

MARIA LUIZA SANTANA RENA MARTINS

**Aplicação de ozônio na remoção de resíduos de  
agrotóxicos organoclorados em pescado**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M386a  
2017

Martins, Maria Luiza Santana Rena, 1989-  
Aplicação de ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos  
organoclorados em pescado / Maria Luiza Santana Rena Martins.  
- Viçosa, MG, 2017.  
x, 93 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Extração (Química). 2. Tilápia-do-Nilo - Efeito de  
produtos químicos agrícolas. 3. Partição de fases. 4. Ozonização.  
5. Tilápia-do-Nilo - Controle de qualidade. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de  
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.


CDD 22. ed. 543.8

MARIA LUIZA SANTANA RENA MARTINS


**APLICAÇÃO DE OZÔNIO NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM PESCADO**

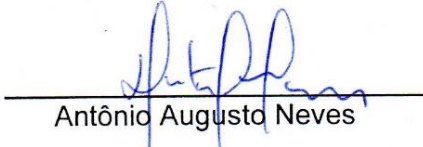
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 01 de novembro de 2017.

  
Fernanda Fernandes Heleno

  
Renata Pereira Lopes Moreira

  
André Fernando de Oliveira

  
Antônio Augusto Neves

  
Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Orientadora)

Dedico este trabalho à *Deus*;  
*Aos meus pais Margareth e Anizio*;  
*A minha irmã Ana Eliza*;  
*Ao meu namorado Tássio.*

*Agradeço pelo apoio e amor incondicional  
durante todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela orientação e colaboração durante todo trabalho e também pelo carinho e amizade.

Aos professores Antônio Augusto Neves, André Fernando de Oliveira pelos ensinamentos transmitidos.

Aos demais professores e funcionários que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao laboratório de química analítica (LAQUA), pela oportunidade de desenvolver o trabalho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos por ele concedidas a mim e minha família. Agradeço em especial por ele se fazer presente em todos os momentos me dando sabedoria e força para vencer cada obstáculo;

A Nossa Senhora, por me cobrir com seu manto sagrado e por interceder por mim a Deus.

Aos meus pais por todo apoio, pelo amor incondicional, pela amizade, pelo cuidado, pela confiança, pelas orações e por me ajudarem a superar e enfrentar as dificuldades;

À minha irmã pelo amor, amizade e companheirismo sempre;

Ao meu namorado, por todo incentivo, amor, paciência, amizade e companheirismo;

A toda família LAQUA, que me acolheu com muito carinho. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas contribuições, pela amizade, pelos momentos de distração, pelo carinho e apoio;

A todos meus familiares e amigos que mesmo indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Maria Luiza Santana Rena Martins, filha de Anizio José Martins e Margareth Santana Rena Martins, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, em 13 de junho de 1989.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Bacharel em Química, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa - MG, diplomando-se como Bacharel em janeiro de 2015.

No período de junho de 2011 a maio de 2012 foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação a Docência (PIBID), com atuação na Escola Estadual Dr. Raimundo Alves Torres, localizada na cidade de Viçosa e no espaço Química em Ação, do departamento de química da UFV.

Estagiou no CISAB (Consortio Intermunicipal de Saneamento Básico da Zona da Mata de Minas Gerais), exercendo atividades no Laboratório de controle de qualidade da água, no período de 01 de abril de 2014 a 18 de dezembro de 2014.

No período de 01 de outubro de 2014 a 30 de junho de 2015 foi bolsista de iniciação científica, no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Genético, do departamento de fitotecnia da UFV.

Em agosto de 2015, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa - UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em novembro de 2017.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFÊRENCIAS .....	4
CAPÍTULO 1-DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO, UTILIZANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA, PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOCORADOS EM FILÉS DE TILÁPIA DO NILO .....	6
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
2.1. Preparo de soluções-padrão e reagentes .....	11
2.2. Instrumentação .....	11
2.2.1. Otimização da temperatura inicial e da rampa inicial .....	12
2.3. Amostras de pescado .....	12
2.3.1. Fortificação das amostras .....	14
2.4. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)....	14
2.4.1. Extração dos agrotóxicos por ESL/PBT- Técnica geral .....	14
2.4.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) .....	15
2.4.2.1. Otimização da mistura extratora usada na ESL/PBT .....	15
2.4.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e refrigeração para ESL/PBT .....	17
2.5. Validação do método analítico .....	18
2.5.1. Seletividade .....	18
2.5.2. Linearidade da resposta do método.....	19
2.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	19
2.5.4. Exatidão .....	19
2.5.5. Precisão .....	20
2.5.5.1. Repetitividade .....	20
2.5.5.2. Precisão intermediária .....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
3.1. Otimização da temperatura inicial e da rampa inicial .....	21
3.2. Análise cromatográfica.....	29

3.3. Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) .....	30
3.3.1. Otimização da mistura extratora usada na ESL/PBT .....	30
3.3.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e refrigeração .....	44
3.4. Validação do método analítico .....	50
3.4.1. Seletividade .....	51
3.4.2. Linearidade do método .....	52
3.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	56
3.4.4. Exatidão .....	57
3.4.5. Precisão .....	58
3.4.5.1. Repetitividade .....	58
3.4.5.2. Precisão intermediária .....	59
4. CONCLUSÕES .....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
CAPÍTULO 2- POTENCIAL DO OZÔNIO NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOCLO- RADOS E SEU EFEITO NA QUALIDADE DO PESCADO .....	66
1. INTRODUÇÃO .....	66
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	67
2.1. Preparo de soluções-padrão e reagentes .....	67
2.2. Obtenção e quantificação do ozônio .....	68
2.3. Fortificação das amostras de filés de tilápia .....	69
2.4. Câmara de fumigação .....	69
2.5. Ozonização do pescado e avaliação da remoção dos agrotóxicos .....	70
2.5.1. Ozônio gasoso .....	70
2.5.2. Ozônio borbulhado em água .....	71
2.6. Efeito da aplicação do ozônio na qualidade do pescado .....	72
2.6.1. Avaliação da cor .....	72
2.6.2. Medida do pH .....	73
2.6.3. Firmeza .....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
3.1. Remoção dos organoclorados em filés de tilápia .....	74
3.1.1. Influência do tempo de exposição na remoção .....	74
3.1.2. Influência da concentração do ozônio na remoção .....	78
3.2. Qualidade do pescado após aplicação do ozônio .....	81
3.2.1. Cor .....	81

3.2.2. pH .....	84
3.2.3. Firmeza .....	86
4. CONCLUSÃO .....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

## RESUMO

MARTINS, Maria Luiza Santana Rena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. **Aplicação de ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos organoclorados em pescado.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Na primeira parte desse trabalho foi otimizado e validado o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para análise de organoclorados em peixe por cromatografia gasosa (CG/DCE). Os resultados indicaram que o método atendeu aos critérios estabelecidos pela ANVISA, uma vez que este apresentou valores de recuperação superiores a 83%, repetitividade com coeficientes de variação inferiores a 16% e limites de detecção e de quantificação menores que 2,0 e que 6,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Na segunda parte do trabalho foi avaliado o potencial do ozônio para degradar resíduos de quatro organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em filés de tilápia do Nilo. Além de avaliar também o efeito do processo de ozonização sobre a qualidade do pescado por meio das análises de pH, cor e firmeza. Filés de tilápia contaminados com os quatro organoclorados foram expostos ao gás ozônio e em água ozonizada. Os dois tratamentos foram realizados variando o tempo de exposição, de 10 a 60 minutos em intervalos de 10 minutos, mantendo a concentração de ozônio constante em 23  $\text{mg L}^{-1}$  e também variando a concentração de ozônio em 18, 23 e 28  $\text{mg L}^{-1}$ , mantendo o tempo de exposição de 30 minutos. Os tratamentos com ozônio reduziram em até 51,9; 60,9; 42,3 e 45,5% dos resíduos de aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT, respectivamente, dos filés. Com relação aos parâmetros de qualidade analisados verificou-se que ao serem expostos em água ozonizada os filés de tilápia tiveram alterações nos três parâmetros avaliados, sendo inadequado seu uso. Em contra partida o pescado exposto ao ozônio gasoso teve poucas alterações na cor e nenhuma alteração no pH e na firmeza, sendo então uma estratégia promissora para remoção de resíduos de organoclorados em filés de tilápia.

## ABSTRACT

MARTINS, Maria Luiza Santana Rena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Application of ozone in the removal of organochlorine pesticide residues in fish.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

In the first part of this work the solid-liquid extraction method with low temperature partition for the analysis of organochlorines in fish by gas chromatography (CG / DCE) was optimized and validated. The results indicated that the method met the criteria established by ANVISA, since it presented recovery values higher than 83%, repeatability with coefficients of variation lower than 16% and limits of detection and quantification lower than 2,0 and 6,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. In the second part of the work the potential of ozone to degrade residues of four organochlorines, aldrin, heptachlor epoxide, dieldrin and DDT in Nile tilapia fillets was evaluated. In addition to evaluating the effect of the ozonation process on fish quality through pH, color and firmness analyzes. Tilapia fillets contaminated with the four organochlorines were exposed to ozone gas and ozonated water. The two treatments were performed by varying the exposure time, from 10 to 60 minutes at 10-minutes intervals, keeping the ozone concentration constant at 23  $\text{mg L}^{-1}$  and also varying the ozone concentration at 18, 23 and 28  $\text{mg L}^{-1}$ , maintaining the exposure time of 30 minutes. Ozone treatments reduced by up to 51,9; 60,9; 42,3 and 45,5% of the residues of aldrin, heptachlor epoxide, dieldrin and DDT, respectively, of the fillets. Regarding the quality parameters analyzed, it was verified that when they were exposed in ozonated water, the fillet of tilapia had changes in the three evaluated parameters, being inappropriate its use. In contrast, the fish exposed to ozone gas had few changes in color, pH and firmness, thus being a promising strategy for the removal of organochlorine residues in tilapia fillets.

## Introdução geral

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe mais cultivadas no Brasil. Cerca de 22 estados brasileiros cultivam essa espécie, gerando uma produção anual que varia de 30 a 40 mil toneladas. A tilápia foi uma das primeiras espécies cultivadas para ser processada e comercializada como filetes congelados (BARBIERI E FERREIRA, 2011).

Diversas espécies de peixes, incluindo a tilápia do Nilo, são frequentemente contaminadas devido à aplicação de agrotóxicos na agricultura em áreas localizadas próximas a rios, lagos e mananciais (PAULINO *et al.*, 2014). Outro problema é que a piscicultura ainda é carente de informações e fiscalizações adequadas ao uso de substâncias químicas durante às práticas de manejo. Como podemos ver na Tabela 1, o MAPA os limites máximos de resíduos de alguns organoclorados apenas para outros tipos de carne. Assim, muitos produtos químicos utilizados no controle de doenças na agricultura e em outros animais como: herbicidas, algicidas, moluscicidas, larvicidas, fungicidas e drogas veterinárias têm sido intencionalmente introduzidas nos ambientes hídricos para combater parasitas de peixes (MEYER, 1991 e MAXIMIANO *et al.*, 2005).

**Tabela 1.** Limite máximo de resíduo dos organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em carnes bovina, suína, equina e ave.

Agrotóxicos	Limite máximo de resíduo (LMR) em $\mu\text{g kg}^{-1}$			
	Carnes			
	Bovina	Suína	Equina	Ave
Aldrin	200	200	200	200
Heptacloro epóxido	200	200	200	200
Dieldrin	200	200	200	200
DDT	1000	1000	1000	1000

Fonte: MAPA, 2007.

Esses produtos, além do efeito tóxico aos tecidos dos peixes, principalmente o das brânquias e do fígado, podem acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco ao consumidor, caso não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento (TAVECHIO *et al.*; 2009). Os efeitos

crônicos dos agrotóxicos na saúde humana, a partir da ingestão de alimentos, não estão bem definidos, mas há evidências de que estes causam câncer, alterações no material genético, bem como interrupção das funções hormonais (LEDOUX, 2011).

Moléculas com elevada massa molar, contendo halogênios e, ou, anéis aromáticos condensados, como é o caso dos agrotóxicos organoclorados, são mais persistentes, possuem alta solubilidade lipídica, elevada bioacumulação em tecidos, sendo por isso, classificados como poluentes orgânicos persistentes. Por isso, embora muitos agrotóxicos dessa classe tenham sido banidos nas décadas de 1970 e 1980, eles ainda são comumente encontrados nos dias de hoje em tecidos de peixes (MUSUMECI, 1992; ANDRÉA, 1998; VAGI *et al.*, 2007).

Em 2001, o Programa de Meio Ambiente das Nações Unidas (UNEP) estabeleceu a Convenção de Estocolmo para restringir os poluentes orgânicos persistentes. Porém, mesmo sendo restringido o uso desses compostos, que inclui os organoclorados, a presença desses no ambiente ainda é muito comum, pois além de serem persistentes, alguns ainda são usados clandestinamente na agricultura devido ao baixo custo e à eficácia contra os insetos nocivos (CHEN *et al.*, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2017; FREIRE *et al.*, 2017).

Alguns tanques de criação utilizam águas de rios, lagos e mananciais que estão localizados próximos a plantações que possivelmente tiveram aplicação de organoclorados. Assim, devido à bioacumulação em tecidos e a alta persistência desses compostos, as criações de peixes podem ficar comprometidas por conter resíduos dessas substâncias, causando prejuízos para a saúde dos peixes e dos seres humanos por meio da cadeia alimentar. Dessa maneira é importante o desenvolvimento de métodos para determinação desses resíduos e de estratégias para remoção dos mesmos.

Para remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando o gás ozônio, conhecido por ter um elevado potencial de oxidação e alto poder de desinfecção. A vantagem em se usar o ozônio para esta finalidade é que este se degrada a oxigênio, não deixando resíduos da sua redução nos alimentos. Estes trabalhos têm mostrado que é possível remover contaminações de agrotóxicos dos alimentos, mantendo a qualidade dos mesmos (WU *et al.*, 2007; SEGAL-ROSENHEIMER

DUBOWSKI, 2007). Resultados interessantes foram obtidos por HELENO *et al.*, 2015, quando empregou ozônio para remoção de resíduos de clorotalonil em uvas, removendo cerca de 60% desse princípio ativo, sem alterar os parâmetros de qualidade como: sólidos solúveis, perda de massa, intensidade de cor, e de diferença de cor total.

Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um método para determinar resíduos de agrotóxicos organoclorados em peixes por cromatografia gasosa e investigar o potencial do ozônio em remover estes resíduos, mantendo a qualidade do pescado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉA, M. M. Contaminação do solo por pesticidas. Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico, v. 60, n. 2, p. 63-65, 1998.

BARBIERI, E.; FERREIRA, L. A. A. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 209–214, 2011.

CHEN, S.; YU, X.; HE, X.; XIE, D.; FAN, Y.; PENG, J. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1297–1300, 2009.

FREIRE, C.; KOIFMAN R. J.; KOIFMAN, S. Serum levels of organochlorine pesticides in blood donors: A biomonitoring survey in the North of Brazil, 2010–2011. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 722-732, 2017.

GONZÁLEZ, J. A. C.; GALINDO, B. F.; APARICIO, V. G.; ALBALADEJO, J. B.; LEÓN, V. M. Levels and temporal trends of organochlorine contaminants in mussels from Spanish Mediterranean waters. **Chemosphere**, v. 182, p. 584-594, 2017.

HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, F. A.; OLIVEIRA, A. F. Ozone Treatment for the Removal of Residual Chlorothalonil and Effects on the Quality of Table Grapes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 4, p. 687-694, 2015.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

MAXIMIANO, A. A. *et al.* Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 10, n. 2, p. 483-491, 2005.

MEYER, F. P. Aquaculture disease health management. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4201-4208, 1991.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo, In: TSAI, S. M., NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira do Solo, 1992. p. 341-360.

PAULINO, M. G.; BENZE, T. P.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, J. B.; FERNANDES, M. N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. **Science of The Total Environment**, v. 497, p. 293–306, 2014.

