsáveis pela alteração de funções do sistema endócrino. Esse efeito ocorre quando os DEs interagem com os receptores hormonais, alterando os padrões de resposta natural do sistema endócrino. Os organismos aquáticos, como os peixes são capazes de acumular concentrações de DEs várias vezes superiores a água ao seu redor. Conseqüentemente, os peixes são uma importante fonte de contaminação para seus predadores e consumidores humanos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método rápido para a determinação de 40 disruptores endócrinos em filé de peixe (jundiá), utilizando QuEChERS modificado e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, empregando analisador triplo quadrupolo (GC-(TQ)MS/MS). Utilizou-se do planejamento fatorial em estrela para otimização do procedimento de extração, o qual consiste da extração de 10,0 g de filé de peixe com 10,0 mL de acetonitrila/1% (v/v) ácido acético seguido de agitação manual por 1 min. Na etapa de partição adicionou-se 2,0 g de cloreto de sódio, 1,7 g de acetato de sódio anidro e 0,3 g de sulfato de magnésio anidro. Realizou-se agitação por 1 min e centrifugação a 3400 rpm por 8 min. Em seguida, o extrato foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo os sorventes C18 e PSA, além de sulfato de magnésio anidro. Foi realizada a agitação manual e centrifugação, o extrato foi filtrado e analisado por GC-(TQ)MS/MS. O método foi validado fortificando a amostra “branco” em três níveis de concentração (10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) obtendo valores de recuperação entre 70,1 e 120,0% para 36 dos 40 disruptores endócrinos avaliados. Valores de RSD inferiores a 20% garantiram a boa precisão do método. A linearidade foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação (r^2) sendo este maior que 0,996 para todos os compostos. O efeito matriz foi avaliado, o qual foi bastante intenso para a maioria dos compostos, com valores superiores a 10%. O efeito matriz foi compensado utilizando-se curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. A aplicação do método foi realizada em 6 amostras de filé de peixe de diferentes espécies, nas quais resíduos de bisfenol A, clorpirifós etílico e bifentrina foram encontrados. O método QuEChERS modificado proposto para a determinação de disruptores endócrinos em filé de peixe utilizando GC-(TQ)MS/MS mostrou ser eficaz, podendo ser aplicado em análise de rotina.

Palavras Chave: QuEChERS, GC-(TQ)MS/MS, filé de peixe, disruptores endócrinos

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DETERMINATION OF ENDOCRINE DISRUPTERS IN FISH FILLET BY MODIFIED QuEChERS AND GC-(TQ)MS/MS

Author: Juliana Scariot Munaretto
Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 27th February, 2012

Endocrine Disrupter Compounds (EDCs) like pesticides, alkylphenols and hormones among other classes of compounds are responsible for alterations in the endocrine system functions. Endocrine disruption occurs when EDCs interact with the hormone receptors, altering the natural response patterns of the endocrine system. Aquatic organisms, such as fish, are able to accumulate EDCs residues in concentration several times higher than the surrounding water. Consequently, fish is a major source of contamination for both top predators and human consumers. This study aimed to develop and validate a fast method for the determination of 40 endocrine disrupters in fish fillet, using modified QuEChERS and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry in tandem, using a triple quadrupole analyzer (GC-(TQ)MS/MS). A factorial design was performed to optimize the extraction procedure, which consist of the extraction of 10.0 g of fish fillet with 10.0 mL of acetonitrile with 1% (v/v) of acetic acid followed by manual shaking for 1 min. In the partition step 2.0 g of sodium chloride, 1.7 g of anhydrous sodium acetate and 0.3 g of anhydrous magnesium sulfate were added, followed by shaking and centrifugation at 3400 rpm for 8 min. Then the extract was transferred to a 15 mL polypropylene tube containing the C18 and PSA sorbents, beyond the anhydrous magnesium sulfate. After shaking and centrifuging, the supernatant was filtered and analyzed by GC-(TQ)MS/MS. The method was validated by spiking the "blank" sample at three concentration levels (10, 25 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) obtaining recovery values between 70.1 to 120.0% for 36 of the 40 endocrine disrupters evaluated. RSD values below 20% ensured the good precision of the method. The linearity was evaluated using the coefficient of determination (r^2) with values higher than 0.996 for all compounds. The matrix effect was evaluated, and it was pretty intense for most compounds, with values exceeding 10%. This effect was compensated using analytical curves obtained with standards prepared in "blank" matrix extracts. This method was applied in 6 samples of fish fillet from different species. Residues of bisphenol A, chlorpyrifos and bifenthrin were detected. Therefore, the modified QuEChERS method proved to be appropriated for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using GC-(TQ)MS/MS since it showed to be effective and can be applied to routine analysis.

Keywords: QuEChERS, GC-(TQ)MS/MS, fish fillet, endocrine disrupters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais características das fontes de ionização empregadas em acoplamentos GC/MS e LC/MS (adaptado de LANÇAS, 2009).....	38
Figura 2 -	Esquema da fonte de ionização por elétrons (CHROMEDIA, 2011).....	39
Figura 3 -	Esquema de funcionamento do analisador de massas, do tipo quadrupolo (CORILO, 2009).....	41
Figura 4 -	Esquema de um analisador triplo quadrupolo e sua cela de colisão (CHROMEDIA, 2011).....	42
Figura 5 -	Planejamento factorial de dois níveis com ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).....	48
Figura 6 -	Planejamento factorial em estrela para duas variáveis codificadas (adaptado de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).	49
Figura 7 -	Cromatogramas de íons totais obtidos por GC-(TQ)MS/MS, a partir de soluções preparadas no extrato da matriz de filé de peixe (A) e em acetonitrila (B), na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$	77
Figura 8 -	Cromatograma no modo MRM obtido por GC-(TQ)MS/MS, a partir de solução preparada no extrato da matriz branco de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$	77
Figura 9 -	Percentual de recuperação de disruptores endócrinos avaliados em sete testes de extração.....	80
Figura 10 -	Cromatogramas obtidos no sistema GC-(TQ)MS/MS no modo <i>full scan</i> para as etapas de limpeza L1, L2, L3, L4, L8 e L10.....	83
Figura 11 -	Cromatogramas obtidos no sistema GC-(TQ)MS/MS no modo <i>full scan</i> para as etapas de limpeza L5, L6, L7, L9 e L11.....	84
Figura 12 -	Percentual de recuperação do conjunto de ensaios gerados através do planejamento factorial em estrela (avaliação 1), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$	86
Figura 13 -	Superfícies de resposta geradas através do planejamento factorial em estrela (avaliação 1) utilizando a média das recuperações (A) e o número de compostos avaliados (B).....	87

Figura 14 - Percentual de recuperação para os compostos em estudo, variando a adição de NaCl (separadamente e junto com os demais sais), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$	88
Figura 15 - Superfície de resposta dos hormônios dietilestilbestrol (DES) e hexestrol, a partir da recuperação média desses compostos.....	89
Figura 16 - Percentual de recuperação do conjunto de ensaios gerados através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 2), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$	90
Figura 17 - Superfícies de resposta geradas através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 2) utilizando a média das recuperações (A) e o número de compostos avaliados (B).....	91
Figura 18 - Procedimento de extração otimizado utilizando o método QuEChERS modificado.....	92
Figura 19 - Cromatograma obtido a partir do extrato "branco" de filé de peixe no modo TIC (A), comparado com o padrão da matriz de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B).....	94
Figura 20 - Cromatograma obtido para a avaliação dos solventes e reagentes utilizados nas análises de filé de peixe, no modo TIC (B), comparado com o padrão na matriz de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A).....	95
Figura 21 - Comparação dos sinais de bisfenol A, no modo MRM, de soluções preparadas no extrato da matriz e em acetonitrila.....	106
Figura 22 - Percentual de recuperação dos disruptores endócrinos avaliados nos filés de tilápia, pangá e carpa, na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fonte e concentração de nonilfenol e seus etoxilados.....	22
Tabela 2 -	Informações sobre os disruptores endócrinos estudados.....	60
Tabela 3 -	Condições dos testes preliminares para a extração de DEs em peixe.....	65
Tabela 4 -	Testes avaliados para a etapa de limpeza do extrato de peixe..	67
Tabela 5 -	Condições dos testes realizados para a avaliação do planejamento fatorial em estrela, avaliação 1.....	68
Tabela 6 -	Condições dos testes realizados para a avaliação do planejamento fatorial em estrela, avaliação 2.....	69
Tabela 7 -	Condições utilizadas no sistema cromatográfica GC-(TQ)MS/MS.....	74
Tabela 8 -	Disruptores endócrinos analisados por GC-(TQ)MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação.....	75
Tabela 9 -	Hormônios analisados por GC-(TQ)MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e produtos para quantificação e confirmação.....	79
Tabela 10 -	Valores dos coeficientes de determinação (r^2), inclinação (a) e intercepção (b) para as curvas analíticas de disruptores endócrinos em acetonitrila.....	96
Tabela 11 -	Valores dos coeficientes de determinação (r^2), inclinação (a) e intercepção (b) para as curvas analíticas de disruptores endócrinos e faixa linear para cada analito no extrato de filé de peixe.....	97
Tabela 12 -	Valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada disruptor endócrino na matriz de filé de peixe.....	98

Tabela 13 -	Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de disruptores endócrinos em filé de peixe.....	100
Tabela 14 -	Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de disruptores endócrinos em filé de peixe, correspondente a precisão intermediária.....	102
Tabela 15 -	Efeito matriz dos disruptores endócrinos avaliados no sistema de GC-(TQ)MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz de filé de peixe.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- APEOs – Alquilfenóis polietoxilados, do inglês *Alkylphenols Polyethoxylates*
- APPI – Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- APs – Alquilfenóis, do inglês *Alkylphenols*
- ASE – Extração Acelerada com Solvente, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*
- BCF – Fator de Bioconcentração
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CEC – Comissão das Comunidades Europeias, do inglês *Commission of the European communities*
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision-Induced Dissociation*
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DC – Corrente Direta, do inglês *Direct Current*
- DDD – Diclorodifenildicloroetano
- DDE – Diclorodifeniletileno
- DDT – Diclorodifeniltricloroetano
- DES – Dietilestilbestrol
- DEs – Disruptores Endócrinos
- DHA – Ácido docosahexaenóico
- DHT – 5 α -diidrotestosterona
- DI-SPME – Microextração em Fase Sólida por Imersão Direta, do inglês *Direct Imersion-Solid Phase Micro Extraction*
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- d-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*

- EDCs – Disruptores Endócrinos, do inglês *Endocrine Disrupter Chemicals or Chemicals*
- EDs – Disruptores Endócrinos, do inglês *Endocrine Disrupters*
- EDSTAC – *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*
- EI – Ionização por Elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- EPA – Ácido eicosapentaenóico
- ESI – Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- ETE (s) – Estação (ões) de Tratamento de Esgoto
- eV – Elétrons volt
- FD – Detector de Fluorescência, do inglês *Fluorescence Detector*
- FID – Detector por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*
- GC-HRMS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês *Gas Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- GPC – Cromatografia com Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*
- HAc – Ácido acético
- HCH – Hexaclorociclohexano
- HD-SPME – Microextração em Fase Sólida por *Headspace*, do inglês *Headspace-Solid Phase Micro Extraction*
- HPAs – Hidrocarbonetos Poliaromáticos
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- K_{oc} – Coeficiente de adsorção ao carbono orgânico do solo

- K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água
- LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- LMR – Limite Máximo de Resíduo
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- m/z – Razão massa carga
- MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MeCN – Acetonitrila
- MgSO₄ – Sulfato de magnésio anidro
- MIP – Polímeros Molecularmente Impressos, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura
- MRM – Monitoramento de Reação Múltipla, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
- MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- MS/MS – Espectrometria de Massas em série, do inglês *Mass Spectrometry in tandem*
- MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
- NaAc – Acetato de sódio anidro
- NaCl – Cloreto de sódio
- NP – Nonilfenol, do inglês *Nonylphenol*
- NP9EO – Nonoxinol-9
- NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*
- NPE – Nonilfenol etoxilado, do inglês *Nonylphenol ethoxylate*
- OCs – Organoclorados
- OP – Octilfenol
- p.a. – Grau pró-análise
- PCBs – Bifenilas Policloradas, do inglês *Polychlorinated Biphenyls*
- PF – Planejamento Fatorial em Estrela

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PS – Padrão de Substituição

PSA – Amina Primária Secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

q – Segundo quadrupolo ou cela de colisão

Q1 ou MS1 – Primeiro quadrupolo

Q3 ou MS3 – Terceiro quadrupolo

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

r – Coeficiente de Correlação

r^2 – Coeficiente de Determinação

RF – Rádio Frequência

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês *Responde Surface Methodology*

SANCO – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*

SE – Sistema endócrino

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

TCD – Detector por Condutividade Térmica, do inglês *Thermal Conductivity Detector*

TIC – Cromatograma do Íon Total, do inglês *Total Ion Chromatogram*

TQ – Triplo quadrupolo

t_R – Tempo de retenção

U.S.EPA – Agência Americana de Proteção Ambiental, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

UE – União Européia

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography*

UV – Ultravioleta

UV-vis – Detector de Ultravioleta Visível

VTG – Vitelogenina

γ_{sat} – Solubilidade em água

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Fórmulas estruturais dos disruptores endócrinos estudados nesse trabalho.....	121
-----------	----------------------------------------------------------------------------------	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Peixe	3
1.1.1. Produção e Importância do Pescado na Alimentação	3
1.1.2. Espécies de Peixes: Jundiá, Carpa, Tilápia e Panga	4
1.2. Sistema Endócrino	7
1.2.1. Hormônios Sexuais Femininos e Masculinos	8
1.2.2. Hormônios Sexuais em Peixe	9
1.3. Propriedades Físico-Químicas Relevantes	10
1.3.1. Solubilidade em Água	10
1.3.2. Coeficiente de Partição	11
1.3.2.1. Hidrofobicidade	11
1.3.3. Bioacumulação e Biomagnificação	12
1.3.4. Bioconcentração	13
1.3.5. Coeficiente de Adsorção	13
1.4. Disruptores Endócrinos (DEs)	14
1.4.1. Definições	14
1.4.2. Disrupção do Sistema Endócrino	14
1.4.3. Fontes de Disruptores Endócrinos	16
1.5. Substâncias Classificadas como Disruptores Endócrinos e suas Fontes de Contaminação	18
1.5.1. Agrotóxicos	19
1.5.2. Alquilfenóis (APs) e Alquilfenóis Polietoxilados (APEs)	21
1.5.3. Hormônios	23
1.5.4. Bisfenol A	24
1.6. Legislação Relacionada aos DEs	25
1.7. Disruptores Endócrinos no Meio Ambiente	27
1.7.1. Disruptores Endócrinos em Peixes	29
1.7.2. Disruptores Endócrinos em Seres Humanos	31

1.8. Técnicas de Extração de Disruptores Endócrinos em Amostras de Peixe .	32
1.9. Técnicas para Determinação de Compostos Orgânicos	36
1.9.1. Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida	36
1.9.2. Espectrometria de Massas	37
1.9.2.1. Fontes de Ionização	37
1.9.2.2. Analisadores de Massas	40
1.9.2.3. Dissociação Induzida por Colisão (CID)	41
1.9.2.4. Técnicas de Operação para Obtenção do Espectro de Massas em MS/MS ...	42
1.9.2.5. Importância do Acoplamento da Cromatografia com a Espectrometria de Massas para a Análise de Disruptores Endócrinos em Peixe	43
1.10. Efeito Matriz	44
1.10.1. Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa	44
1.11. Padrão Interno e Padrão de Substituição (<i>surrogate</i>)	45
1.12. Planejamento Fatorial	46
1.13. Validação	49
1.13.1. Seletividade	50
1.13.2. Linearidade e Curva Analítica	51
1.13.3. Precisão	52
1.13.4. Exatidão	53
1.13.5. Limites de Detecção e Quantificação	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1. Instrumentação	56
2.2. Materiais Utilizados	57
2.3. Processamento da Amostra	58
2.4. Seleção do Padrão Interno e do Padrão de Substituição (<i>surrogate</i>)	58
2.5. Preparo de Soluções Analíticas	59
2.6. Otimização do Sistema Cromatográfico GC-(TQ)MS/MS para a Determinação de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe	63
2.6.1. Programação da Temperatura do Forno da Coluna Cromatográfica e do Injetor	63
2.6.2. Condições do Sistema de Detecção	63

2.7. Otimização do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe	64
2.8. Otimização da Etapa de Limpeza do Método QuEChERS Modificado	66
2.9. Planejamento Fatorial	67
2.10. Análise dos Reagentes e Solventes Utilizados	69
2.11. Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe	69
2.11.1. Seletividade	70
2.11.2. Linearidade e Curva Analítica.....	70
2.11.3. LOD e LOQ.....	70
2.11.4. Ensaios de Recuperação para Avaliação da Exatidão	71
2.11.5. Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária	71
2.11.6. Avaliação do Efeito Matriz	72
2.12. Aplicação do Método	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
3.1. Otimização do Sistema Cromatográfico GC-(TQ)MS/MS para a Determinação de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe	74
3.2. Otimização do Método QuEChERS para a Extração de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe	80
3.3. Otimização da Etapa de Limpeza do Método QuEChERS	82
3.4. Planejamento Fatorial	85
3.5. Validação do Método QuEChERS Modificado Otimizado	93
3.5.1. Seletividade e Análise de Solventes e Reagentes.....	93
3.5.2. Curva Analítica e Linearidade.....	95
3.5.3. Determinação dos Valores de LOD e LOQ.....	98
3.5.4. Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)	99
3.5.5. Precisão Intermediária.....	102
3.5.6. Efeito Matriz.....	103
3.6. Aplicação do Método	106
4. CONCLUSÕES	109
PERSPECTIVAS FUTURAS	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

INTRODUÇÃO

Organismos vivos estão diariamente expostos a uma ampla variedade de substâncias químicas, as quais podem ser encontradas nos alimentos, na água, em produtos de cuidado pessoal/doméstico e farmacêutico. Tais substâncias podem atingir efluentes industriais, esgotos domésticos, efluentes hospitalares, etc., e contaminar o meio ambiente através de atividades antropogênicas. Muitas dessas substâncias são bastante preocupantes e devido a sua toxicidade uma maior atenção tem se dado, em especial, a uma classe de compostos, os disruptores endócrinos (BARREK *et al.*, 2009; REINEN *et al.*, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Disruptores endócrinos (DEs) de acordo com a U.S.EPA (1997a) são conceituados como: “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais os quais são responsáveis, pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Muitas classes de substâncias são classificadas como DEs, tais como: agrotóxicos, alquilfenóis, hormônios, bifenilas policloradas, bisfenóis (sendo o bisfenol A mais conhecido), dentre outras. Devido a presença de DEs no meio ambiente, observa-se que organismos aquáticos, como os peixes, sofrem grande influência, podendo ser uma fonte de contaminação importante aos seus predadores e consumidores humanos (LeDOUX, 2011).

O peixe tem destaque na alimentação humana, por apresentar elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, também conhecidos como ômega 3, os quais possuem propriedades importantes à saúde humana por serem responsáveis pela prevenção e diminuição de sintomas de determinadas doenças. Além disso, no Brasil a produção de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos sendo a região Nordeste a maior produtora de pescado, com 411 mil toneladas/ano, e esse número só tende a aumentar (MPA, 2010).

A fim de proteger a saúde pública limites máximos de resíduo (LMRs) são estabelecidos considerando riscos toxicológicos, contaminação ambiental e efeitos microbiológicos e farmacológicos. No Brasil a presença de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes ambientais em produtos de origem animal são

monitorados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC).

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para a determinação de 40 disruptores endócrinos em filé de peixe (*Rhamdia quelen*) através do uso do método QuEChERS modificado e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série (GC-(TQ)MS/MS). Como objetivos específicos (I) realizar o planejamento fatorial para otimizar o método de extração QuEChERS modificado, (II) testar as melhores condições de limpeza do extrato. Além disso, (III) aplicar o método proposto em amostras de outras espécies de peixes, além da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Peixe

1.1.1. Produção e Importância do Pescado na Alimentação

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA (2010) a produção brasileira de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos, passando de 990.899 toneladas anuais para 1.240.813 em 2009. Houve um crescimento de 15,7% nos anos de 2008 e 2009, sendo que a aquicultura apresentou uma elevação de 43,8%, passando de 289.050 toneladas/ano para 415.649 toneladas/ano. A aquicultura (definida como o cultivo de organismos aquáticos para o consumo) teve um papel de destaque no crescimento da produção de pescado no país. Somente a piscicultura teve uma elevação de 60,2% em 2008 e 2009, na comparação com 2007. A criação de tilápia chegou a 132 mil toneladas/ano sendo o carro chefe da produção aquícola e representa 39% do total de pescado cultivado. A produção da pesca extrativa, tanto marítima quanto continental (rios, lagos, etc.) passou no mesmo período de 783.176 toneladas para 825.164 toneladas/ano, um aumento em torno de 5,4%.

A maior região produtora de pescado no Brasil é o Nordeste com 411 mil toneladas/ano, seguida da região Sul, com 316 mil/ano. A região Norte está em terceiro lugar, com 263 mil toneladas, a Sudeste, com 177 mil e, por último, Centro-oeste, com 72 mil. Santa Catarina é o maior produtor entre os estados, com 207 mil toneladas/ano, seguida do Pará, com 136 mil toneladas. A Bahia, com 119 mil toneladas, é o terceiro maior produtor nacional seguida de perto pelo Ceará, com 88 mil toneladas (MPA, 2010).

Até 2011 a expectativa do Ministério da Pesca e Aquicultura é de que a produção total de pescado atinja a meta de 1,43 milhão de toneladas, desse modo, a aquicultura responderá por cerca de 570 mil toneladas/ano e a pesca extrativa, tanto marítima quanto continental, com cerca de 860 mil toneladas/ano (MPA, 2010).

As exportações brasileiras no ano de 2008 alcançaram o montante de US\$ 239 milhões, correspondendo a 36 mil toneladas. No acumulado de 2009 as exportações brasileiras recuaram para US\$ 169 milhões, o que equivaleu a 30 mil

toneladas de pescado. Em termos proporcionais a redução foi de 29% em valores e de 18% em quantidade do produto. As importações brasileiras apresentaram comportamento inverso, tanto em valores quanto em volume. No ano de 2008 o país importou US\$ 658 milhões e 208 mil toneladas, enquanto no ano seguinte as importações aumentaram para US\$ 688 milhões e para 230 mil toneladas. O crescimento percentual foi, respectivamente, de 5% e de 10%. Por causa deste conjunto de resultados, a balança comercial brasileira entre 2008 e 2009 teve seu déficit aumentado em 24% no volume financeiro e em 16% em quantidade (MPA, 2011).

Os alimentos funcionais, ou nutracêuticos, são definidos como alimentos que, além dos nutrientes básicos, possuem propriedades de prevenção ou diminuição dos sintomas de determinadas doenças. Dentre esses alimentos, destaca-se a carne de peixe, na qual encontram-se ácidos graxos poliinsaturados chamados de ômega-3, sendo os principais encontrados no peixe o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA). Esses são responsáveis pelos efeitos de proteção à saúde humana (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003).

1.1.2. Espécies de Peixes: Jundiá, Carpa, Tilápia e Panga

Jundiá é um peixe de água doce da espécie *Rhamdia quelen*, o qual é encontrado do sudeste do México ao centro da Argentina. Na região Sul do Brasil é uma espécie importante na piscicultura, pois, além de ser um peixe de fácil manejo, rápido crescimento e que se adapta bem às dietas elaboradas e variações do ambiente é considerado promissor para a criação intensiva, tendo boa aceitação pelos consumidores e maior valor comercial (CORRÊIA *et al.*, 2009). Este é um peixe de couro, cuja cor varia de marrom-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara. O crescimento do jundiá é bastante pronunciado durante os primeiros anos de vida, e o crescimento é maior nos machos do que nas fêmeas até o terceiro ou quarto ano, onde o inverso começa a ocorrer. O crescimento máximo teórico calculado das fêmeas é de 66,5 cm enquanto dos machos é de 52 cm, as fêmeas também levam vantagem quanto ao tempo de vida onde tendem a

viver uma vida teórica maior de 21 anos, enquanto para os machos esse tempo é de 11 anos (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004).

A respiração do jundiá ocorre através das brânquias, que são estruturas de cor vermelha, localizadas na cabeça, a água entra por sua boca passando através das brânquias, ocorrendo a passagem de oxigênio da água para o sangue. A anatomia do peixe consiste de um esôfago curto o qual faz a ligação da cavidade da boca e brânquias com o estômago. No estômago é armazenado o alimento ingerido e onde inicia-se a digestão das proteínas. Seguindo esse percurso, o alimento segue para o intestino onde completa-se a digestão e ocorre a absorção dos nutrientes. Junto ao esôfago encontra-se o fígado, o qual processa e armazena parte dos nutrientes absorvidos, além de produzir a bile, a qual emulsifica as gorduras, facilitando sua digestão. Na época de reprodução o jundiá apresenta nas laterais da cavidade abdominal as gônadas, sendo os testículos para produção de espermatozoides para os machos, e para as fêmeas, os ovários nos quais são produzidos os óvulos. Uma bexiga natatória auxilia o jundiá a se manter na profundidade desejada sem muito esforço, o rim tem como função a excreção de metabólitos produzidos e do excesso de água que entra no seu corpo. O jundiá poderá armazenar gordura dentro da cavidade ventral, dependendo da sua alimentação (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004).

O jundiá tem como habitat natural lagos e poços fundos dos rios, preferindo águas mais calmas, com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre troncos e pedras, de onde saem à noite para procurar alimento. As larvas dessa espécie se alimentam de zooplâncton, mas os adultos são omnívoros, com uma preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004; LAZZARI *et al.*, 2011).

As carpas apresentam corpo alongado e um pouco comprimido, lábios grossos, dois pares de barbilhões no ângulo da boca, e uns mais curtos sobre o lábio superior. Sua coloração é variável, carpas selvagens são castanho/verde nas laterais traseiras e superiores, com sombreamento amarelo ouro ventralmente. Carpas cor de ouro são criadas para fins ornamentais (FAO, 2012a). Essa espécie vive principalmente no fundo das águas, mas procura por comida nas camadas média e alta de água. A carpa é onívora, com tendência ao consumo de alimentos

de origem animal, tais como insetos aquáticos, larvas de insetos, vermes, moluscos, e zooplâncton (FAO, 2012a). Sendo este o grupo de peixes mais cultivados no mundo, representando aproximadamente 40% da produção. Dentre elas, está a carpa húngara (*Cyprinus carpio*), espécie de acelerado crescimento e fácil adaptação às condições de cativeiro. No entanto, essa espécie pode apresentar rejeição ao consumo pela população, devido a um sabor indesejável em sua carne, adquirido pelo hábito de revolver o fundo do tanque à procura de alimento (CORRÊIA *et al.*, 2009).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recebe esse nome por ser originária da bacia do Nilo e vem se tornando um dos principais peixes para a piscicultura em todo o mundo. Esta espécie está adaptada às condições de clima e práticas criatórias mais correntes no Brasil. Por ser uma espécie eurialina, que se adapta facilmente às águas salobras, foi introduzida na região nordestina pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) em 1973, onde encontrou condições favoráveis de crescimento e adaptou-se facilmente nos açudes. Além disso, a produção de tilápias pode ser aumentada com a reversão, que consiste na introdução na ração de hormônio feminino ou masculino, sendo este último o mais habitual, com a finalidade de gerar tilápias de sexo, tamanho e pesos uniformes e com rápido crescimento (VILA NOVA; GODOY; ALDRIGUE, 2005).

Pangasius hypophthalmus (panga) é uma das principais espécies de pesca no rio Mekong, localizado no sudeste asiático, sendo um dos maiores e mais importante local de pesca do mundo. O Vietnã exporta essa espécie para mais de 80 países. O panga possui corpo longo, cabeça relativamente pequena, boca larga com pequenos dentes afiados, olhos grandes. Os peixes jovens apresentam uma listra preta ao longo da linha lateral e outra linha preta logo abaixo desta linha. Os adultos são grandes de coloração cinza uniforme, mas às vezes com tom esverdeado e laterais prateadas (FAO, 2012b).

O percentual de gordura em peixes é bastante variado principalmente por sofrer influência da dieta devido a sua composição de ácidos graxos, pois uma dieta rica em ácido graxos (ômega 3) poderia aumentar o teor destes na carne, e assim agregar valor ao produto (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004). Em jundiás juvenis inteiros (50 g de peso corporal) pode variar de 2,5 a 5,7%, em jundiás maiores (200 a 450 g de peso corporal), o teor de gordura no músculo fica em torno

de 3% ou mais (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004). O percentual de gordura na tilápia é baixo, cerca de 1% (NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE, 2011).

1.2. Sistema Endócrino

Todos os mamíferos, aves, peixes e outros organismos vivos possuem um sistema endócrino (SE). O SE é composto por: (1) glândulas localizadas por todo o corpo; (2) hormônios que são produzidos pelas glândulas e liberados na corrente sanguínea ou fluido que envolve as células. Além de (3) receptores em vários órgãos e tecidos, os quais reconhecem e respondem aos hormônios através da interação com o DNA (ácido desoxirribonucléico) da célula ou por meio de outros complexos processos de sinalização intracelular (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2007; U.S.EPA, 2010).

O sistema endócrino é um dos três sistemas reguladores em seres humanos e animais, os outros são: o sistema nervoso e imunológico. Apresentando assim, importante influência ao regulamentar o crescimento, desenvolvimento e mecanismos homeostáticos, como: estrutura e função reprodutiva; manutenção dos níveis normais de glicose e íons no sangue; controle do metabolismo geral do organismo; pressão arterial; e outras funções. Algumas das principais glândulas endócrinas incluem a hipófise, tireóide, pâncreas, supra-renais e gônadas masculinas e femininas (testículos e ovários) (U.S.EPA, 1997b).

Hormônios são mensageiros químicos que coordenam o funcionamento do organismo como um todo, respondendo pela comunicação entre diferentes tipos de células. A identificação ocorre através de receptores, os quais são estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular. Após a interação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (GUYTON, 1988; LINTELMANN *et al.*, 2003; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007; U.S.EPA, 2010).

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e são classificados em três grupos principais, de acordo com o número de átomos de carbono, derivados da progesterona (hormônios da gravidez), com 21 carbonos. Com 19 carbonos, derivados da androsterona (hormônios sexuais masculinos) e

derivados da estrona (hormônios sexuais femininos), com 18 átomos de carbono (LINTELMANN *et al.*, 2003; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006). O principal local de síntese desses hormônios são no corpo lúteo (progestógenos), testículos (andrógenos) e para os estrógenos, os ovários (LINTELMANN *et al.*, 2003).

1.2.1. Hormônios Sexuais Femininos e Masculinos

Os hormônios sexuais femininos – estrógenos e progestógenos – desempenham diferentes funções no organismo feminino. Os estrógenos (estradiol, estrona, estriol, dentre outros) são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas e regulação da reprodução. O estradiol estimula a proliferação e crescimento nos órgãos do trato reprodutivo, causa também o desenvolvimento do endométrio do útero, além de influenciar na libido. A progesterona ajuda a regular as mudanças que ocorrem durante a menstruação e influencia o desenvolvimento de membranas fetais e glândulas mamárias durante a gestação. A metabolização desses hormônios ocorre principalmente no fígado, e os compostos lipofílicos são conjugados com o ácido glucurônico ou com sulfato para aumentar sua solubilidade em água e então serem excretados pelos rins. Uma pequena parte dos conjugados pode retornar pela circulação enterohepática e servir novamente como hormônio ativo na circulação (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Os principais hormônios masculinos são a testosterona e a diidrotestosterona, os quais promovem o desenvolvimento e diferenciação nos órgãos reprodutivos masculinos, antes e após o nascimento. Os androgênios responsáveis pelas características secundárias masculinas contribuem nas funções para o crescimento de ossos e aumento na síntese de proteínas, especialmente nos músculos. Na idade adulta a testosterona é essencial para a produção de espermatozóides. Sendo a testosterona o principal hormônio produzido e liberado, o mesmo é metabolizado nos tecidos periféricos (30 a 50%) e no fígado (50 a 70%) (LINTELMANN *et al.*, 2003).