SEGAL-ROSENHEIMER, M.; DUBOWSKI, Y. Heterogeneous ozonolysis of cypermethrin using real-time monitoring FTIR techniques. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 11682-11691, 2007.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

VAGI, M. C.; PETSAS, A. S.; KOSTOPOULOU, M. N.; KARAMANOLI, M. K.; LEKKAS, T. D. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. **Desalination**, v. 210, n. 1, p. 146–156, 2007.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T. W. H.; CHAN, G. Y. S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v. 18, p. 466-472, 2007.

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO, UTILIZANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA, PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOCLORADOS EM FILÉS DE TILÁPIA DO NILO

#### 1. Introdução

A aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo, sendo a piscicultura de água doce a atividade que mais tem se destacado, principalmente no que se refere ao cultivo de tilápias (WAGNER *et al.*, 2004).

As tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), originárias da África, pertencem à família *Cichlidae*, gênero *Oreochromis*, espécie *Oreochromis niloticus* e apresentam escamas grandes, pouco brilhantes, listras nítidas verticais, colorações esbranquiçadas no ventre e prateada no dorso (LUND, 1989).



**Figura 1:** Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Fonte: USGS-science for a changing word.

O filé de tilápia do Nilo possui em média 75% de água, entre 3,4 a 8,5% de lipídeos, 20% de proteína e 2% de minerais, sendo que a composição pode variar dependendo da dieta, do manejo alimentar, da idade e do tamanho dos peixes (KUBITZA, 2000).

Em 1953 foi introduzida inicialmente no Brasil a tilápia *rendalli* em açudes do Nordeste, mas devido ao baixo desempenho no crescimento, foi substituída gradativamente pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo

esta última espécie a mais utilizada nos criatórios do país, uma vez que possui um excelente rendimento em ganho de peso e crescimento. Esta, além de apresentar carne de qualidade superior com poucas espinhas, o que facilita a filetagem (FIGUEREDO E VALENTE, 2008), possui boa aceitação por parte dos consumidores e elevado valor de mercado (PEREIRA E SILVA, 2012), sendo assim, a tilápia do Nilo é a espécie de tilápia mais produzida no mundo, e a segunda espécie de peixe mais cultivada, perdendo somente para as carpas (CONTE, 2003)

No Brasil, a tilápia lidera a produção aquícola, tendo sido produzidas em 2014, cerca de 260 mil toneladas, sendo esta produção 31% maior que a de 2011. A produção comercial de tilápias ocorre em praticamente todo o país, mas as regiões Nordeste, Sudeste e Sul se destacam com volumes maiores de produção. Importantes polos de produção dessa espécie estão localizados no Ceará, Bahia, Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Sendo cultivadas predominantemente em tanques-redes e em viveiros (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2015).

Apesar da crescente demanda e produção de tilápia no Brasil, ainda faltam esclarecimentos e controle com relação ao uso de produtos químicos na piscicultura. Estes muitas vezes são usados de maneira inadequada para desinfecção, controles de pragas e predadores, tratamentos de doenças, hormônios, além dos anestésicos para transporte, dentre outros (ELER E MILLANI, 2007).

Além disso, de acordo com dados do IBGE, os agrotóxicos são a segunda maior causa de contaminação dos mananciais no país, perdendo apenas para o esgoto doméstico. Esses dados são preocupantes e comprovam que uma parte considerável dos agrotóxicos aplicados nas lavouras acaba indo para os rios, solo, ar e águas subterrâneas (IBGE, 2011).

Assim, tanto as águas de mananciais de rios e represas que abastecem as populações, quanto os peixes que vivem nessas águas e se alimentam de materiais retirados do fundo desses locais apresentam concentração de agrotóxicos, mesmo anos após parar a aplicação destes (BRANCO, 1998).

A contaminação das águas com agrotóxicos prejudica diretamente a fauna e a flora aquática, podendo levar a morte de algumas espécies. Além disso, há também os efeitos indiretos, pois os peixes armazenam os agrotóxicos no tecido adiposo não sofrendo danos diretamente, mas podem causar danos aos seres humanos que

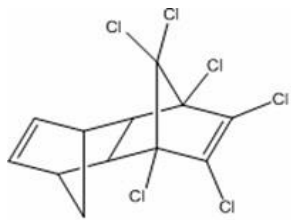
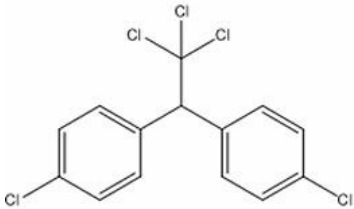
podem se intoxicar ao consumir o peixe contaminado (AG SOLVE-MONITORAMENTO AMBIENTAL, 2017).

Resíduos de agrotóxicos, principalmente a classe dos organoclorados, ainda são encontrados em vários ambientes. Embora muitos compostos dessa classe tenham sido banidos para uso agrícola, eles ainda são estudados, pois possuem alta persistência no ambiente. Estes compostos altamente lipofílicos e possuem fácil bioacumulação, sendo encontrados em tecidos lipídicos, tais como vegetais, frutos, e peixes, principalmente no fígado e no tecido adiposo (NETTO *et al.*, 2012).

Resíduos de organoclorados são altamente tóxicos para os seres humanos, podendo aumentar os riscos de ocorrência de câncer, bem como causar danos aos sistemas nervoso, cardíaco, endócrino e reprodutivo (RAND, 1985).

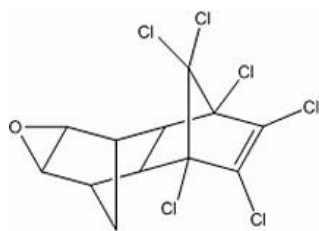
Na Tabela 2 são apresentadas as estruturas químicas, com as respectivas massas molares e solubilidade dos organoclorados em estudo.

**Tabela 2:** Estrutura química, massa molar e solubilidade dos organoclorados aldrin, DDT, dieldrin e heptacloro epóxido.

Organoclorados	Massa molar/(g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade a 25 °C/(µg L <sup>-1</sup> )
<p style="text-align: center;"><b>Aldrin</b></p> 	364,93	27
<p style="text-align: center;"><b>DDT (Dicloro difenil tricloroetano)</b></p> 	354,49	1,2 a 5,5

---

### Dieldrin

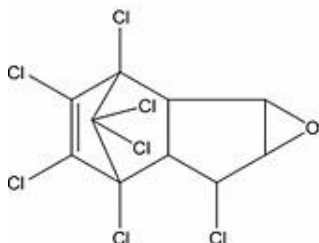


380,90

140

---

### Heptacloro epóxido



389,40

180

---

Fonte: ALMEIDA, 2007

A análise de resíduos de agrotóxicos, nas mais diferentes matrizes, é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. Estas técnicas são muito importantes na análise química em função de sua facilidade em efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra, por meio da utilização de detectores seletivos (GALLI *et al.*, 2006).

A quantificação de compostos orgânicos utilizando técnicas cromatográficas fornece resultados com limites de detecção na faixa de nanogramas a microgramas/L ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), dependendo do detector e da técnica de extração. Contudo, são técnicas que dependem de etapas iniciais para preparação das amostras (GALLI *et al.*, 2006).

O preparo de amostra é uma etapa muito importante dentro do processo analítico, tendo como principal objetivo promover o fracionamento e o enriquecimento da amostra, com todos os analitos de interesse, e deixa-los o mais livre possível dos interferentes presentes na matriz.

Normalmente, amostras ambientais e alimentos são matrizes muito complexas, não podendo ser analisadas sem antes passar por um tratamento preliminar. Assim, é necessário que se faça a preparação da amostra, com uso da técnica de extração, *clean up* dos extratos para remoção de impurezas, e em alguns casos, pré-concentração dos mesmos (KAIPPER, 2001).

Nas últimas décadas, a técnica de extração de agrotóxicos mais amplamente utilizada para alimentos de origem animal era de extração sólido-

líquido (ESL) (LEDOUX, 2011). Esta técnica tem sido aplicada a carnes e peixes, como pode ser visto nos trabalhos de Baranowska; Barchańska; Pacak (2006) e de Patel *et al.* (2005), respectivamente. Mas, assim como a técnica de extração líquido-líquido, a ESL consome solventes orgânicos e amostras, além de co-extrair interferentes da matriz (ALBERO *et al.*, 2003).

Recentemente, o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), que significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, foi usado por Sapozhnikova e Lehotay (2013), para a determinação de 18 agrotóxicos no músculo de Bagre (“peixe gato”) por cromatografia gasosa rápida de baixa pressão acoplada a espectrometria de massa com triplo quadrupolo (LP-GC/MS-MS). Essa técnica tem sido aplicada para determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, entretanto, apresenta uma etapa de *clean-up* para limpeza dos extratos inserida no protocolo experimental.

As técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos têm tido melhorias e avanços nas etapas de extração e purificação das amostras e também na simplicidade e redução no consumo de solventes. Nessa perspectiva, a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) tem tido bons resultados com relação a estes termos.

A ESL/PBT possibilita a extração de agrotóxicos e o *clean-up* dos extratos simultaneamente. Esta técnica é semelhante à extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura desenvolvida por Goulart *et al.* (2008) para extração de agrotóxicos em leite. A mesma técnica foi, posteriormente, aplicada para diversas matrizes, como por exemplo, água, tomate e abacaxi, conforme relatado nos trabalhos de Silvério *et al.* (2012), Pinho *et al.* (2010), Morais *et al.* (2014), respectivamente.

Estes métodos tem como vantagem o menor consumo de solventes, reduzindo a evaporação e troca dos mesmos, evitando a etapa de *clean-up*, além de serem simples e eficientes. Os métodos consistem em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que a água e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura, constituída de amostra e solvente extrator é agitada e levada ao *freezer* para separação das fases. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra congela, ficando na parte inferior do recipiente utilizado, e a fase superior, contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos, pode ser

filtrada, utilizando sulfato de sódio anidro com o intuito de eliminar possível presença de água. Finalmente, amostra é analisada por cromatografia gasosa (GOULART *et al.*, 2008).

Assim, esse estudo tem como objetivo desenvolver um método utilizando a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinar resíduos de agrotóxicos organoclorados em peixe por cromatografia gasosa.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Preparo de soluções-padrão e Reagentes**

A partir de padrões analíticos dos agrotóxicos Aldrin (pureza = 98,5% m/m), DDT (pureza = 98,8% m/m), Heptacloro epóxido (pureza = 99,5% m/m) obtidos da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, EUA) e do Dieldrin (pureza = 97,9% m/m) obtido da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha), foram preparadas soluções-estoque dos padrões dos agrotóxicos nas concentrações de 1000 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA). Outras soluções de trabalho usadas foram também preparadas a partir da solução estoque, por meio de diluições. Uma solução de bifentrina (92,2% m/m, FMC do Brasil) a 10,0 mg L<sup>-1</sup> utilizada como padrão interno foi preparada em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA), a partir de uma solução de 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Estas soluções foram armazenadas em *freezer* vertical (Continental-Brasil) à temperatura de aproximadamente – 20 °C.

### **2.2. Instrumentação**

As análises cromatográficas foram feitas utilizando um cromatógrafo a gás, modelo GC-2014 da Shimadzu contendo uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária composta de 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano com 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm de espessura de filme (ZB-5 – Phenomenex) e um detector por captura de elétrons (DCE), equipado com um auto-injetor AOC-20i.

As condições cromatográficas como, programação de temperatura da coluna, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás

de arraste, etc. foram adaptadas de Carlos *et al.* (2013). A temperatura inicial e a rampa inicial foram otimizadas. As condições de análise por CG/DCE otimizadas foram:

- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Volume injetado: 1,0 µL
- Razão de split: 1:5
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Programação de aquecimento da coluna:

140 °C (1 min)  $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$  200 °C  $\xrightarrow{4\text{ °C min}^{-1}}$  240 °C  $\xrightarrow{20\text{ °C min}^{-1}}$   
290 °C

- Temperatura do detector: 300 °C
- Tempo total de análise: 15,5 min

As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo *software* GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão). A identificação de compostos em extratos orgânicos das matrizes foi efetuada por comparação do tempo de retenção com padrões. As curvas analíticas foram obtidas pelo método de padronização interna, sendo usada a razão entre a área de cada analito e do padrão interno como resposta.

### 2.2.1. Otimização da temperatura inicial e da rampa inicial

O estudo foi realizado a fim de determinar qual a temperatura inicial e rampa inicial, deveriam ser usadas nas condições cromatográficas, para se obter uma melhor separação dos compostos, com menor largura dos picos ( $A/h$ ) e melhor fator de retenção ( $k = t_R'/t_M$ ). A largura foi calculada dividindo-se a área do pico pela sua altura. O fator de retenção foi calculado dividindo-se o tempo de retenção ajustado de cada analito ( $t_R' = t_R - t_M$ ) pelo tempo de retenção do solvente, o qual foi considerado o  $t_M$ .

A otimização foi realizada por um planejamento experimental Matriz de Doehlert de duas variáveis com três pontos centrais. Os dados foram avaliados por meio da regressão múltipla utilizando a estratégia *stepwise*. Os valores mínimos e máximos foram: temperatura inicial 120 e 200 °C e rampa de 10 e

30 °C/min, respectivamente. As demais condições de análises foram mantidas constantes. Os ensaios realizados estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Ensaios do planejamento da Matriz de Doehlert para duas variáveis com três pontos centrais para otimização da temperatura inicial e rampa inicial

Valores	
Temperatura inicial/(°C)	Rampa de temperatura/(°C/min)
120	20
140	10
140	30
180	10
180	30
200	20
160	20
160	20
160	20

### 2.3. Amostras de pescado

Para o processo de otimização e validação do método foram utilizadas amostras de filés de tilápia do Nilo, isentas dos agrotóxicos em estudo, provenientes do comércio de Viçosa – MG. A presença dos agrotóxicos foi previamente avaliada por meio da análise de extratos do branco, ou seja, amostra não fortificada.

As amostras eram armazenadas em *freezer* (280 L- CONSUL, Viçosa-MG, Brasil) a aproximadamente -20 °C. Antes das análises as amostras eram deixadas a temperatura ambiente até descongelarem e em seguida eram cortadas e trituradas em um processador caseiro, mix (Walita, São Paulo, Brasil).

### **2.3.1. Fortificação das amostras**

Amostras de filés de tilápia, já processadas, de massas igual a 3,0000 g, medidas em balança analítica (Sartorius BP 2215 com precisão de  $1 \times 10^{-4}$  g), foram fortificadas, com 0,030 mL da solução de trabalho contendo os quatro agrotóxicos na concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a fim de se obter uma concentração igual a  $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de cada analito nessa massa de peixe.

Após adição dos analitos, as amostras foram agitadas em vórtex (CERTOMAT® MV) por 10 segundos e deixadas em repouso por 2 horas para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração, e foram determinadas as condições ótimas para análise dos agrotóxicos aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT, por cromatografia gasosa.

## **2.4. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)**

### **2.4.1. Extração dos agrotóxicos por ESL/PBT – Técnica geral**

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para análise dos agrotóxicos aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em amostras de filés de tilápia foi adaptada da técnica descrita para extração de piretróides e organofosforados em tomates (PINHO, 2007, PINHO et al,2010).

Uma massa de 3,0000 g das amostras fortificadas foi medida em frascos de vidro transparente com tampa plástica, com capacidade de 30 mL. A esta amostra foram adicionados 7,5 mL de solvente extrator (água, acetonitrila e acetato de etila). A mistura obtida foi agitada em vórtex (CERTOMAT<sup>R</sup> MV) com a velocidade mantida em 8, durante um tempo. A composição do solvente extrator, a força iônica e o tempo de agitação foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração desses agrotóxicos. Após agitação a amostra foi centrifugada a 2000 rpm e colocadas em freezer a  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ , por 12 horas. Após este período, a amostra congelada foi descartada e a fase orgânica líquida separada por filtração simples em papel de filtro contendo 2,0 g de sulfato de sódio anidro (Vetec – PA), sendo que em seguida o papel de filtro foi lavado com 1 mL de acetonitrila resfriada também a  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ . O volume do extrato

obtido foi transferido e armazenado em frasco de vidro no *freezer* até o momento da análise cromatográfica.

#### **2.4.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)**

No processo de otimização da técnica ESL/PBT alguns parâmetros importantes para análise dos agrotóxicos em estudo foram avaliados procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. Foram realizadas duas otimizações, a primeira a fim de avaliar qual seria a melhor composição da mistura extratora e uma segunda para avaliar qual seria o melhor tempo de agitação, centrifugação e refrigeração.

Realizou-se as otimizações por meio de planejamento fatorial completo, usado para investigar a influência de todos os fatores e os efeitos de suas interações na resposta.

##### **2.4.2.1. Otimização da mistura extratora usada na ESL/PBT**

Os dois primeiros planejamentos foram realizados a fim de otimizar o volume e a composição ideal da mistura extratora para haver uma melhor extração. Os planejamentos eram compostos por três variáveis e dois níveis, sendo então um planejamento fatorial completo  $2^3$  envolvendo 8 ensaios realizados em triplicata, ou seja, 24 experimentos. As razões entre as áreas dos analitos e as áreas do padrão interno, obtidas nas análises cromatográficas foram utilizadas como respostas.

Em um primeiro planejamento as variáveis estudadas foram volume de água, volume de acetonitrila e volume de acetato de etila. Já em um segundo planejamento avaliou-se o uso de uma solução de cloreto de sódio (NaCl)  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em substituição a água, com objetivo de aumentar a força iônica. Os dados dos planejamentos estão dispostos nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Planejamento fatorial  $2^3$  aplicado para otimização da solução extratora, contendo água, usada na ESL/PBT em amostras de filés de tilápia.

Variáveis		Níveis	
		(-1)	(+1)
Volume (mL)	Água	1,0	2,0
	Acetonitrila	6,5	8,0
	Acetato de etila	0,0	1,5

Ensaio	Fatores codificados		
	Água	Acetonitrila	Acetato de etila
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

**Tabela 5.** Planejamento fatorial  $2^3$  aplicado para otimização da solução extratora, contendo solução de cloreto de sódio ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), usada na ESL/PBT em amostras de filés de tilápia.

Variáveis		Níveis	
		(-1)	(+1)
Volume (mL)	NaCl ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ )	0,0	1,0
	Acetonitrila	6,5	8,0
	Acetato de etila	0,0	1,5

Ensaio	Fatores codificados		
	NaCl	Acetonitrila	Acetato de etila
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

#### 2.4.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e refrigeração para ESL/PBT

Um terceiro planejamento foi realizado para otimizar o tempo de agitação, de centrifugação e de refrigeração, afim de se obter uma maior extração dos compostos estudados. Para isso, um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central (n=2), totalizando 10 ensaios realizados em duplicata, ou seja, 20 experimentos. Utilizou-se como resposta, assim como nos estudos anteriores, as razões entre as áreas dos analitos e as áreas do padrão interno. Os dados do planejamento estão dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central (n=2) aplicado na otimização do tempo de agitação, centrifugação e refrigeração para ESL/PBT usada na extração de agrotóxicos presentes em amostras de filés de tilápia.

	Variáveis	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Tempo	Agitação (s)	10	20	30
	Centrifugação (min)	1	2	3
	Refrigeração (h)	3,0	4,5	6,0

Ensaio	Fatores codificados		
	Água	Acetonitrila	Acetato de etila
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0

## 2.5. Validação do método analítico

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em peixe e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, foi validado com base nos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão seguindo as normas da ANVISA de 2017 (ANVISA, 2017).

### 2.5.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de peixes isentas dos agrotóxicos (branco) com os cromatogramas dos extratos das amostras fortificadas com os agrotóxicos. Para obtenção desses extratos as amostras foram submetidas ao procedimento de extração ESL/PBT otimizado e posterior análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. As análises dos dados cromatográficos foram feitas utilizando o software GCsolution (Shimadzu Scientific Instruments, 2004).

### 2.5.2. Linearidade da resposta do método

A linearidade de resposta do método foi feita utilizando-se extratos obtidos de amostras de filés de tilápia fortificados com aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em oito concentrações (10; 20; 30; 50; 100; 150; 250; 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Dos extratos obtidos recolheu-se uma alíquota de 180  $\mu\text{L}$ , e acrescentou-se a esta 20  $\mu\text{L}$  do padrão interno (bifentrina) em acetonitrila, na concentração de 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ . As amostras foram analisadas por CG/DCE e os dados utilizados para construção de uma curva analítica. A curva foi construída relacionando as razões das áreas do analito de interesse pelo padrão interno com as concentrações citadas. A linearidade foi avaliada através da regressão linear destas curvas analíticas.

### 2.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados utilizando parâmetros obtidos por meio das curvas analíticas. Estes podem ser calculados por meio das Equações 1 e 2.

— (Equação 1)

— (Equação 2)

Sendo:

s = Estimativa do desvio padrão das áreas obtidas para o branco da matriz

S = Inclinação da curva analítica

### 2.5.4. Exatidão

Para determinar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação. Para tais ensaios as amostras de filés de Tilápia foram fortificadas em concentrações iguais a 30, 100 e 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os quatro

agrotóxicos. Estes experimentos foram feitos em triplicata e a exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação (%R) conforme a equação 3.

$$* \text{ ————— } + \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$C_E$  = Média das concentrações obtidas experimentalmente

$C_R$  = Concentração teórica (concentração em que as amostras foram fortificadas)

As médias das concentrações obtidas experimentalmente foram calculadas por meio das equações da reta de cada analito, obtidas pelas curvas analíticas.

### 2.5.5. Precisão

A precisão do método ESL/PBT otimizado em filés de tilápia foi avaliada, por estudos de repetitividade e de precisão intermediária.

A precisão representa a dispersão de seus resultados em diferentes ensaios. Tais resultados são avaliados através do coeficiente de variação (CV), calculado conforme a Equação 4.

$$\left( \frac{s}{\bar{x}} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

$s$  = Desvio padrão das áreas obtidas para o analito de interesse e o padrão interno.

$\bar{x}$  = média entre a razão das áreas obtidas para o analito de interesse e o padrão interno.

#### 2.5.5.1. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada tendo como base o guia da ANVISA (2003). O experimento foi realizado em triplicata para 3 diferentes concentrações (30,

100 e 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para o aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT. Os coeficientes de variação (CV) de cada agrotóxico foram então determinados.

#### **2.5.5.2. Precisão intermediária**

A precisão intermediária refere-se a precisão avaliada utilizando-se o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo-se exatamente quais as condições a variar, tais como: Diferentes analistas, equipamentos ou tempo (INMETRO, 2003)

Nesse estudo a precisão intermediária foi avaliada pelo mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento em diferentes dias (dia 1, dia 3 e dia 5). Tal avaliação foi feita por meio dos coeficientes de variação (CV), que foram obtidos pela análise dos extratos (triplicata) em 3 diferentes concentrações (30, 100 e 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para os quatro agrotóxicos.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Otimização da temperatura inicial e da rampa inicial**

Para separação, identificação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos nos extratos de carne de peixe, foi utilizada cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. Devido ao alto poder de resolução da técnica cromatográfica e alta sensibilidade do detector aos compostos halogenados, foi possível quantificar os quatro organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT. Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas, segundo adaptações das condições usadas por Carlos *et al.* (2013), posteriormente foi realizado um planejamento para otimizar a temperatura inicial e a rampa inicial.

A temperatura inicial tem grande importância na análise por cromatografia gasosa, pois a mesma influencia na resolução e no tempo de retenção dos compostos. Segundo Lanças (1993), uma temperatura inicial muito baixa, não afetará a resolução de compostos com pontos de ebulição mais elevados, enquanto que em temperaturas iniciais elevadas, os compostos serão eluídos rapidamente e a resolução será afetada. Entretanto, há também uma influência da rampa inicial sobre o sistema.

Essa otimização permitiu avaliar melhor a importância das variáveis, temperatura inicial e da rampa inicial, sobre as respostas cromatográficas de alguns agrotóxicos organoclorados.

Para cada pico foi avaliada a influência de duas respostas, largura do pico (A/h), que é calculada dividindo-se a área do pico pela sua altura e fator de retenção ( $k = t_R / t_M$ ). O estudo foi realizado usando o planejamento experimental Matriz de Doehlert de duas variáveis com três pontos centrais, por meio da regressão múltipla utilizando a estratégia *stepwise*.

Para avaliar a influência dessas respostas em cada pico não foram utilizadas funções de desejabilidade, mas o comportamento de cada analito foi avaliado individualmente e um procedimento para seleção de condições ótimas foi proposto, permitindo a interpretação química da importância de cada parâmetro. A equação geral da matriz de Doehlert para duas variáveis é:

$$b_1 A + b_2 B + b_3 AB + b_4 A^2 + b_5 B^2 + D = y \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo:

A = Temperatura inicial,

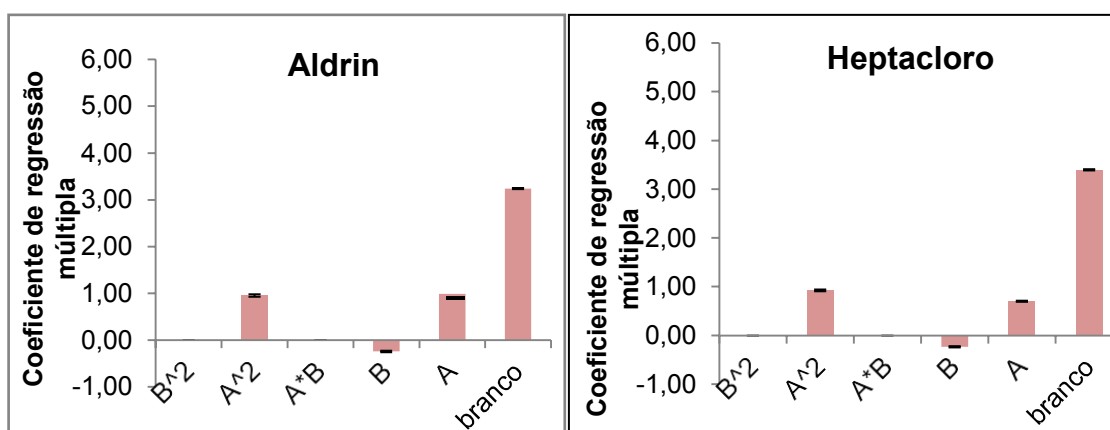
B = Rampa inicial

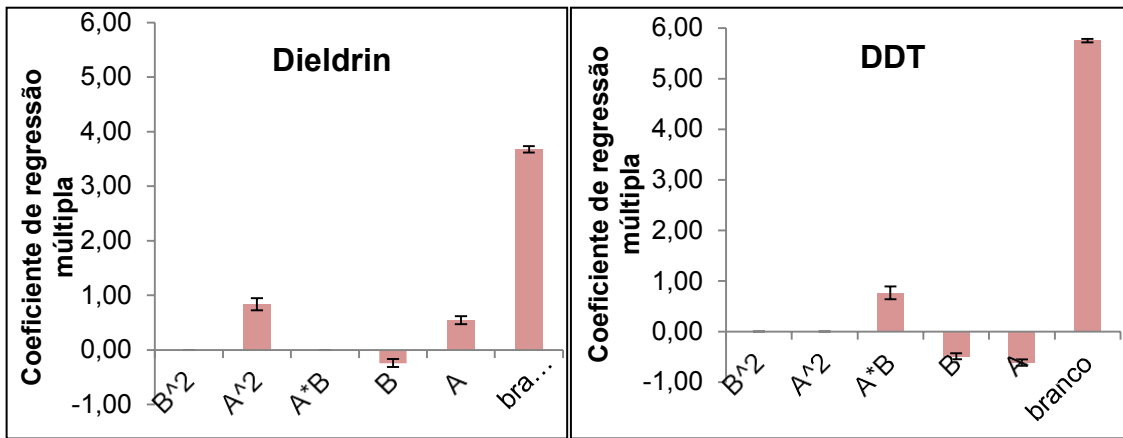
D = Termo constante

y = Respostas utilizadas

$b_1, b_2, b_3, b_4$  e  $b_5$  = Coeficientes da equação.

Pelo gráfico de barra para cada pico, após a regressão *stepwise*, pode-se notar quais parâmetros foram ou não significativos para as respostas A/h e k. Os gráficos para cada agrotóxico são mostrados nas Figuras 2 e 3.





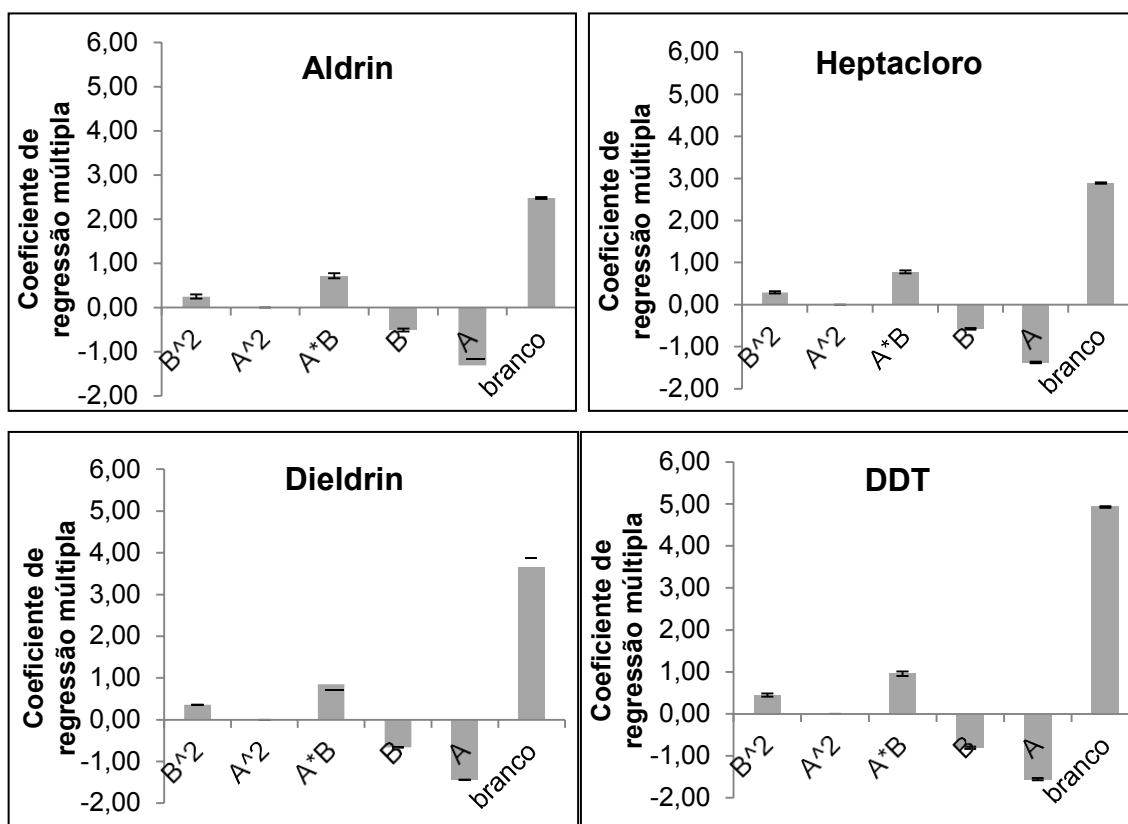
**Figura 2.** Influência dos parâmetros temperatura inicial (A) e rampa inicial (B) sobre a resposta largura do pico (A/h) para os quatro agrotóxicos.

Analisando os gráficos da Figura 2 percebe-se que há uma mesma tendência para os agrotóxicos aldrin, heptacloro epóxido e dieldrin, onde os parâmetros temperatura inicial (A) e temperatura inicial ao quadrado (A<sup>2</sup>) foram significativos de maneira que quanto maior esses valores, maior a largura dos picos, já o parâmetro rampa inicial (B) também foi significativo para esses três picos, porém quanto maior a rampa inicial, menor a largura do pico. Já para o DDT, A e B foram significativos, e quanto maior os valores de temperatura inicial e rampa inicial menor a largura do pico. Para esse agrotóxico a interação entre esses parâmetros também foi significativa.