A testosterona é reduzida a um andrógeno mais potente, 5 α -diidrotestosterona (DHT) pela fração microssomal em alguns órgãos (ex: próstata e epidídimo), além de ser precursor de estradiol e estrona. Assim, hormônios sexuais masculinos e femininos são secretados por ambos os sexos, mas hormônios

masculinos são secretados em maiores quantidades e são mais potentes em homens. Os hormônios femininos são excretados em maiores quantidades e mais ativos em mulheres (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Esteróides sexuais apresentam funções muito importantes na diferenciação de mamíferos, a qual é genética e hormonalmente regulada. O processo de diferenciação sexual é muito sensível a respeito de influências externas devido a enorme complexidade envolvida nas reações (LINTELMANN *et al.*, 2003).

1.2.2. Hormônios Sexuais em Peixe

Embora o sistema endócrino seja altamente conservado no reino animal, diferenças entre espécies existem e podem afetar a sensibilidade e resposta aos disruptores endócrinos (definição em 1.4.1). Essas diferenças incluem a variabilidade quantitativa e qualitativa nos níveis de hormônios endógenos e receptores, diferenças na duração dos períodos críticos de desenvolvimento e diferenças nos processos de determinação do sexo (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Os peixes têm o esteróide ovariano 17β -estradiol como seu principal hormônio, assim como os mamíferos. A diferença é relacionada quanto aos hormônios andrógenos, em que além da testosterona, também o 11-cetotestosterona e o 11β -hidroxitestosterona são responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas e pela indução a espermatogênese (U.S.EPA, 2006; LINTELMANN *et al.*, 2003; BALDISSEROTTO, 2009). A expressão da sexualidade nos peixes é bastante diversificada, pois os mesmos podem ser gonocoristas, ou seja, possuírem gônadas femininas ou masculinas. Ou pode ocorrer o hermafroditismo, quando há a presença de ovários e testículos no mesmo peixe. Quando se trata de cultivo de peixe a maioria é do tipo gonocorista, e em algumas espécies pode ocorrer o hermafroditismo transitório no período da juventude. Todo o processo de reversão sexual é normalmente concluído em cerca de 40 dias após a incubação, mas tende a se prolongar em peixes submetidos a um crescimento retardado em seus primeiros anos de vida. O uso de altas doses de hormônios sexuais em criações de peixe, influenciando o sexo dos

mesmos, é um método comum para obter culturas com um único sexo (LINTELMANN *et al.*, 2003; BALDISSEROTTO, 2009).

A vitelogenina (VTG) é uma proteína que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É uma fosfolipoproteína sintetizada no fígado e é regulada por estrógenos, tipicamente, 17β -estradiol e transportada através do sangue para os ovários, onde são incorporados no desenvolvimento dos óvulos. O gene da VTG também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expressivo, possivelmente devido à baixa concentração de estradiol no sangue. No entanto, o aumento de VTG no plasma do organismo, serve como marcador para a exposição de peixes machos a diferentes concentrações de substâncias com atividade estrogênica (LINTELMANN *et al.*, 2003; BILA; DEZOTTI, 2003).

1.3. Propriedades Físico-Químicas Relevantes

O destino e o comportamento dos disruptores endócrinos, tanto no organismo como no meio ambiente, estão diretamente relacionados com as suas propriedades físico-químicas. Portanto, para que se possa compreender os efeitos dessas substâncias no meio ambiente, suas propriedades físico-químicas devem ser levadas em consideração.

1.3.1. Solubilidade em Água

A solubilidade em água (γ_{sat}) é a concentração máxima de uma substância dissolvida em água pura, em uma dada temperatura. Em águas superficiais, a solubilidade é fortemente dependente da temperatura, do pH, dos sais dissolvidos ou ainda da existência de substâncias húmicas ou materiais suspensos. Todavia, os valores experimentais são também úteis para se determinar o grau de hidrofobicidade de uma determinada substância (BAIRD, 2002; LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.3.2. Coeficiente de Partição

Partição é a distribuição de uma substância química entre duas fases, seja ela abiótica como água, sedimentos suspensos ou de fundo, ou biótica como plantas e animais, que estão em equilíbrio ou em estado estacionário. É expressa pela razão da concentração da substância química nas duas fases avaliadas (GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.3.2.1. Hidrofobicidade

O grau de hidrofobicidade de uma substância é representado pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), ou seja:

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

Onde:

C_{octanol} é a concentração da substância em n-octanol e

$C_{\text{água}}$ é a concentração da substância em água.

O n-octanol é empregado por apresentar tanto características hidrofóbicas como hidrofílicas. Portanto, uma ampla faixa de substâncias apresenta valores mensuráveis de K_{ow} . Também serve como modelo para simular os tecidos adiposos (gorduras) encontrados em espécies animais, podendo ser usado para estimar a partição de uma substância em fases orgânicas apolares (outros solventes ou biota). O coeficiente de partição octanol/água, por uma questão de conveniência, é geralmente utilizado em sua forma logarítmica decimal ($\log K_{ow}$), dado sua magnitude ser, na maioria das vezes, muito grande, excedendo em algumas ocasiões a um milhão. Também é considerado um excelente parâmetro para inferir o fator de bioconcentração de uma determinada substância química (BAIRD, 2002; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Em geral, quanto maior for o coeficiente de partição K_{ow} octanol-água, maior será a probabilidade de encontrar o produto químico na matéria orgânica de solos e

sedimentos e, finalmente, de ocorrer migração para tecidos gordurosos de organismos vivos. Porém, valores de $\log K_{ow}$ de 7,8 ou maiores são indicativos de produtos químicos capazes de adsorver fortemente em sedimentos, o que tornará realmente improvável que adquiram mobilidade suficiente para introduzir-se nos tecidos vivos (BAIRD, 2002).

A polaridade de uma substância química também está inversamente relacionada com sua hidrofobicidade. A ausência de grupos polares nas moléculas de uma substância altera a polaridade da mesma diminuindo, conseqüentemente, sua solubilidade em água. Deste modo, pode-se dizer que tal substância apresenta elevada hidrofobicidade e elevada lipofilicidade. Além disso, moléculas com alto peso molecular tendem a apresentar menor solubilidade em água, portanto, a sua hidrofobicidade é relativamente elevada (GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.3.3. Bioacumulação e Biomagnificação

Bioacumulação é um termo geral que descreve a tomada de um contaminante químico, do ambiente, por uma ou todas as rotas possíveis (respiração, dieta, via dérmica, etc.), a partir de qualquer fonte no ambiente onde tais substâncias estão presentes. Portanto, a sequência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia alimentar resulta no fenômeno da biomagnificação. Por exemplo, os peixes acumulam algumas substâncias químicas procedentes de sua alimentação, ou ainda através da ingestão de material particulado adsorvido nos sedimentos ou presente em suspensão nas águas. Em muitos casos, tais substâncias não são metabolizadas, ou seja, acabam se acumulando nos tecidos adiposos, resultando no aumento de sua concentração ao longo do tempo. Por conseqüência, as aves predadoras que se alimentam destes peixes apresentarão concentrações ainda maiores destas substâncias no organismo (BAIRD, 2002; GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.3.4. Bioconcentração

Diferentemente de bioacumulação, a bioconcentração e o fator de bioconcentração (BCF) referem-se a captação de uma substância química por um organismo aquático na fase aquosa, na água. Nem todas as substâncias químicas presentes na água estão disponíveis, devido a sorção ao material suspenso e dissolvido. Sendo assim, esse fenômeno está relacionado com a biodisponibilidade. Por exemplo, quando a água passa através das brânquias de um peixe, os compostos se difundem de forma seletiva desde a água até a carne gordurosa, tornando-se mais concentrados. O BCF é a razão de equilíbrio entre a concentração de um produto químico específico em um peixe (por exemplo), em relação à concentração dissolvida nas águas circundantes, se o mecanismo de difusão representa a única fonte da substância para, no caso, o peixe (BAIRD, 2002; LINTELMANN *et al.*, 2003).

1.3.5. Coeficiente de Adsorção

O conhecimento do coeficiente de adsorção de uma substância por unidade de carbono orgânico do solo (K_{oc}) é importante para descrever a adsorção de uma substância química ao material em suspensão (matéria orgânica) presente nas águas superficiais. O K_{oc} aumenta seu valor com o aumento da hidrofobicidade (K_{ow}) de um composto, ou seja, quanto maior o K_{oc} , mais forte é a adsorção (afinidade) da substância pela matéria orgânica (LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

A sorção de substâncias químicas está diretamente relacionada com o transporte e a mobilidade das mesmas no meio ambiente. Geralmente, moléculas que estão sorvidas apresentam menor mobilidade e, conseqüentemente não estão disponíveis para participar de processos de transferência de fases. Também estão menos biodisponíveis e mais protegidas da luz ultravioleta, ocasionando menor degradação das mesmas no ambiente, através da fotólise direta (GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.4. Disruptores Endócrinos (DEs)

1.4.1. Definições

Interferentes do sistema endócrino são substâncias que podem interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos e, em 1991, receberam o nome de disruptores endócrinos por Theo Colborn (SODRÉ *et al.*, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; WANG; BASKIN, 2008). Devido a tradução, do inglês *Endocrine Disrupters* (EDs) ou ainda *Endocrine Disrupting Compounds or Chemicals* (EDCs), disruptores endócrinos não é a única maneira de chamar as substâncias que interferem no sistema endócrino. Pode-se ainda utilizar os termos: perturbadores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos, dentre outras (GHISELLI; JARDIM, 2007). Para fins de padronização será utilizado somente o termo disruptores endócrinos (DEs) no presente trabalho.

Um disruptor endócrino é, segundo o Programa Internacional de Segurança Química, classificado como “uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou em seus descendentes, ou subpopulações” (DAMSTRA *et al.*, 2002; EUROPEAN COMMISSION, 2007). Segundo a U.S.EPA (1997a), “um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais os quais são responsáveis, pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Os disruptores endócrinos podem exibir tanto um comportamento estrogênico como androgênico (GHISELLI; JARDIM, 2007; BIRKETT; LESTER, 2003).

1.4.2. Disrupção do Sistema Endócrino

Devido à natureza complexa do sistema endócrino, os estímulos externos, por exemplo, a exposição à compostos orgânicos, os quais imitam a atividade endócrina,

podem influenciar suas funções (LINTELMANN *et al.*, 2003). Desse modo, mudanças nas concentrações efetivas dos hormônios podem ocorrer. Essas substâncias podem se ligar ao receptor hormonal e, conseqüentemente, mimetizar ou bloquear a resposta biológica normal pelo fato de ocuparem o lugar do hormônio (NICOLOPOULOU-STAMATI; PITSOS, 2001; LINTELMANN *et al.*, 2003; NOGUEIRA, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Algumas substâncias podem imitar a ação de hormônios naturais, levando o organismo a desencadear de um modo exagerado ou em um tempo inapropriado a um estímulo falso, sendo este um efeito agonista (LINTELMANN *et al.*, 2003; NOGUEIRA, 2003; BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007). A potência do agonista exógeno depende da sua afinidade com o receptor, bem como sua capacidade de ativar esse receptor, tendo em vista que, diferentes substâncias apresentam estruturas diferentes dos receptores hormonais (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Um efeito antagonista ocorre quando uma substância ao ligar-se ao receptor provoca o bloqueio, ou minimiza as respostas induzidas pelos agonistas, porque o receptor não pode ser ativado normalmente (LINTELMANN *et al.*, 2003; NOGUEIRA, 2003; BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007). A inibição do receptor pode ser competitiva, ou seja, o agonista endógeno e o antagonista exógeno competem pelo mesmo sítio ativo de ligação. Ou ainda pode ser não-competitivo, no qual o inibidor liga-se no receptor ou receptores hormonais do complexo, mas não no sítio ativo de ligação. Enquanto uma inibição competitiva pode levar a desativação total do receptor, a inibição não-competitiva pode resultar na redução das reações realizadas pelo receptor (LINTELMANN *et al.*, 2003).

Tanto para reações agonistas como antagonistas entre ligante exógeno e receptor hormonal, a concentração do ligante frequentemente desempenha um importante papel, visto que as concentrações dos hormônios endógenos são normalmente muito baixas. Portanto, se uma elevada concentração de disruptores endócrinos estiver presente no organismo, pode-se observar disrupção endócrina, mesmo se ligantes exógenos apresentem baixa afinidade de ligação com o receptor (LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os DEs podem influenciar no metabolismo de hormônios através de diferentes caminhos: (1) inibindo importantes reações catalisadas por enzimas, por

exemplo, a conversão de testosterona através da enzima aromatase para a biosíntese de estrógenos. Desse modo, havendo uma maior concentração de testosterona e uma diminuição de estrógenos, resultando em efeitos androgênicos ou antiestrogênicos. O metabolismo também pode ser influenciado pela (2) indução de enzimas metabolizadoras de hormônios, como o citocromo do grupo P-450 no fígado, essas enzimas possuem função chave na síntese e degradação de hormônios esteróides, e sua produção ou atividade pode ser influenciada por diversos compostos orgânicos (LINTELMANN *et al.*, 2003; BIRKETT; LESTER, 2003).

O transporte de hormônios através da corrente sanguínea para tecidos e órgãos-alvo pode também sofrer perturbação do sistema endócrino, visto que compostos lipofílicos estão em sua maior parte ligados a proteínas plasmáticas, como albumina e globulinas. O efeito depende da quantidade livre de hormônios, pois somente moléculas livres podem se ligar e ativar os receptores. Assim, na presença de substâncias químicas que possam competir com os hormônios pelos sítios de ligação das proteínas de transporte, pode haver aumento na concentração de hormônios livres (LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Outros efeitos que podem ocorrer no sistema endócrino são alterações na síntese, remoção dos hormônios de seus respectivos receptores e interações com sistemas multi-hormonais, bem como outras possibilidades. Pode-se observar que os mecanismos envolvidos são complexos, e portanto, não foram completamente elucidados. Com o aumento nas pesquisas realizadas a respeito desse tema poderá ser elucidado mais relações entre os organismos expostos, a disrupção endócrina e aos disruptores endócrinos (LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.4.3. Fontes de Disruptores Endócrinos

Os disruptores endócrinos, assim como outros poluentes ambientais podem ser provenientes de uma variedade de fontes (BAIRD, 2002; BIRKETT; LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; BILA; DEZOTTI, 2003). Estas fontes podem ter implicações com a exposição humana, efeitos em outras espécies animais, bem

como efeitos e/ou acumulação no meio ambiente. Geralmente, as fontes de contaminação se dividem em duas categorias principais (BIRKETT; LESTER, 2003):

1. Fontes Pontuais: apresentam um ponto de entrada bem definido do poluente no meio ambiente, geralmente através de cursos d'água. Pode-se citar as descargas de efluentes industriais e esgotos domésticos, bem como outros, tratando-se de descargas diretas para os corpos d'água.
2. Fontes não Pontuais: algumas vezes também chamados de fontes difusas, não tem um ponto de entrada definido. O ponto real de entrada dos poluentes depende do tipo de fonte, a sua localização, bem como a forma física dos compostos. Bons exemplos são: a deposição atmosférica e escoamento superficial, principalmente, provenientes de práticas agrícolas. A chuva pode transportar partículas que se depositam nas superfícies de cursos d'água, sendo esses solúveis em água, portanto, podem ser transportados por longas distâncias.

O transporte de uma determinada substância oriunda de uma fonte não pontual de uma área urbana é diferente daquela proveniente de uma zona rural. Existem algumas razões para isso: boa parte da área urbana é coberta com materiais impermeáveis; como na área urbana há pouca exposição do solo ao meio ambiente, o processo de erosão é menos favorecido e as partículas do solo acabam sendo transportadas preferencialmente para as águas superficiais. Na área urbana a poluição pode se dar também pelo acúmulo de lixos, durante o trânsito, nas emissões radioativas, enquanto que na área rural a poluição advém basicamente da erosão do solo. Na área rural as deposições podem ser incorporadas ao solo, ou seja, sorvidas ou infiltradas, dificultando a remoção, enquanto que na área urbana a deposição na superfície do solo (impermeável) acaba sendo escoada para os corpos d'água (lixiviação) (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Assim, as principais fontes de poluição de águas superficiais são de origem industrial, doméstica e agrícola. Nota-se que a disrupção endócrina observada no meio ambiente aquático, em especial, em peixes é atribuída principalmente aos resíduos de substâncias orgânicas descartadas em cursos d'água (BIRKETT; LESTER, 2003).

A principal fonte de contaminação aos seres humanos é sem dúvida a presença de disruptores endócrinos na alimentação, uma vez que muitas dessas substâncias são utilizadas em processos de produção de alimentos industrializados e/ou no processo de embalagem dos mesmos (LINTELMANN *et al.*, 2003; BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; BILA; DEZOTTI, 2007). Além disso, na ingestão de água potável contaminada, pois várias dessas substâncias não são completamente degradadas durante os processos empregados em estações de tratamento de água e esgoto (GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.5. Substâncias Classificadas como Disruptores Endócrinos e suas Fontes de Contaminação

Muitas das substâncias classificadas como disruptores endócrinos eram anteriormente classificadas como micropoluentes orgânicos. Destacam-se compostos como os alquilfenóis (APs), alquilfenóis polietoxilados (APEOs), hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), ftalatos, bisfenol A, retardantes de chama polibromados, dioxinas, furanos, agrotóxicos e hormônios esteróides (BIRKETT; LESTER, 2003).

A União Européia (UE) produziu um relatório contendo uma série de substâncias suspeitas de atuarem como disruptores endócrinos em seres humanos e em animais (SEC, 2007). Assim como a U.S.EPA, que tem uma lista, principalmente, para agrotóxicos que atuam como DEs (U.S.EPA, 2007). Tendo em vista o vasto número de compostos que apresentam atividade de disrupção do sistema endócrino, para o presente trabalho foram selecionadas algumas classes de substâncias para desta forma, descrevê-las mais detalhadamente. As classes escolhidas foram: os agrotóxicos, os alquilfenóis incluindo alquilfenóis polietoxilados, os hormônios, além do bisfenol A.

1.5.1. Agrotóxicos

O termo agrotóxico, segundo o *Codex Alimentarius*, refere-se a qualquer substância ou mistura que tenha como objetivo prevenir, destruir ou controlar qualquer tipo de praga incluindo espécies de plantas ou animais que devam estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos e rações animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante a estocagem e transporte. Sendo excluídos desse conceito os fertilizantes, nutrientes animais e/ou vegetais, aditivos alimentares e medicamentos de uso veterinário (FAO, 2005).

A legislação brasileira conceitua agrotóxicos através do decreto nº 4.074, de 04 de Janeiro de 2002, o qual regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, como sendo:

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

O termo agrotóxico inclui em seu contexto, principalmente, inseticidas, herbicidas e fungicidas, bem como outras classificações de acordo com o organismo-alvo (BAIRD, 2002; BIRKETT; LESTER, 2003). Podem ainda ser divididos em vários subgrupos, onde os mais importantes são os organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, clorfenoxi herbicidas e triazinas (BIRKETT; LESTER, 2003).

Vários agrotóxicos, bem como seus metabólitos, estão comprovadamente relacionados com alterações no sistema endócrino (em especial substâncias mais antigas), observadas em estudos envolvendo ensaios *in vitro* e *in vivo*, sobretudo de espécies animais provenientes de ambientes aquáticos (LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Destaque-se o subgrupo dos organoclorados (OCs), essa classe foi amplamente utilizada, mundialmente, desde os anos 40 devido ao forte efeito no controle de pragas e doenças. OCs foi a primeira classe de agrotóxicos orgânicos sintetizados testados na agricultura, e DDT e HCH foram, provavelmente, os mais conhecidos. A produção e o uso intenso na agricultura desses compostos resultaram em uma ampla contaminação do meio ambiente (KALYONCU; AGCA; AKTUMSEK, 2009). Dentre os OCs observa-se um grande número de substâncias responsáveis por atuarem como DEs, principalmente pelo fato de serem persistentes no meio ambiente, devido a alta estabilidade química, baixa solubilidade em água e elevada lipofilicidade, podendo ser facilmente bioacumulados (BAIRD, 2002; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os agrotóxicos podem ser absorvidos, pelas culturas, diretamente através de suas folhas, ou indiretamente pelo solo, além de poderem ser transportados pela chuva e pelo vento de seus pontos de aplicações para culturas vizinhas (BIRKETT; LESTER, 2003; HILDEBRANDT; LACORTE; BARCELÓ, 2007; FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011). O uso amplamente difundido de agrotóxicos proporciona, além de seu acúmulo em diferentes culturas vegetais e em solos, na contaminação de águas e de toda a cadeia alimentar aquática (BIRKETT; LESTER, 2003; FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011). Esses processos são altamente dependentes do tipo de agrotóxico, do solo, da cultura, das condições climáticas, dos procedimentos de aplicação, e assim, o destino dos agrotóxicos é muito variável (HILDEBRANDT; LACORTE; BARCELÓ, 2007).

Além disso, esses produtos químicos podem ser transferidos das plantas para os animais através da cadeia alimentar, ou ainda ocorrer a pulverização de solução de agrotóxicos na criação de animais nas suas acomodações a fim de prevenir infestações de pragas. Conseqüentemente, ambas as rotas desses contaminantes podem levar a bioacumulação de agrotóxicos persistentes em produtos alimentares de origem animal, tais como: carne, peixe, gordura, ovos e leite (LeDOUX, 2011).

1.5.2. Alquilfenóis (APs) e Alquilfenóis Polietoxilados (APEs)

Os alquilfenóis (APs) são substâncias formadas por um grupamento fenólico ligado a uma cadeia carbônica e são utilizados principalmente na produção dos alquilfenóis etoxilados (APEs). Os APEs fazem parte de uma classe de substâncias denominada surfactantes, que são moléculas anfifílicas. Dependendo da polaridade da parte hidrofílica estes surfactantes podem ser classificados em catiônicos, aniônicos e não iônicos. Os surfactantes não iônicos são usados como detergentes e agentes emulsificadores, e também podem ser sulfonados ou fosforilados para produzirem detergentes aniônicos, lubrificantes, aditivos em indústria de agrotóxicos, antioxidantes e aditivos de óleos lubrificantes. Neste contexto, os APEs são moléculas pertencentes à classe dos surfactantes não iônicos e estão presentes em formulações de diversos produtos como detergentes e agrotóxicos. Dentro da classe dos APEs, o nonilfenol etoxilado (NPE) é o mais comum (BIRKETT; LESTER, 2003; SILVA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2008; GADZAŁA-KOPCIUCH; FILIPIAK; BUSZEWSKI, 2008).

Produtos cosméticos, como maquiagem, cremes para a pele, produtos para cuidado do cabelo e de banho podem também ser fontes diretas de exposição a estes compostos, um exemplo é o nonoxinol-9 (NP9EO), usado como espermicida em produtos contraceptivos, ver Tabela 1 (BIRKETT; LESTER, 2003).

A solubilidade dos APEs em água depende do número de grupos polares presentes na parte hidrofílica da molécula. Quanto maior o número de grupos polares, maior a solubilidade em água. Os APEs são substâncias pouco polares, portanto, predominantemente lipofílicas, podendo se acumular nos tecidos gordurosos de diversos organismos (BIRKETT; LESTER, 2003; SILVA *et al.*, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Após o uso, tanto doméstico quanto industrial, os APEs são levados até Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Durante os diferentes ciclos do tratamento deste efluente pode ocorrer biodegradação dos APEs, levando a formação de metabólitos biorefratários, algumas vezes mais tóxicos que o próprio produto de origem, por exemplo, o 4-nonilfenol e o 4-octilfenol (LESTER, 2003; SILVA *et al.*, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; BIRKETT; SOARES *et al.*, 2008). Os surfactantes, em geral, sofrem 80% de biodegradação, formando água e gás

carbônico. No entanto, os APEs não obedecem esta regra de aceitabilidade ambiental, considerando que sua biodegradação primária resulta na formação de vários metabólitos persistentes que não são completamente eliminados nas ETEs. Estima-se que cerca de 60 a 65% de todo nonilfenol que chega nas ETEs são descartados no meio ambiente (SILVA *et al.*, 2007).

O nonilfenol e seus isômeros são os mais críticos, devido a sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. Devido a sua característica lipofílica ($\log K_{ow}$ de 3,80 a 4,77), eles adsorvem preferencialmente na matéria orgânica e sedimentos, não estando prontamente submetido à biodegradação anaeróbica (SILVA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2008).

Devido à presença dos compostos etoxilados em corpos d'água, a forma mais comum de exposição do homem a estes produtos é através da água. Além disso, foi observado que a presença desses compostos em alimentos pode ser originária de diversas vias de contaminação. O emprego dessas substâncias pelas indústrias alimentícias, o uso na agricultura como agentes de limpeza, agrotóxicos, bem como em embalagens de alimentos, podem ser as possíveis fontes desta substância nos alimentos (SILVA *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Fonte e concentração de nonilfenol e seus etoxilados.

Fonte	Concentração
Detergentes	0-28%
Desodorante	1-3%
Maquiagem	0,1-10%
Produtos para cabelos	1-30%
Pinturas	0,6-3%
Efluente de processamento de papel	NP* (0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$), NPE** (0,1 a 35,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Estações de tratamento de efluentes	<0,02-330 $\mu\text{g L}^{-1}$
Agrotóxicos	<1-20%
Alimentos	NP (0,1-19,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$)

FONTES: BIRKETT; LESTER, 2003.

*NP: nonilfenol

**NPE: nonilfenol etoxilado

1.5.3. Hormônios

Os estrogênios apresentam em sua estrutura um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático, enquanto que nos progestagênios este grupo fenólico é substituído por um grupo cetona. Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, seus derivados sintéticos são bastante utilizados como contraceptivos (hormônios inibidores do processo de ovulação), mas também são empregados para o controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama. Já os progestagênios são empregados nos tratamentos voltados para as causas de infertilidade e descontrole do ciclo menstrual (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Existem também os anabolizantes sintéticos os quais são substâncias químicas relacionadas estruturalmente com a testosterona. Os esteróides sintéticos são obtidos basicamente a partir da reação de alquilação ou esterificação dos hormônios naturais, prevenindo-os da metabolização rápida no organismo, assim garantindo o efeito desejado. Os esteróides mais utilizados são o etinilestradiol e mestranol (sendo esses estrógenos), norgestrel e noretisterona (esses progestagênicos), metiltestosterona, fluoximesterona, etilestrenol, mesterolona, fenilpropionato de nandrolona e ésteres da testosterona, como anabolizantes (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os hormônios são eliminados principalmente na forma de conjugados glucorinados ou sulfatados, através da urina, ou em menor proporção pelas fezes (na forma livre). Sob condições ambientais esses conjugados podem ser desfeitos, assim resultando em hormônios livres e seus metabólitos. Esse rompimento dos conjugados é resultado da produção das enzimas β -glucorinidase e arilsulfatase por populações de bactérias presentes (AURIOL *et al.*, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007; MULLER *et al.*, 2008). Devido a isso, a presença de hormônios na forma livre é principalmente encontrada no esgoto doméstico, pela grande quantidade da bactéria fecal *Escherichia coli* (AURIOL *et al.*, 2006).

Vários organismos excretam diferentes quantidades de esteróides sexuais, dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou gravidez. Como exemplo, a quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida pode ser até mil vezes

maior que a de uma mulher em atividade normal (da ordem de 2 a 20 μg de estrona/dia, 3 a 65 μg de estriol/dia, e 0,3 a 5 μg de estradiol/dia), dependendo do estágio da gravidez (GHISELLI; JARDIM, 2007).

As principais fontes de esteróides sexuais, naturais e sintéticos, estão localizadas nas áreas rurais destinadas à agropecuária, através da contaminação do solo e da água pelos dejetos animais, como o estrume de gado, bem como na área urbana, através de descargas de esgotos domésticos nas águas superficiais (LINTELMANN *et al.*, 2003; BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

1.5.4. Bisfenol A

Bisfenol é um nome genérico dado a um grupo de difenilalcanos, comumente empregados na produção de plásticos, onde o bisfenol A é o principal representante deste grupo. O bisfenol A é produzido em grandes quantidades, sendo que mais de 90% é utilizado na indústria de plásticos para a produção de policarbonetos, resinas epóxido, resinas de poliéster-estireno insaturadas e retardantes de chama. Os plásticos fabricados são utilizados em embalagens de alimentos e bebidas, tais como revestimento interno para latas de alumínio, tampas de garrafas, além de usos como aditivos em papel térmico, tintas em pó, na odontologia, como estabilizantes em plásticos, entre outros (BIRKETT; LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; BALLESTEROS-GOMEZ; RUBIO; PEREZ-BENDITO, 2009).

O coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) de 3,4 do bisfenol A, indica a sua lipofilicidade e tendência para se ligar a matéria orgânica no ambiente aquático, sendo o meio aquático a principal rota de distribuição aos demais compartimentos ambientais. Uma vez no meio ambiente, o bisfenol A pode ser degradado biologicamente, com velocidades bastante diferentes, apresentando um tempo de meia-vida variando de 1 a 180 dias em solo e de 2,5 a 4 dias em água. Em peixes valores medidos de BCF, entre 5 e 68, indicam baixa bioacumulação e valores calculados de 42 a 196 indicam média bioacumulação. Em relação a sua atividade estrogênica, alguns estudos realizados *in vitro* mostram que o bisfenol A apresenta um potencial de bioacumulação de 4 a 6 ordens de magnitude menor que o 17 β -

estradiol, mas tem demonstrado possuir alguma atividade antiandrogênica. Pelo fato de ser amplamente empregado nos processos industriais, portanto, estando presente em diversas formulações de produtos de uso doméstico. Suas principais fontes de contaminação são os efluentes industriais, esgotos domésticos, bem como lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; BALLESTEROS-GOMEZ; RUBIO; PEREZ-BENDITO, 2009).

1.6. Legislação Relacionada aos DEs

A fim de proteger a saúde pública, a União Européia define que os limites máximos de resíduos devem ser estabelecidos em conformidade com os princípios geralmente reconhecidos de avaliação da segurança, tendo em conta os riscos toxicológicos, a contaminação ambiental e os efeitos microbiológicos e farmacológicos dos resíduos. Devem ter-se igualmente em conta outras avaliações científicas da segurança das substâncias em causa, efetuadas por organizações internacionais ou por organismos científicos estabelecidos na Comunidade (EU, 2009a).

Resíduo pode ser conceituado como sendo uma substância, ou seus metabólitos, os quais estão presentes em produtos agrícolas, e/ou animais, ou ainda na água (EU, 2009b). Já o termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (EU, 2010).

Desse modo, o limite máximo de resíduo (LMR) é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável (IDA). Esta é obtida a partir de ensaios de experimentação, avaliando-se a toxicidade, a teratogenicidade e carcinogenicidade destes compostos não intencionais (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004).

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA (2010). Além disso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA é responsável por monitorar a presença de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes ambientais em produtos de origem animal por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, o qual é responsável por fiscalizar se ocorrem violações de limites máximos de resíduos ou teores máximos de contaminantes, e onde é detectada a utilização de produtos de uso veterinário de utilização proibida, para os quais não há limite de tolerância (MAPA, 2010).

Decorrente da preocupação na comunidade científica em relação aos possíveis efeitos danosos aos seres humanos e outros animais submetidos a exposição dos DEs, tem-se desenvolvido relatórios, discussões, meios de avaliação, etc., a fim de esclarecer, desenvolver estratégias e/ou solucionar esse problema. A Comissão das Comunidades Europeias (CEC, 1999) apresentou um documento, com o objetivo de identificar os problemas de disrupção endócrina e as suas consequências, além de definir medidas políticas adequadas com base no princípio de precaução, a fim de dar uma resposta rápida e eficaz ao problema, de forma a tranquilizar a opinião pública. Em 2007 apresentou-se outro documento a fim de implementar a substâncias suspeitas de atuarem como disruptores endócrinos (CEC, 2007). No relatório gerado em 2011 sabe-se que na União Européia não há programas de monitoramento de DEs coordenados ou monitorados, mas sim programas individuais (EUROPEAN COMMISSION, 2011). A Agência de Proteção Ambiental Americana (U.S.EPA) também tem uma comissão para avaliação dos DEs, sendo esta a *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee* (EDSTAC). A EDSTAC apresentou um relatório final no qual apresenta recomendações para avaliações *in vitro* e *in vivo* de disruptores endócrinos (U.S.EPA, 2011).

1.7. Disruptores Endócrinos no Meio Ambiente

Atualmente muitos pesquisadores veem desenvolvendo trabalhos a fim de determinar a presença de disruptores endócrinos no meio ambiente, onde em sua maior parte realizam-se trabalhos em água e em estações de tratamento de esgoto. Cabe destacar aqui alguns resultados obtidos: Liu *et al.* (2011) aplicaram um método para a determinação de 28 esteróides em água superficial, lodo e em estações de tratamento de esgoto utilizando UHPLC-ESI. Foram encontrados 17 β -boldenona, 5 α -diidrotestosterona, progesterona, estrona e epi-androsterona na faixa de concentração que variou de 0,4 a 621 ng L⁻¹ e de 1,6 a 372 ng g⁻¹ em água e lodo, respectivamente. Amostras de solo foram analisadas para verificar a presença de clorofenóis, alquilfenóis, nitrofenóis e cresóis utilizando GC-MS/MS e QuEChERS. 2,4,6-triclorofenol, 4-terc-octilfenol, 2-clorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol foram detectados em níveis de traços, menores que o LOQ do método proposto, <10 μ g kg⁻¹ (PADILLA-SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Na Espanha, o esgoto líquido de ETEs foi utilizado para determinar alquilfenóis polietoxilados, bisfenol A, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e seus metabólitos utilizando SPE e LC-MS/MS. A faixa de concentração desses DEs foi de <10 ng L⁻¹ a aproximadamente 1200 ng L⁻¹. Tais resultados demonstraram que existe uma complexidade de DEs nas ETEs e eventualmente essas substâncias entram no meio ambiente, onde organismos aquáticos estão expostos a esses poluentes (VEGA-MORALES; SOSA-FERRERA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2010).

Devido a preocupação em relação aos DEs na Áustria foi realizado o monitoramento de 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estriol, estrona, 17 α -etinilestradiol, nonilfenol-1-etoxilado, nonilfenol-2-etoxilado, nonilfenol-1-ácido carboxílico, nonilfenol-2-ácido carboxílico, nonilfenol, octilfenol, octilfenol-1-etoxilado, octilfenol-2-etoxilado e bisfenol A, em aproximadamente 2000 amostras de água subterrânea e 240 de água de superfície. Dentre esses, 414 amostras foram coletas em todo o país em 2001, e o restante das amostras nas proximidades de áreas industrializadas e de atividades agrícolas. As amostras foram analisadas utilizando LC-MS/MS e GC-HRMS, utilizando SPE como procedimento de preparo da amostra. Os resultados demonstraram a presença dessas substâncias em diferentes concentrações, por exemplo, nonilfenol com um máximo de 1500 ng L⁻¹, bisfenol A com concentração

máxima de 930 ng L⁻¹ e estrona 1,6 ng L⁻¹. Destaque-se que em alguns casos a concentração de nonilfenol excede limites toxicológicos para a vida aquática (HOHENBLUM *et al.*, 2004).

O Ministério do Meio Ambiente de Ontário, Canadá conduziu uma pesquisa em 2006 a fim de investigar a presença de produtos farmacêuticos, hormônios e bisfenol A em 258 amostras por 16 meses, sendo estas fontes de água e sistemas de água para beber. As amostras foram analisadas a fim de verificar a presença de 48 substâncias por LC-MS/MS e SPE. Dentre as 48 substâncias, 27 foram encontradas em um dos tipos de amostra analisada, ou em ambas. A maioria das substâncias detectadas foram antibióticos, sendo que hormônios não foram detectados em nenhuma das amostras e bisfenol A foi encontrado tanto em fontes de água quanto em sistemas de água potável. De um modo geral, os autores relataram que as concentrações encontradas nas águas de Ontário são menores que níveis encontrados anteriormente e relatados em outros trabalhos (KLEYWEGT *et al.*, 2011).

Na análise da água de superfície do rio Ganges e da água subterrânea de localidades agrícolas e industriais de Kampur, Índia, foram detectados em ambas as amostras HCH (os isômeros α , β , γ , δ -HCH), dieldrin e malationa. A presença de malationa e HCH em água de superfície foi atribuída à intensa atividade agrícola na área de Kanpur ao longo da planície do Ganges (SANKARARAMAKRISHNAN; SHARMA; SANGHI, 2005).

No Brasil, foram realizadas oito amostragens no rio Atibaia, Campinas (SP), sendo que duas amostras foram coletadas no período de chuvas (março de 2006 e janeiro de 2007) e outras duas amostras no período de seca no inverno (maio e junho de 2006). Os DEs encontrados, além de outros fármacos, foram dibutilftalato em quase todas as amostras, seguido de bisfenol A e dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. De acordo com os resultados obtidos, os autores observaram que uma maior concentração de substâncias é observada no período de seca, bem como concentrações mais elevadas foram encontradas em amostras coletadas mais próximas da cidade de Campinas, e desse modo, longe da nascente do rio (MONTAGNER; JARDIM, 2011).

1.7.1. Disruptores Endócrinos em Peixes

Organismos aquáticos, como os peixes, são capazes de acumular resíduos de disruptores endócrinos muitas vezes mais altos que a água em seu entorno, conseqüentemente, eles são uma fonte importante de contaminação para seus predadores e aos consumidores humanos (LeDOUX, 2011).

Um método para a determinação de organoclorados, organofosforados e PCBs foi aplicado a tecidos de peixes (*Tilapia mossambique*, *Cynoscion xanthulu*) coletados no período de maio de 2001 em um lago na Califórnia, o qual serve como reservatório de drenagem agrícola. Foi observada uma concentração total de DDT e de PCBs de 116 a 304 ng g⁻¹. Os autores avaliaram o risco toxicológico dessas substâncias constatando que, no fígado de peixe, as concentrações de endrin e da soma de DDTs excedeu o limite estabelecido para efeito toxicológico em invertebrados (14 ng g⁻¹). A concentração de DDE no músculo dos peixes foi superior ao limiar de concentração de 50 ng g⁻¹ para a proteção de pássaros predadores. Desse modo, observou-se a contaminação contínua de organoclorados, em especial, em espécies que vivem nesse reservatório (SAPOZHNIKOVA; BAWARDI; SCHLENK, 2004). DDT e seus metabólitos também foram encontrados em 244 amostras de músculo de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*) e bagre africano (*Clarias gariepinus*) de três diferentes rios na Etiópia. Concentrações mais elevadas foram encontradas em espécies com maior teor de gordura (ex: *p,p'*-DDE: 149,9 ng g⁻¹), e nessas também uma quantidade considerada de endossulfan sulfato (até 65,1 ng g⁻¹) foi encontrada (NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE, 2011).

Shao *et al.* (2007) analisaram o filé de peixe comprado em mercados de Beijing, China, onde constataram a presença de nonilfenol e bisfenol A, os quais foram detectados na faixa de concentração de 0,33 a 55,98 µg kg⁻¹. A presença desses compostos em tais concentrações foi atribuída a contaminação do meio ambiente aquático no qual viviam.

A contaminação de peixes de diversas espécies também foi observada por Liu *et al.* (2011) na China, os quais observaram a presença de 4-terc-octilfenol, 4-cumilfenol, 4-nonilfenol e bisfenol A em músculo de peixe com concentrações máximas de 4,6; 4,4; 18,9 e 83,5 ng g⁻¹. Esteróides também foram encontrados, em

níveis mais baixos $<11,3 \text{ ng g}^{-1}$, sendo eles estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estriol. Nesse trabalho, também foi calculado o fator de bioacumulação (BCF) dos alquilfenóis variando na faixa de 18 a 97, esse valor é espécie específico, e dependente de uma série de fatores como, sexo, estado reprodutivo, fase da vida, tamanho, bem como as condições ambientais (LIU *et al.*, 2011).

O peixe da espécie *Danio rerio* foi submetido a exposição em concentrações conhecidas de 17β -estradiol e de dois isômeros do nonil e octilfenol, sendo estes: (4-(3',6'-dimetil-3'-heptil)fenol, 363-NP e 4-(3'-metil-3'-heptil)fenol, 33-OP), onde concentrações de 0,35; 1,8 e $33 \mu\text{g g}^{-1}$ foram encontradas, respectivamente (NAVARRO *et al.*, 2010).

Além desses poucos estudos descritos acima, existem outros (FENLON *et al.*, 2010; SINGH; SINGH, 2008) que de um modo geral são desenvolvidos principalmente para a determinação de organoclorados, alquilfenóis e hormônios esteróides. Os níveis de concentração variam dos locais onde são coletadas as amostras de peixe e do tecido avaliado, mas na maioria deles observa-se a grande presença de bisfenol A em praticamente todas as amostras em níveis relativamente altos. Demonstrando desse modo que existe a contaminação do ambiente aquático e que isso deve ser uma preocupação constante nos dias atuais, a fim de diminuir os impactos ambientais gerados pela contaminação de DEs.

Não foram encontrados trabalhos de monitoramento de peixes em rios brasileiros, mas um trabalho sob condições monitoradas foi realizado por LOPES *et al.* (2006) a fim de estudar o efeito do inseticida triclorfon em peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Os parâmetros como bioconcentração, tempo de meia-vida, eliminação de triclorfon, dentre outros, foram avaliados. Constatou-se que o triclorfon apresenta um tempo de meia-vida médio em peixes e baixa bioconcentração e para que houvesse a eliminação de 95% do inseticida do músculo de pacu seria necessário um período de 50 dias.

Sabe-se que a presença de DEs em peixe acarreta em diversos problemas em seu sistema endócrino, estudos já relataram a presença de hermafroditismo em peixes expostos a substâncias com efeito estrogênico, além de alterações em outras espécies animais, como pássaros, répteis e mamíferos. Em alguns casos, esses efeitos podem conduzir ao declínio da população (AURIOL *et al.*, 2006; BILA; DEZOTTI, 2007; U.S.EPA, 2006; REINEN *et al.*, 2010). A fim de avaliar a exposição

de peixes aos DEs muitos trabalhos avaliam a presença da proteína vitelogenina, a qual apresenta muitas vantagens em seu monitoramento, uma vez que esta é controlada pela interação entre o estrógeno com o seu respectivo receptor. Desse modo, estando relacionada diretamente com a constante preocupação de ruptura endócrina. Além disso, ela pode responder secundariamente a compostos androgênicos através da supressão de andrógenos naturais e, conseqüentemente, havendo a redução dos estrogênios endógenos (U.S.EPA, 2006; REINEN *et al.*, 2010; MATOZZO *et al.*, 2008).

1.7.2. Disruptores Endócrinos em Seres Humanos

É muito complexa a confirmação dos efeitos causados pela presença de DEs em alimentos, embalagens, cosméticos, água ou em outras fontes nos seres humanos, o que se relata em alguns trabalhos é que a pequena quantidade ingerida, mas não só de uma substância, e sim de um “coquetel” diário pode ser responsável por alterações no sistema endócrino de seres humanos (WARING; HARRIS, 2011).

No Brasil, Koifman *et al.* (2002) apresentaram os resultados de um estudo epidemiológico, que relaciona a exposição a agrotóxicos durante os anos 80 e distúrbios reprodutivos, tais como, câncer de mama, ovário e próstata, taxas de avaliação de esperma, observados nos anos 90 em estados brasileiros. Os resultados observados estão de acordo com evidências, apoiando uma possível associação entre a exposição a agrotóxicos e distúrbios reprodutivos (KOIFMAN; KOIFMAN; MEYER, 2002). Agrotóxicos têm sido detectados em amostras de sangue humano, no leite materno e resíduos presentes em alimentos consumidos pela população em geral, apontando a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas, de câncer, de doenças mentais, de disfunções na reprodutividade humana relacionadas ao uso dos mesmos (SIQUEIRA; KRUSE, 2008; BILA; DEZOTTI, 2007).

Desse modo, a contaminação por produtos químicos persistentes é potencialmente prejudicial a organismos em níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. E os seres humanos estão expostos a essa contaminação, visto que a

principal fonte de exposição crônica a essas substâncias é a dieta (LeDOUX, 2011; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Um exemplo das consequências devastadoras da exposição em seres humanos a disruptores endócrinos é o caso do potente princípio ativo dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético. Anteriormente a sua proibição no início dos anos 70, ele foi, erroneamente, prescrito para cerca de cinco milhões de mulheres grávidas para impedir o aborto espontâneo e promover o crescimento fetal. Passado algum tempo, depois que as crianças atingiram a puberdade, descobriu-se que o DES afetou o desenvolvimento do sistema reprodutivo, além de ter causado câncer vaginal (U.S.EPA, 2010; PRINS, 2008; BAIRD, 2002; CEC, 1999).

1.8. Técnicas de Extração de Disruptores Endócrinos em Amostras de Peixe

A etapa de preparo de amostra e as operações envolvidas podem afetar o resultado final, necessitando-se desta forma, que para se obter a informação correta deve-se realizar o preparo adequado. É de extrema importância que a amostra para análise esteja homogênea e que seja representativa. Uma amostra representativa tem a composição química, a mais próxima possível da média do material como um todo (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

Observa-se na literatura o uso de diversas técnicas de preparo de amostra para a extração de disruptores endócrinos em amostra de peixe, com o objetivo de minimizar o manuseio da amostra, determinar níveis cada vez menores de concentração, bem como reduzir os resíduos tóxicos gerados.

A fim de tornar o preparo de amostra mais rápido tem se utilizado as técnicas de Extração com Solvente Acelerada (ASE, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*) e Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*), ambas, baseiam-se no uso de alta temperatura e pressão para aquecer a mistura da amostra com o solvente extrator (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011; BALLESTEROS-GOMEZ; RUBIO; PEREZ-BENDITO, 2009). ASE foi utilizada para a determinação de 4-n-nonilfenol e 4-terc-octilfenol em filé de peixe, com posterior limpeza do extrato utilizando extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) com sorvente propildiol, no qual os autores obtiveram uma média de

recuperação para os dois compostos estudados de 70% (GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; FILIPIAK, A.; BUSZEWSKI, 2008).

O tradicional Soxhlet tem sido também utilizado para a extração de agrotóxicos organoclorados em peixe, com o uso de n-hexano e mistura de n-hexano e acetona, principalmente. Essa técnica geralmente permite a extração de uma ampla gama de agrotóxicos, mas utilizada inadequadamente pode resultar em baixas recuperações (LeDOUX, 2011). O longo tempo de extração e o uso de grande quantidade de solventes orgânicos são desvantagens bastante relevantes quando se deseja escolher a técnica ideal para se trabalhar (LeDOUX, 2011; FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

Yang *et al.* (2007) utilizaram ultrassom para a extração de HCH e seus isômeros, hexaclorobenzeno, DDT, DDE e DDD, onde utilizaram 100 mL de uma mistura de hexano e diclorometano seguida de sonicação por 40 min e repouso por 10 h e nova sonicação (20 min). Posteriormente uma sequência de etapas de limpeza e concentração do extrato foi realizada, utilizando colunas empacotadas, evaporador rotatório e fluxo de nitrogênio. Observa-se aqui um grande tempo para o preparo da amostra e uma sequência de etapas que acarretam em maior manuseio da amostra, podendo resultar em maiores perdas de analito, não sendo o almejado. De mesmo modo, Vallejo *et al.* (2010) utilizou ultrassom para a determinação de 5 hormônios em peixe, em um procedimento com menor consumo de solvente orgânico, tendo como solvente extrator 5 mL de acetona submetido a banho ultrassônico por 2 min e 5 ciclos. O sobrenadante foi filtrado utilizando filtros de PTFE e concentrado, e seguido de adição de 1 mL de hexano para a etapa de limpeza utilizando cartuchos de florissil e logo após, evaporado.

Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) é um meio de preparo de amostra que combina o uso de força mecânica para a homogeneização entre a amostra e um determinado sorvente, e pode ser aplicada na extração de disruptores endócrinos em peixe (LeDOUX, 2011). Destaca-se que esta técnica pode algumas vezes resultar em baixas recuperações e devido ao uso de altas concentrações de sorventes necessita-se de uma etapa adicional de limpeza (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Várias abordagens são dadas a fim de eliminar interferentes coextraídos, incluindo congelamento, centrifugação, partição líquido-líquido, Cromatografia com

Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*), Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*) além de outras (LeDOUX, 2011).

SPE é a técnica de limpeza mais popular, visto que a amostra passa por um cartucho no qual contém uma coluna de um determinado sorvente, e o analito é adsorvido sobre as partículas do adsorvente, os analitos são liberados com a adição de um solvente de eluição (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011). Vallejo *et al.* (2010) analisaram a bile de peixes onde foi realizada a hidrólise dos conjugados dos hormônios analisados e seguida a extração utilizando SPE, com cartuchos Oasis-HBL e concentração do extrato sob fluxo de nitrogênio.

Na técnica de SPME os analitos são adsorvidos em uma fibra recoberta com uma camada de fase sólida a qual é empurrada para fora de uma microseringa. O analito é, então, termicamente dessorvido e transferido ao sistema cromatográfico. O benefício dessa técnica é a eliminação do uso de solventes. Esta técnica pode ser utilizada analisando o *headspace* (HD-SPME, do inglês *Headspace-Solid Phase Micro Extraction*) ou fazendo-se a imersão direta da fibra na solução (DI-SPME, do inglês do inglês *Direct Imersion-Solid Phase Micro Extraction*) (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

A técnica de Polímeros Molecularmente Impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) emprega polímeros os quais estão interligados e organizados com o objetivo de mimitizar o reconhecimento biológico, onde em condições adequadas são capazes de reconhecer a molécula modelo. Desse modo, utilizando SPME juntamente com a MIP, Hu *et al.* (2010) desenvolveram um método para determinar 4 hormônios (estrone, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol) em filé de peixe.

O método QuEChERS (do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe**) foi originalmente desenvolvido para a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos em frutas e vegetais e se tornou muito conhecido desde que foi introduzido por Anastassiades *et al.* (2003). Esse método é caracterizado pelo uso de um solvente polar, acetonitrila, para extração de matrizes que contenham água e são utilizados sais a fim de obter separação de fases (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Essa adição de sais permite que compostos de diferentes polaridades possam ser extraídos. A adição de sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), promove a separação entre a água e a fase orgânica e permite, desse modo, a partição dos

compostos polares mais facilmente (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011). Pode-se adicionar cloreto de sódio (NaCl) para auxiliar no efeito *salting out* e acetato de sódio (NaAc) para que haja a formação de tampão acetato quando adiciona-se ácido acético à acetonitrila. O efeito *salting out* consiste da adição em excesso de um sal proporcionando, desse modo, que o analito se torne menos solúvel na fase aquosa (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Juntamente com o método QuEChERS foi proposto um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE), onde uma quantia de extrato é colocada em contato com uma mistura de sorventes e/ou sais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003;). Esses sorventes podem ser uma amina primária-secundária (PSA), a qual tem elevado efeito quelante devido a presença dos grupamentos amino primário e secundário, acarretando em remoção de ácido orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos (PRESTES *et al.*, 2009; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011). Pode-se ainda utilizar C18 para remover substâncias interferentes apolares, como lipídeos, e ainda carbono grafitizado para remover esteróis e pigmentos como clorofila (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011). O menor tempo de preparo de amostra, a eliminação de etapas de evaporação e a troca do uso de cartuchos tradicionais de SPE por d-SPE são algumas das vantagens oferecidas com o método QuEChERS.

Norli; Christiansen; Deribe (2011) empregaram o método QuEChERS modificado para a determinação de 22 agrotóxicos organoclorados e 7 PCBs em filé de peixe das espécies tilápia (*Oreochromis niloticus*) e salmão (*Salmo salar*). Nesse trabalho os autores propuseram a adição de água anteriormente a adição de acetonitrila bem como uma etapa de congelamento para remoção de lipídeos presentes na matriz de peixe.

Muitos pesquisadores propõem alterações no procedimento, portanto, encontra-se o termo método QuEChERS modificado, ou seja, tem como base o método original, mas pequenas alterações foram propostas a fim de melhorá-lo e/ou adequá-lo as matrizes trabalhadas. Observa-se que o uso do método QuEChERS em comparação com as demais técnicas de extração, aqui apresentadas, possibilita a extração de um número maior de analitos de diferentes grupos químicos e polaridades em amostras sólidas, como alimentos. Além disso, é um procedimento

que não exige instrumentação diferenciada, e utiliza-se uma quantidade bastante reduzida de solvente orgânico.

1.9. Técnicas para Determinação de Compostos Orgânicos

1.9.1. Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida

A Cromatografia Gasosa é uma técnica de separação com um poder de resolução excelente, a qual baseia-se na diferente distribuição de substâncias da amostra entre uma fase estacionária e a fase móvel (um gás), sendo esta aplicada a análise de compostos voláteis ou volatilizáveis, termicamente estáveis. Após serem separadas na coluna, as substâncias analisadas chegam ao sistema de detecção, sendo os principais detectores clássicos aplicados nessa técnica: Detector por Condutividade Térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detector*); Detector por Ionização em Chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*); Detector por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*) e Detector de Nitrogênio e Fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica importante, pois a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para serem analisados por Cromatografia Gasosa e o requisito principal para a análise em HPLC é a solubilidade dos compostos na fase móvel (HARRIS, 2008). Os principais sistemas de detecção são: Detector de Ultravioleta e Visível (UV-vis); Detector por Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) e Detector de Fluorescência (FD, do inglês *Fluorescence Detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2008).

A Cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Muito importante destacar que, com o uso desses detectores clássicos, as análises quantitativas ficam limitadas, de um modo geral, a identificação do analito através do seu tempo de retenção (t_R) característico,

o que pode gerar um grande problema, pois vários compostos podem apresentar o mesmo t_R , resultando na identificação equivocada do analito em questão (LANÇAS, 2009).

Desse modo, fez-se necessário o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas, combinando assim, as vantagens da Cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da Espectrometria de Massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

1.9.2. Espectrometria de Massas

A história da Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) teve início com os experimentos de J. J. Thomson, em 1897, sobre raios catódicos, onde ao aplicar um campo elétrico em um tubo, observou-se a deflexão do elétron dentro do mesmo, sendo esta uma das primeiras determinações da razão m/z (massa/carga) (LANÇAS, 2009).

O princípio básico da Espectrometria de Massas é a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos e separação através da sua m/z , seguida da detecção qualitativa e quantitativa da respectiva m/z e abundância. Essa ionização pode ser realizada termicamente, por campo elétrico, por impacto energético de elétrons, íons ou fótons, dentre outros. O espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector, sendo que os dois últimos são operados sob condições de alto vácuo. A fonte de íons não necessariamente estará sob vácuo, podendo ficar em pressão atmosférica (GROSS, 2004).

1.9.2.1. Fontes de Ionização

Tratando-se de fontes de ionização em Espectrometria de Massas muitas podem ser as opções a serem utilizadas, sendo necessário avaliar as características dos analitos de interesse e desse modo escolher a fonte de ionização mais adequada para a análise. A Figura 1 faz uma relação entre a massa molecular e a

polaridade dos analitos, sendo possível observar a fonte ideal para a aplicação desejada. Pode-se utilizar com Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) as fontes de eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ou ainda fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*) (LANÇAS, 2009)

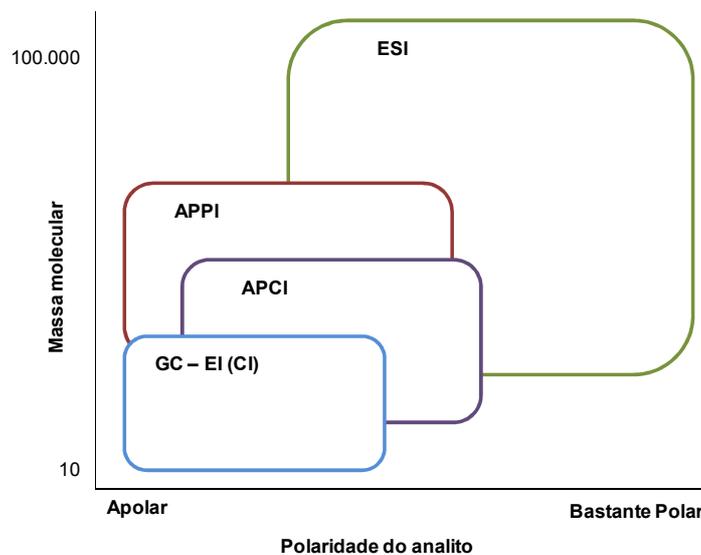
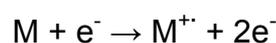


Figura 1 - Principais características das fontes de ionização empregadas em acoplamentos GC/MS e LC/MS (adaptado de LANÇAS, 2009).

Quando se trata do acoplamento da Cromatografia Gasosa com a Espectrometria de Massas (GC/MS, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*), dois são os modos de ionização possíveis: Ionização por Elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) ou por Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*).

Ionização por Elétrons (EI): consiste no bombardeio de elétrons sobre uma molécula neutra, sendo que previamente esta molécula foi transferida para a fase gasosa. Portanto, quando um dos elétrons da fonte de ionização se aproximar de um dos elétrons que está orbitando a molécula, estes irão se repelir, Figura 2. Com isso, o elétron da molécula será ejetado gerando um íon molecular carregado positivamente (GROSS, 2004).



Quando se trata de EI, não existe equilíbrio térmico porque os íons são gerados na fase gasosa e sob vácuo, geralmente de 10^{-3} e 10^{-5} torr. Sob esse vácuo é improvável ocorrer interações entre íons depois que estes são formados. Logo o espectro de massas de EI é reproduzível, pois se trata de um método físico de ionização, não ocorrendo reações químicas ou colisões dentro da fonte de íons (BENASSI, 2009). A eficiência do EI é dependente da energia de ionização, que é o mínimo de energia necessária para a ionização, sendo para a maioria das moléculas, de 7-15 eV. Assume-se que a energia ótima para a ionização em EI é de 70 eV, visto que nenhum átomo ou molécula ficará sem ser ionizado, assegurando desse modo, uma reprodutibilidade nos espectros gerados, não havendo diferenças significativas entre os espectros experimentais e uma biblioteca de dados (GROSS, 2004).

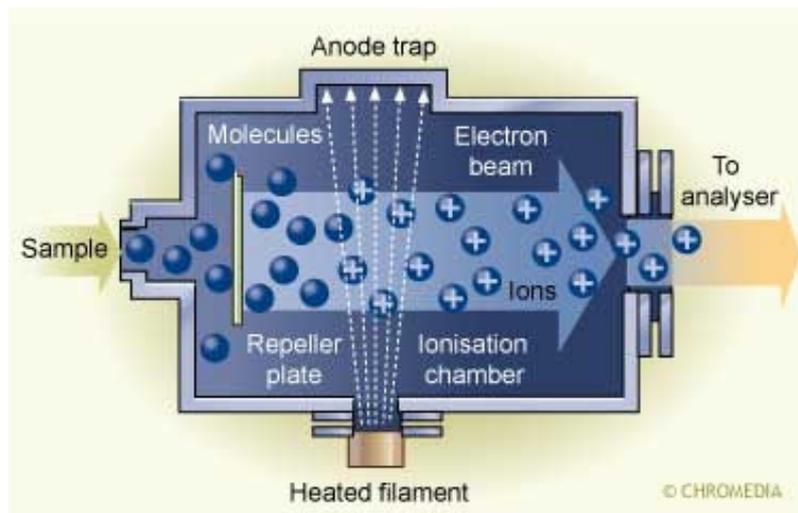


Figura 2 - Esquema da fonte de ionização por elétrons (CHROMEDIA, 2011).

Ionização Química (CI): Foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Utilizando esse tipo de ionização, novas espécies são formadas quando moléculas gasosas interagem com íons, onde pode envolver a transferência de um elétron, próton, ou outra espécie carregada entre os reagentes (o analito neutro e os íons do gás reagente). Esta mistura (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito, ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em

fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem as moléculas carregadas do analito $[M+H]^+$. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observado fragmentação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; GROSS, 2004).

1.9.2.2. Analisadores de Massas

Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . Atualmente, existem uma grande variedade de analisadores de massas, e a escolha do mais apropriado depende da aplicação (faixa de massas desejada), desempenho (resolução) bem como o custo. Alguns exemplos são: quadrupolo (e triplo quadrupolo), *ion trap*, tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo, dentre os quais estão brevemente descritos abaixo o quadrupolo e o triplo quadrupolo.

Quadrupolo (qMS): É o analisador de massas mais popular, principalmente, pela sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade, facilidade de ser entendido e operado. O quadrupolo é composto de quatro barras usualmente de metal, disposta em pares nos quais se aplicam uma corrente contínua do tipo DC (corrente direta) e um potencial RF (rádio frequência) alternante. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados ao centro da região entre os quatro cilindros e atravessam o quadrupolo axialmente. Suas trajetórias são dependentes do campo elétrico produzido onde apenas íons de determinada m/z terão essa trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que os íons de diferentes m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim o espectro de massas. A trajetória dos íons é um pouco complexa, mas simplificadamente seguem uma trajetória helicoidal, ver Figura 3 (LANÇAS, 2009; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CORILO, 2009; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

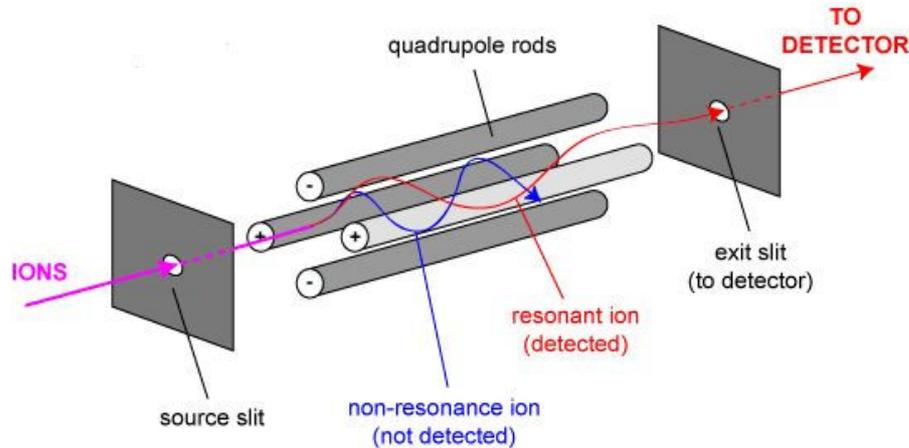


Figura 3 - Esquema de funcionamento do analisador de massas, do tipo quadrupolo (CORILO, 2009).