Os modelos obtidos para o comportamento do fator de capacidade (ou de retenção, k) em função das variáveis do planejamento apresentaram a mesma equação geral ( $b_5B^2 + b_3AB + b_2B + b_1A + D = k$ ), para praticamente todos analitos analisados.

O comportamento dos parâmetros dos modelos apresentou uma tendência bem definida em relação aos analitos de cada cromatograma. De uma maneira geral, os termos associados à rampa inicial ( $b_2$  e  $b_5$ ) foram positivos e aumentaram com a ordem de eluição, significando que há uma maior influência nos tempos de retenção dos analitos menos retidos em relação aos mais retidos. O termo associado à temperatura inicial ( $b_1$ ) foi negativo, indicando que quanto maior a temperatura inicial, menor o tempo de retenção. Por fim, o termo de interação ( $b_3$ ) também foi negativo, de maneira que menores temperaturas, associadas a rampas maiores também contribui para diminuição do tempo de retenção. Além de explicar esse comportamento, foi

importante também verificar a existência do termo de interação e se conhecer a magnitude de todos os termos em relação aos parâmetros de separação para os agrotóxicos em estudo.



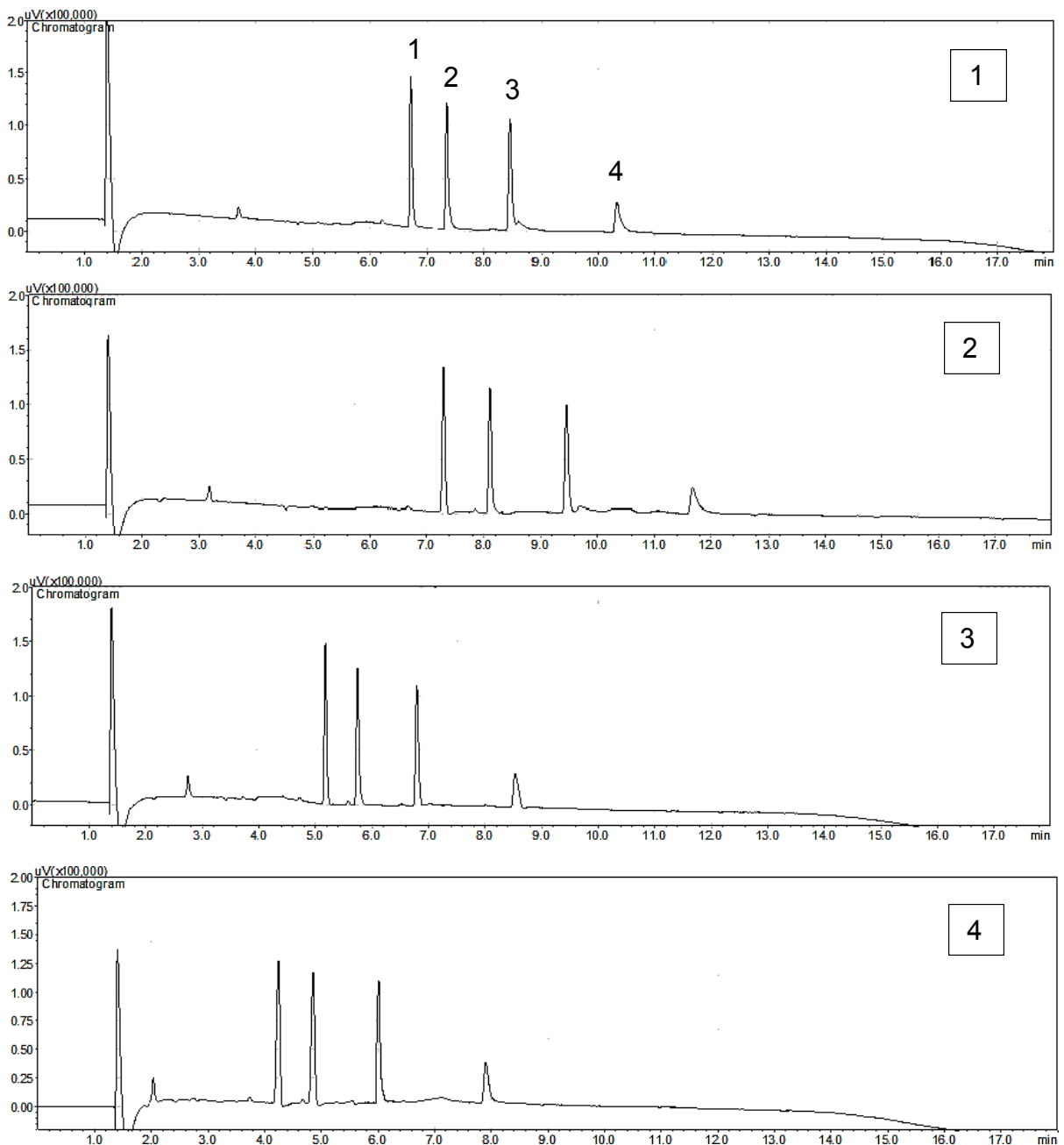
**Figura 3.** Influência dos parâmetros temperatura inicial (A) e rampa inicial (B) sobre a resposta fator de retenção (k) para os quatro agrotóxicos.

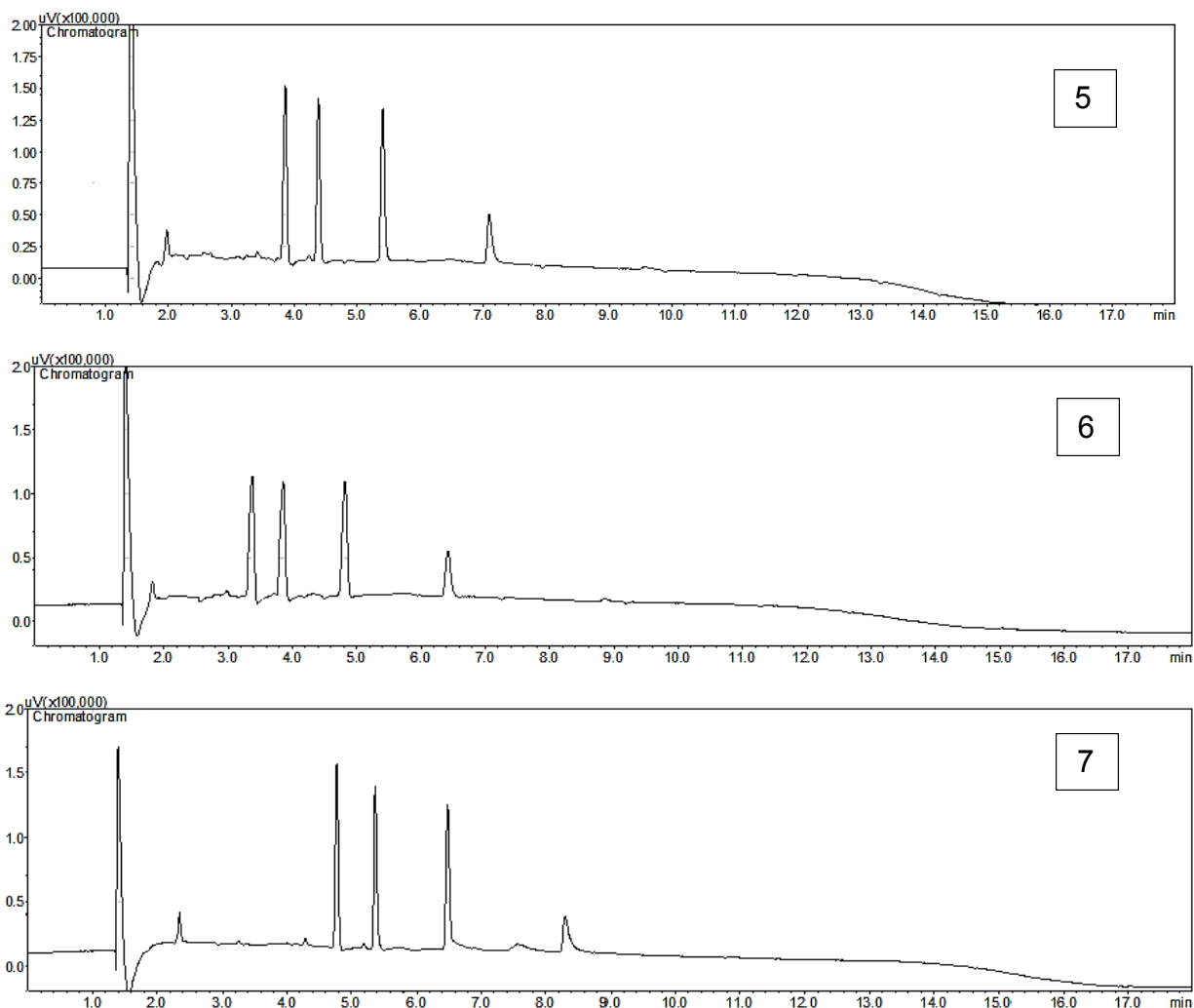
Pela Figura 3 nota-se que há uma mesma tendência para os quatro agrotóxicos, onde os parâmetros rampa inicial ao quadrado ( $B^2$ ) e a interação entre a temperatura inicial e a rampa ( $A*B$ ) foram significativos de maneira que quanto maior esses valores, maior o fator de retenção. Os parâmetros temperatura inicial e rampa inicial também foram significativos para todos os agrotóxicos estudados, porém quanto maior esses parâmetros, menor o fator de retenção.

Em relação à estimativa da largura de pico ( $A/h$ ), foi possível considerar que a tendência geral para os quatro agrotóxicos foram similares ( $b_4A^2 + b_2B + b_1A = (A/h)$ ), sendo que os termos envolvendo a temperatura inicial ( $b_1$  e  $b_4$ ) foram positivos e o termo da rampa inicial ( $b_2$ ) foi negativo. A influência dos parâmetros diminuiu com a ordem dos analitos. Observou-se que os

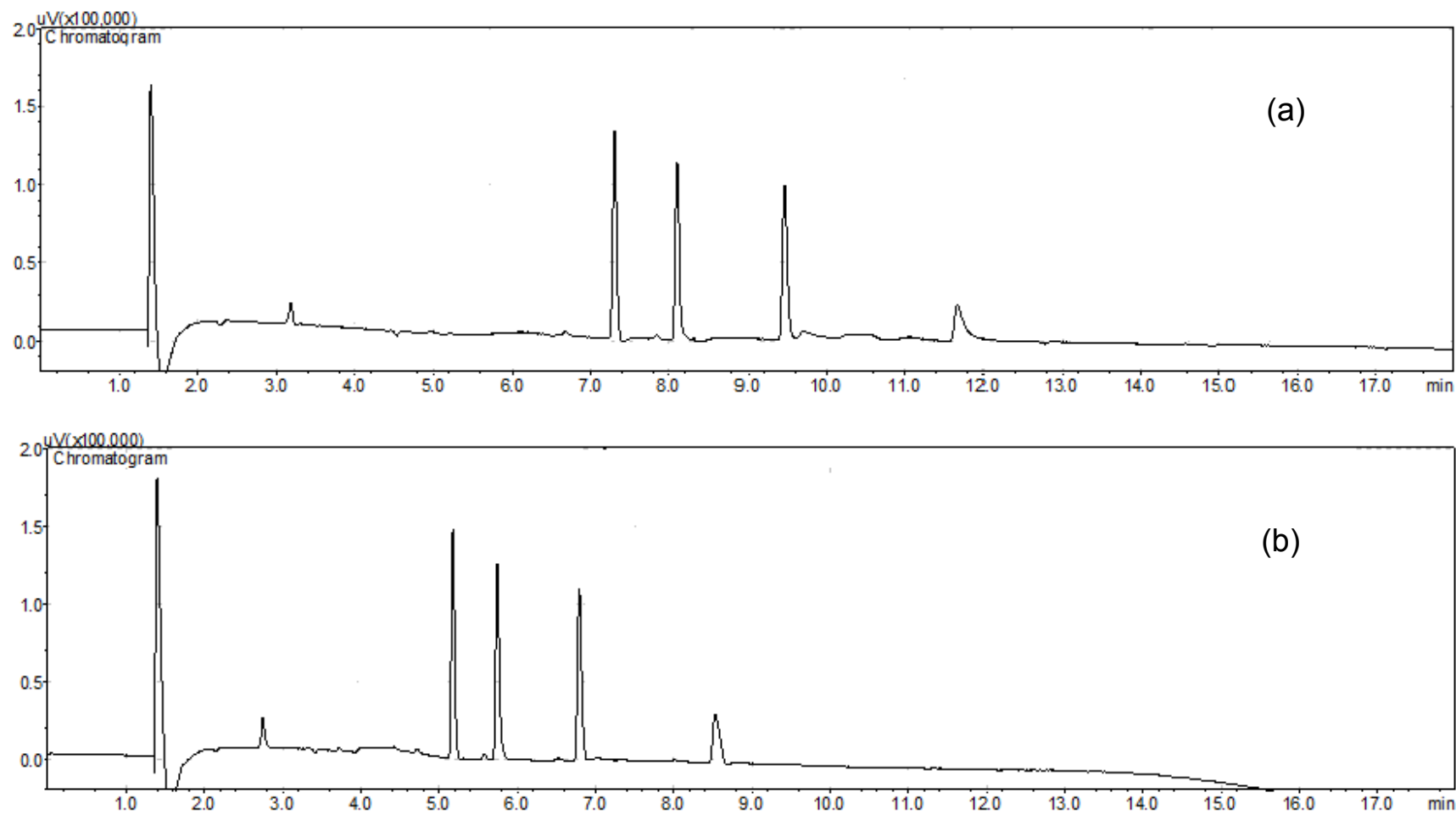
agrotóxicos são influenciados de maneira similar em relação à esses parâmetros.

Os cromatogramas dos ensaios realizados, conforme descrito no item 2.2.1. são mostrados na Figura 4. Para melhor visualizar a influência da temperatura inicial (A) e da rampa inicial (B), pode-se comparar dois cromatogramas com mesmos valores A, variando apenas B e em seguida dois cromatogramas com mesmo valor de B e diferentes valores para A (Figura 5 e 6).