Tripla quadrupolo (TQ): Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (q ou cela de colisão) não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1 ou MS1) geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3 ou MS2) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A principal vantagem de um analisador do tipo tripla quadrupolo, em relação a um quadrupolo simples é o aumento da relação sinal/ruído, visto que no primeiro selecionam-se somente os íons característicos do analito de interesse. Ou seja, por ser mais seletivo, se torna mais sensível, podendo desse modo obter melhores limites de quantificação para a substância de interesse (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

1.9.2.3. Dissociação Induzida por Colisão (CID)

Na dissociação induzida por colisão, CID, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto (ver Figura 4). Todos os quadrupolos são controlados para

transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

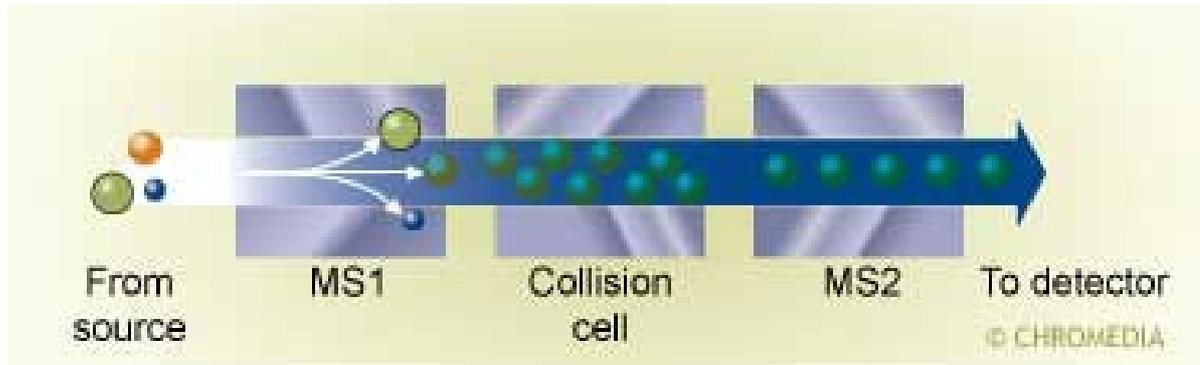


Figura 4 - Esquema de um analisador triplo quadrupolo e sua célula de colisão (CHROMEDIA, 2011).

1.9.2.4. Técnicas de Operação para Obtenção do Espectro de Massas em MS/MS

Full scan: Este tipo de varredura é muito comum quando se tem um único quadrupolo, mas quando se tem um sistema MS/MS pode-se utilizá-lo também, utilizando somente o Q1, desse modo realizando a varredura completa da amostra em uma faixa ampla de m/z , durante a corrida cromatográfica. O cromatograma nessa condição é conhecido como Cromatograma de Íon Total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*). Neste caso, o q2 e o Q3 funcionam como lentes, transmitindo os íons (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

Monitoramento do Íon Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*): O modo SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas de mesmo modo pode ser utilizado no sistema triploquadrupolar. Quando operado no modo SIM pode-se escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse, que estão presentes em uma mistura complexa. Neste caso, o q2 e o Q3 servem somente para transmitir os íons filtrados no Q1 (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

Scan do Íon Produto: Consiste em selecionar um íon precursor de determinada m/z no Q1, o qual opera em modo SIM, e determinar todos os íons

produtos resultantes da dissociação induzida por colisão no Q3 (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Scan do Íon Precursor: Consiste na escolha de um íon produto para determinar a origem do mesmo, ou seja, qual o íon precursor que originou este produto. Todos os íons precursores que produzam íons de massa-carga, seja por reações ou fragmentações, serão detectados. Assim, o Q1 opera no modo *scan*, enquanto o Q3 no modo SIM (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; RICCIO, 2009).

Monitoramento de Reação Múltipla (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*): Neste tipo de varredura é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produtos que são filtrados em Q3. A ausência da varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, que é associado a um aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

1.9.2.5. Importância do Acoplamento da Cromatografia com a Espectrometria de Massas para a Análise de Disruptores Endócrinos em Peixe

Como já visto, a determinação da presença de disruptores endócrinos em produtos de origem animal é de extrema importância, e devido as concentrações bastante baixas desses compostos, existe a necessidade do uso de técnicas analíticas com alta seletividade, a fim de quantificá-los adequadamente.

O uso de técnicas de separação como a Cromatografia isoladamente, não permite uma separação suficientemente adequada e confiável, devido a baixa seletividade e sensibilidade dos detectores clássicos empregados. Mas o acoplamento da Cromatografia com a Espectrometria de Massas em série pode superar isso, devido a alta seletividade desse acoplamento. Assim, possibilitando a simplificação dos procedimentos de preparo de amostra, resultando em métodos mais rápidos e menos trabalhosos (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005).

O uso da Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas em série, em especial operando no modo MRM é de grande importância para a análise destes compostos (analitos-alvo) presentes em nível de traços em matrizes muito

contaminadas, complexas e/ou com muitas interferências, como é o caso da matriz peixe. Isso ocorre, devido a redução na probabilidade de interferências espectrais permitindo a identificação através do monitoramento de duas (ou três) transições: uma para a quantificação e a outra para a confirmação do analito em questão (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; SOLER; PICÓ, 2007). A Diretiva (2002/657/EC) ainda descreve que para instrumentos LC-MS/MS e GC-MS/MS deve-se monitorar duas transições, a partir do mesmo íon precursor; ou ainda de dois íons precursores e um produto para cada precursor. Quando a relação da intensidade entre o íon de confirmação e o íon de quantificação for $>50\%$ é aceito uma variação de $\pm 20\%$; quando de 20% a 50% , aceita-se variação de $\pm 25\%$; e sendo esta de 10% a 20% pode-se ter uma variação de $\pm 30\%$ e $<10\%$ pode-se aceitar uma variação de $\pm 50\%$.

1.10. Efeito Matriz

O efeito matriz é observado como um aumento ou diminuição na resposta do detector na presença no analito no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (PIZZUTI *et al.*, 2007; PINHO *et al.*, 2009).

1.10.1. Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa

O efeito de matriz pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: *i)* mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas do analito no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta; *ii)* erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema pode ser evitado quando acopla-se o cromatógrafo com um espectrômetro de massas; *iii)* aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas

com mesmo tempo de retenção do analito; extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado, fato comum aos detectores fotométricos de chama (PINHO *et al.*, 2009).

Observa-se o pronunciamento do efeito matriz em análises de amostras complexas, mas as condições cromatográficas no injetor, na coluna cromatográfica e no detector devem ser consideradas. Destaque-se como principal fator em GC o sistema de injeção, onde quando as soluções-padrão são preparadas em solvente puro e analisadas, os sítios ativos do insersor (*liner*) estão disponíveis para a retenção dos analitos e, assim, uma menor quantidade é transferida para a coluna e conseqüentemente detectada. Na análise do extrato da matriz contendo esses analitos, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do *liner*. Assim, quando comparada a resposta do extrato contendo os analitos com soluções preparadas em solvente do mesmo analito, ocorre uma superestimação dos resultados (PINHO *et al.*, 2009).

A fim de minimizar a influencia da matriz sobre os resultados obtidos, deve-se preparar as soluções padrões no extrato da matriz, desse modo mascarando os sítios ativos presentes no *liner* (FRENICH *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2009). Ou ainda com um melhor preparo e purificação dos extratos na etapa de limpeza.

1.11. Padrão Interno e Padrão de Substituição (*surrogate*)

Idealmente, a substância usada como Padrão Interno (PI) deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra, e, quando cromatografada não coeluir com os analitos em estudado na amostra. Este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico. O método de padronização interna é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna e tamanho da amostra. Este método é bastante útil em cromatografia gasosa, na qual se usa seringa para injeção de amostra e por isso deve ser feito a cada análise (RIBANI *et al.*, 2004).

O Padrão de Substituição (PS), do inglês *surrogate*, é definido como um composto puro adicionado ao material de análise, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa. É chamado de padrão de substituição porque este é transferido para a amostra e pode não estar efetivamente no mesmo equilíbrio que se encontra na forma nativa, portanto a determinação da recuperação do padrão de substituição realiza-se fazendo uma “correção de recuperação” para a substância de interesse (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI *et al.*, 2004). Idealmente pode-se utilizar compostos isotopicamente modificados, pois os mesmos não são encontrados na natureza nesta forma, e são quimicamente idênticos aos analitos não deuterados. Assim, utilizando Cromatografia Gasosa eles apresentaram tempos de retenção próximos e utilizando Espectrometria de Massas são identificados pela diferença de massas entre o padrão isotópico e o analito (AHMADKHANIHA *et al.*, 2010).

1.12. Planejamento Fatorial

A otimização de variáveis experimentais é geralmente realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens, tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. Estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados. Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de mais de uma variável, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (CUNICO *et al.*, 2008).

A metodologia de superfícies de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) é uma ferramenta de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G. E. P. Box na década de 1950, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Apresenta duas etapas distintas, modelagem e

deslocamento, as quais são repetidas tantas vezes quanto necessário, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é normalmente feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências das variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Utilizando o modelo linear o primeiro passo é investigar a superfície de resposta em torno das condições habituais de funcionamento do processo. O planejamento contém um ponto central (Figura 5), e por isso varre três níveis de cada fator, permitindo assim, verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear. Ao todo realizam-se 7 ensaios, sendo três repetições do ponto central, e a resposta é estimada pela equação 2 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). No entanto, esta metodologia é possível de ser aplicada somente quando se utilizam variáveis quantitativas, visto que, para variáveis qualitativas, não há como adicionar níveis no ponto central. Com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um fatorial completo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

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

Onde:

x_1 e x_2 : são os fatores variados codificados;

b_0 : é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas;

b_1 e b_2 : são os coeficientes relacionados com as variáveis x_1 , x_2 ;

e : é o erro aleatório associado ao modelo.

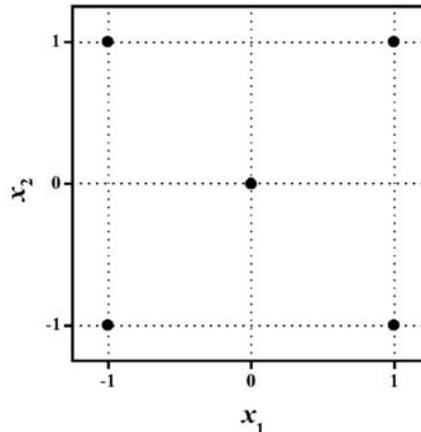


Figura 5 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A partir do planejamento montado, pode-se construir a matriz de coeficientes de contraste. A matriz de coeficientes de contraste \mathbf{X} , juntamente com o vetor de respostas \mathbf{y} , obtido experimentalmente, será utilizada para cálculo dos coeficientes do modelo, conhecidos também como *vetor de regressão* (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

$$\hat{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (3)$$

Onde:

\hat{y} : é o vetor das respostas estimadas pelo modelo;

\mathbf{b} : é o vetor de regressão ($\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t\mathbf{y}$);

$(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}$: é a matriz inversa do produto da transposta da matriz \mathbf{X} com ela mesma.

Em determinado momento percebe-se que o modelo linear é incapaz de descrever adequadamente os dados, desse modo, faz-se uso do modelo quadrático, cuja expressão geral para duas variáveis está representada abaixo (Equação 4) (TARLEY *et al.*, 2009).

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (4)$$

Este modelo tem seis parâmetros, ou seja, é uma ampliação do modelo linear, e essa ampliação pode ser feita de várias maneiras, sendo a mais comum a construção do planejamento em estrela, o qual consiste em acrescentar ao

planejamento inicial (linear) um planejamento idêntico, porém girado de 45° em relação à orientação de partida. O resultado é uma distribuição octogonal conforme a Figura 6 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

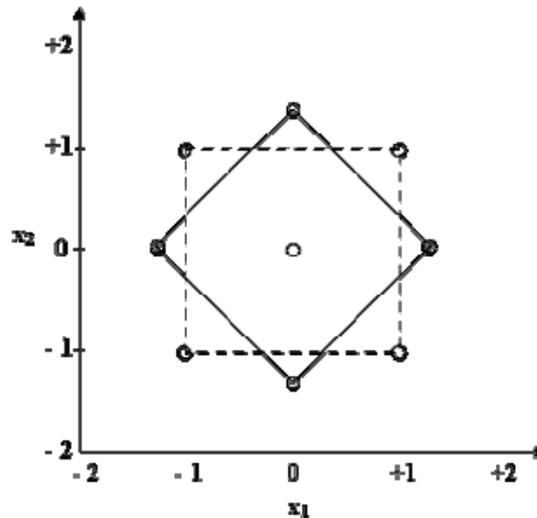


Figura 6 - Planejamento fatorial em estrela para duas variáveis codificadas (adaptado de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

1.13. Validação

Faz-se necessário a validação de métodos analíticos a fim de mostrar a qualidade nas medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sugere que seja feito planejamento da validação levando em consideração os seguintes itens: definição da aplicação, objetivo e escopo do método; definição dos parâmetros de validação e critérios de aceitação; verificação das características de desempenho do equipamento, se as mesmas estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificação dos materiais (por exemplo, reagentes); planejamento dos experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e execução dos experimentos de validação (INMETRO, 2011).

No Brasil, há guias de validação tais como o da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, bem como do INMETRO com o DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011 (INMETRO, 2011). Os órgãos internacionais também dispõem de guias como a Conferência Internacional em Harmonização (ICH, 2005), União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e SANCO (2009).

A validação de um método é uma exigência na prática das análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica e linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e de quantificação.

1.13.1. Seletividade

Seletividade de um método é a capacidade que o mesmo possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; ANVISA 2003). Pode-se também dizer que é a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de derivação, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2009).

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se ela não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

1.13.2. Linearidade e Curva Analítica

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é (INMETRO, 2011):

$$y = ax + b \quad (5)$$

sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = coeficiente linear - interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (a). A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2011). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

A partir dos pontos experimentais calcula-se o coeficiente de correlação (r), parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa, podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado

como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). É aceito pela ANVISA um coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2003). Pode-se utilizar do coeficiente de determinação (r^2) o qual é a porcentagem da variação da variável dependente (y) explicada pela variável independente (x), por exemplo, quando $r^2=0,99$ indica que as variáveis dependentes explicam 99% da variação da variável independente.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho existe uma faixa de resposta linear, desse modo, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

1.13.3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI *et al.*, 2004). A precisão é avaliada através do desvio padrão absoluto (σ), o qual utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (RIBANI *et al.*, 2004).

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) (INMETRO, 2011).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). Várias medições da mesma amostra estão envolvidas, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intra-corrída. Não se deve confundir repetitividade com precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos (INMETRO, 2011). O objetivo da avaliação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratorial) e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (SANCO, 2011).

1.13.4. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com o INMETRO, a limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2011).

Valores aceitos de recuperação para a análise de substâncias a nível de traços é entre a faixa de 70 a 120% (SANCO, 2009). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

1.13.5. Limites de Detecção e Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2011).

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com um grau aceitável de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOQ como a menor concentração da curva analítica (INMETRO, 2011).

O LOD e o LOQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e às vezes subjetiva (já que a curva

analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Para resolver este problema do cálculo do LOD e LOQ é importante utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LOQ (RIBANI *et al.*, 2004).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental consistiu na otimização do método QuEChERS modificado e a otimização do método multirresíduo por GC-(TQ)MS/MS para a análise de disruptores endócrinos em filé de peixe.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.1. Instrumentação

A instrumentação utilizada para o desenvolvimento do trabalho segue descrita abaixo:

- ✓ Agitador Vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga (Centribio, Brasil);
- ✓ Processador de alimentos Varimix (Targo, Espanha);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- ✓ Sistema GC-(TQ)MS/MS: Cromatógrafo a gás Varian 1200-MS equipado com:
 - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
 - Coluna capilar VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), com 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme;
 - Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA);
 - Detector de massas triplo quadrupolo 1200, atuando no modo MRM (Varian, EUA);

- Injetor 1079 com Programação de Temperatura de Vaporização – PTV, com insersor de vidro silanizado (d.i. 3.4 mm) contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MS *Workstation* 6.4 (Varian, EUA).

2.2. Materiais Utilizados

- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3[®] (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (Mallinckrodt, México);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA)
- ✓ Cloreto de cálcio p.a. (Spectrum, EUA)
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ✓ Florisil 60-100 mesh (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL;
- ✓ Gás argônio analítico 99,9992% usado como gás de colisão no sistema GC-(TQ)MS/MS (Air Products, Brasil);
- ✓ Gás hélio analítico 99,9997% usado como gás de arraste no sistema GC-(TQ)MS/MS (Air Products, Brasil);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudo (conforme Tabela 2);

2.3. Processamento da Amostra

As amostras “branco” de jundiá foram adquiridas em uma piscicultura na cidade de São João do Polêsine no Rio Grande do Sul, Brasil e feitos cortes para a retirada dos filés de peixe. Uma porção aproximada de 500 g de filé foi processada até completa homogeneização, utilizando processador VariMix. Após processada, as amostras foram acondicionadas em freezer, com temperatura abaixo de -10 °C, até a sua utilização.

O mesmo procedimento foi utilizado para as amostras das espécies de jundiá, panga, tilápia e carpa, as quais foram adquiridas de supermercados de Santa Maria no Rio Grande do Sul, Brasil.

2.4. Seleção do Padrão Interno e do Padrão de Substituição (*surrogate*)

Utilizou-se como padrão interno para a avaliação do instrumento o trifenilfosfato e o quintozeno. O trifenilfosfato foi utilizado tendo como base o trabalho desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.* (2003) para análises utilizando QuEChERS. Foi utilizado também o quintozeno como PI, visto que seu uso não é permitido, com base no PNCRC/MAPA (2010). Os padrões internos foram utilizados a fim de controle do instrumento aceitando-se valores de 20% de variação de área, não sendo utilizados para os cálculos. No extrato final (1 mL) foi adicionado 10 µL de uma solução, contendo quintozeno e trifenilfosfato na concentração de 10 mg L⁻¹.

No presente trabalho utilizou-se a trifluralina d-14 como padrão de substituição, tendo como fim a avaliação do procedimento de extração, e não utilizá-la para “correção da recuperação” de nenhum analito. Para todas as amostras de filé de peixe (10,0 g) foram adicionados 100 µL do padrão de substituição na concentração de 10 mg L⁻¹.

2.5. Preparo de Soluções Analíticas

Preparou-se individualmente cada padrão sólido e/ou líquido, levando-se em consideração a pureza dos mesmos, portanto, pesando-se a quantidade necessária para o preparo de uma solução na concentração de 1000 mg L^{-1} em acetonitrila grau HPLC. A partir desta solução estoque, diluiu-se obtendo uma solução de 100 mg L^{-1} de cada composto, também em acetonitrila. A partir dessas soluções preparou-se uma mistura contendo todos os compostos em uma concentração de 10 mg L^{-1} .

Uma mistura de todos os compostos em estudo nesse trabalho foi preparada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, e a partir dessa solução foram preparadas as soluções analíticas de trabalho, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0 e $200,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, as quais foram utilizadas para avaliar a linearidade do método.

Na Tabela 2 estão apresentados todos os nomes dos disruptores endócrinos, grau de pureza, classe, grupo químico e LMR dos padrões analíticos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Os padrões sólidos foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer, exceto os hormônios (mestranol, estrona, 17α -estradiol e 17α -etinilestradiol) que foram utilizados da marca Sigma-Aldrich e a trifluralina deuterada que foi adquirida da empresa CND Isotopes.

Tabela 2 - Informações sobre os disruptores endócrinos estudados.

Disruptores endócrinos	Fórmula	MM	CAS	Pureza (%)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) MAPA	Classe	Grupo Químico
Hormônios							
17 α -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	57-91-0	100,0	-	HN	Esteróide
17 α -etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	57-63-6	98,0	-	HS	Esteróide
17 β -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	50-28-2	96,0	-	HN	Esteróide
Dietilestilbestrol*	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268,4	56-53-1	99,0	1	HS e Na	Estilbeno
Estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	53-16-7	99,0	-	HN	Esteróide
Hexestrol	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	84-16-2	98,5	-	Na	Estilbeno
Mestranol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310,4	72-33-3	99,2	-	HS	Esteróide
Alquilfenóis							
4-n-nonilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220,4	104-40-5	99,3	-	Ad e Pd	Fenol
4-n-octilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,3	1806-26-4	99,5	-	Pd	Fenol
4-terc-octilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,3	140-66-9	99,0	-	Pd	Fenol
Bisfenol							
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,3	80-05-7	99,5	-	Plas	-
Agrotóxicos							
Aldrin*	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,9	309-00-2	97,0	50	I	Organoclorado
Alacloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,8	15972-60-8	99,5	-	H	Cloroacetamida
2,4 - DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0	3424-82-6	99,0	-	Pd	Organoclorado
2,4 - DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320,0	53-19-0	97,5	-	Pd	Organoclorado
4,4 - DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0	72-55-9	98,5	-	Pd	Organoclorado
Alfa-HCH*	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,8	319-84-6	98,0	50	I	Organoclorado

Atrazina	$C_8H_{14}ClN_5$	215,7	1912-24-9	99,0	-	H	Triazina
Beta-HCH*	$C_6H_6Cl_6$	290,8	319-85-7	97,5	50	I	Organoclorado
Bifentrina	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	422,9	82657-04-3	99,5	-	I e A	Piretróide
Clorpirifós etílico	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,6	2921-88-2	99,5	-	I, F e A	Organofosforado
Clorpirifós metílico	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	322,5	5598-13-0	97,5	-	I e A	Organofosforado
DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	354,5	50-29-3	99,0	-	I	Organoclorado
Delta-HCH*	$C_6H_6Cl_6$	290,8	319-86-8	99,0	50	I	Organoclorado
Diazinona	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,3	333-41-5	96,0	-	I e A	Organofosforado
Dicofol	$C_{14}H_9Cl_5O$	370,5	115-32-2	98,8	-	A	Organoclorado
Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,9	60-57-1	97,5	-	I	Organoclorado
Dimetoato	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	229,3	60-51-5	98,0	-	I e A	Organofosforado
Dodecacloro (mirex)*	$C_{10}Cl_{12}$	545,5	2385-85-5	99,0	50	I	Organoclorado
Endossulfan alfa	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406,9	959-98-8	96,0	-	I	Organoclorado
Endossulfan beta	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406,9	19670-15-6	98,0	-	I	Organoclorado
Endossulfan sulfato	$C_9H_6Cl_6O_4S$	422,9	1031-07-8	99,5	-	Pd	Organoclorado
Endrin*	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,9	72-20-8	99,5	50	I	Organoclorado
Fenarimol	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	331,2	60168-88-9	97,5	-	Fg	Piridiminil carbonol
Gama-HCH	$C_6H_6Cl_6$	290,8	58-89-9	98,5	-	I	Organoclorado
Heptacloro*	$C_{10}H_5Cl_7$	373,3	76-44-8	98,5	50	I	Organoclorado
Heptacloro epóxido endo	$C_{10}H_5Cl_7O$	389,5	28044-83-9	99,0	-	I	Organoclorado
Heptacloro epóxido exo	$C_{10}H_5Cl_7O$	389,5	1024-57-3	99,0	-	I	Organoclorado
Hexaclorobenzeno	C_6Cl_6	284,8	118-74-1	99,5	-	Fg e I	Organoclorado

Malationa	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,4	121-75-5	99,0	-	I e A	Organofosforado
Parationa etílica	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291,3	56-38-2	99,5	-	I e A	Organofosforado
Parationa metílica	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,2	298-00-0	98,5	-	I	Organofosforado
Permetrina	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	391,3	52645-53-1	94,0	-	I e F	Piretróide
Quintozeno (PI)	$C_6Cl_5NO_2$	295,3	82-68-8	96,0	-	Fg	Cloronitrofenil
Simazina	$C_7H_{12}ClN_5$	201,7	122-34-9	98,5	-	H	Triazina
Triclorfon	$C_4H_8Cl_3O_4P$	257,4	52-68-6	97,0	-	I	Organofosforado
Trifenilfosfato (PI)	$C_{18}H_{15}O_4P$	326,3	115-86-6	99,5	-	-	-
Trifluralina	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335,3	1582-09-8	97,5	-	H/Dn	Dinitroanilina
Trifluralina d-14 (PS)	$C_{14}H_3D_{14}F_3N_2O_4$	348,4	347841-79-6	99,1	-	-	-
Vinclozolina	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	286,1	50471-44-8	99,5	-	Fg	Dicarboximida

*Disruptor endócrino com LMR estabelecido.

A: acaricida; Ad: adjuvante; An: anabolizante; F: formicida; Fg: fungicida; H: herbicida; cloro/nitrofenil; HN: hormônio natural; HS: hormônio sintético; I: inseticida; MM: massa molecular; Pd: produto de degradação; Plas: Plastificante.

FONTE: MAPA, 2010; NIST, 2011; CHEMBLINK, 2012; ALANWOOD, 2011; TOMLIN, 2003; PAN, 2011.

2.6. Otimização do Sistema Cromatográfico GC-(TQ)MS/MS para a Determinação de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe

Neste trabalho a otimização do sistema cromatográfico foi realizada utilizando a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série (GC-(TQ)MS/MS). O uso da Espectrometria de Massas é bastante interessante, visto que, proporciona maior sensibilidade e seletividade que detectores clássicos utilizados em Cromatografia. Com o uso dessa técnica pode-se analisar compostos que não são separados adequadamente no sistema cromatográfico, ou seja, coeluem, e ainda, utilizando nos modos SIM ou MRM, diminui-se as interferências espectrais e a possibilidade de identificação equivocada dos analitos.

2.6.1. Programação da Temperatura do Forno da Coluna Cromatográfica e do Injetor

A programação do forno da coluna foi realizada a fim de separar um grande número de compostos pela técnica de Cromatografia, sem que houvesse coeluição de muitos compostos. Essa separação facilitaria a otimização dos segmentos para a análise do espectrômetro de massas, onde um número menor de compostos em um segmento significa uma menor quantidade de íons a serem monitorados por um determinado tempo, assim, aumentando a sensibilidade para aquele (s) analito (s) presente (s) no segmento. Já a programação da temperatura do injetor também foi realizada a fim de proporcionar a volatilização adequada de todos os compostos no sistema se injeção.

2.6.2. Condições do Sistema de Detecção

Com o propósito de obter condições ótimas do sistema de detecção iniciou-se com a injeção individual de cada composto em uma concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ no modo *full scan* operando na faixa de massas de 50 a 500 u, para a obtenção dos tempos de retenção e adequação das janelas (segmentos) de análise. Bem como, a

identificação dos íons característicos para cada composto (dois ou três) para posterior obtenção das fragmentações características de cada analito. Os íons selecionados foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) foi realizado o *full scan* no íon produto variando as energias de colisão entre 5 e 40 V a fim de otimizar as melhores condições de detecção.

Otimizados os parâmetros acima, foram avaliadas as transições, no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) a serem utilizadas para a quantificação e confirmação dos compostos estudados. A transição de maior intensidade foi utilizada para a quantificação do analito e a de segunda maior intensidade para a confirmação do mesmo. Para todos os disruptores endócrinos avaliados nesse trabalho foi utilizado o modo de ionização por elétrons.

2.7. Otimização do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe

Foram realizados alguns testes preliminares a fim de avaliar o melhor procedimento para a extração de disruptores endócrinos em filé de peixe, de acordo com a Tabela 3.

Para todos os testes foi realizada a agitação manual por 1 min entre cada etapa de adição, seja ela de água ultrapurificada, acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e/ou sais. Seguido a isso uma etapa de centrifugação foi realizada à 3400 rpm por 8 min com temperatura de refrigeração de 10 °C. O extrato obtido foi transferido para um segundo frasco para a etapa de limpeza, como descrito no item 2.8.

Tabela 3 – Condições dos testes preliminares para a extração de DEs em peixe.

Teste	Quantidade de amostra	Água ultrapurificada	Acetonitrila	Ácido acético 1%*	NaCl	MgSO₄	Acetato de sódio
E1	10 g	10 mL	10 mL	-	1 g	4 g	-
E2	10 g	10 mL	10 mL	Sim	1 g	4 g	1,7 g
E3	10 g	10 mL	10 mL	Sim	3 g	4 g	1,7 g
E4	10 g	-	10 mL	Sim	-	2 g	1,7 g
E5	10 g	-	10 mL	-	-	2 g	-
E6	10 g	5 mL	10 mL	-	1 g	4 g	-
E7	10 g	5 mL	10 mL	Sim	1 g	4 g	1,7 g

* Preparada uma solução de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético

E: refere-se ao procedimento de extração

2.8. Otimização da Etapa de Limpeza do Método QuEChERS Modificado

A limpeza do extrato foi realizada a fim de minimizar os interferentes da matriz que possam ser extraídos juntamente com os analitos na etapa de extração do método. Foram avaliados 11 diferentes combinações de sorventes e sais, os quais foram analisados no modo *full scan* para identificar possíveis interferentes que estariam presentes no extrato, mas que mesmo não sendo detectados, quando utilizando o modo MRM, estariam presentes no sistema de análise.

Após a etapa de extração o sobrenadante foi transferido para um segundo frasco já contendo os sais e/ou sorventes para a limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), os quais seguem a Tabela 4. Os tubos contendo o extrato e os sais foram agitados manualmente por 1 min e em seguida centrifugados por 8 min a 3400 rpm, no final dessa etapa o sobrenadante foi filtrado em filtros de nylon de 0,2 µm.

Para os extratos submetidos a criogenia, 4 mL foram transferidos para uma seringa contendo uma fritada e acondicionados por 2 h a -20 °C, baseado no trabalho de NORLI; CHRISTIANSEN; DERIBE (2011). Passado esse período seguiu-se com a etapa de limpeza. Os extratos que passaram pela etapa com CaCl₂ foram primeiramente agitados e centrifugados sem a adição dos demais sais, e o restante do sobrenadante foi transferido a outro frasco, contendo os sorvente/sais. Os frascos foram agitados manualmente e centrifugados, o sobrenadante foi filtrado e analisado.

Tabela 4 - Testes avaliados para a etapa de limpeza do extrato de peixe.

Teste	Quantidade de extrato (mL)	Criogenia	CaCl ₂ (g)	MgSO ₄ (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)	Florisil (mg)
L1	2*	2 h (-20 °C)	1	250	50	-	-
L2	2	-	-	250	50	-	-
L3	2*	-	1	250	50	-	-
L4	2	2 h (-20 °C)	-	250	50	-	-
L5	2	-	-	250	50	250	-
L6	2	-	-	300	50	250	-
L7	2	-	-	300	-	250	-
L8	3	-	-	300	-	-	1000
L9	3	-	-	300	-	250	1000
L10	3	-	-	300	50	-	1000
L11	3	-	-	300	50	250	1000

* Foram utilizados 4 mL para a etapa de criogenia e 2 mL para a limpeza
L: refere-se ao procedimento de limpeza.

2.9. Planejamento Fatorial

Posteriormente aos testes descritos no item 2.7 foi realizado o planejamento fatorial em estrela a fim de encontrar um procedimento que permitisse a extração adequada dos disruptores endócrinos em estudo em filé de peixe, utilizando uma sequência de etapas simples e de fácil execução. O planejamento consistiu na variação de dois fatores, sendo eles as quantidades de água e NaCl a serem adicionadas. Utilizou-se para a realização dos cálculos as condições de: 10 e 20 mL de água e 3,0 e 6,0 g de NaCl. Na Tabela 5 estão representados os testes que foram gerados a partir do planejamento em estrela. Para esses foi utilizado o teste L6 como etapa de limpeza (item 2.8).

Tabela 5 – Condições dos testes realizados para a avaliação do planejamento fatorial em estrela, avaliação 1.