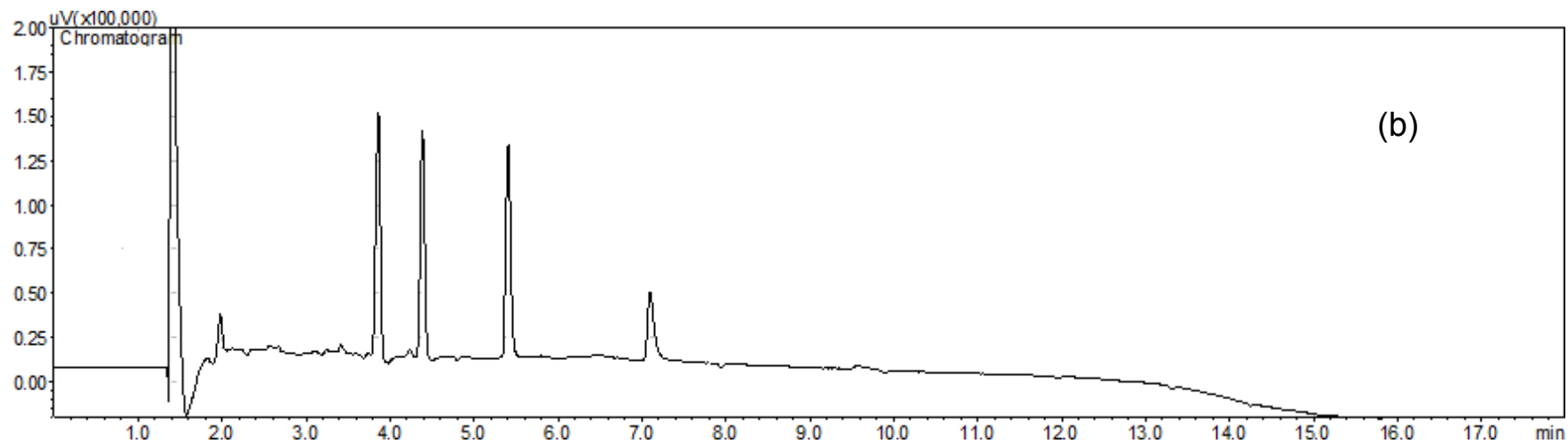
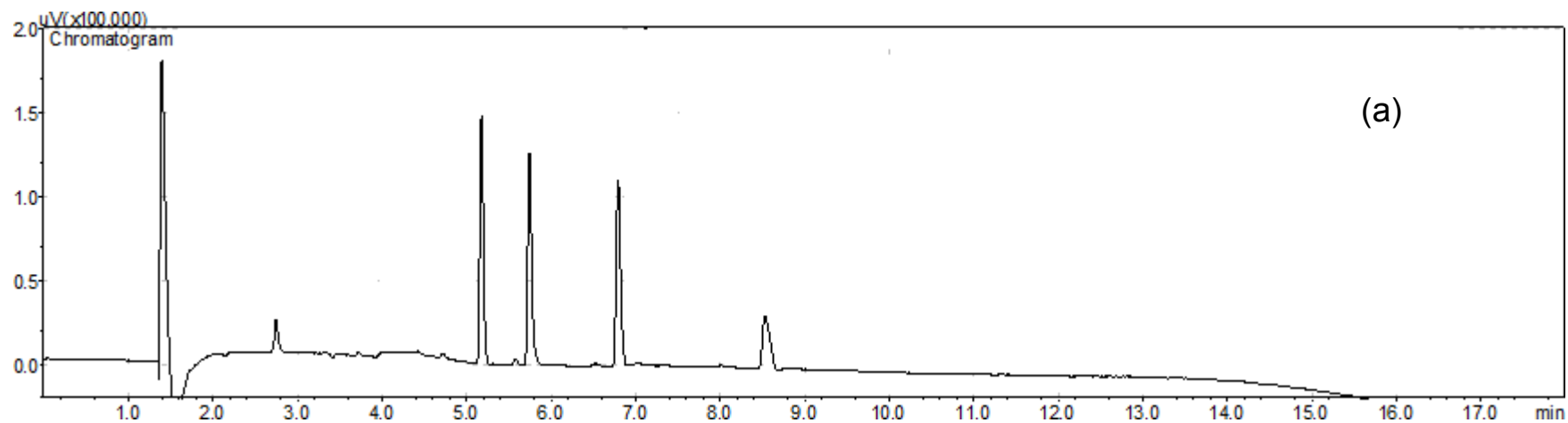




**Figura 4.** Cromatogramas dos experimentos realizados para otimização da temperatura inicial (A) e da rampa inicial (B). Os valores das temperaturas e rampas iniciais para cada um dos cromatogramas apresentados foram: 1: A=120 e B=20; 2: A=140 e B=10; 3: A=140 e B=30; 4: A=180 e B=10; 5: A=180 e B=30; 6: A=200 e B=20; 7: A=160 e B=20. Ordem de eluição dos picos: 1-aldrin, 2-heptachloro epóxido, 3-dieldrin e 4-DDT.



**Figura 5:** Cromatogramas dos ensaios 2(a) e 3(b), onde a temperatura inicial foi de 140 °C nos dois ensaios e a rampa inicial foi de 10 e 30 °C min<sup>-1</sup>, para os ensaios 2(a) e 3(b), respectivamente.



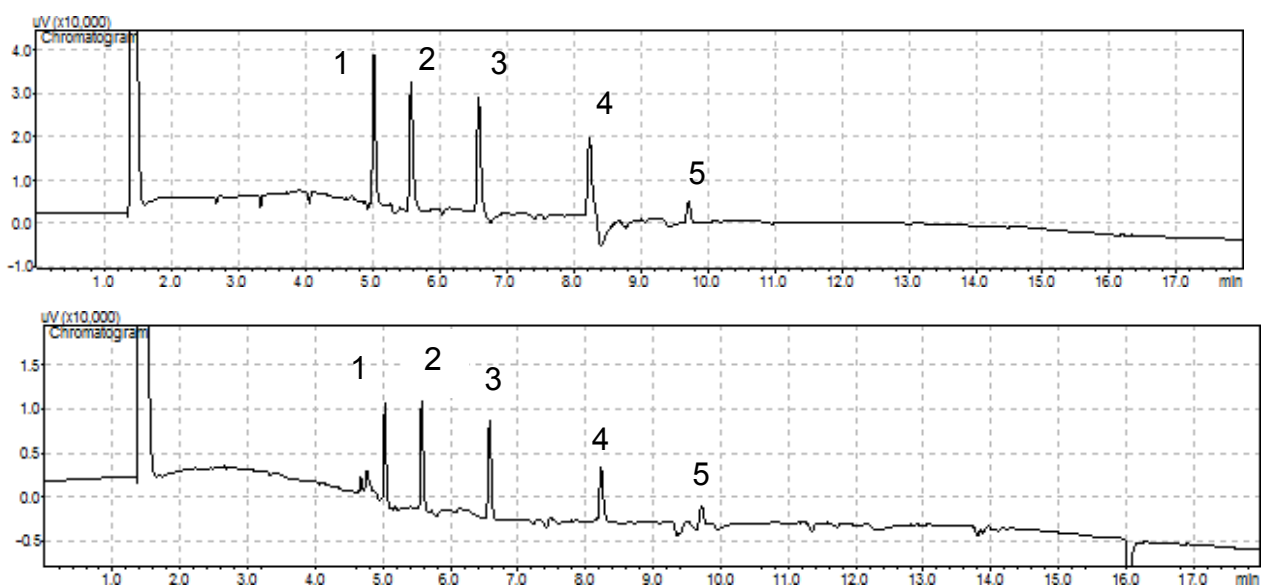
**Figura 6:** Cromatogramas dos ensaios 3(a) e 5(b), onde a rampa inicial foi de  $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  nos dois ensaios e a Temperatura inicial foi de  $140$  e  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para os ensaios 3(a) e 5(b), respectivamente.

Observando as Figuras X, Y e Z nota-se que o aumento da rampa inicial diminui o tempo de corrida, uma vez que os tempos de retenção diminuem. Já o aumento da temperatura, apesar de contribuir para diminuição dos tempos de retenção ocasiona um aumento na largura dos picos, o que não é bom.

Assim, para obter uma menor largura dos picos, um bom fator de retenção, que resulta em uma boa separação destes agrotóxicos, e um menor tempo de corrida, as melhores condições são menores temperaturas iniciais e maiores rampas iniciais. Logo, optou-se por trabalhar com a temperatura inicial em 140 °C e com a rampa de 30 °C min<sup>-1</sup> (ensaio 3).

### 3.2. Análise cromatográfica

Na Figura 7, são apresentados os cromatogramas característicos da solução-padrão contendo os quatro agrotóxicos e do extrato de filé de tilápia fortificado com os mesmos organoclorados. As condições cromatográficas estabelecidas possibilitaram uma boa separação e resolução dos picos analisados. O tempo necessário para eluição dos analitos de interesse e do padrão interno foi de 10 minutos. Entretanto, optou-se por deixar um tempo total de análise, de 15,5 min, para garantir uma limpeza adequada do sistema cromatográfico antes da próxima injeção.



**Figura 7.** Cromatogramas de solução-padrão contendo aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin, DDT na concentração de 180,0 µg L<sup>-1</sup> e bifentrina (padrão interno na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup> (A); e extrato de filé de tilápia

fortificado com os inseticidas na concentração de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  e bifentina na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (B). Aldrin (1):  $t_R = 5,03 \text{ min}$ ; heptacloro epóxido (2):  $t_R = 5,60 \text{ min}$ ; dieldrin (3):  $t_R = 6,58 \text{ min}$ , DDT (4):  $t_R = 8,23 \text{ min}$  e bifentrina (5):  $t_R = 9,72 \text{ min}$ .

A identificação dos organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT foram realizadas por comparação entre os tempos de retenção de cada analito em solução-padrão e no extrato de filé de tilápia fortificado.

### **3.3. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)**

Assim como descrito no item 2.4.2., a otimização foi dividida em 2 etapas, primeiro otimizou-se a mistura extratora e em seguida os tempos de agitação, centrifugação e refrigeração. Os resultados serão apresentados abaixo.

#### **3.3.1. Otimização da mistura extratora usada na ESL/PBT**

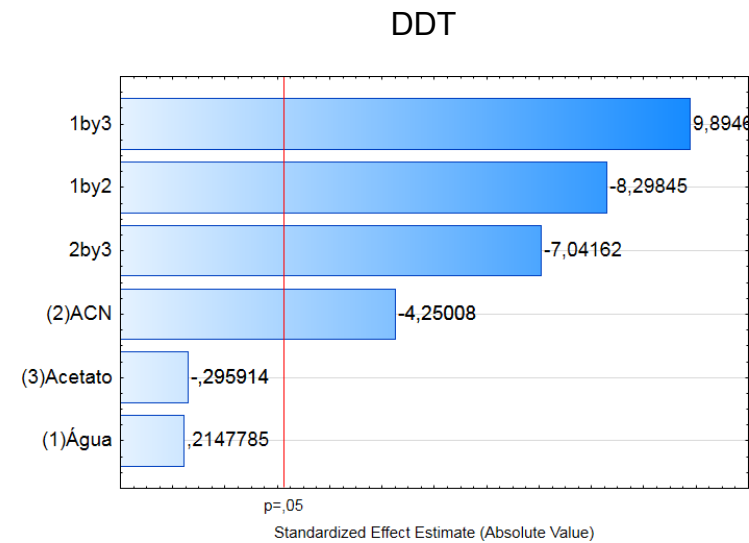
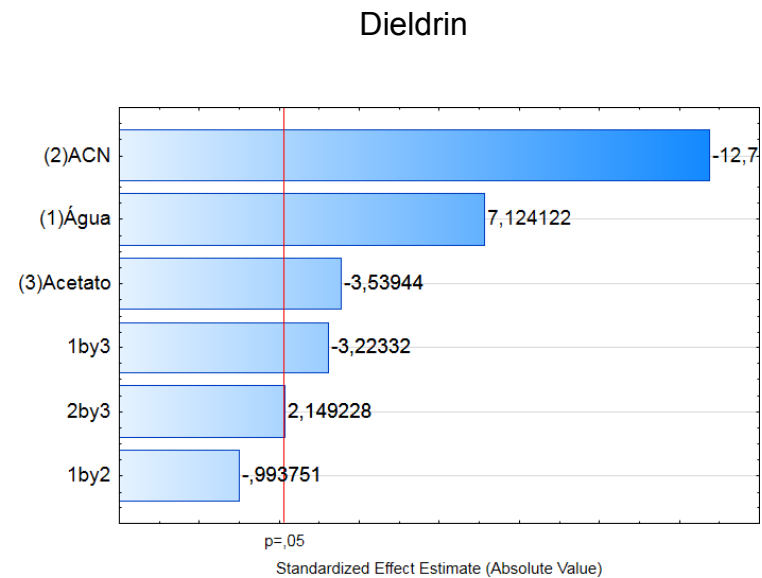
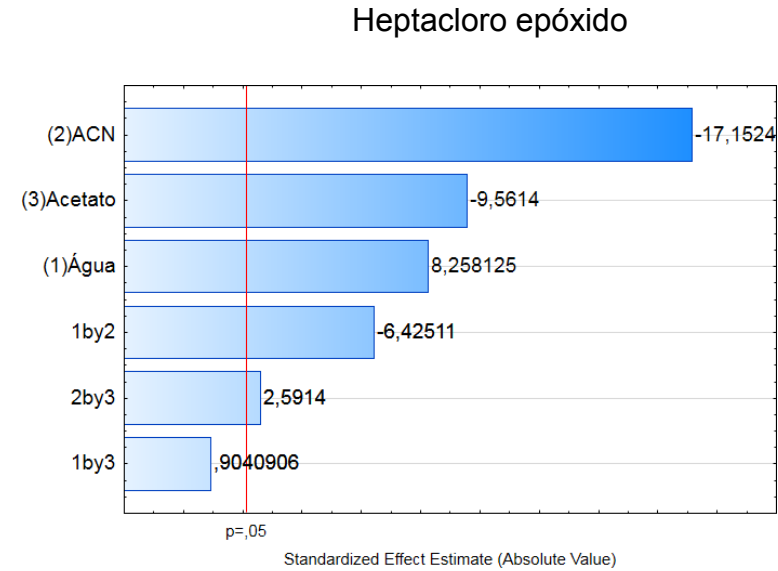
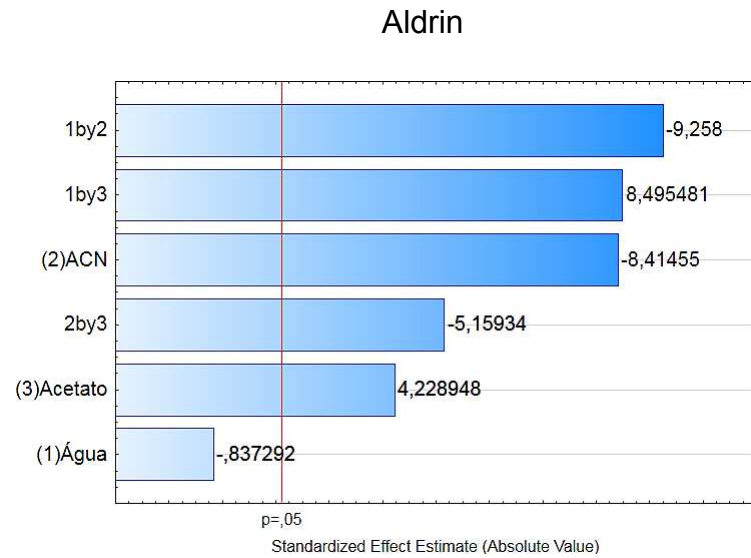
Em 2005, foi desenvolvido, por Vieira (2005), um trabalho que possibilitou a análise de piretróides em água e solo. Para isso foram otimizadas e validadas as técnicas de extração líquido-líquido por partição em baixa temperatura (ELL/PBT) e extração sólido-líquido por partição em baixa temperatura (ESL/PBT). No desenvolvimento do trabalho notou-se que a proporção do volume de acetonitrila, água e acetato de etila na etapa de extração influenciava na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos.

Assim, a escolha do solvente que melhor se adequa à técnica ESL/PBT é muito importante. Dessa forma, neste trabalho foram realizados testes por meio de planejamentos experimentais de misturas extratoras a fim de se estabelecer a proporção ideal entre o volume de água ou solução de cloreto de sódio ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), acetonitrila e acetato de etila que alcançasse a melhor porcentagem de extração dos quatro organoclorados, pela técnica ESL/PBT.

Primeiro, otimizou-se as quantidades de água, acetonitrila e acetato de etila utilizando um planejamento fatorial  $2^3$ , conforme descrito no item 2.4.2.1

e a significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor.