Teste	Água ultrapurificada (mL)	NaCl (g)	MgSO₄ (g)*
PF1	10,0	3,0	4,0
PF2	20,0	3,0	8,0
PF3	10,0	6,0	4,0
PF4	20,0	6,0	8,0
PF5	15,0	4,5	6,0
(ponto central)	15,0	4,5	6,0
	15,0	4,5	6,0
PF6	7,9	4,5	3,2
PF7	15,0	6,6	6,0
PF8	22,1	4,5	8,8
PF9	15,0	2,4	6,0

* a quantidade de MgSO₄ foi ajustada em função da quantidade de água.

PF: planejamento fatorial em estrela (avaliação 1).

Após realizar estes testes, a condição ótima sugerida foi testada realizando a adição de NaCl junto com todos os demais sais utilizados, e também adicionando este separadamente, seguido de agitação e posterior adição dos demais sais.

Um segundo planejamento fatorial foi realizado (deslocamento), a fim de identificar a possibilidade do uso de uma menor adição de água (1,0 e 5,0 mL) e NaCl (1,0 e 3,0 g), para obter melhores resultados de recuperação e menor consumo de reagentes. A Tabela 6 demonstra os experimentos gerados, de mesmo modo foi utilizado o teste de limpeza L6.

Tabela 6 - Condições dos testes realizados para a avaliação do planejamento fatorial em estrela, avaliação 2.

Teste	Água ultrapurificada (mL)	NaCl (g)	MgSO₄ (g)*
PF1*	1,0	1,0	1,5
PF2*	5,0	1,0	7,5
PF3*	1,0	3,0	1,5
PF4*	5,0	3,0	7,5
PF5*	3,0	2,0	4,5
(ponto central)	3,0	2,0	4,5
	3,0	2,0	4,5
PF6*	0,2	2,0	0,3
PF7*	3,0	3,4	4,5
PF8*	5,8	2,0	8,7
PF9*	3,0	0,6	4,5

* a quantidade de MgSO₄ foi ajustada em função da quantidade de água.

PF*: planejamento fatorial em estrela (avaliação 2).

2.10. Análise dos Reagentes e Solventes Utilizados

Foram avaliados os solventes e reagentes utilizados no preparo da amostra a fim de se observar a presença de contaminantes nos mesmos. Para tal, fez-se o procedimento normal de preparo da amostra, mas sem a adição da amostra de filé de peixe.

2.11. Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe

O método QuEChERS modificado para a determinação de disruptores endócrinos em filé de peixe foi validado avaliando os parâmetros de: seletividade, linearidade e curva analítica, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária, além da avaliação do efeito matriz.

2.11.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada fazendo injeções no sistema cromatográfico com a matriz “branco”, ou seja, ausente de disruptores endócrinos, e da amostra fortificada com os mesmos. A comparação dos cromatogramas obtidos foi realizada a fim de avaliar a ocorrência de coeluição entre as substâncias de interesse e os interferentes da matriz.

2.11.2. Linearidade e Curva Analítica

A linearidade das curvas analíticas foi realizada através da injeção das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 2.5, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram preparadas em solvente orgânico (acetonitrila) e no extrato da matriz de filé de peixe. As curvas analíticas preparadas no extrato da matriz foram injetadas 3 vezes, enquanto a curva em acetonitrila foi injetada somente uma vez no sistema cromatográfico. A partir disso, foram calculadas as médias das áreas de cada analito, em seguida foi obtida a regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2), a fim de obter a linearidade do método para cada disruptor endócrino.

2.11.3. LOD e LOQ

A determinação do limite de quantificação (LOQ) foi realizada adotando o menor ponto da curva analítica para cada analito, levando em consideração a relação sinal ruído (INMETRO, 2011). Desse modo, o limite de detecção (LOD) foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o LOQ. Como o método QuEChERS proposto não apresenta etapas de diluição ou pré-concentração os limites adotados são referentes ao instrumento e ao método de preparo de amostra, não havendo distinção dos valores.

2.11.4. Ensaio de Recuperação para Avaliação da Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através dos ensaios de recuperação, fortificando as amostras de filé de peixe “branco” em três níveis de concentração (10; 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), seguindo o método de extração otimizado. Foram realizadas 6 réplicas de extração para cada nível e a recuperação foi calculada de acordo com a equação 6, seguindo o guia de validação do INMETRO (2011).

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

2.11.5. Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), como mostra a equação 7.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - \bar{x}_m)^2/n-1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

\bar{X} = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão, em termos de repetitividade (RSD_r) foi avaliada realizando a extração e análise de seis réplicas de cada nível de concentração ($n=6$), sendo que cada réplica foi injetada uma única vez. A precisão intermediária (RSD_{pi}) foi avaliada fazendo a injeção da solução analítica de disruptores endócrinos (curva analítica) e das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo estas preparadas em dia diferente da avaliação da repetitividade, ou seja, realizando o procedimento analítico completo em dias diferentes.

2.11.6. Avaliação do Efeito Matriz

Para a avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas analíticas obtidas, preparadas em acetonitrila e aquelas preparadas no extrato “branco” da matriz, filé de peixe. O cálculo foi efetuado através da equação 8 (PIZZUTTI *et al.*, 2007).

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada disruptor endócrino, preparadas na matriz (filé de peixe);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada disruptor endócrino, preparadas em solvente (acetonitrila).

2.12. Aplicação do Método

O método desenvolvido foi aplicado a amostras compradas em supermercados de Santa Maria, sendo os peixes não somente da espécie *Rhamdia quelen*. Para os peixes de outros gêneros analisados foram realizadas três fortificações na amostra no nível intermediário de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, a fim de avaliar a

recuperação dos disruptores endócrinos nos diferentes gêneros. Desse modo, para cada peixe comprado foi realizada uma (1) análise e três (3) fortificações.

Foram analisadas 6 amostras, sendo 2 da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá), outras duas da espécie *Pterogymnus laniarius* (panga), uma de *Cyprinus carpio* (carpa húngara) e outra de *Oreochromis niloticus* (tilápia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Otimização do Sistema Cromatográfico GC-(TQ)MS/MS para a Determinação de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe

A Tabela 7 descreve as condições utilizadas no sistema GC-(TQ)MS/MS para a determinação dos disruptores endócrinos avaliados. O tempo total de análise foi de 35 min para a determinação de 40 disruptores endócrinos (exceto os hormônios), sendo que os últimos 10 min são para limpeza do sistema.

Tabela 7 - Condições utilizadas no sistema cromatográfico GC-(TQ)MS/MS.

Parâmetros	GC-(TQ)MS/MS
Coluna analítica	VF-5-MS
Tempo de <i>delay</i>	<i>Full scan</i> : 4 min MRM: 6 min
Gás de arraste e vazão	Hélio; 1 mL min ⁻¹
Programação de temperatura do injetor	100 °C (0,1 min) - 200 °C min ⁻¹ - 280 °C
Programação de temperatura do forno da coluna	50 °C (1 min) - 10 °C min ⁻¹ - 65 °C - 25 °C min ⁻¹ - 180 °C - 5 °C min ⁻¹ - 280 °C
Volume de injeção	2 µL (<i>splitless</i>)
Temperatura da linha de transferência	250 °C
Temperatura da fonte de ionização	210 °C
Gás de colisão e pressão	Argônio (2 mtorr)
Fonte de ionização	EI (70 eV)

A Tabela 8 apresenta todos os disruptores endócrinos analisados por GC-(TQ)MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e íons produtos para quantificação e confirmação de cada substância em estudo.

A Figura 7 apresenta o cromatograma de íons totais preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz de filé de peixe, já a Figura 8 apresenta o cromatograma no modo de aquisição MRM preparada no extrato da matriz de filé de peixe na concentração de 50 µg L⁻¹.

Tabela 8 - Disruptores endócrinos analisados por GC-(TQ)MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e produtos para a quantificação e confrimação.

Segmento	t_R (min)	Compostos	1ª Transição - quantificação			2ª Transição - confirmação		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
1	6,54	Triclorfon	185	93	15	185	109	20
	8,97	4-terc-octilfenol	135	77	31	135	107	31
2	9,37	Trifluralina	306	264	10	306	206	15
	9,37	Trifluralina d-14 (PS)	315	267	8	315	209	10
3	10,00	HCH - alfa	219	183	10	219	147	20
	10,09	Hexaclorobenzeno	284	214	35	284	249	30
	10,19	Dimetoato	125	79	10	125	125	10
	10,30	Simazina	201	138	15	201	173	15
	10,40	Atrazina	215	200	10	215	173	10
4	10,55	4-n-octilfenol	107	77	30	206	107	30
	10,55	HCH - beta	219	183	10	219	147	20
	10,60	Quintozeno (PI)	295	237	10	295	265	10
	10,68	Lindano	219	183	10	219	147	20
	10,75	Diazinona	304	179	10	304	162	10
5	11,36	HCH - delta	219	183	10	219	147	20
6	11,75	4-n-nonilfenol	220	107	20	107	77	30
	11,96	Clorpirifós metil	286	208	10	286	241	25
	12,05	Vinclozolina	212	145	20	212	172	15
	12,12	Parationa metílica	263	109	25	263	136	10
	12,12	Alacloro	188	160	10	188	130	40
7	12,38	Heptacloro	274	239	20	274	237	20

8	12,93	Malationa	173	99	15	173	127	10
9	13,15	Clorpirifós etílico	314	258	15	314	286	15
10	13,34	Aldrin	263	193	30	263	191	30
	13,39	Parationa etílica	291	81	25	291	109	20
11	13,67	Dicofol	139	111	10	139	75	25
14	14,48	Heptacloro-epóxido exo	353	263	15	353	282	15
	14,56	Hepacloro-epóxido endo	272	237	18	272	141	30
15	15,20	2,4-DDE	246	176	25	318	246	25
	15,53	Endosulfan Alfa	241	170	15	241	172	15
16	16,10	Bisfenol A	213	119	15	213	91	15
	16,17	4,4-DDE	246	176	25	318	246	25
	16,39	Dieldrin	277	206	15	277	241	10
	16,44	2,4-DDD	235	165	20	235	199	20
17	17,04	Endrin	263	193	30	263	191	30
	17,42	Endosulfan Beta	241	170	15	241	172	15
18	17,60	DDT I	235	165	20	235	199	20
19	18,62	Endosulfan sulfato	272	237	15	272	235	10
	18,75	DDT II	235	165	20	235	199	20
20	19,36	Trifenilfosfato (PI)	325	169	18	325	226	18
21	20,35	Bifentrina	181	165	20	181	166	10
22	22,27	Mirex	272	237	10	272	143	40
	22,58	Fenarimol	251	139	20	251	111	35
23	23,71	Permetrina cis	165	91	10	165	127	5
	23,97	Permetrina trans	165	91	10	165	127	5

PS: padrão de substituição

PI: padrão interno

t_R: tempo de retenção

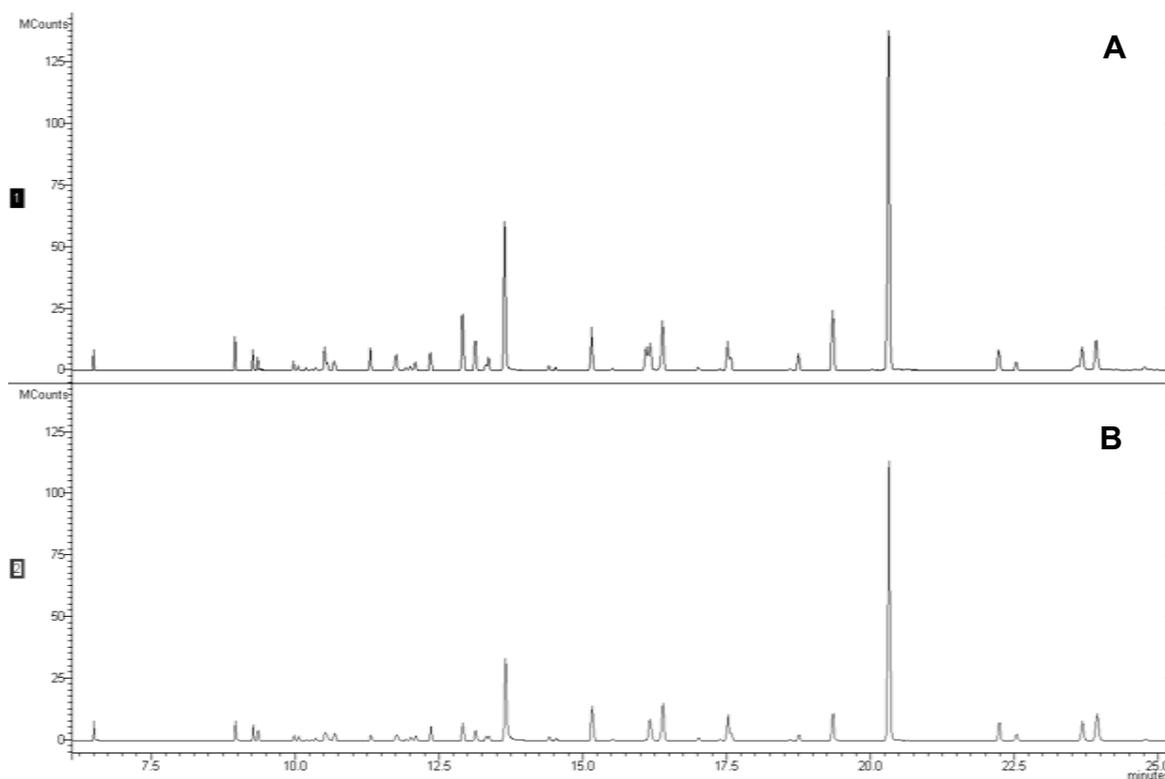


Figura 1 - Cromatogramas de íons totais obtidos por GC-(TQ)MS/MS, a partir de soluções preparadas no extrato da matriz de filé de peixe (A) e em acetonitrila (B), na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

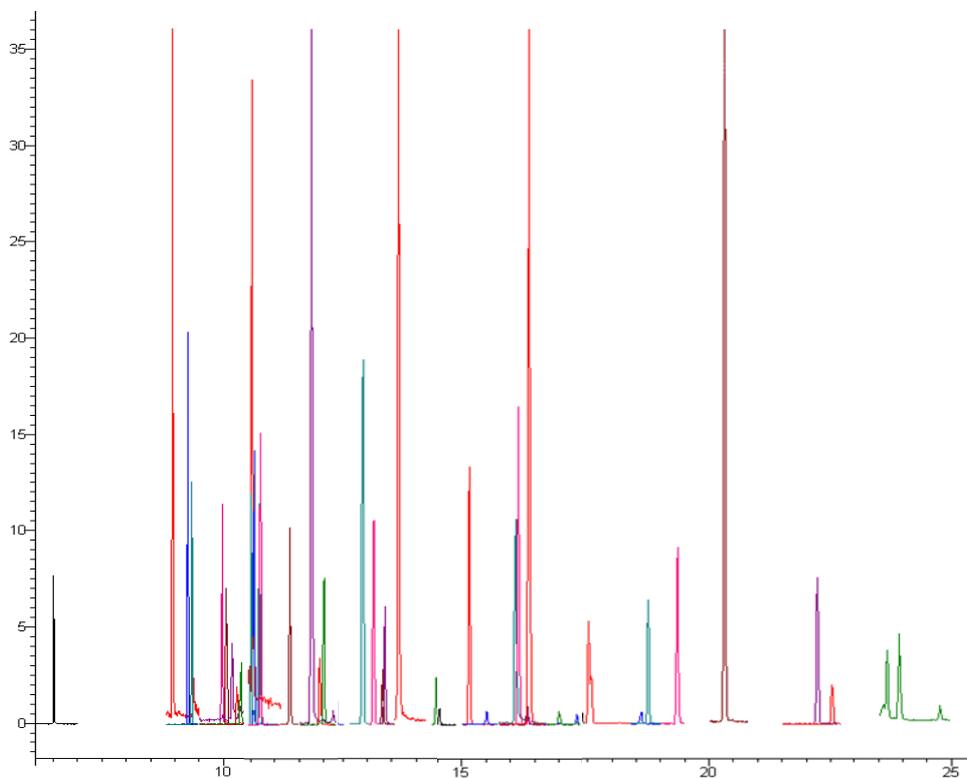


Figura 2 - Cromatograma no modo MRM obtido por GC-(TQ)MS/MS, a partir de solução preparada no extrato da matriz branco de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ressalta-se que foi proposto um método, separadamente, a fim de quantificar somente os hormônios que geram sinal por Cromatografia Gasosa. Isso foi realizado a fim de avaliar conjuntamente a otimização dos testes de extração (Tabela 9). Cabe salientar que a determinação desses compostos por Cromatografia Gasosa deve ser realizada fazendo-se a derivação dos mesmos para se obter um sinal cromatográfico adequado. Como não foi realizada essa etapa, mas mesmo assim sete hormônios apresentam sinal adequado na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, deu-se continuidade aos estudos.

Tabela 9 - Hormônios analisados por GC-(TQ)MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e produtos para quantificação e confirmação.

Segmento	t_R (min)	Compostos	1ª Transição - quantificação			2ª Transição - confirmação		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
1	18,54	Dietilestilbestrol	268	107	30	268	145	20
1	18,60	Hexestrol	135	107	20	135	91	30
2	22,90	Estrona	270	157	30	270	144	30
2	23,00	17 α -estradiol	272	157	30	272	127	30
2	23,20	17 β -estradiol	272	157	30	272	127	30
2	23,30	Mestranol	227	127	30	227	181	20
3	24,10	17 α -etinilestradiol	213	157	30	213	107	20

t_R : tempo de retenção

3.2. Otimização do Método QuEChERS para a Extração de Disruptores Endócrinos em Filé de Peixe

A otimização do procedimento de extração foi realizada no sistema GC-(TQ)MS/MS. Baseando-se na literatura foram inicialmente realizados sete testes para a extração de disruptores endócrinos em filé de peixe. Desse modo, a Figura 9 apresenta os resultados de recuperação para os compostos avaliados em cada teste, sendo que esses foram realizados fortificando a matriz na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para todos os testes de extração foi utilizado a etapa de limpeza otimizada, de acordo com o item 3.3.

Ressalta-se que os hormônios estão incluídos em todos os resultados apresentados nessa sessão. A fim de melhorar a compreensão, nos resultados para DEs foram excluídos os hormônios.

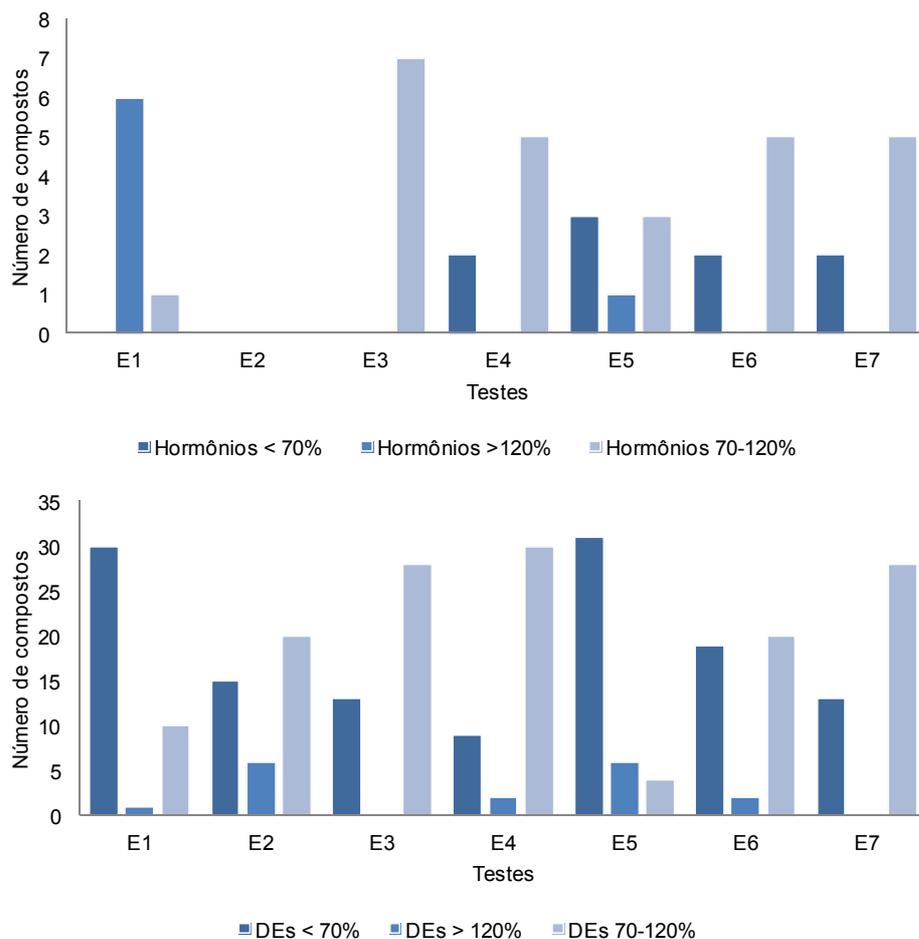


Figura 3 - Percentual de recuperação de disruptores endócrinos avaliados em sete testes de extração.

Observou-se que os testes E3, E4 e E7 apresentaram os melhores resultados, sendo que E4 mesmo apresentando alguns compostos com recuperação acima de 120% mostrou-se adequado para um número maior de compostos. E3 e E7 não apresentaram nenhum composto com recuperação acima de 120%, porém, em comparação com E4, apresentaram um número ligeiramente menor de compostos dentro da faixa ideal, entre 70 e 120%.

O uso de acetonitrila como solvente de extração é interessante visto que proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, além disso, uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da matriz, tais como ceras, gorduras e pigmentos são extraídos (PRESTES *et al.*, 2009).

A água pode ser adicionada a fim de proporcionar uma melhor interação entre a amostra e o solvente extrator, no caso a acetonitrila. Destaca-se que o método QuEChERS foi desenvolvido inicialmente para matriz com teor de água bastante elevado (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Os testes E1, E5, E6 resultaram em recuperações inadequadas dos compostos em estudo, podendo ser atribuída a utilização de acetonitrila não acidificada. O que pode ser confirmado comparando-se o teste E6 ao E7, para o qual foram obtidas melhores recuperações, com a diferença que em E7 foi acidificado o solvente de extração. O controle do pH é importante para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido. Desse modo, o tamponamento dos extratos entre pH 4 e 5 com ácido acético (pKa=4,75) e acetato de sódio tem sido adotado em trabalhos que empregam QuEChERS como procedimento de preparo de amostra (PRESTES *et al.*, 2009).

A diferença na quantidade de NaCl foi importante quando comparou-se os testes E2, que resultou em recuperação insatisfatória, com relação ao E3. Com isso, pode-se dizer que a quantidade de 1,0 g de NaCl (E2) não foi suficiente para proporcionar o efeito *salting out* para a quantidade de 10 mL de água, já 3 g (E3) proporcionou um efeito satisfatório, para essa mesma quantidade de água adicionada. O efeito *salting out* é importante, uma vez que diminui a solubilidade de analitos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice versa (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

A adição de $MgSO_4$ em todos os testes devido a sua ação secante, o qual tem uma capacidade de retenção de água bastante elevada, quando comparado com outros sais, a fim de proporcionar uma melhor etapa de partição. Além disso, sua hidratação é uma ação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, principalmente de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Como observa-se extrações com valores de recuperação adequados em três procedimentos distintos, deve-se avaliar com maior profundidade, a fim de identificar um procedimento ótimo. Para tanto, fez-se necessário a realização do planejamento fatorial em estrela, o qual está discutido em 3.4.

3.3. Otimização da Etapa de Limpeza do Método QuEChERS

A etapa de limpeza é de grande importância, pois visa a remoção de interferentes no extrato da matriz obtido. Nessa etapa deve-se optar pelo procedimento que, ao mesmo tempo, remova as interferências do extrato, mas não interfira na recuperação dos compostos em análise. Como já descrito no item 2.8, diferentes sorventes e combinações foram testadas a fim de garantir a limpeza do extrato sem perda da eficiência da extração. Para tanto, observa-se na Figura 10 um sinal bastante intenso em aproximadamente 29,7 min, cujo espectro de massas, quando comparado com a biblioteca, corresponde ao colesterol. O colesterol é encontrado em peixes em quantidades bastante variáveis, de acordo com a literatura de 31 a 270 mg/100 g de filé de peixe (TACO, 2006). Isso evidencia a necessidade de remoção adequada desse composto, pois se o mesmo permanecer no extrato, a injeção contínua pode acarretar em maior manutenção do instrumento. O uso exclusivo de PSA ou florisil, bem com a combinação desses dois sorventes, ou ainda o uso de $CaCl_2$ (combinado com PSA e criogenia, ou mesmo sem criogenia) ou a realização de uma etapa de criogenia juntamente com PSA não foram eficientes para a remoção do colesterol, sendo necessária a adição de C18 para que o mesmo pudesse ser removido adequadamente, como visto na Figura 11. Concluindo assim que, os testes L1, L2, L3, L4, L8 e L10 não são adequados para serem utilizados como etapa de limpeza na extração de filé de peixe.

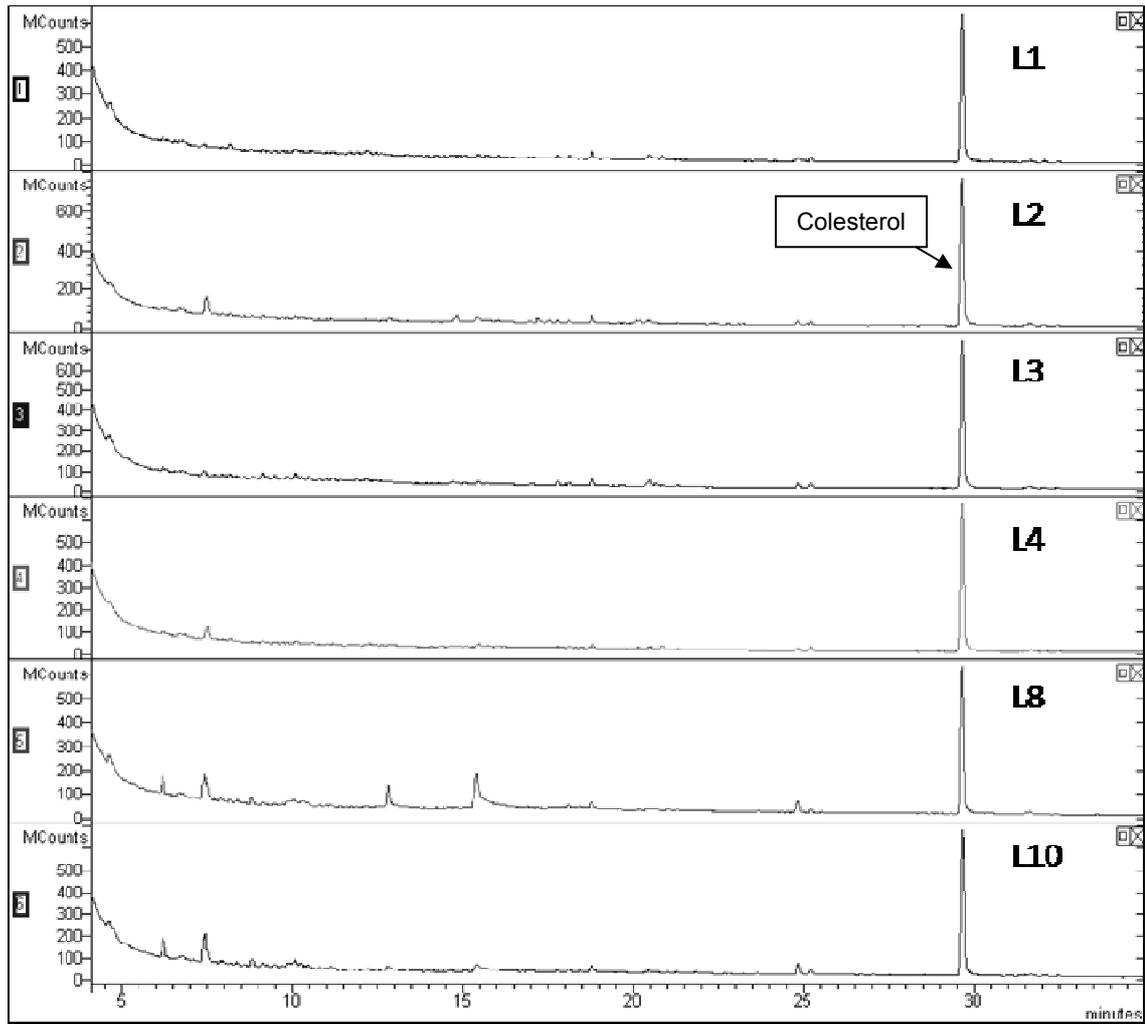


Figura 4 - Cromatogramas obtidos no sistema GC-(TQ)MS/MS no modo *full scan* para as etapas de limpeza L1, L2, L3, L4, L8 e L10.

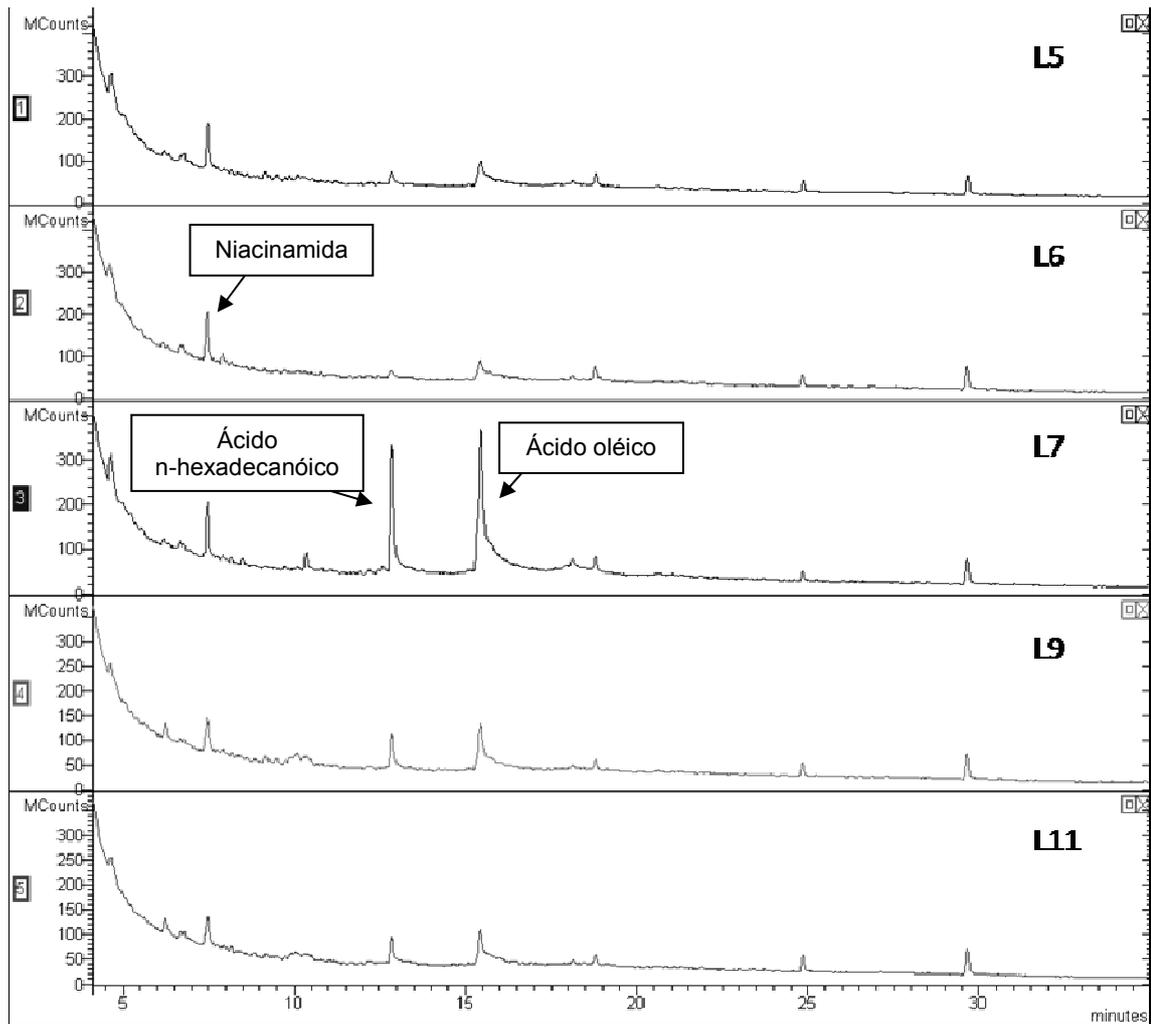


Figura 5 - Cromatogramas obtidos no sistema GC-(TQ)MS/MS no modo *full scan* para as etapas de limpeza L5, L6, L7, L9 e L11.

Na Figura 11 observa-se uma redução bastante intensa do sinal referente ao colesterol (quando comparado aos demais), demonstrando assim a importância da adição do sorvente C18 nessa etapa. Fica claro que, a ausência de PSA intensifica os sinais em 12,9 e 15,5 min, que quando comparados com a biblioteca seus espectros correspondem aos ácidos n-hexadecanóico e oléico, respectivamente, como visto em L7 e L9. L11 tem a adição de PSA, mas o seu sinal comparado com os obtidos em L5 ou L6 não é satisfatório, além disso, em L11 há uma combinação de três diferentes sorventes além do sal de $MgSO_4$, o que não é ideal do ponto de vista do consumo de reagentes. Além disso, para essa quantidade de sorventes e sais seria necessário otimizar uma maior quantidade de extrato a ser adicionado, visto que o sobrenadante resultante obtido no final da etapa de centrifugação foi bastante reduzido. Tem-se que os melhores cromatogramas obtidos foram com L5 e

L6, visto que ambos continham C18 e PSA nas mesmas quantidades, mas pequena diferença na quantidade de $MgSO_4$. A partir desses resultados adotou-se o procedimento de limpeza L6 para o método QuEChERS proposto.

No t_R de 7,5 min o espectro gerado pela biblioteca, corresponde a niacinamida a qual é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao grupo das vitaminas do complexo B sendo amplamente distribuída nos alimentos de origem animal e vegetal (MARIA; MOREIRA, 2011). O sinal correspondente a essa vitamina foi removido com eficiência somente utilizando criogenia ou $CaCl_2$, mas levando em consideração a intensidade dos demais compostos, aceitou-se como satisfatório o perfil encontrado em L6.

A fim de avaliar se havia perdas na etapa de limpeza, fez-se uma comparação entre uma fortificação realizada na matriz passando pela etapa de extração e seguida da etapa de limpeza (L6), e outra fortificando somente o extrato branco para a etapa de limpeza. Não foi observada perda na etapa de limpeza, assegurando, assim, que a etapa crítica para a recuperação dos analitos de interesse é a etapa de extração e não a de limpeza.

3.4. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial em estrela foi primeiramente realizado utilizando quantidades mais elevadas de água (10,0 e 20,0 mL) e NaCl (3,0 e 6,0 g) na etapa de extração do filé de peixe (avaliação 1). Os resultados das fortificações realizadas pelo conjunto de ensaios gerados estão representados na Figura 12.

Em todos os resultados do planejamento fatorial estão inclusos os resultados obtidos para os hormônios.

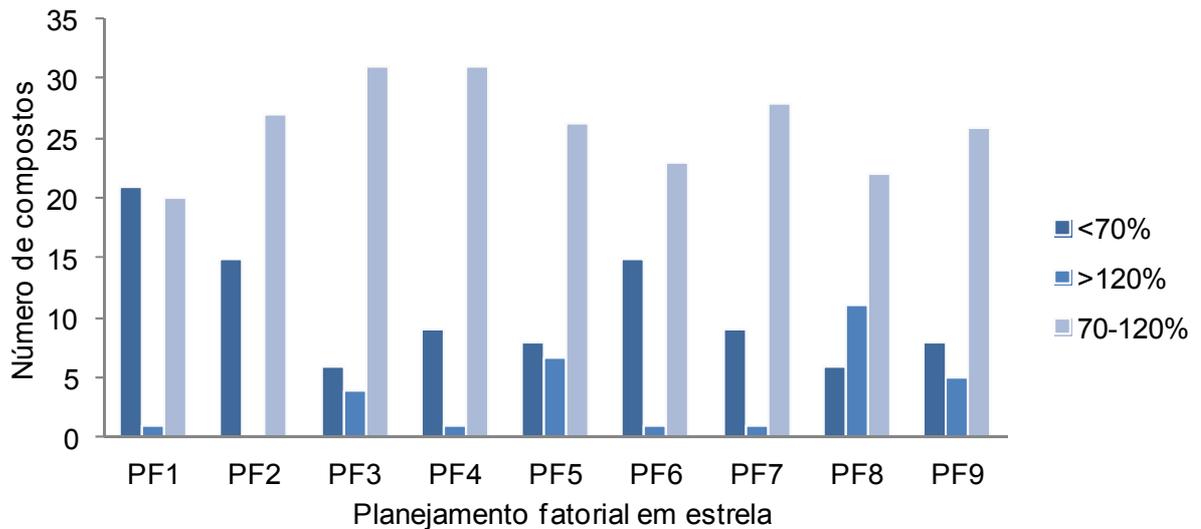


Figura 6 - Percentual de recuperação do conjunto de ensaios gerados através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 1), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

As superfícies de resposta foram montadas utilizando a média das recuperações de todos os compostos em cada teste e o número total de compostos com recuperação adequada, ou seja, entre 70 e 120%, como visto na Figura 13.

A superfície de resposta obtida demonstra que a média das recuperações e o número total de compostos melhora conforme as quantidades de água e NaCl se aproximam de 15 mL e 6,0 g, respectivamente. Desse modo, adotou-se, como sendo a condição ótima para a extração de disruptores endócrinos em filé de peixe a adição de 15 mL de água e 6,0 g de NaCl.

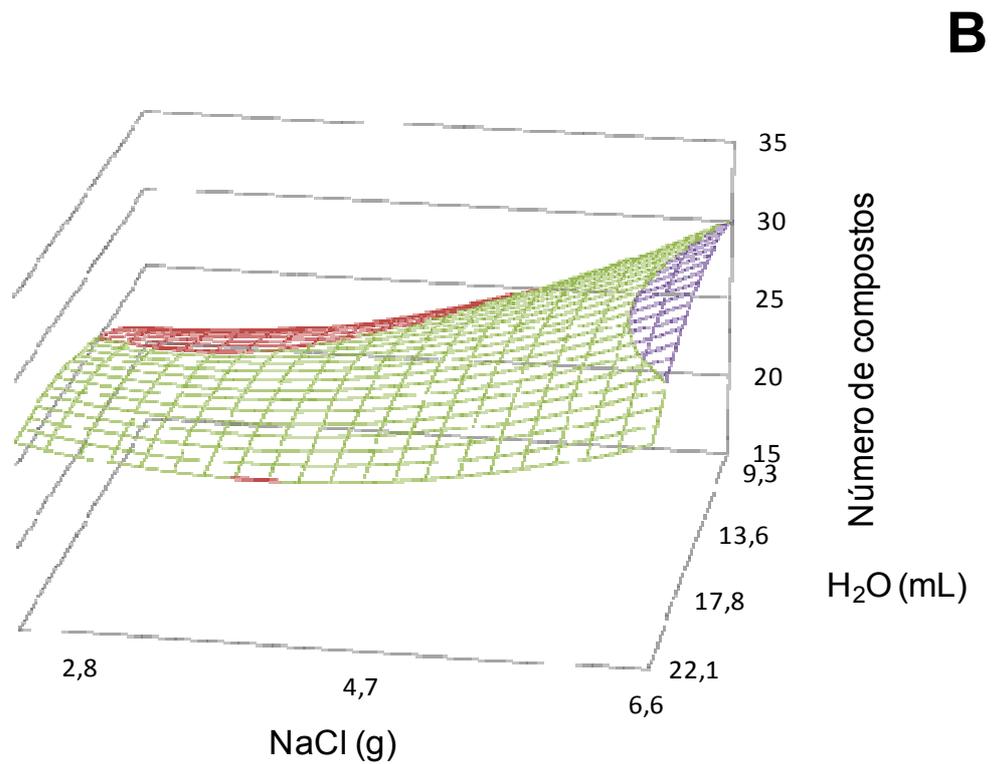
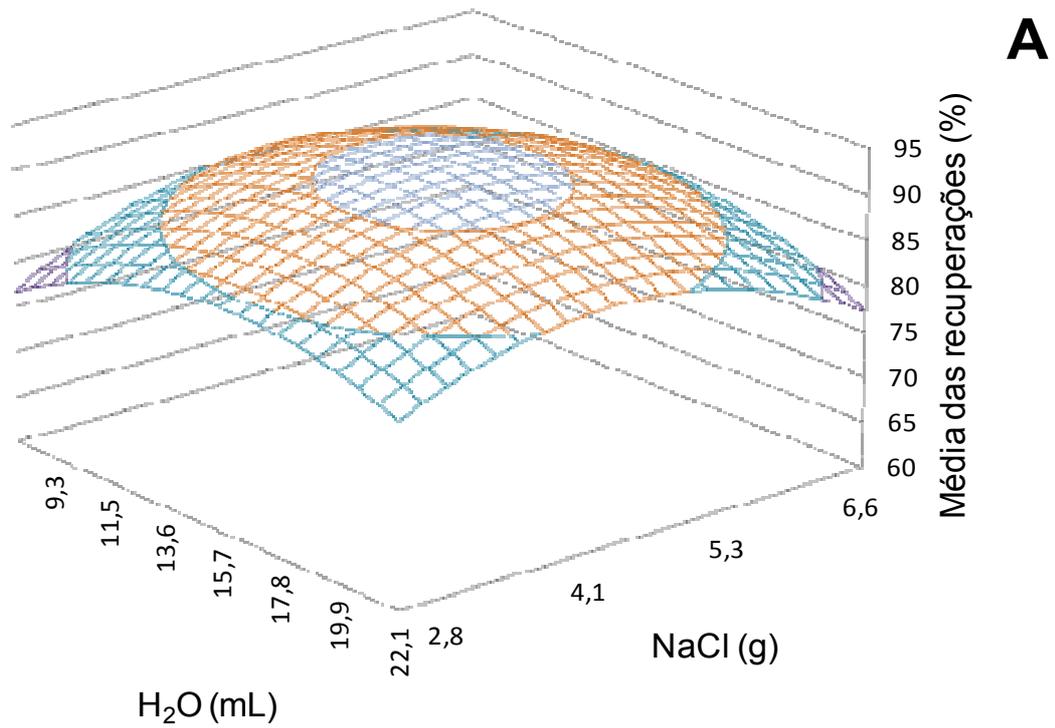


Figura 7 - Superfícies de resposta geradas através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 1) utilizando a média das recuperações (A) e o número de compostos avaliados (B).

Para comprovar essa eficácia na extração, um teste foi realizado fortificando o filé de peixe em uma concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e, além disso, realizou-se a otimização da adição desse sal. Testou-se a adição de NaCl separadamente dos demais sais, para verificar se o mesmo adicionado separadamente e seguido de agitação resultaria em um efeito *salting out* mais pronunciado, os resultados estão representados na Figura 14.

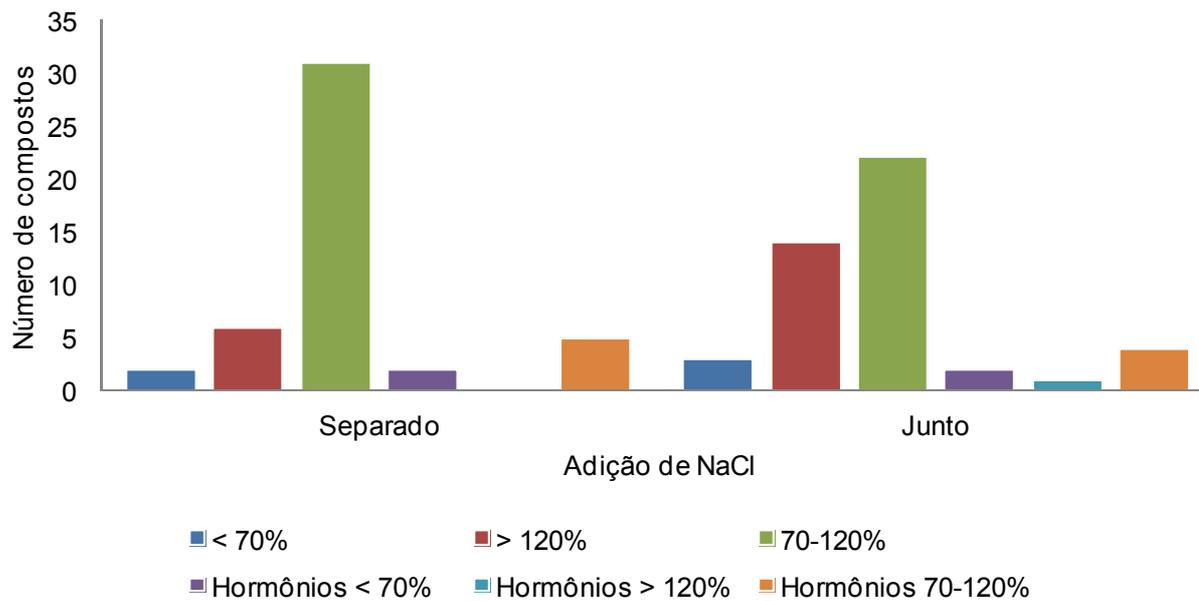


Figura 8 - Percentual de recuperação para os compostos em estudo, variando a adição de NaCl (separadamente e junto com os demais sais), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Analisando os resultados obtidos observar-se uma diferença nos percentuais de recuperação entre os dois testes variando a adição de NaCl. Os resultados obtidos foram melhores adicionando o sal separadamente dos demais sais de extração.

Realizando-se uma avaliação mais criteriosa, observa-se que para alguns compostos esse método proposto pelo planejamento fatorial em estrela não seria o ideal. Os hormônios, dietilestilbestrol (DES) e hexestrol apresentaram valores de recuperação entre 40,7 e 44,8%, independentemente do modo de adição de NaCl. Desse modo, construiu-se a superfície de resposta somente para esses dois compostos, como mostra a Figura 15, na qual observa-se que o ponto ótimo seria o oposto, ou seja, uma menor quantidade de água e NaCl.

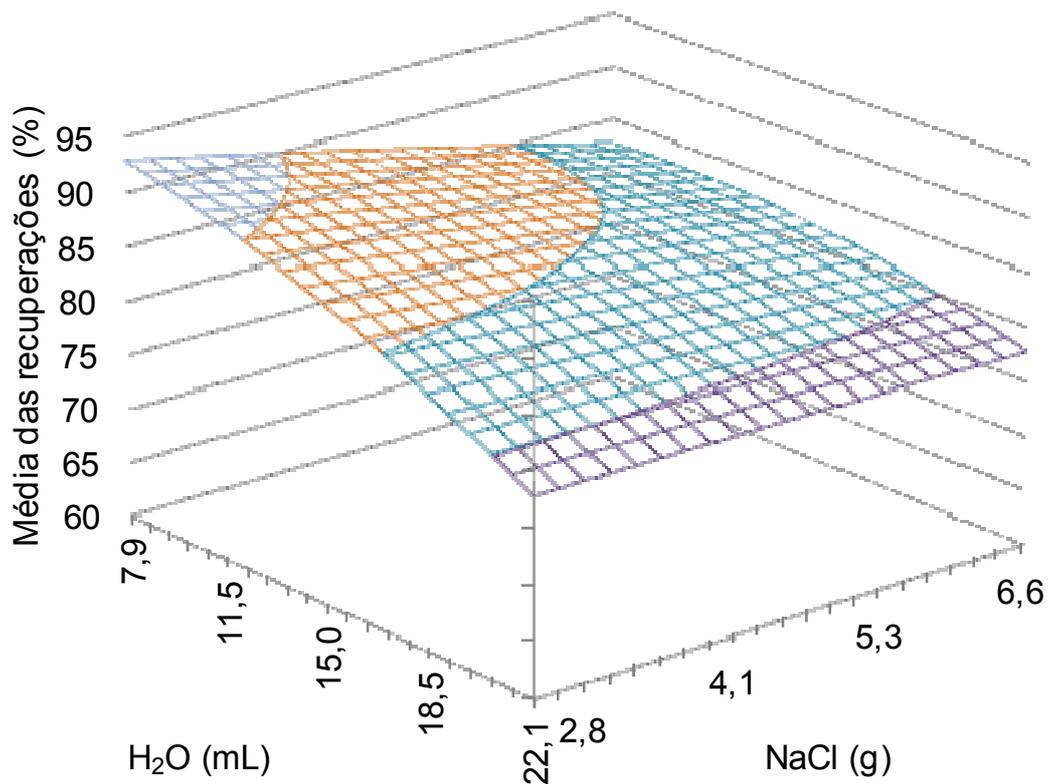


Figura 9 - Superfície de resposta dos hormônios dietilestilbestrol (DES) e hexestrol, a partir da recuperação média desses compostos.

As estruturas químicas desses hormônios (DES e hexestrol), os quais são hormônios não-esteróides, são bastante diferentes das estruturas esteróides dos demais hormônios, justificando a baixa recuperação em relação aos demais. Além disso, ambos têm valor de $\log K_{ow} = 5,1$, conferindo uma maior probabilidade de se aderir na matéria orgânica, no caso o tecido adiposo do filé de peixe.

Com base nesses resultados, decidiu-se realizar uma segunda avaliação, com um segundo planejamento fatorial em estrela, utilizando os mesmos fatores, mas em proporções reduzidas. Utilizou-se quantidades menores de água (1,0 e 5,0 mL) e NaCl (1,0 e 3,0 g) na etapa de extração do filé de peixe (avaliação 2). Os resultados das fortificações realizadas dos ensaios estão representados na Figura 16.

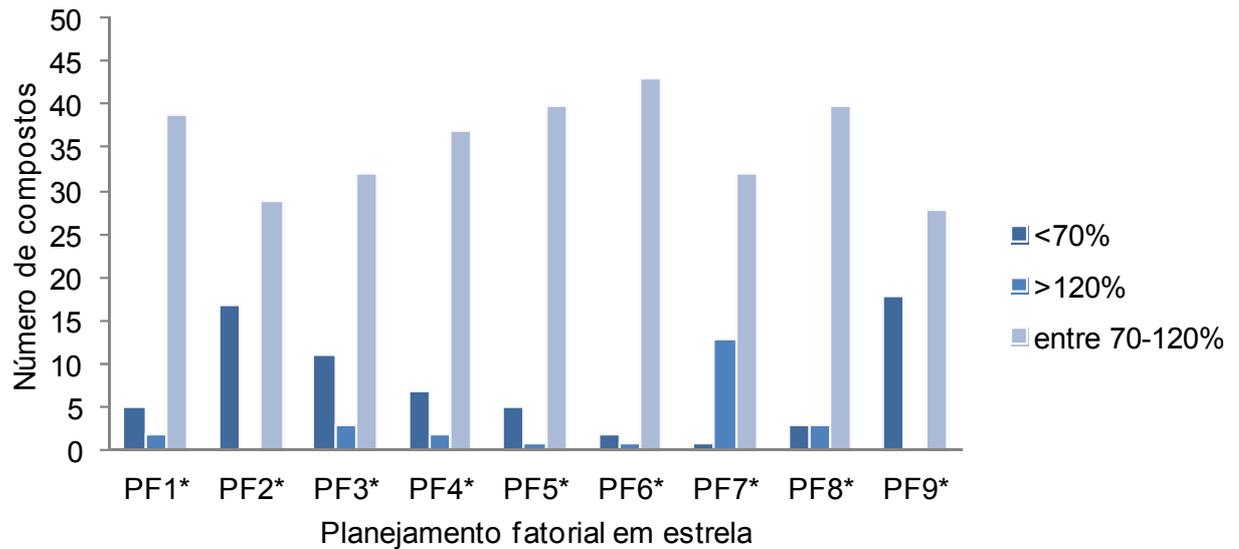


Figura 10 - Percentual de recuperação do conjunto de ensaios gerados através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 2), na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

As superfícies de resposta foram montadas utilizando a média das recuperações de todos os compostos em cada teste e o número total de compostos com recuperação adequada, ou seja, entre 70 e 120%, como visto na Figura 17.

Observando-se a Figura 16 evidencia-se que o PF6* resultou em melhor recuperação, entre 70 e 120%, para um número maior de compostos. Quando gerada a superfície de resposta para o planejamento fatorial em estrela (Figura 17) nota-se que a média das recuperações e o número de compostos melhoram de acordo com a diminuição da quantidade de água adicionada (0,2 mL), tendendo a zero. Em relação a quantidade de NaCl o ótimo é observado com o uso de 2,0 g do sal. Esse resultado, melhora inclusive os resultados para os dois hormônios citados anteriormente, que quando utilizando as condições geradas na avaliação 1 do planejamento fatorial em estrela não foram adequados. Assume-se, portanto, que a adição de água no procedimento para extração de disruptores endócrinos em filé de peixe é desnecessária, mas a adição de 2,0 g de NaCl é de suma importância.

O uso de NaCl influencia na recuperação, principalmente, de compostos polares, ou ainda pode fazer com que coextrativos mais polares possam ser extraídos. Além disso, o uso desse sal pode influenciar no aumento do sinal e formato do pico cromatográfico, devido a coextração de analitos protetores. Analitos protetores são agentes mascarantes, os quais podem melhorar a eficiência de introdução do analito para a coluna. A quantidade de sal a ser utilizada deve ser otimizada, pois se for muito elevada pode acarretar na extração excessiva de

coextrativos polares, diminuindo a recuperação dos analitos de interesse (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

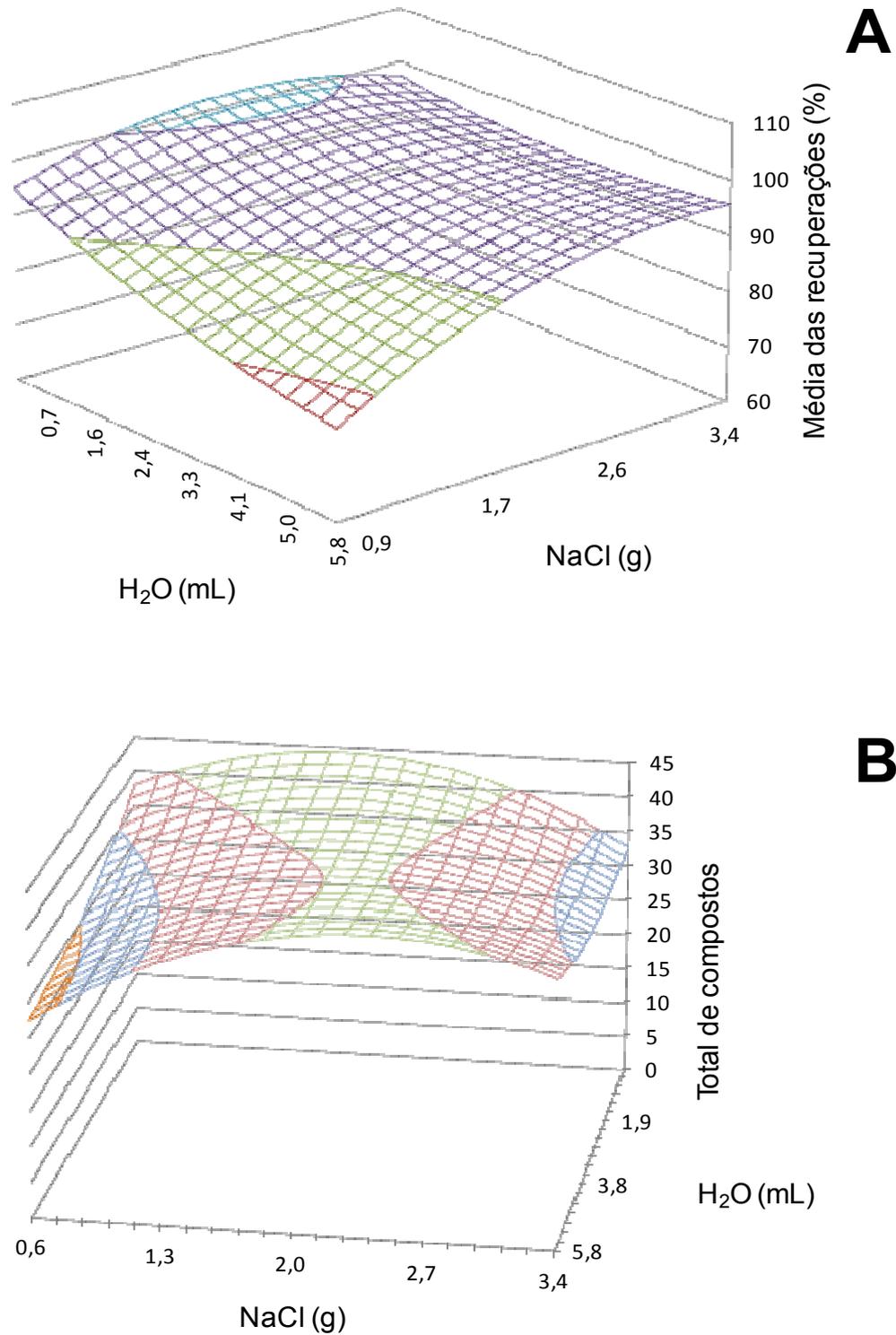


Figura 11 - Superfícies de resposta geradas através do planejamento fatorial em estrela (avaliação 2) utilizando a média das recuperações (A) e o número de compostos avaliados (B).

A Figura 18 refere-se ao método QuEChERS modificado otimizado utilizando o planejamento fatorial, ressalta-se que a etapa de adição de água foi excluída. A eliminação dessa etapa foi realizada com base nas superfícies de resposta geradas, visto que a menor quantidade de água testada foi a qual resultou em melhores recuperações e um maior número de disruptores endócrinos extraídos. Portanto esse procedimento foi utilizado para a realização da validação, na qual foram excluídos os hormônios, visto que os mesmos serão avaliados em um trabalho futuro utilizando Cromatografia Líquida.

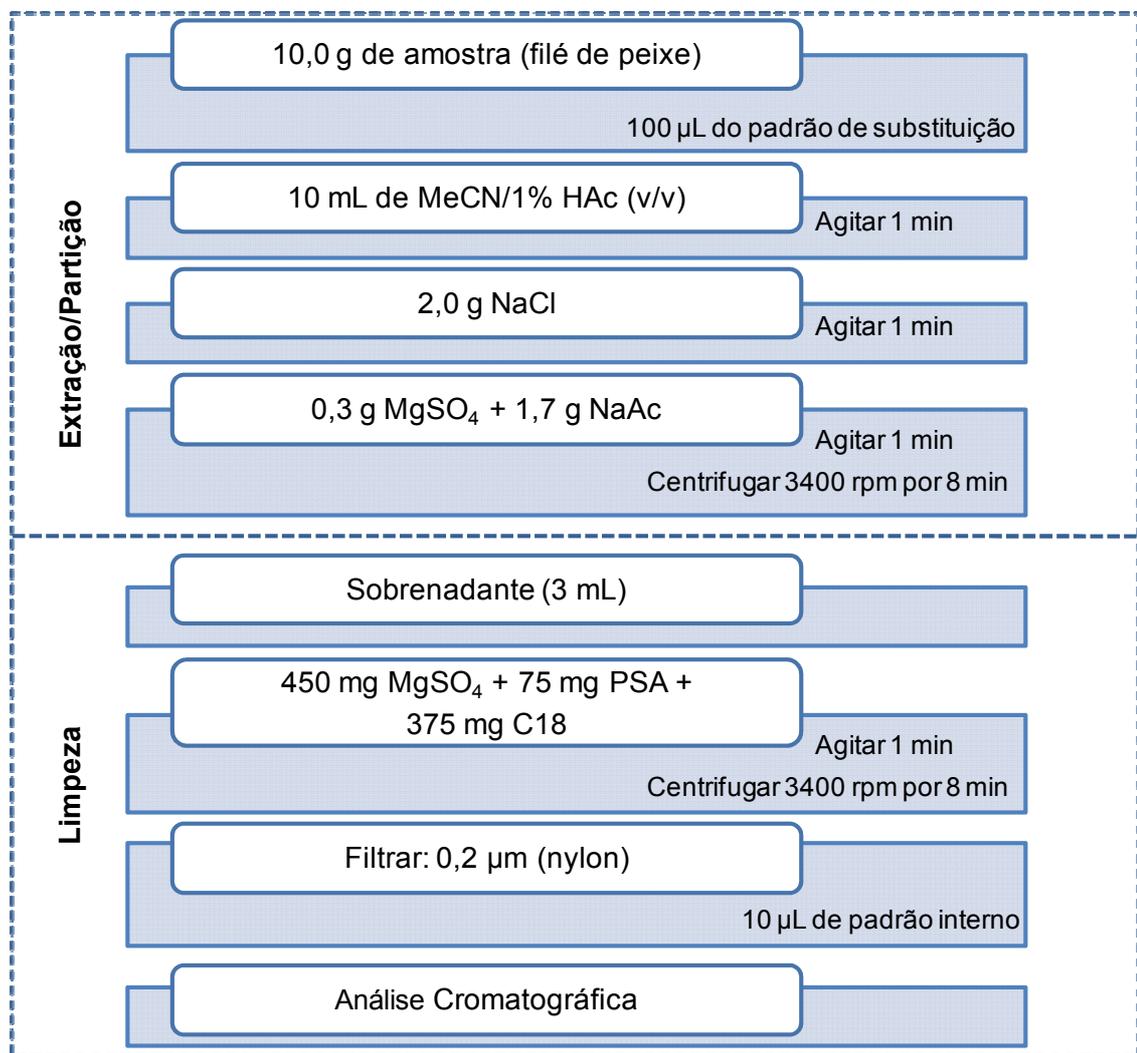


Figura 12 - Procedimento de extração otimizado utilizando o método QuEChERS modificado.

3.5. Validação do Método QuEChERS Modificado Otimizado

A validação do método QuEChERS foi realizada utilizando GC-(TQ)MS/MS, seguindo o procedimento descrito em Figura 18, na qual foram avaliados os disruptores endócrinos relacionados na Tabela 2, excluindo os hormônios. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato de filé de peixe, sendo assim, possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ, da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), e demais parâmetros descritos a seguir.

3.5.1. Seletividade e Análise de Solventes e Reagentes

A seletividade do método foi assegurada, uma vez que não há interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada disruptor endócrino com os mesmo íons de quantificação e confirmação na matriz de filé de peixe, conforme Figura 19.