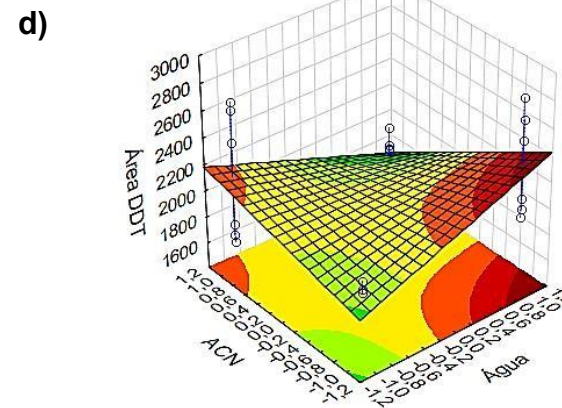
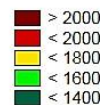
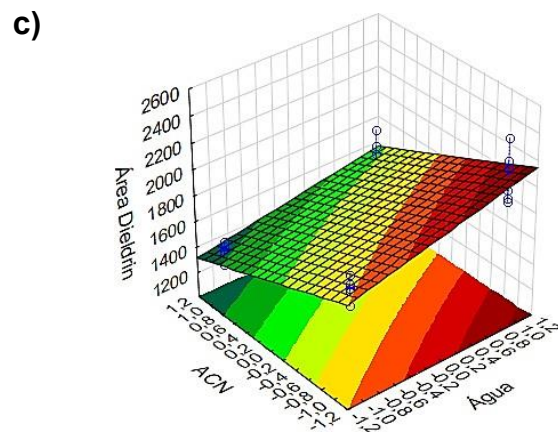
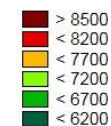
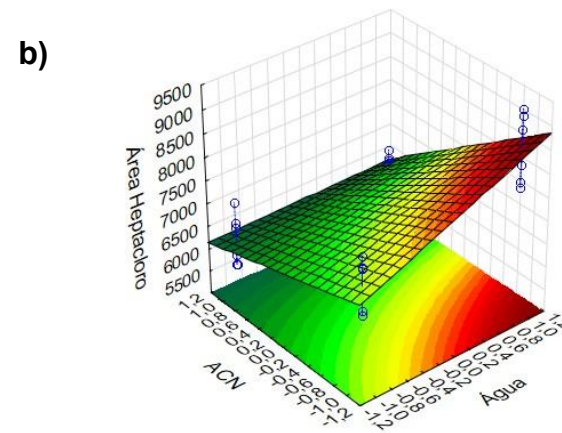
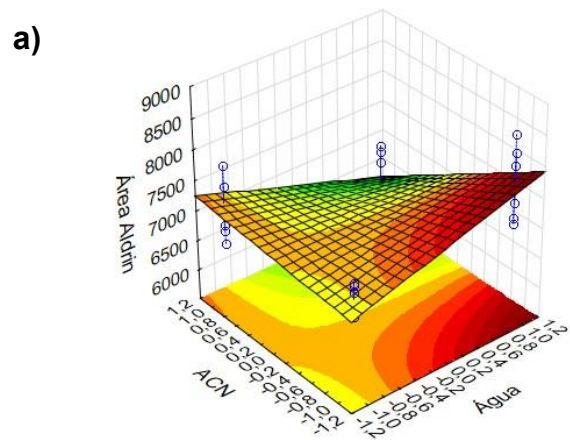
A área normalizada de cada agrotóxico no extrato de cada ensaio, determinada experimentalmente, foi utilizada como resposta para gerar os gráficos de Pareto. Estes gráficos mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos. Quanto mais à direita da linha vermelha a barra estiver mais significativo será o efeito na área normalizada do agrotóxico. Os gráficos foram gerados para cada um dos agrotóxicos, conforme mostrado na Figura 8.



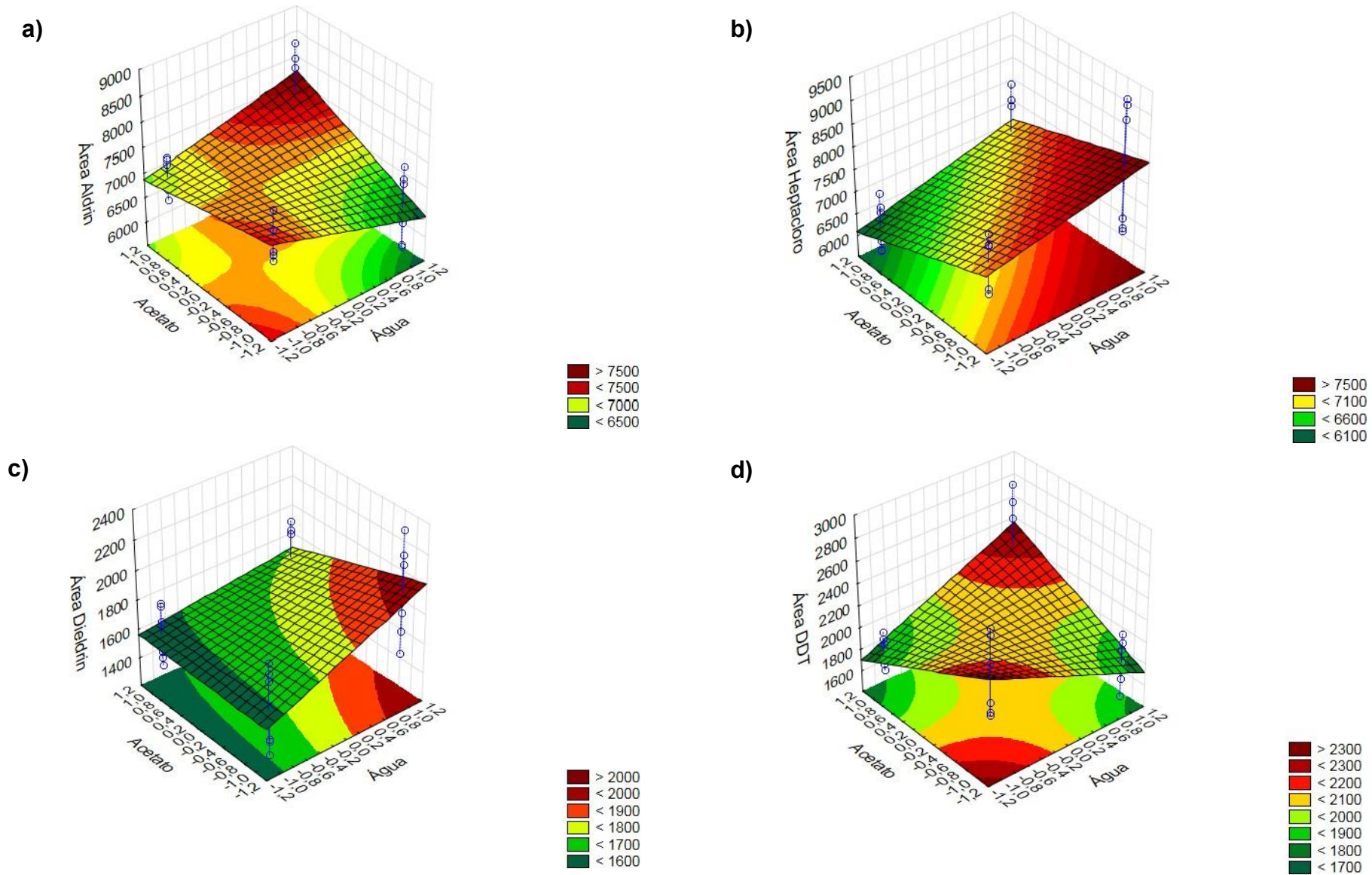
**Figura 8.** Gráfico de Pareto para as variáveis, quantidade de água, acetonitrila, acetato de etila e interações na extração do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em filés de tilápia por ESL/PBT.

De acordo com os gráficos de Pareto apresentados na Figura 8 nota-se que a variável acetonitrila foi significativa, interferindo de maneira negativa, para os quatro agrotóxicos, ou seja, quanto menor a quantidade de acetonitrila maior a resposta. Já a quantidade de acetato influenciou de maneira positiva a resposta do aldrin e de maneira negativa os organoclorados heptacloro e dieldrin, enquanto que para o DDT a adição do acetato não foi significativa. A variável água não foi significativa para o aldrin e DDT, porém, influenciou de maneira positiva nas respostas dos agrotóxicos heptacloro e dieldrin, ou seja, uma maior quantidade de água implica em uma melhor resposta para estes dois agrotóxicos.

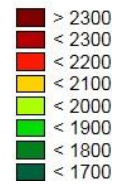
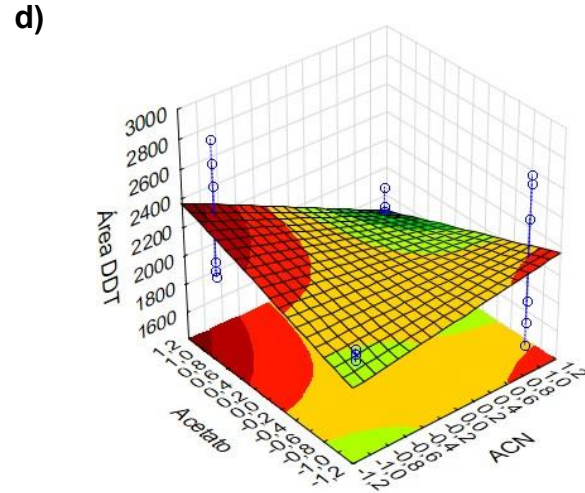
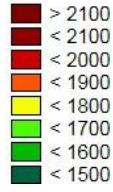
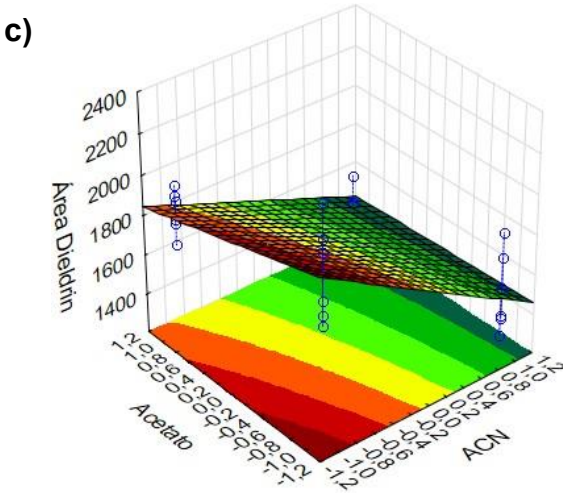
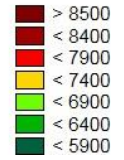
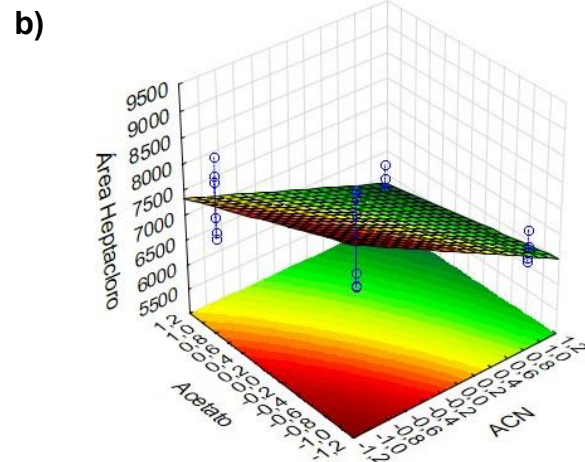
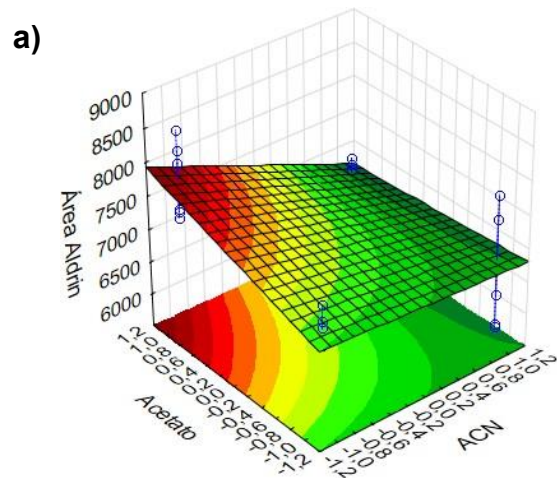
As interações entre os fatores, dois a dois, podem ser melhor avaliadas a partir das superfícies de respostas, que estão presentes nas Figuras 9, 10 e 11.



**Figura 9.** Superfície de respostas representando a interação entre a quantidade de acetonitrila (ACN) e de água para um planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 10.** Superfície de respostas representando a interação entre a adição de acetato de etila e a quantidade de água para um planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 11.** Superfície de respostas representando a interação entre a adição de acetato de etila e a quantidade de acetonitrila (ACN) para um planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.

Analisando a Figura 9, que representa a interação entre a quantidade de água e de acetonitrila, pode-se observar um mesmo comportamento para os quatro agrotóxicos, onde menores valores de acetonitrila e maiores valores de água resultam em uma maior resposta.

A interação entre a quantidade de água e a adição de acetato de etila, representada na Figura 10, teve comportamento semelhante para o aldrin e DDT, de maneira que estes fatores são diretamente proporcionais, ou seja, o aumento da quantidade de água e a adição do acetato de etila aumentam a resposta. Essa mesma interação teve comportamento semelhante entre o heptacloro e o dieldrin, porém, nesse caso, maiores respostas são obtidas quando não se adiciona acetato de etila juntamente com um aumento na quantidade de água.

Observando a Figura 11, nota-se que a interação entre a quantidade de acetonitrila e de acetato de etila teve uma mesma tendência para o aldrin e o DDT, sendo que maiores quantidades de acetato de etila e menores quantidades de acetonitrila ocasionam um aumento na resposta. Já para os agrotóxicos heptacloro e dieldrin menores quantidades de acetonitrila e de acetato de etila implicam em uma maior resposta.

De posse dessas análises dos gráficos de Pareto e das superfícies de resposta, pode-se concluir que de uma maneira geral, para os quatro agrotóxicos, as melhores condições seriam maiores volumes de água, menor quantidade de acetonitrila e não adicionar acetato de etila. Porém, apesar de uma maior quantidade de água melhorar a extração observou-se durante os experimentos, que ao colocar 2,0 mL de água, a separação das fases durante o congelamento era dificultada e ao recolher o extrato uma pequena quantidade de água permanecia na fase orgânica. Assim, por questões práticas, deve-se utilizar menor quantidade de acetonitrila, menor quantidade de água e não adicionar acetato de etila (6,5 mL de ACN + 1,0 mL de água), para se ter uma melhor extração simultânea dos quatro agrotóxicos.

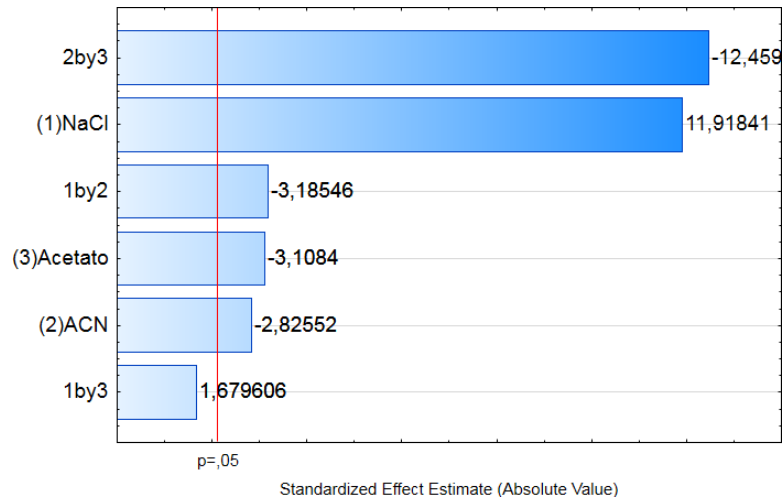
Após saber qual seria a quantidade dos solventes e de água ideais para se obter uma melhor extração foi realizado um segundo planejamento  $2^3$ , a fim de avaliar a força iônica, cujo aumento é sempre recomendado na extração de agrotóxicos em amostras aquosas, pois a adição de um sal à mistura extratora pode melhorar a taxa de recuperação, particularmente, no caso de analitos

polares. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fase orgânica (LANÇAS, 2004).