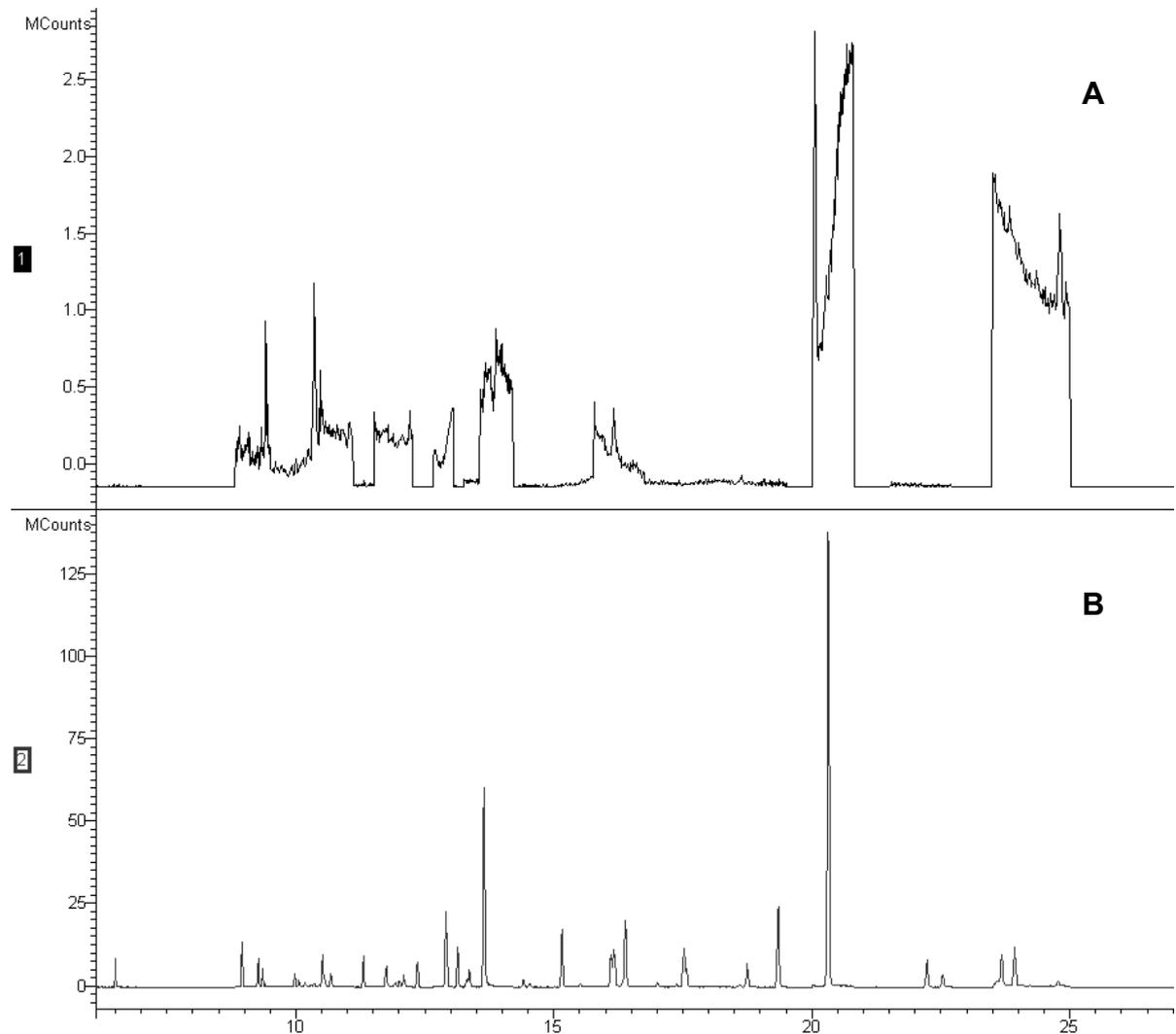


Figura 13 - Cromatograma obtido a partir do extrato "branco" de filé de peixe no modo TIC (A), comparado com o padrão da matriz de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B).

A avaliação dos solventes e reagentes utilizados nas análises de filé de peixe foi averiguada, e como visto na Figura 20, não foi observada a presença de interferentes.

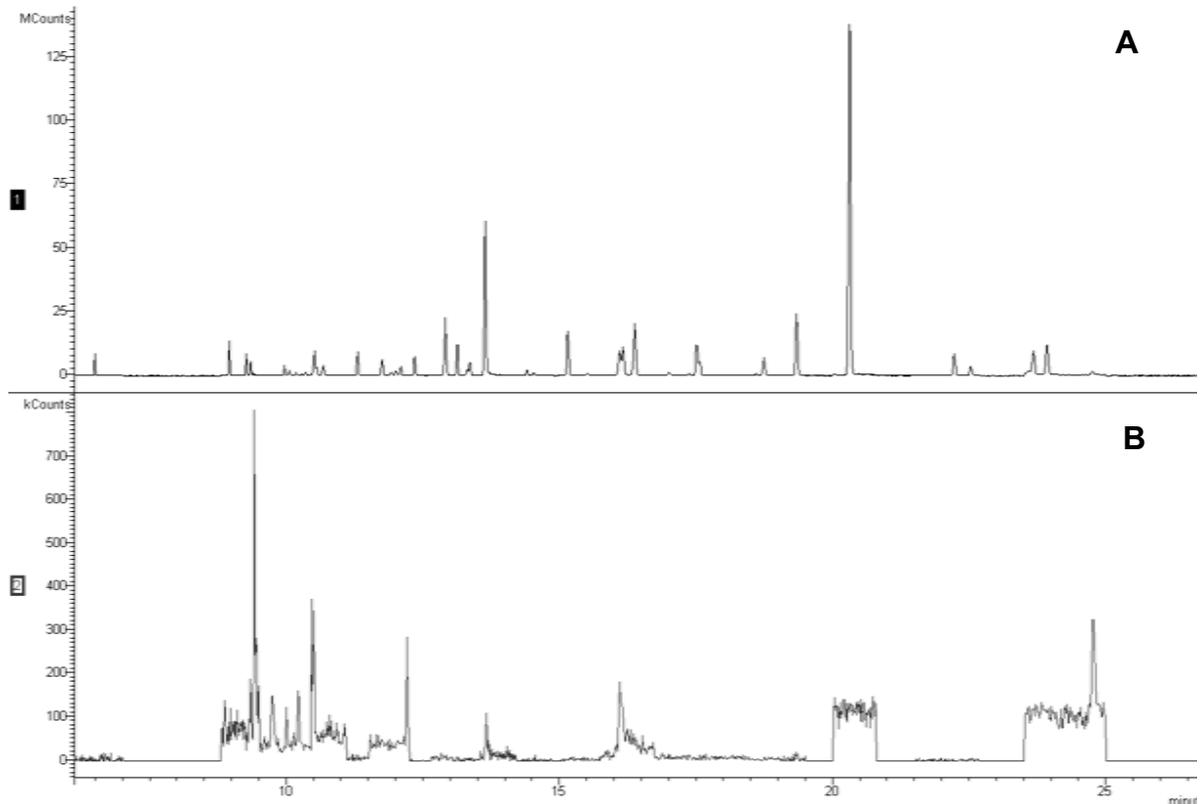


Figura 14 - Cromatograma obtido para a avaliação dos solventes e reagentes utilizados nas análises de filé de peixe, no modo TIC (B), comparado com o padrão na matriz de filé de peixe na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A).

3.5.2. Curva Analítica e Linearidade

As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores dos coeficientes de determinação (r^2), inclinação (a) e intercepção (b) para as equações das curvas analíticas de cada disruptor endócrino, bem como a faixa linear, em solvente orgânico (acetonitrila) e no extrato da matriz de filé de peixe.

Tabela 10 - Valores dos coeficientes de determinação (r^2), inclinação (a) e intercepção (b) para as curvas analíticas de disruptores endócrinos em acetoneitrila.

Disruptor Endócrino	r^2	Inclinação (a)	Intercepção (b)
Triclorfon	0,9963	$1,51 \times 10^5$	$-5,90 \times 10^5$
4-terc-octilfenol	0,9993	$4,89 \times 10^5$	$-2,21 \times 10^5$
Trifluralina d-14 (PS)	0,9979	$4,06 \times 10^5$	$-4,30 \times 10^5$
Trifluralina	0,9978	$2,75 \times 10^5$	$-6,64 \times 10^5$
Alfa-HCH	0,9976	$2,36 \times 10^5$	$-5,59 \times 10^5$
Hexaclorobenzeno	0,9966	$1,87 \times 10^5$	$-2,44 \times 10^5$
Dimetoato	0,9677	$2,83 \times 10^4$	$-1,74 \times 10^5$
Simazina	0,9925	$5,28 \times 10^4$	$-2,96 \times 10^5$
Atrazina	0,9988	$1,02 \times 10^5$	$-2,80 \times 10^5$
4-n-octilfenol	0,9982	$2,03 \times 10^5$	$-3,57 \times 10^5$
Beta-HCH	0,9917	$2,22 \times 10^5$	$-1,32 \times 10^5$
Lindano	0,9952	$1,89 \times 10^5$	$-7,75 \times 10^5$
Diazinona	0,9972	$2,13 \times 10^5$	$-4,16 \times 10^5$
Delta-HCH	0,9948	$6,75 \times 10^4$	$-3,90 \times 10^5$
4-n-nonilfenol	0,9836	$3,46 \times 10^5$	$-4,92 \times 10^5$
Clorpirifós metílico	0,9911	$3,65 \times 10^4$	$-1,85 \times 10^5$
Vinclozolina	0,9958	$1,52 \times 10^5$	$-3,72 \times 10^5$
Alacloro	0,9945	$2,96 \times 10^5$	$-1,06 \times 10^6$
Parationa metílica	0,9654	$5,13 \times 10^4$	$-4,14 \times 10^5$
Heptacloro	0,9939	$1,62 \times 10^5$	$-7,24 \times 10^5$
Malationa	0,9925	$2,36 \times 10^5$	$-7,86 \times 10^5$
Clorpirifós etílico	0,9966	$1,57 \times 10^5$	$-4,79 \times 10^5$
Aldrin	0,9967	$1,09 \times 10^5$	$-3,02 \times 10^5$
Parationa etílica	0,9915	$9,39 \times 10^4$	$-4,00 \times 10^5$
Dicofol	0,9934	$1,04 \times 10^6$	$-3,96 \times 10^6$
Heptacloro epóxido exo	0,9970	$8,21 \times 10^4$	$-1,19 \times 10^5$
Heptacloro epóxido endo	0,9964	$7,41 \times 10^4$	$-2,39 \times 10^5$
2,4-DDE	0,9957	$1,13 \times 10^6$	$-3,38 \times 10^6$
Endossulfan-alfa	0,9950	$5,86 \times 10^4$	$-1,91 \times 10^5$
Bisfenol A	0,9465	$4,13 \times 10^4$	$1,89 \times 10^4$
4,4-DDE	0,9966	$1,71 \times 10^6$	$-4,74 \times 10^6$
Dieldrin	0,9934	$9,22 \times 10^4$	$-1,32 \times 10^5$
2,4-DDD	0,9969	$3,24 \times 10^6$	$-8,32 \times 10^6$
Endrin	0,9928	$6,41 \times 10^4$	$-2,99 \times 10^5$
Endossulfan-beta	0,9933	$3,52 \times 10^4$	$7,81 \times 10^4$
Endossulfan sulfato	0,9909	$2,81 \times 10^4$	$-1,59 \times 10^5$
DDT	0,9844	$2,73 \times 10^5$	$-1,97 \times 10^6$
Bifentrina	0,9919	$2,83 \times 10^6$	$-7,60 \times 10^6$
Mirex	0,9969	$7,30 \times 10^5$	$-2,16 \times 10^6$
Fenarimol	0,9906	$1,41 \times 10^5$	$-4,85 \times 10^5$
Permetrina cis/trans	0,9945	$7,20 \times 10^5$	$-1,56 \times 10^6$

Tabela 11 - Valores dos coeficientes de determinação (r^2), inclinação (a) e intercepção (b) para as curvas analíticas de disruptores endócrinos e faixa linear para cada analito no extrato de filé de peixe.

Disruptor Endócrino	r^2	Inclinação (a)	Intercepção (b)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Triclorfon	0,9977	$1,43 \times 10^5$	$-6,76 \times 10^4$	1 - 200
4-terc-octilfenol	0,9995	$8,79 \times 10^5$	$4,84 \times 10^5$	5 - 200
Trifluralina d-14 (PS)	0,9993	$5,35 \times 10^5$	$-3,60 \times 10^5$	1 - 200
Trifluralina	0,9990	$3,43 \times 10^5$	$-3,88 \times 10^5$	1 - 200
Alfa-HCH	0,9982	$3,31 \times 10^5$	$5,69 \times 10^5$	1 - 200
Hexaclorobenzeno	0,9991	$2,38 \times 10^5$	$8,84 \times 10^5$	1 - 200
Dimetoato	0,9981	$1,63 \times 10^5$	$3,52 \times 10^5$	25 - 200
Simazina	0,9991	$7,78 \times 10^4$	$4,42 \times 10^3$	5 - 200
Atrazina	0,9997	$1,32 \times 10^5$	$-1,72 \times 10^5$	5 - 200
4-n-octilfenol	0,9990	$2,30 \times 10^5$	$2,31 \times 10^5$	5 - 200
Beta-HCH	0,9994	$6,12 \times 10^5$	$-1,13 \times 10^5$	5 - 200
Lindano	0,9988	$2,54 \times 10^5$	$-1,85 \times 10^5$	5 - 200
Diazinona	0,9997	$2,86 \times 10^5$	$-1,87 \times 10^5$	1 - 200
Delta-HCH	0,9990	$2,15 \times 10^5$	$-3,20 \times 10^5$	1 - 200
4-n-nonilfenol	0,9993	$9,85 \times 10^5$	$-9,30 \times 10^5$	1 - 200
Clorpirifós metílico	0,9988	$8,88 \times 10^4$	$-1,73 \times 10^5$	1 - 200
Vinclozolina	0,9990	$2,14 \times 10^5$	$-3,66 \times 10^5$	1 - 200
Alacloro	0,9984	$3,92 \times 10^5$	$-8,51 \times 10^5$	1 - 200
Parationa metílica	0,9996	$1,70 \times 10^5$	$-4,08 \times 10^5$	5 - 200
Heptacloro	0,9985	$2,08 \times 10^5$	$-3,47 \times 10^5$	1 - 200
Malationa	0,9994	$9,01 \times 10^5$	$-6,37 \times 10^5$	1 - 200
Clorpirifós etílico	0,9985	$2,91 \times 10^5$	$1,01 \times 10^7$	1 - 200
Aldrin	0,9982	$1,40 \times 10^5$	$-2,23 \times 10^5$	5 - 200
Parationa etílica	0,9986	$2,95 \times 10^5$	$-6,18 \times 10^5$	5 - 200
Dicofol	0,9997	$1,78 \times 10^6$	$-2,07 \times 10^6$	1 - 200
Heptacloro epóxido exo	0,9983	$1,16 \times 10^5$	$-1,78 \times 10^5$	5 - 200
Heptacloro epóxido endo	0,9991	$9,34 \times 10^4$	$-1,30 \times 10^5$	5 - 200
2,4-DDE	0,9994	$1,49 \times 10^6$	$-1,32 \times 10^6$	1 - 200
Endossulfan-alfa	0,9987	$7,94 \times 10^4$	$-5,65 \times 10^4$	10 - 200
Bisfenol A	0,9982	$1,48 \times 10^6$	$-9,64 \times 10^5$	1 - 200
4,4-DDE	0,9994	$2,08 \times 10^6$	$-2,22 \times 10^6$	1 - 200
Dieldrin	0,9986	$1,15 \times 10^5$	$6,11 \times 10^4$	5 - 200
2,4-DDD	0,9995	$4,27 \times 10^6$	$-5,44 \times 10^4$	1 - 200
Endrin	0,9988	$9,19 \times 10^4$	$-1,41 \times 10^5$	5 - 200
Endossulfan-beta	0,9986	$6,47 \times 10^4$	$-1,15 \times 10^5$	10 - 200
Endossulfan sulfato	0,9975	$6,90 \times 10^4$	$-7,26 \times 10^4$	1 - 200
DDT	0,9962	$7,01 \times 10^5$	$-2,44 \times 10^6$	1 - 200
Bifentrina	0,9985	$3,85 \times 10^6$	$-1,31 \times 10^5$	1 - 200
Mirex	0,9996	$8,47 \times 10^5$	$-1,34 \times 10^6$	1 - 200
Fenarimol	0,9990	$2,25 \times 10^5$	$-4,07 \times 10^5$	1 - 200
Permetrina cis/trans	0,9987	$8,83 \times 10^5$	$4,49 \times 10^6$	10 - 200

A linearidade para os disruptores endócrinos quando preparados na matriz de filé de peixe foi bastante eficiente visto que para todos os analitos obteve-se um r^2 maior de 0,996. Ao contrário, para alguns compostos o valor de r^2 ficou abaixo de 0,99 quando preparados em solvente (acetonitrila), sendo estes: dimetoato, 4-n-nonilfenol, parationa metílica, bisfenol A e DDT.

3.5.3. Determinação dos Valores de LOD e LOQ

Os valores de limite de detecção e quantificação foram obtidos como descrito em 2.13.5, onde o menor ponto da curva foi utilizado como valor de quantificação e o mesmo dividido por 3,33 como valor de detecção do disruptor endócrino no método. A faixa de LOQ variou de 1,0 a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e o LOD de 0,3 a 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 12). Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios de acordo com o método apresentado e validado, visto que atendem a legislação brasileira, para os compostos que são de uso permitido (Tabela 2). Os valores de LOQ obtidos além de serem mais baixos que os valores estabelecidos pela legislação brasileira, são adequados para a quantificação dos DEs em estudo, sendo que sua maioria é de uso proibido (MAPA, 2010).

Tabela 12 - Valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada disruptor endócrino na matriz de filé de peixe.

Disruptor Endócrino	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Triclorfon	0,3	1,0
4-terc-octilfenol	1,5	5,0
Trifluralina d-14 (PS)	0,3	1,0
Trifluralina	0,3	1,0
Alfa-HCH	0,3	1,0
Hexaclorobenzeno	0,3	1,0
Dimetoato	7,5	25,0
Simazina	1,5	5,0
Atrazina	1,5	5,0
4-n-octilfenol	1,5	5,0
Beta-HCH	1,5	5,0
Lindano	1,5	5,0
Diazinona	0,3	1,0
Delta-HCH	0,3	1,0

4-n-nonilfenol	0,3	1,0
Clorpirifós metílico	0,3	1,0
Vinclozolina	0,3	1,0
Alacloro	0,3	1,0
Parationa metílica	1,5	5,0
Heptacloro	0,3	1,0
Malationa	0,3	1,0
Clorpirifós etílico	0,3	1,0
Aldrin	1,5	5,0
Parationa etílica	1,5	5,0
Dicofol	0,3	1,0
Heptacloro epóxido exo	1,5	5,0
Heptacloro epóxido endo	1,5	5,0
2,4-DDE	0,3	1,0
Endossulfan-alfa	3,0	10,0
Bisfenol A	0,3	1,0
4,4-DDE	0,3	1,0
Dieldrin	1,5	5,0
2,4-DDD	0,3	1,0
Endrin	1,5	5,0
Endussulfan-beta	3,0	10,0
Endosulfan sulfato	0,3	1,0
DDT	0,3	1,0
Bifentrina	0,3	1,0
Mirex	0,3	1,0
Fenarimol	0,3	1,0
Permetrina cis/trans	3,0	10,0

3.5.4. Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

Na Tabela 13 apresentam-se os valores das médias dos percentuais de recuperação ($n=6$) e RSD_r (repetitividade) para os 40 disruptores endócrinos avaliados em filé de peixe nos níveis de concentração de 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando o método QuEChERS modificado otimizado. A recuperação foi calculada utilizando curva analítica preparada no extrato da matriz de filé de peixe, aceitando o critério de recuperação entre 70 e 120% e $RSD \leq 20\%$.

Tabela 13 - Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de disruptores endócrinos em filé de peixe.

Disruptor Endócrino	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		25 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec. média (%)	RSD_r (%)	Rec. média (%)	RSD_r (%)	Rec. média (%)	RSD_r (%)
Triclorfon	43,2	18,2	40,8	8,7	34,3	10,1
4-terc-octilfenol	97,0	10,1	98,4	12,0	96,8	4,4
Trifluralina d-14 (PS)	100,1	11,0	100,9	8,8	97,0	3,3
Trifluralina	98,8	13,4	98,2	10,7	92,3	3,4
Alfa-HCH	91,6	13,1	97,4	12,3	95,0	5,0
Hexaclorobenzeno	54,5	15,1	50,5	14,7	50,1	6,7
Dimetoato	-	-	106,5	4,0	110,3	7,0
Simazina	101,4	10,2	92,4	15,8	92,5	6,6
Atrazina	109,0	12,0	100,0	9,3	91,1	6,9
4-n-octilfenol	105,1	9,7	105,5	11,3	98,8	5,6
Beta-HCH	80,0	13,0	82,4	10,6	80,0	3,2
Lindano	99,5	12,9	101,0	12,0	94,3	8,6
Diazinona	97,9	13,6	97,1	10,2	93,2	6,0
Delta-HCH	107,8	12,3	103,0	11,2	92,5	8,8
4-n-nonilfenol	78,7	13,8	80,1	11,1	72,4	7,8
Clorpirifós metílico	105,4	10,4	95,9	4,2	92,5	6,6
Vinclozolina	120,0	13,4	113,2	9,5	105,5	8,3
Alacloro	113,2	14,7	105,9	10,2	95,2	5,4
Parationa metílica	114,7	18,1	98,3	10,6	90,0	5,9
Heptacloro	88,9	14,9	82,0	12,4	77,3	6,8
Malationa	113,5	10,7	112,3	11,3	107,3	4,5
Clorpirifós etílico	119,8	4,8	110,9	6,6	92,9	9,1
Aldrin	76,7	20,0	70,1	12,1	70,7	8,0
Parationa etílica	117,4	12,7	107,7	12,5	101,9	6,3
Dicofol	62,5	13,2	60,7	13,3	56,4	4,1
Heptacloro epóxido exo	97,7	13,0	91,3	11,6	86,4	7,2
Heptacloro epóxido endo	95,8	13,0	92,0	10,6	85,6	7,3
2,4-DDE	80,8	13,2	78,1	10,1	73,6	6,5
Endossulfan-alfa	107,1	19,0	88,3	11,7	82,2	9,2
Bisfenol A	118,2	13,9	104,5	12,7	90,5	2,1
4,4-DDE	74,2	11,0	70,4	8,9	70,4	5,3
Dieldrin	89,9	13,2	85,9	12,6	91,0	7,8
2,4-DDD	90,8	13,5	87,7	12,5	81,9	5,5
Endrin	94,7	14,5	86,9	13,3	81,5	4,5
Endossulfan-beta	102,7	16,3	85,7	10,9	83,9	6,1
Endosulfan sulfato	120,0	12,3	108,4	11,4	115,9	16,4

DDT	96,1	14,9	80,5	14,0	76,6	8,4
Bifentrina	98,9	7,8	82,6	9,5	75,9	3,8
Mirex	51,2	14,1	45,0	14,8	40,6	4,8
Fenarimol	106	10,1	97,9	11,9	90,0	4,8
Permetrina cis/trans	81,2	19,1	74,3	11,9	73,6	12,0

Rec: recuperação

O organofosforado dimetoato não pode ser quantificado na fortificação realizada no nível de concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, pois seu limite de quantificação é de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, desse modo, sendo o mesmo avaliado somente nos níveis de concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Os valores de recuperação nos três níveis de concentração variaram de 70,1 a 120,0%, exceto os disruptores endócrinos triclorfon, hexaclorobenzeno, dicofol e mirex que não ficaram dentro da faixa aceitável de recuperação em nenhum dos níveis de concentração avaliados. A boa precisão, para todos os analitos em todos os níveis de fortificação avaliados, foi assegurada sendo satisfatória com valores de RSD_r entre 2,1 e 20%.

O uso da trifluralina-d14 como padrão de substituição proporcionou avaliar o procedimento de extração, julgando se o mesmo apresentaria resultados satisfatórios nos três níveis avaliados. Fixando-se a sua concentração, pode-se comparar os resultados obtidos nos diferentes níveis de concentração dos analitos. Observa-se que a recuperação média do PS manteve-se praticamente constante nos três níveis, demonstrando desse modo que não houve alterações drásticas do procedimento de extração.

O mirex é considerado um dos agrotóxicos mais estáveis e persistentes no solo e sedimentos, K_{ow} de 5,28; é pouco solúvel em água, isso pode explicar a baixa recuperação devido à sua acumulação no tecido adiposo (PINTO; PINTO; FILHO, 2007). Os compostos dicofol e hexaclorobenzeno também podem ser justificados por essa persistência com valores de K_{ow} de 4,30 e 5,73.

Já a baixa recuperação do triclorfon não pode ser atribuída a possível acumulação no tecido adiposo do filé de peixe, visto que seu K_{ow} de 0,43 é bastante baixo, não conferindo essa característica. Sugere-se, portanto, que ele tenha sido adsorvido no sistema de injeção, não sendo transferido adequadamente a coluna cromatográfica, e assim, resultando em sua baixa recuperação.

3.5.5. Precisão Intermediária

Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação variaram na faixa de 70,1 a 119,5%. Os compostos triclorfon, hexaclorobenzeno, dicofol e mirex continuaram a apresentar valores de recuperação inferiores ao recomendado (entre 70 e 120%), assim como na avaliação da repetitividade. Uma boa precisão pode ser observada, com valores de RSD_{pi} entre 3,9 e 20%. A trifluralina d-14 manteve-se constante, quando comparada com os resultados da avaliação da repetitividade.

Na Tabela 14 estão descritos os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada em filé de peixe utilizando o método QuEChERS modificado, na concentração intermediária de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 14 - Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de disruptores endócrinos em filé de peixe, correspondente a precisão intermediária.

Disruptor Endócrino	$25 \mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec. média (%)	RSD_{pi} (%)
Triclorfon	29,3	9,0
4-terc-octilfenol	82,6	8,8
Trifluralina d-14 (PS)	104,8	4,1
Trifluralina	89,2	6,8
Alfa-HCH	89,2	11,9
Hexaclorobenzeno	43,7	20,0
Dimetoato	70,1	11,9
Simazina	107,5	11,2
Atrazina	96,5	15,6
4-n-octilfenol	106,4	10,6
Beta-HCH	76,1	5,8
Lindano	93,2	4,3
Diazinona	96,7	6,0
Delta-HCH	89,7	5,2
4-n-nonilfenol	73,3	7,4
Clorpirifós metílico	88,8	4,0
Vinclozolina	98,9	6,4
Alacloro	97,5	6,5
Parationa metílica	99,8	9,1
Heptacloro	70,9	8,2
Malationa	96,9	5,5
Clorpirifós etílico	70,2	8,3
Aldrin	74,2	6,1
Parationa etílica	93,3	6,8

Dicofol	46,9	11,3
Heptacloro epóxido exo	82,6	6,5
Heptacloro epóxido endo	77,0	9,9
2,4-DDE	74,7	5,9
Endossulfan-alfa	76,7	4,5
Bisfenol A	96,7	12,6
4,4-DDE	79,2	3,9
Dieldrin	78,5	3,9
2,4-DDD	76,3	9,0
Endrin	77,6	14,0
Endossulfan-beta	87,1	16,8
Endossulfan sulfato	82,6	11,4
DDT	70,5	5,7
Bifentrina	71,3	11,7
Mirex	40,4	10,5
Fenarimol	90,1	10,2
Permetrina cis/trans	119,5	5,6

3.5.6. Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz está descrita na Tabela 15, na qual observa-se a importância de tal estudo para a matriz de filé de peixe em relação aos disruptores endócrinos avaliados no sistema de GC-(TQ)MS/MS. Destaca-se como sendo de extrema importância o preparo de soluções analíticas no extrato da matriz, desse modo mimetizando os interferentes/coextrativos tanto para as amostras quanto para as soluções analíticas utilizadas para a quantificação dos compostos de interesse. Observa-se que somente o analito triclorfon apresentou efeito de matriz negativo, diferentemente dos demais compostos. O efeito matriz positivo é bastante pronunciado para diversos compostos, destacando a relevância da avaliação desse parâmetro para a validação de métodos analíticos de análise em filé de peixe.

Valores de efeito matriz superiores a 50% devem ser considerados, visto que são fontes de erro quantitativo bastante importante (ECONOMOU *et al.*, 2009). Pinho *et al.* (2009) também destacou efeito matriz bastante elevado quando utilizado Espectrometria de Massas.

Tabela 15 - Efeito matriz dos disruptores endócrinos avaliados no sistema de GC-(TQ)MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz de filé de peixe.

Disruptor Endócrino	Efeito Matriz (%)
Triclorfon	-5,6
4-terc-octilfenol	79,8
Trifluralina d-14 (PS)	31,7
Trifluralina	24,5
Alfa-HCH	40,3
Hexaclorobenzeno	27,4
Dimetoato	474,3
Simazina	47,3
Atrazina	29,1
4-n-octilfenol	13,1
Beta-HCH	175,7
Lindano	34,7
Diazinona	34,4
Delta-HCH	219,4
4-n-nonilfenol	185,0
Clorpirifós metílico	143,3
Vinclozolina	40,6
Alacloro	32,3
Parationa metílica	231,8
Heptacloro	28,8
Malationa	281,5
Clorpirifós etílico	85,8
Aldrin	29,3
Parationa etílica	214,1
Dicofol	71,2
Heptacloro epóxido exo	41,3
Heptacloro epóxido endo	26,1
2,4-DDE	31,9
Endossulfan-alfa	35,6
Bisfenol A	3476,0
4,4-DDE	21,5
Dieldrin	14,8
2,4-DDD	32,0
Endrin	43,3
Endossulfan-beta	83,8
Endossulfan sulfato	145,9
DDT	156,7
Bifentrina	35,9
Mirex	16,0
Fenarimol	58,9
Permetrina cis/trans	22,5

Coextrativos como lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, etc.), e outros componentes de massa molar elevada também podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após a purificação da amostra. O efeito de matriz é mais significativo também quando os analitos encontram-se em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. Nessa situação, quando injetada a solução-padrão dos analitos preparados em solvente puro, em baixa concentração, uma quantidade expressiva do analito é retida na interface do *liner*, conseqüentemente, pequena quantidade de analito é detectada. Quando se analisam os extratos, apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, porque a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Outra característica de alguns disruptores endócrinos é a susceptibilidade de sofrer degradação térmica quando analisados em solvente puro (PINHO *et al.*, 2009).

Pinho *et al.* (2009) destacou que organoclorados não tem efeito matriz muito elevado, exceto o DDT, o qual pode ser termicamente degradado no injetor após acúmulo de coextrativo. Isso não é evidenciado nos resultados obtidos utilizando matriz de filé de peixe, onde em sua maioria os agrotóxicos organoclorados apresentaram percentual de efeito matriz bastante elevado.

A Figura 21 demonstra, no modo MRM, a diferença entre os sinais obtidos para o bisfenol A quando preparado no extrato da matriz e em acetonitrila. Ilustrando assim o valor de efeito matriz bastante elevado observado, como descrito na Figura 15.