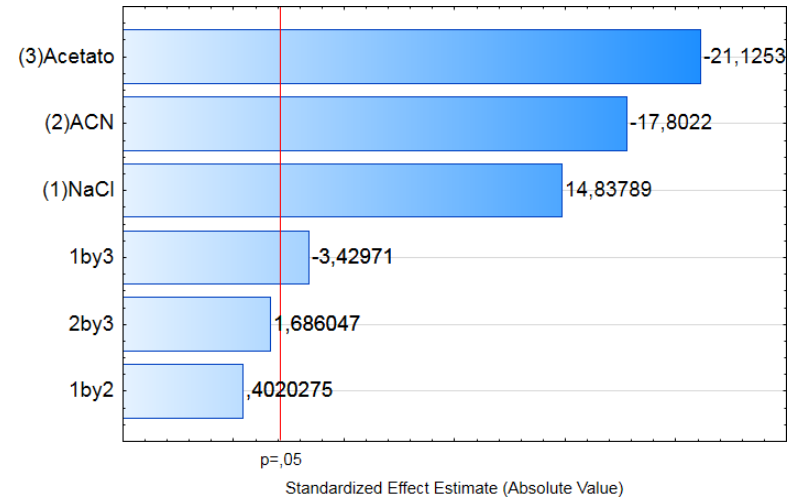
Assim, para manter as características da mistura extratora e avaliar o efeito da força iônica, o volume de água foi substituído por uma solução de NaCl 0,20 mol L<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 2.4.2.1.

O planejamento contou com oito ensaios, conforme a Tabela 5. De posse das áreas normalizadas para cada pico em cada ensaio, obtiveram-se os gráficos de Pareto, mostrados na Figura 12 e as superfícies de resposta, Figuras 13, 14 e 15.

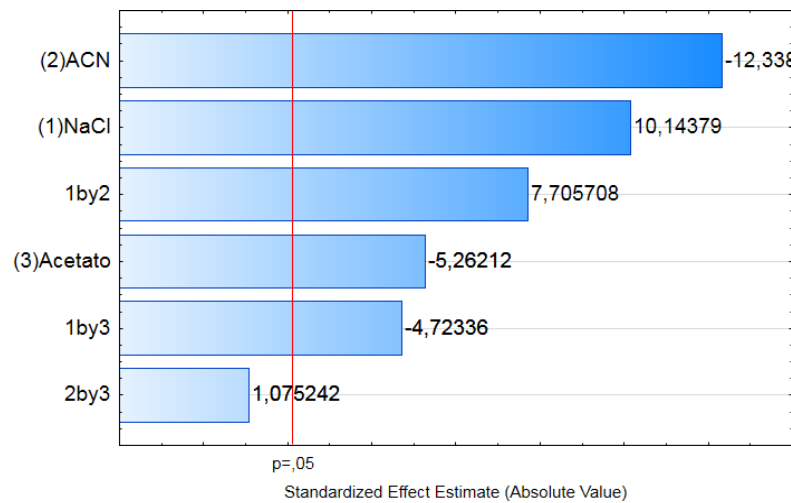
Aldrin



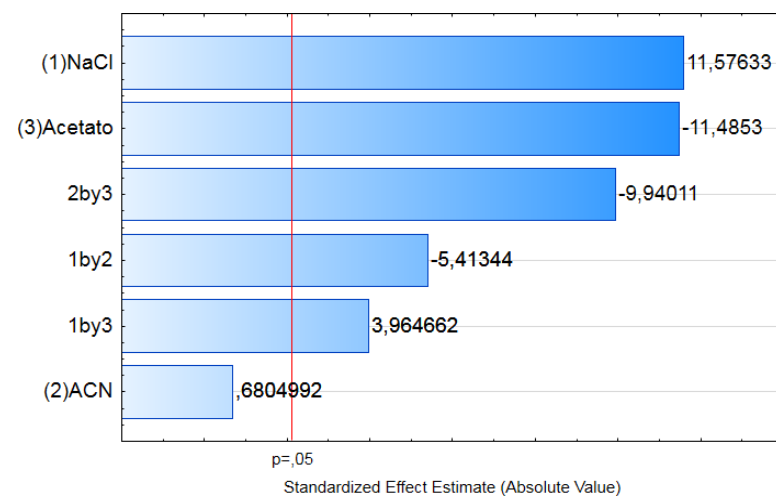
Heptacloro epóxido



Dieldrin



DDT



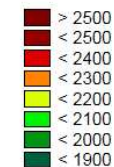
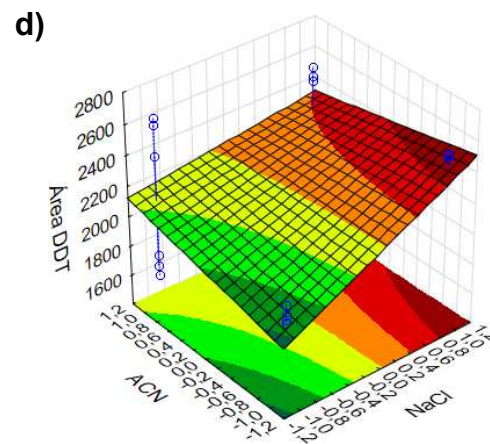
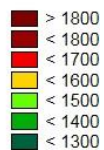
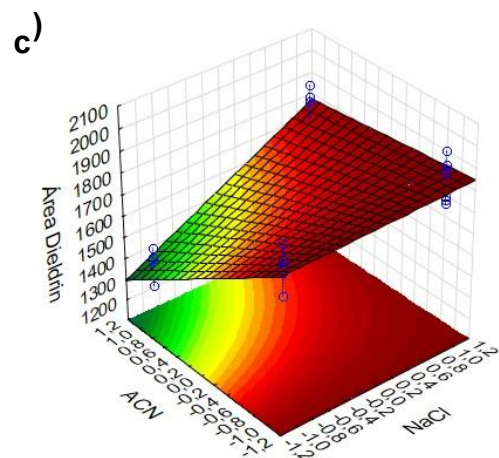
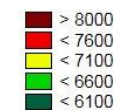
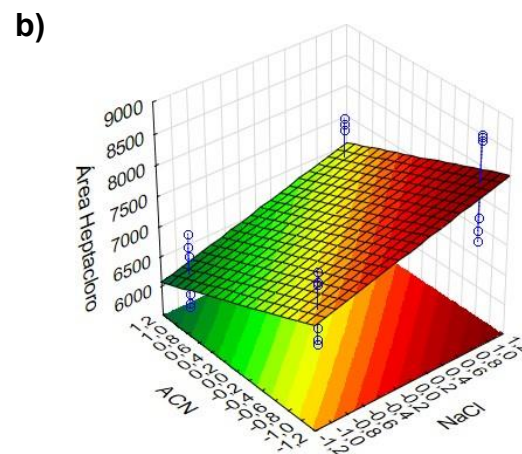
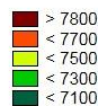
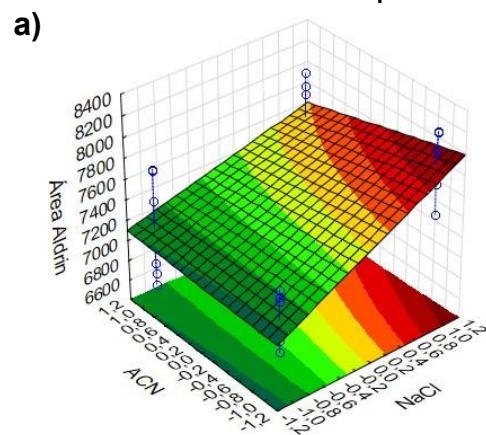
**Figura 12.** Gráfico de Pareto para as variáveis, quantidade de acetonitrila, adição de NaCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>, acetato de etila e interações na extração do Aldrin, Heptacloro epóxido, Dieldrin e DDT em filés de tilápia por ESL/PBT.

Ao observar os gráficos da Figura 12 nota-se que o aumento da força iônica pela adição da solução de NaCl foi significativo, tendo uma influencia positiva na resposta dos quatro agrotóxicos em estudo, favorecendo assim a extração deles pela técnica ESL/PBT.

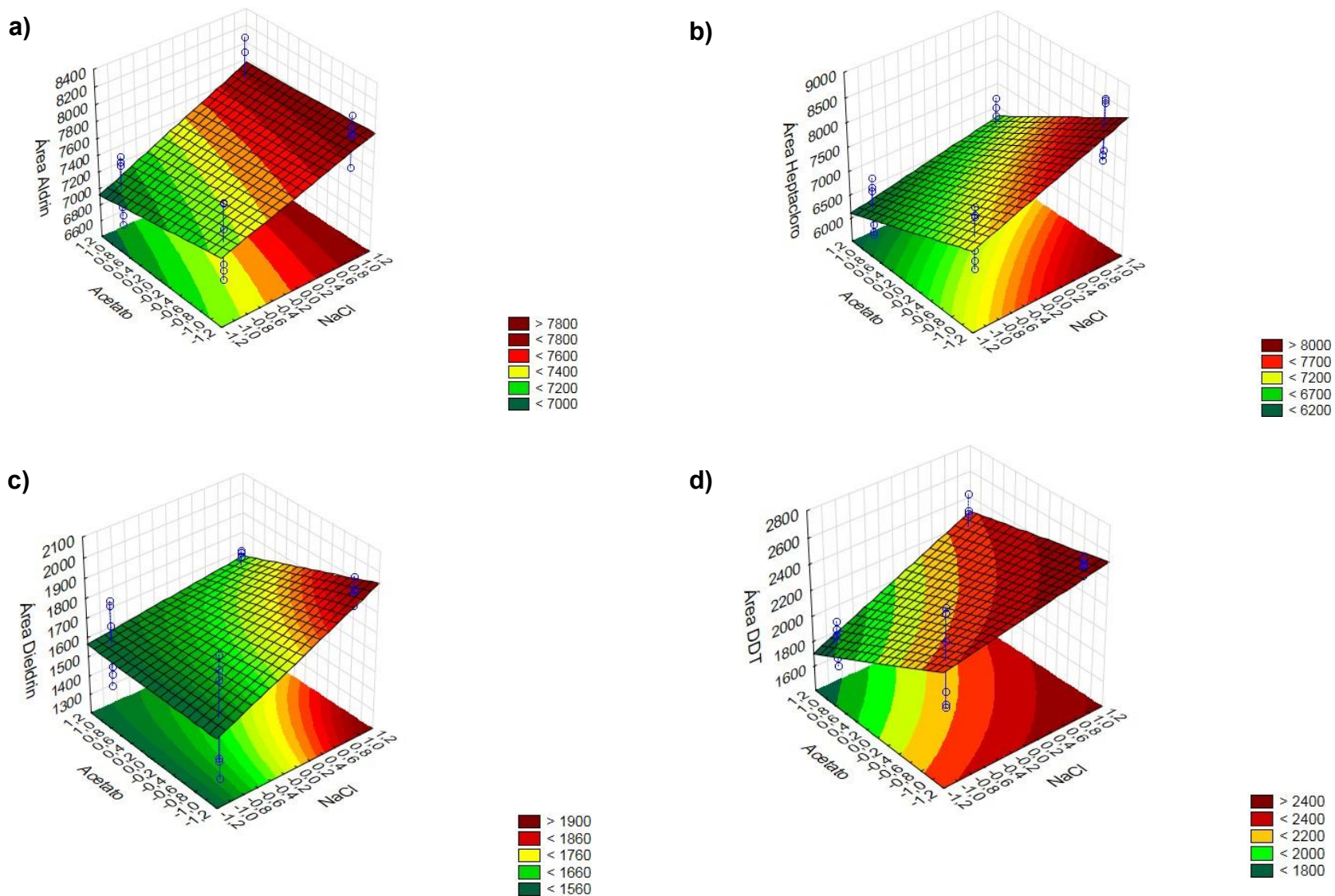
A adição de acetato de etila também foi significativa para os quatro compostos, influenciando de maneira negativa nas respostas destes. Assim, não adicionar acetato favorece a extração.

A variável acetonitrila foi significativa para o aldrin, heptacloro e dieldrin, entretanto interferiu de maneira negativa na resposta dos mesmos, de maneira que quanto menor a quantidade de acetonitrila, melhor a extração. Já para o DDT essa variável não foi significativa.

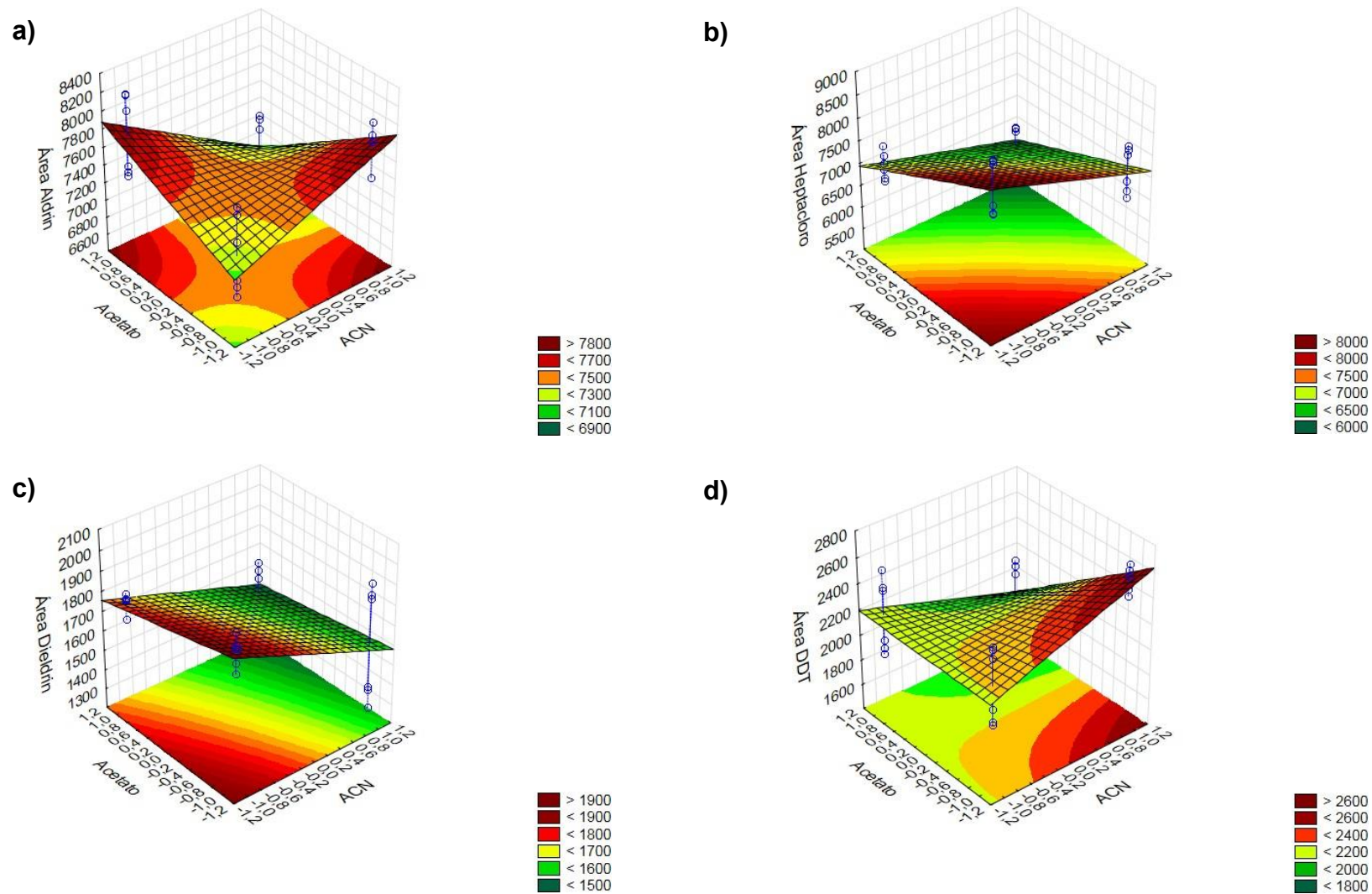
Assim como no primeiro planejamento, foram obtidas as superfícies de resposta para auxiliar na avaliação das interações entre os fatores, dois a dois (Figuras 13, 14 e 15).



**Figura 13.** Superfície de respostas representando a interação entre a quantidade de acetonitrila (ACN) e a adição da solução de NaCl 0,2 mol. L<sup>-1</sup> para um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 14.** Superfície de respostas representando a interação entre a adição de NaCl 0,2 mol. L<sup>-1</sup> e adição de acetato de etila (acetato) para um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptachloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 15.** Superfície de respostas representando a interação entre a quantidade de acetonitrila (ACN) e adição de acetato de etila (acetato) para um planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como resposta a área normalizada de cada pico. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.