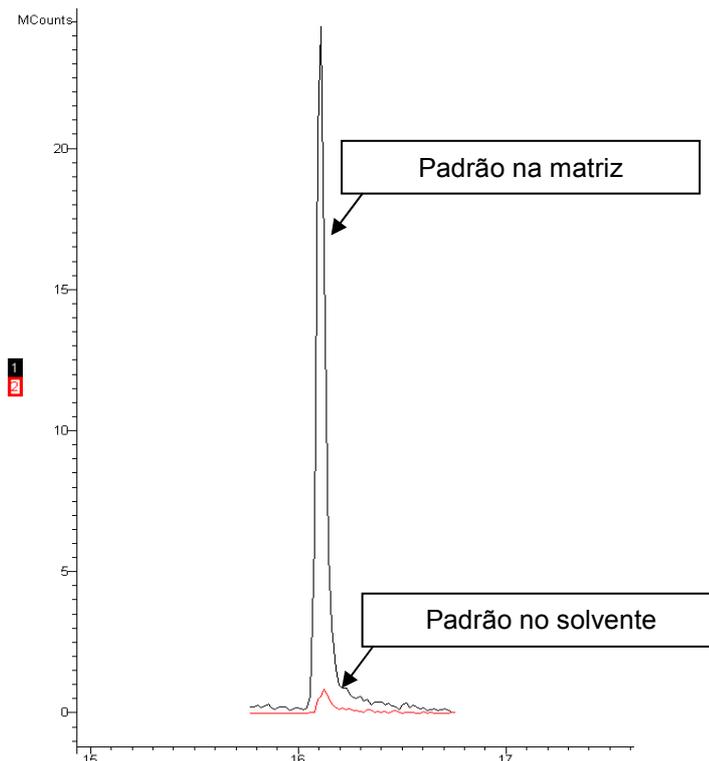


Figura 151 - Comparação dos sinais de bisfenol A, no modo MRM, de soluções preparadas no extrato da matriz e em acetonitrila.

3.6. Aplicação do Método

Aplicação do método proposto consistiu na análise de 6 amostras, sendo 2 da espécie *Rhamdia quelen*, outras duas da espécie *Pterogymnus lanarius* (panga), uma sendo *Cyprinus carpio* (carpa húngara) e outra *Oreochromis niloticus* (tilápia). Sendo que, para os peixes panga, carpa húngara e tilápia fizeram-se três fortificações, no nível intermediário de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, a fim de verificar a robustez do método, avaliando-se a recuperação dos disruptores endócrinos.

Nas duas amostras de filé de jundiá analisados foram encontrados resíduos de bisfenol A nas concentrações de $14,5$ e $6,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em somente uma das amostras ainda foram encontrados resíduos de clorpirifós etílico e bifentrina nas concentrações de $34,7$ e $2,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Avaliando-se a espécie *Oreochromis niloticus* nota-se que a mesma apresenta comportamento semelhante a *Rhamdia quelen*, visto que 3 disruptores endócrinos (triclorfon, hexaclorobenzeno e mirex) mantiveram-se com percentuais de recuperação inferiores à 70%, com exceção do dicofol que a média de

recuperação foi de 78,1%. No entanto, outros 4 compostos não obtiveram recuperação na faixa de 70 a 120%, sendo estes: HCH-delta, 4-n-nonilfenol, endossulfan sulfato e aldrin. Sendo assim, possível avaliar 33 disruptores endócrinos em amostras de filé de tilápia (Figura 22). Na amostra avaliada foi encontrado resíduo de bisfenol A na concentração de $2,7 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Já para o filé de peixe panga os compostos triclorfon, hexaclorobenzeno, dicofol e mirex comportaram-se como no filé de jundiá, assim como o HCH-delta, endossulfan sulfato e aldrin, com recuperações inferiores a 70%. Sendo assim, possível avaliar 33 disruptores endócrinos em amostras de filé de panga. Foram analisadas duas amostras de filé de panga, sendo que não foram encontrados resíduos de disruptores endócrinos dentro dos limites estabelecidos pelo método proposto.

As recuperações obtidas para a carpa húngara não foram adequadas para a maioria dos compostos, demonstrando que o método proposto não pode ser aplicado em amostras da espécie *Cyprinus carpio*.

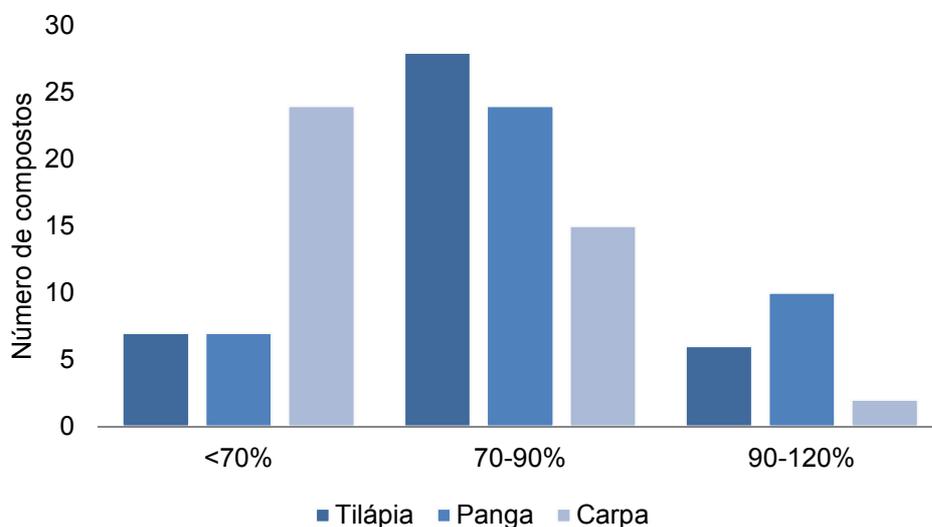


Figura 22 - Percentual de recuperação dos disruptores endócrinos avaliados nos filés de tilápia, panga e carpa, na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$.

O bisfenol A embora apresente solubilidade em água moderadamente elevada, o valor do seu coeficiente de partição octanol-água (K_{ow} 3,4) permite assumir que tal substância está preponderantemente adsorvida na matéria orgânica. Entretanto, seu transporte no ambiente aquático constitui a maior rota de distribuição para os demais compartimentos ambientais (GHISELLI; JARDIM, 2007). Nos

trabalhos desenvolvidos por Shao *et al.* (2007) e Liu *et al.* (2011) também observou-se a presença de bisfenol A nas concentrações de 55,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 83,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

A presença clorpirifós etílico na amostra de filé de jundiá pode ser justificada por uma possível contaminação deste organofosforado nos produtos utilizados na sua alimentação, como relatado por Sun; Chen (2008).

A bifentrina é um inseticida com elevada toxicidade em peixe, causando tremores, convulsões e, por consequência, ocasionando sua morte. Observa-se, uma pequena quantidade de trabalhos científicos com o intuito de averiguar a presença de disruptores endócrinos em filé de peixe com a finalidade de avaliar concentrações tóxicas no músculo, assim limitando a discussão dos resultados através de comparativos com outros autores.

Os resultados obtidos demonstram a importância da avaliação do comportamento dos extratos obtidos pelas diferentes espécies de peixes existentes, não podendo ser sempre extrapolado. Bem como, os resultados positivos para alguns disruptores endócrinos evidenciam a importância da realização de monitoramentos de resíduos em espécies aquáticas, como os peixes. Destaca-se a importância da conscientização do uso dessas substâncias, visto do grande impacto ambiental e à saúde humana que estas geram.

4. CONCLUSÕES

O método QuEChERS modificado otimizado para filé de peixe mostrou-se ser eficaz na extração de 36 dos 40 disruptores endócrinos avaliados utilizando o sistema GC-(TQ)MS/MS no modo MRM com fonte EI, obtendo valores de recuperação entre 70,1 e 120%. A precisão do método também demonstrou ser adequada visto que valores de RSD inferiores a 20% foram obtidos. Além desses, o parâmetro de linearidade foi suficientemente adequado para todos os analitos com valores de r^2 maiores de 0,996, bem como os limites de quantificação apresentados, atendendo a legislação brasileira.

A realização do planejamento fatorial em estrela permitiu encontrar um procedimento de extração ótimo, a fim de atender as necessidades propostas nesse trabalho. Faz-se necessário o uso dessa ferramenta a fim de minimizar o período de realização de testes, e conseqüentemente o consumo desnecessário de reagentes. Destaca-se que a eliminação da etapa de adição de água, e a adição de NaCl (mesmo que sendo necessário sua adição em uma etapa individualizada) tornam esse procedimento rápido e de fácil execução. Um procedimento com menor número de etapas está sujeito a uma menor probabilidade de erros analíticos, melhorando a ainda mais a eficácia do procedimento.

A etapa de limpeza destacou-se como sendo de suma importância durante o desenvolver do trabalho, visto que diferentes combinações e proporções de sorventes e/ou sais podem influenciar na qualidade do extrato obtido. Um extrato com menor quantidade de coextrativos/interferentes contribui para a manutenção de todo o sistema de detecção, além de sofrer influência sobre a recuperação dos analitos em estudo. Devido a presença de colesterol e os ácidos oleico e n-hexadecanóico em quantidades elevadas em filé de peixe, o uso de C18 e PSA nessa etapa demonstrou ser indispensável.

Em relação ao efeito matriz do extrato de filé de peixe observou-se que o mesmo exerce grande influência nos disruptores endócrinos avaliados, sendo fundamental o preparo de soluções analíticas na matriz, a fim de mimetizar a presença de coextrativos/interferentes.

O método mostrou-se aplicável em amostras de filé de peixe, possibilitando a detecção da presença de bisfenol A na amostra de tilápia, além de clorpirifós etílico,

bifentrina e bisfenol A na espécie *Rhamdia quelen*. A espécie *Oreochromis niloticus* proporcionou a determinação do acaricida dicofol, o qual não foi possível otimizar para as demais espécies avaliadas, mas apresentou recuperação insatisfatória para HCH-delta, 4-n-nonilfenol, endossulfan sulfato e aldrin. O filé de panga analisado somente não mostrou-se adequado para a determinação de HCH-delta, endossulfan sulfato e aldrin e nas amostras analisadas não foram encontrados resíduos de disruptores endócrinos.

Portanto, concluí-se que o método QuEChERS modificado proposto para a determinação de disruptores endócrinos em filé de peixe utilizando GC-(TQ)MS/MS mostrou ser eficaz, podendo ser aplicado em análise de rotina, por atender as legislações de acordo com os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram atingidos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Tendo em vista os resultados obtidos através do planejamento fatorial em estrela desenvolver o método cromatográfico utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas para a determinação de hormônios em filé de peixe;
- Ampliar o escopo de disruptores endócrinos a serem avaliados nesta matriz;
- Realizar o planejamento fatorial com mais de 2 fatores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADKHANIHA, R. *et al.* Quantification of endogenous steroids in human urine by gas chromatography mass spectrometry using a surrogate analyte approach. **J. Chromatogr. B**, 878 (2010) 845.

ALAN WOOD, 2011. Disponível em <<http://www.alanwood.net/>> Acesso em 06 de Agosto de 2011.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC Int.**, 86 (2003) 412.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2010. <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso: 07 de Novembro de 2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 899, de 29/05/2003.

AURIOL, M. *et al.* Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process. Biochem.**, 41 (2006) 525.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. 2ª Ed. UFSM, Santa Maria, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Ed. UFSM: Santa Maria, 2004.

BALLESTEROS-GOMEZ, A.; RUBIO, S.; PEREZ-BENDITO, D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 449.

BARREK, S. *et al.* Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. **Talanta**, 79 (2009) 712.

BENASSI, M., 2009. Ionização por Impacto de Elétrons. <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=45&numero=6>> Acesso 26 de novembro, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, 26 (2003) 523.

BILA; D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim. Nova**, 30 (2007) 651.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. 1ª ed., IWA Publishing CRC Press LLC: USA, 2003.

BRASIL, Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. <<http://www.inpev.org.br/responsabilidades/legislacao/images/Decreto.PDF>> Acesso: 03 de Novembro de 2011.

CEC - Commission of the European Communities. On the implementation of the Community strategy for endocrine disruptors - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, SEC(2007), 2007.

CEC - Commission of the European Communities, 1999 - Communication from the commission to the council and the European Parliament. Community Strategy for Endocrine Disruptors - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Commission of the European Communities.

CHEMBLINK, 2012. Disponível em: <<http://www.chemblink.com>> Acesso em 06 de Agosto de 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, 31 (2008) 623.

CHROMEDIA, 2011. <www.chromedia.org> Acesso 28 de novembro de 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2ª ed, Unicamp: Campinas, 2009, cap: 8 e 9.

CORILO, Y. E., 2009. **Quadrupolos**. <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3>> Acesso 27 de novembro de 2011.

CORRÊIA, V. *et al.* Crescimento de jundiá e carpa húngara criados em sistema de recirculação de água. **Ciência Rural**, 39 (2009) 1533.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, 9 (2008) 23.

DAMSTRA, T *et al.*, 2002, **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 180p.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxicilina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, 40 (2004) 1.

Diretiva (2002/657/EC) <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:PT:PDF>> Acesso 27 de novembro de 2011.

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 5856.

EU, EUROPEAN UNION, 2009a. Regulamento (CE) nº 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de maio de 2009.

EU, EUROPEAN UNION, 2009b. Regulation (EC) nº 1107/2009 of the European Parliament and of the Council, de 21 de outubro de 2009.

EU, EUROPEAN UNION, 2010. Disponível em: <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21113_pt.htm> Acesso: 20 de dezembro de 2011.

EUROPEAN COMMISSION, 2007. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/index_en.htm> Acesso: 25 de Julho de 2011.

EUROPEAN COMMISSION, 2010. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/index.htm>> Acesso: 17 de Julho de 2011.

EUROPEAN COMMISSION, 2011. Commission staff working paper. 4th Report on the implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), SEC, 2011.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. <<http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379>> Acesso em 03 de Novembro de 2011.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2012a. <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en> Acesso 13 de março de 2012.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2012b. <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Pangasius_hypophthalmus/en> Acesso 13 de março de 2012.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 30 (2011) 814.

FENLON, K. A. *et al.* Gas-liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the quantitation of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents and from wild populations. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 112.

FRENICH, A. G. *et al.* Compensation for matrix effects in gas chromatography – tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 4798.

GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; FILIPIAK, A.; BUSZEWSKI, B. Isolation, purification and determination of 4-*n*-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol in aqueous and biological samples. **Talanta**, 74 (2008) 655.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, 30 (2007) 695.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry. A textbook**. 1^a ed. Springer, Alemanha, 2004.

GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Koogan, 1988. 457-459 p.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7^a ed., LTC, Rio de Janeiro, 2008, cap. 25.

HILDEBRANDT, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387 (2007), 1459.

HOHENBLUM, P. *et al.* Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Sci. Total Environ.**, 333 (2004) 185.

HU, Y. *et al.* A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. **Talanta**, 80 (2010) 2099.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE). Disponível em <<http://www.ich.org/>>. Acesso em novembro de 2011.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, ver. 4, 2011.

KALYONCU, L.; AGCA, I.; AKTUMSEK, A. Some organochlorine pesticide residues in fish species in Konya, Turkey. **Chemosphere**, 74 (2009) 885.

KLEYWEGT, S. *et al.* Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency. **Sci. Total Environ.**, 409 (2011) 1481.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 18 (2002) 435.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 23 (2003) 20.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, 1 (2009) 35.

LAZZARI, R. *et al.* Densidade de estocagem no crescimento, composição e perfil lipídico corporal do jundiá. **Ciência Rural.**, 41(2011) 712.

LeDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 1021.

LINTELMANN, J. *et al.* Endocrine disruptors in the environment. **Pure Appl. C**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LIU, J. *et al.* Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. **Environ. Pollut.**, 159 (2011) 2815.

LIU, S. *et al.* Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 1367.

LOPES, R. B. *et al.* Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, 64 (2006) 56–62.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: 14 de Julho de 2011.

MARIA, C. A. B. DE; MOREIRA, R. F. A. A intrigante bioquímica da niacina – uma revisão crítica. **Quim. Nova**, 34, (2011) 1739.

MATOZZO, V. *et al.* Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. **Environ. Int.**, 34 (2008) 531.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA), 2011. <<http://www.mpa.gov.br>> Acesso em: 12 de novembro de 2011.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia river, São Paulo state (Brazil). **J. Braz. Chem. Soc.**, 22 (2011) 1452.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA), 2010. <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta> Acesso em: 12 de novembro de 2011.

MULLER, M. *et al.* Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. **Environ. Toxicol. Chem.**, 27 (2008) 1649.

NAVARRO, P. *et al.* Determination of alkylphenols and 17 β -estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 5890.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4^a ed., Bookman, 2010, cap: 6.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; PITSOS, M. A. The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. **Hum. Reprod. Update**, 7 (2001) 323.

NIST (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY), 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>> Acesso em 06 de Agosto de 2011.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química**, 88 (2003) 65.

NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 7234.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 24 (2005) 683.

PADILLA-SÁNCHEZ, J. A. *et al.* Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 5724.

PAN (PESTICIDE ACTION NETWORK), 2011. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>> Acessado em: 02 de Janeiro de 2012.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, 32 (2009) 987.

PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; FILHO, R. M. Avaliação de contaminação ambiental causada por poluentes orgânicos persistentes utilizando simulação computacional. **Quím. Nova**, 30 (2007) 565.

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

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, 32 (2009)1620.

PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocr. Relat. Cancer**, 15 (2008) 649.

REINEN, J. *et al.* Endocrine disrupting chemicals-Linking internal exposure to vitellogenin levels and ovotestis in Abramis brama from Dutch surface waters. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 30 (2010) 209.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C. de; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Quim. Nova**, 29 (2006) 817.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, 27 (2004) 771.

RICCIO, M. F. **Triplo quadrupolo**, 2009. <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9>> Acesso 27 de novembro de 2011.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2009). **Document nº SANCO/10684/2009**. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*.

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; SHARMA, A. K.; SANGHI, R. Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. **Environ. Int.**, 31 (2005) 113.

SAPOZHNIKOVA, Y.; BAWARDI, O.; SCHLENK, D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. **Chemosphere**, 55 (2004) 797.

SEC, 2007 - Commission staff working document on the implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372). Commission of the European Communities.

SHAO, B. *et al.* Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chem.**, 105 (2007) 1236.

SILVA, F. V. *et al.* Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental. **Rev. Bras. Toxicol.**, 20 (2007) 1.

SINGH, P. B.; SINGH, V. Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 25 (2008) 342.

SIQUEIRA, S. L. de; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Ver. Esc. Enferm.**, 42 (2008) 584.

SOARES, A. *et al.* Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environ. Int.**, 34 (2008) 1033.

SODRÉ, F. F. *et al.* Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, 2 (2007) 187.

SOLER, C.; PICÓ, Y. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *TrAC*, **Trends Anal. Chem.**, 26 (2007) 103.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? **Scientia Chromatographica**, 2 (2010) 25.

SUÁREZ-MAHECHA, H. *et al.* Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, 28 (2002) 101.

SUN, F.; CHEN, H. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. **Chemosphere**, 71 (2008) 1866.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf> Acesso: 15 de dezembro de 2011.

TARLEY, C. R. T. *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchem. J.**, 92 (2009) 58.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, 29 (2006) 338.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, 74 (2002) 835.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0.** Londres, 2003. CD-ROM.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 1997a. <<http://www.epa.gov/ncer/rfa/archive/grants/97/endocrine.html>> Acesso: 23 de Julho de 2011.

U.S. EPA. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/012, 1997b.

U.S.EPA. Fish Screening Assay Discussion Paper. U.S. Environmental Protection Agency, 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/ref-3_fish_assay_discussionpaper.pdf> Acesso: 25 de Julho de 2011.

U.S.EPA. Draft list of initial pesticide active ingredients and pesticide inerts to be considered for Screening under the federal food, drug, and cosmetic act. June, 2007. U.S.EPA - Environmental Protection Agency.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2010. <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>> Acesso: 25 de Julho de 2011.

U.S.EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2011. <<http://www.epa.gov/scipoly/oscp/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>> Acesso: 19 de Novembro de 2011.

YANG, R. *et al.* Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau. **Environ. Int.**, 33 (2007) 151.

VALLEJO, A. *et al.* Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography–mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 8327.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. **J. Hazard. Mater.**, 183 (2010) 701.

VILA NOVA, C. M. V. M.; GODOY, H. T.; ALDRIGUE, M. L. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 25 (2005) 430.

WANG, M-H.; BASKIN, L. S. Endocrine disruptors, genital review development, and hypospadias. **J. Androl.**, 29 (2008) 499.

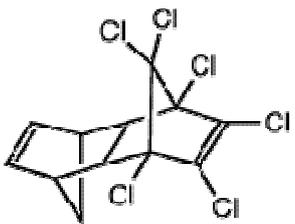
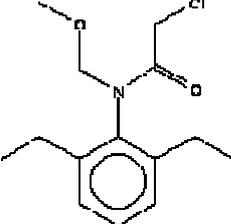
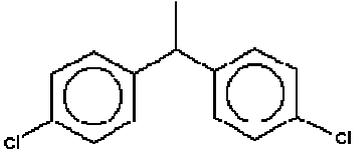
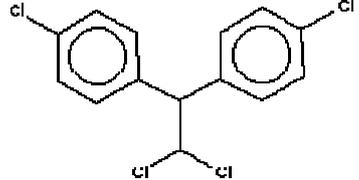
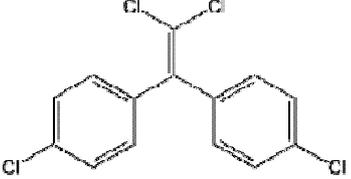
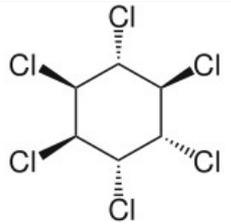
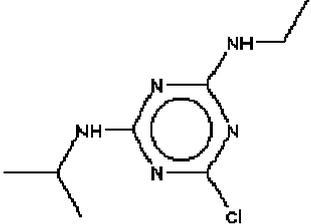
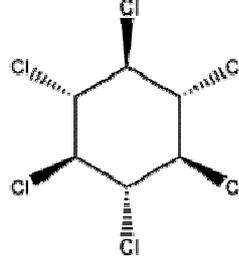
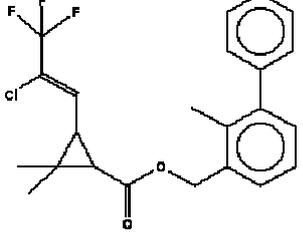
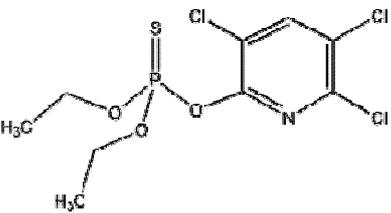
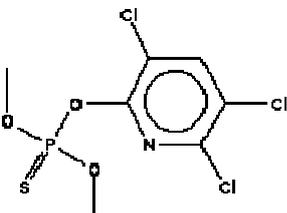
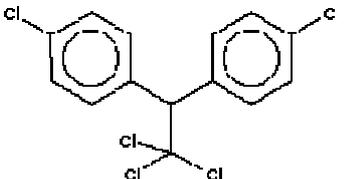
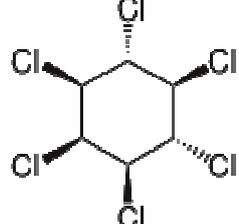
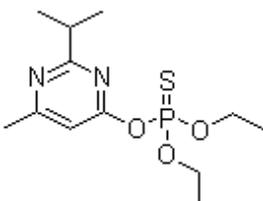
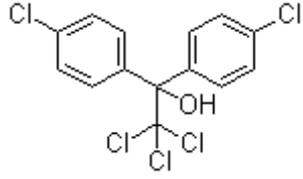
WARING, R.H.; HARRIS, R.M. Endocrine disrupters - A threat to women's health? **Maturitas**, 68 (2011) 111.

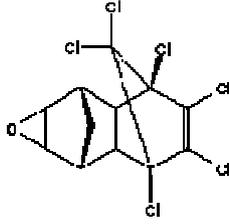
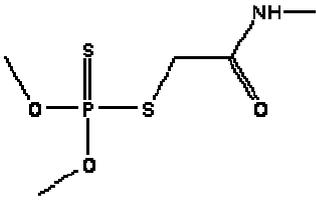
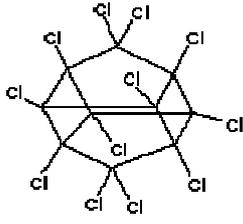
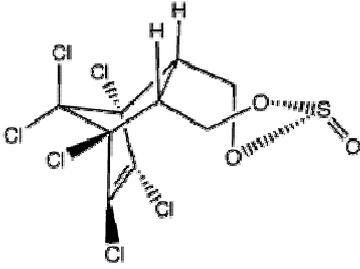
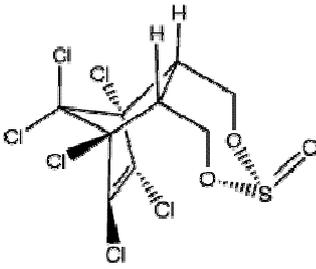
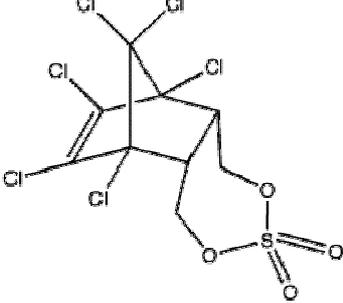
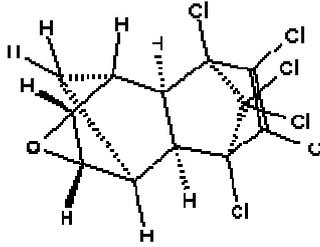
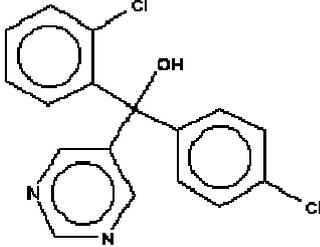
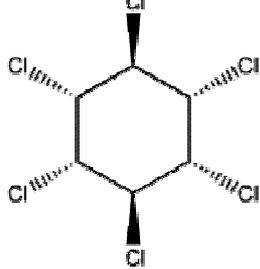
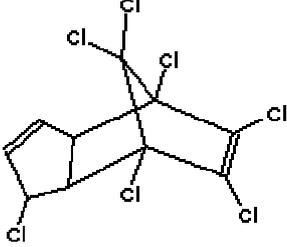
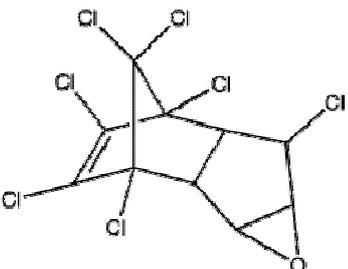
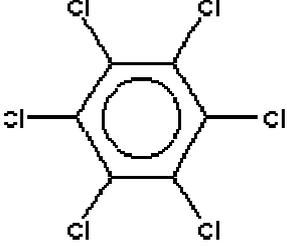
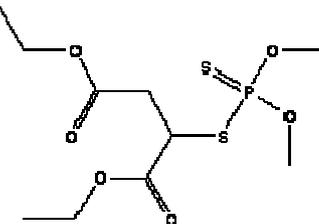
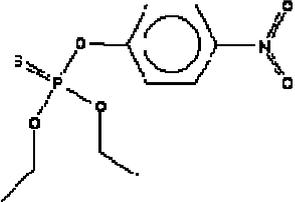
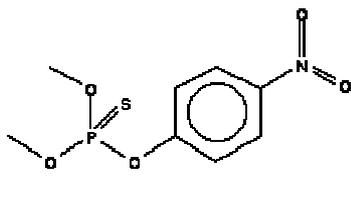
WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chem.**, 125 (2011) 803.

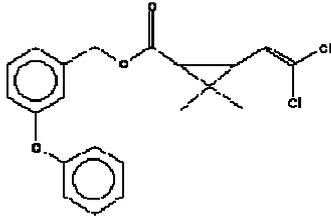
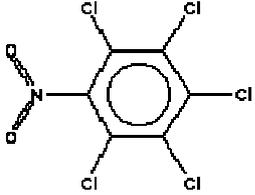
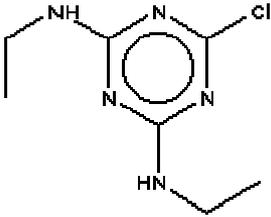
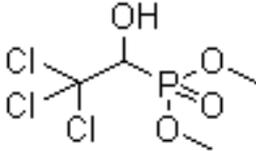
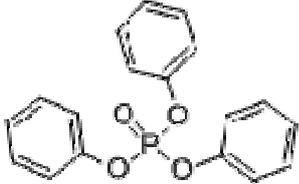
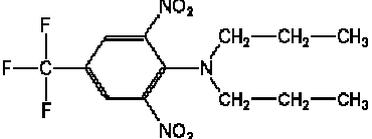
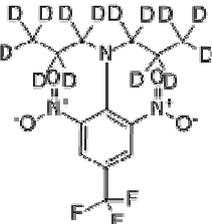
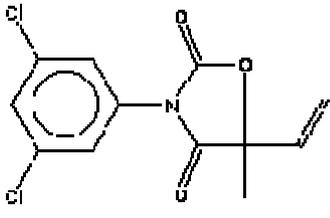
ANEXO

Anexo 1 - Fórmulas estruturais dos disruptores endócrinos estudados nesse trabalho.

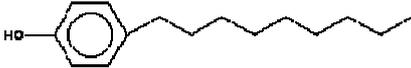
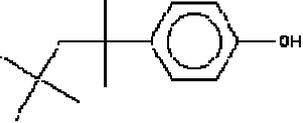
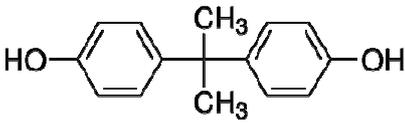
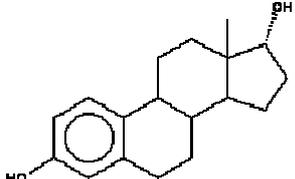
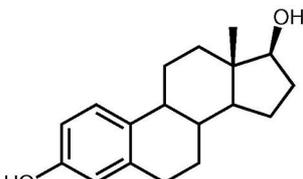
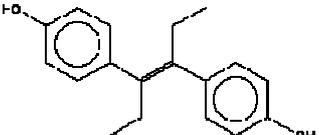
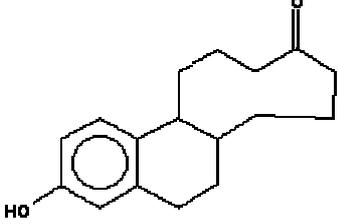
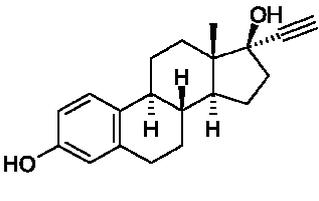
Agrotóxicos:

 <p>Aldrin</p>	 <p>Alacloro</p>	 <p>2,4 DDE</p>
 <p>2,4 DDD</p>	 <p>4,4 DDE</p>	 <p>Alfa HCH</p>
 <p>Atrazina</p>	 <p>Beta HCH</p>	 <p>Bifentrina</p>
 <p>Clorpirifós etílico</p>	 <p>Clorpirifós metílico</p>	 <p>DDT</p>
 <p>Delta HCH</p>	 <p>Diazinona</p>	 <p>Dicofol</p>

 <p>Dieldrin</p>	 <p>Dimetoato</p>	 <p>Dodecacloro (mirex)</p>
 <p>Endossulfan alfa</p>	 <p>Endossulfan beta</p>	 <p>Endossulfam sulfato</p>
 <p>Endrin</p>	 <p>Fenarimol</p>	 <p>Gama HCH</p>
 <p>Heptacloro</p>	 <p>Heptacloro epóxido endo/exo</p>	 <p>Hexaclorobenzeno</p>
 <p>Malationa</p>	 <p>Parationa etílica</p>	 <p>Parationa metilica</p>

		
Permetrina cis/trans	Quintozeno (PI)	Simazina
		
Triclorfon	Trifenilfosfato (PI)	Trifluralina
		
Trifluralina d-14 (PS)	Vinclozolina	

Alquilfenóis, Bisfenol A e Hormônios:

		
4-n-nonilfenol	4-n-octilfenol	4-terc-octilfenol
		
Bisfenol A	17α-estradiol	17β-estradiol
		
Dietilestilbestrol	Estrona	17α-etinilestradiol