A Figura 13 representa a interação entre a adição de NaCl e a quantidade de acetonitrila. Observando essas superfícies de resposta nota-se um comportamento semelhante para os quatro agrotóxicos, onde a adição de NaCl e menores quantidades de acetonitrila resultam em uma maior resposta.

A interação entre a adição de NaCl e a adição de acetato de etila, representada na Figura 14, teve também um comportamento parecido para todos os compostos, de maneira que a adição de NaCl e a não adição de acetato de etila causam um aumento na resposta.

Por fim, ao observar a Figura 15, percebe-se que a interação entre a quantidade de acetonitrila e a adição de acetato de etila teve uma mesma tendência para o heptacloro e o dieldrin, sendo que menores quantidades de acetato de etila e menores quantidades de acetonitrila ocasionam um aumento na resposta. Para o aldrin, essas duas variáveis são inversamente proporcionais, sendo assim menores quantidades de acetonitrila e a adição do acetato de etila ou maiores quantidades de acetonitrila e não adicionar acetato de etila ocasionará um aumento resposta. Para o DDT essa interação também é negativa, porém somente uma maior quantidade de acetonitrila e menor quantidade de acetato de etila levam a uma maior resposta.

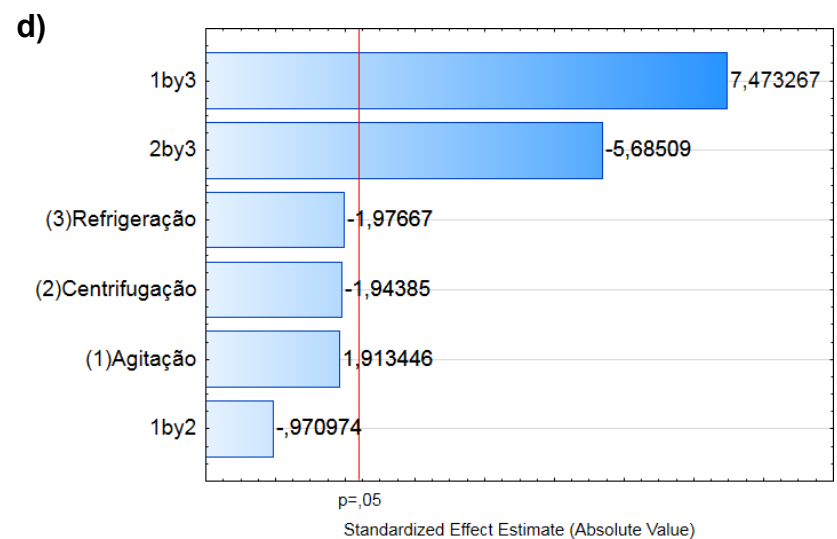
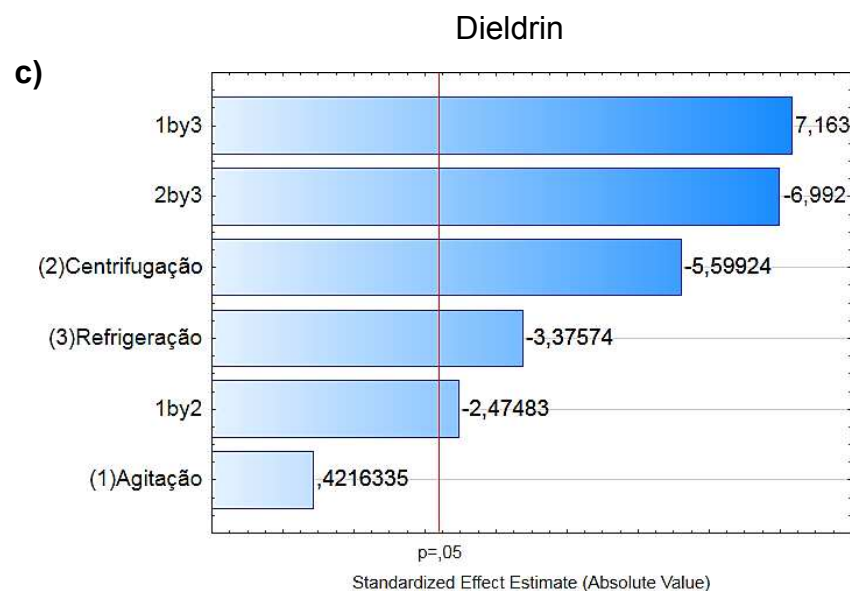
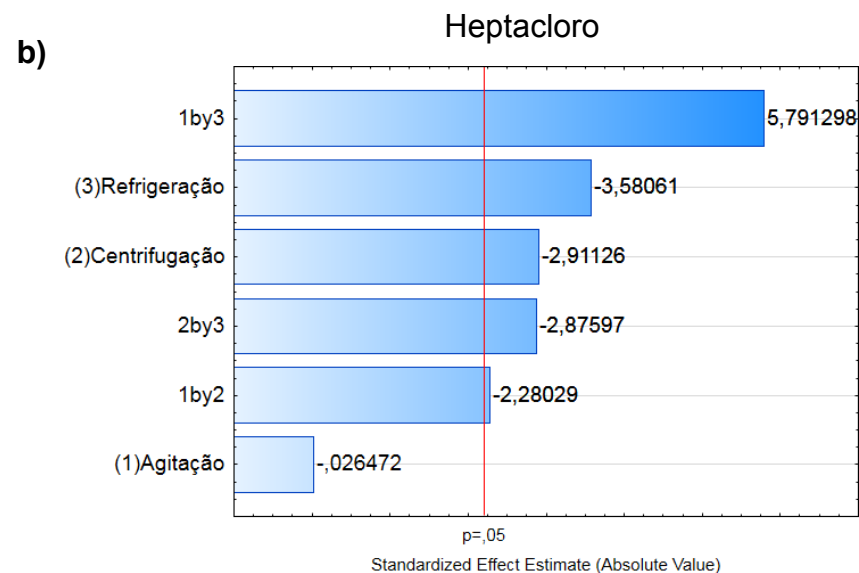
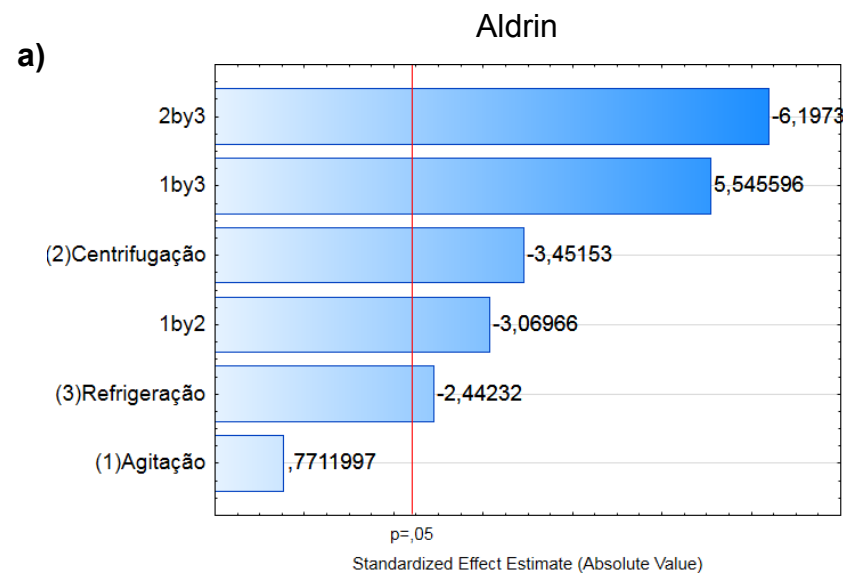
Realizado o estudo dos dois planejamentos experimentais pode-se definir a condição ideal, que melhor extrai os quatro agrotóxicos simultaneamente pela técnica ESL/PBT. Concluindo então que a mistura extratora deve ser composta por uma menor quantidade de acetonitrila, pelo aumento da força iônica, por meio da adição de uma solução de NaCl no lugar da água, não havendo a necessidade de mudar a polaridade dessa mistura pela adição de acetato de etila (6,5 mL de ACN + 1,0 mL de solução de NaCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>). Assim, além de extrair simultaneamente os quatro organoclorados com mais eficiência, fez-se uso de um menor volume de solvente orgânico.

### **3.3.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e refrigeração.**

Outros parâmetros importantes que devem ser otimizados para obter uma melhor extração pela técnica ESL/PBT são, o tempo de agitação, centrifugação e refrigeração após o contato da matriz com a solução extratora anteriormente otimizada.

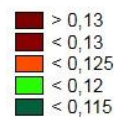
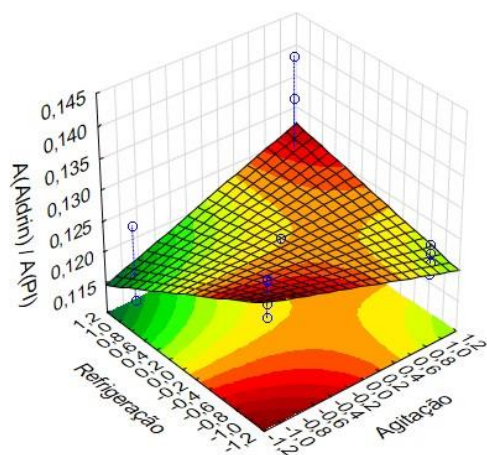
Para avaliar a condição ótima para essas três variáveis foi feito um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), sendo o experimento feito em duplicata, conforme descrito no item 2.4.2.2.

Nesse planejamento, a razão entre a área do analito e a área do padrão interno, determinada experimentalmente, foi utilizada como resposta para gerar os gráficos de Pareto e as superfícies de resposta, que possibilitam verificar quais os efeitos e as interações são estatisticamente significativos. Os gráficos de Pareto gerados para cada um dos agrotóxicos estão dispostos na Figura 16 e as superfícies de respostas nas Figuras 17, 18 e 19.

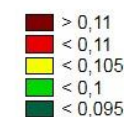
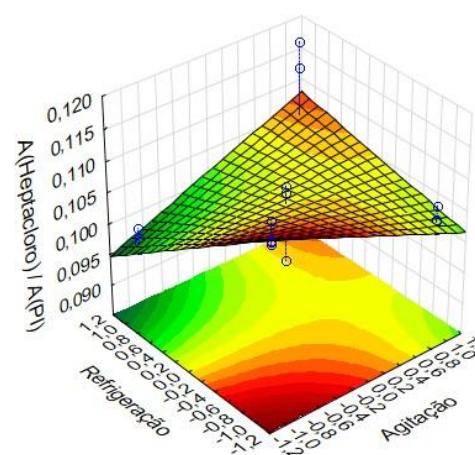


**Figura 16.** Gráfico de Pareto para as variáveis, tempo de agitação, centrifugação e refrigeração e suas interações na extração do Aldrin, Heptacloro epóxido, Dieldrin e DDT em filés de tilápia por ESL/PBT.

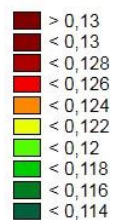
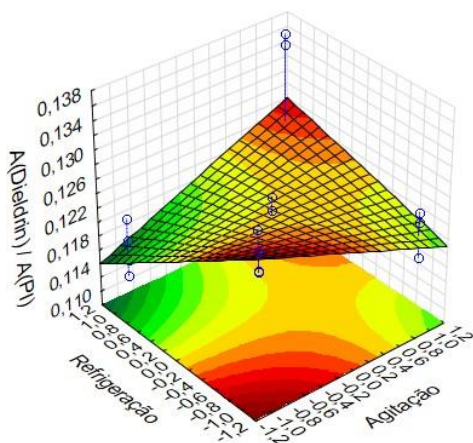
a)



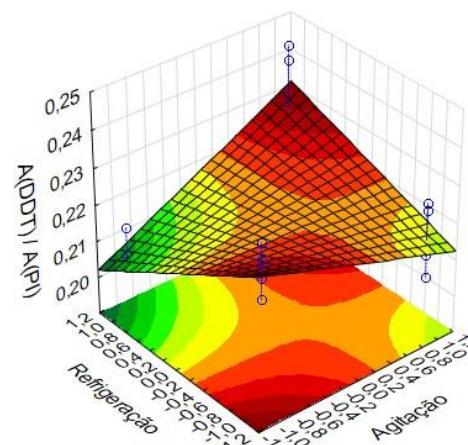
b)



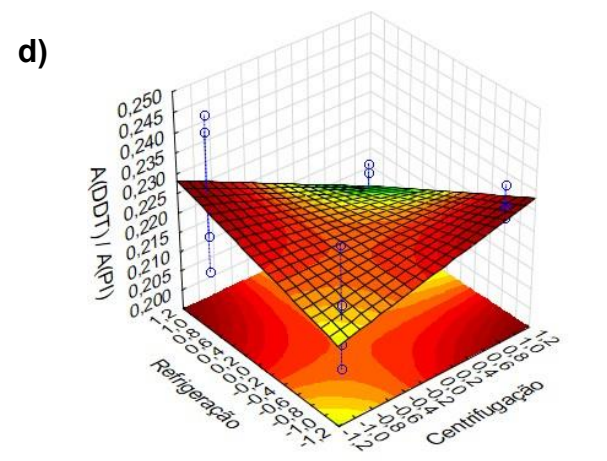
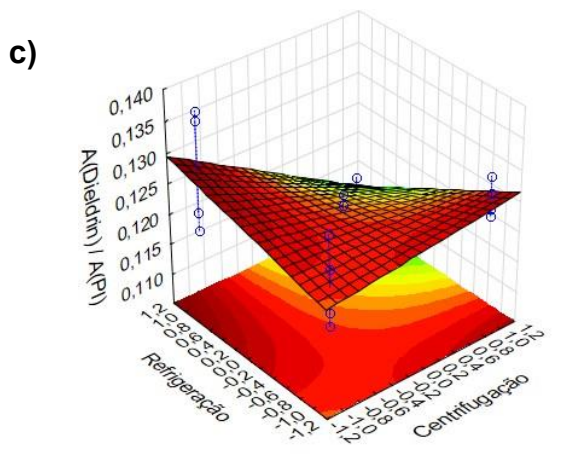
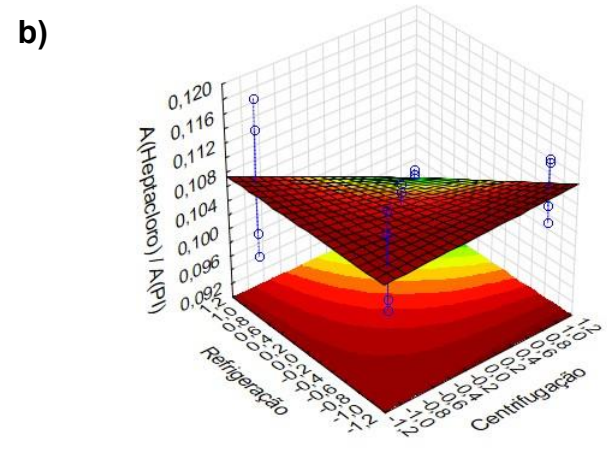
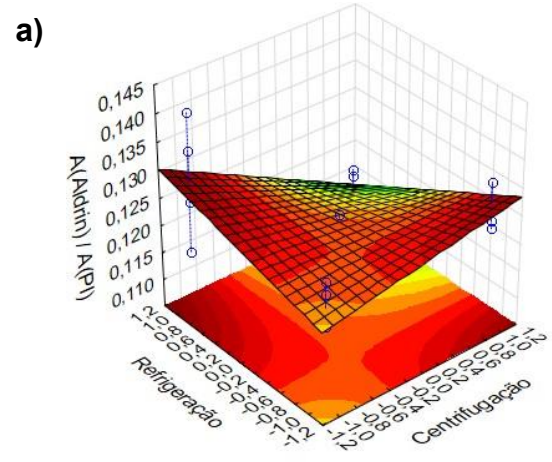
c)



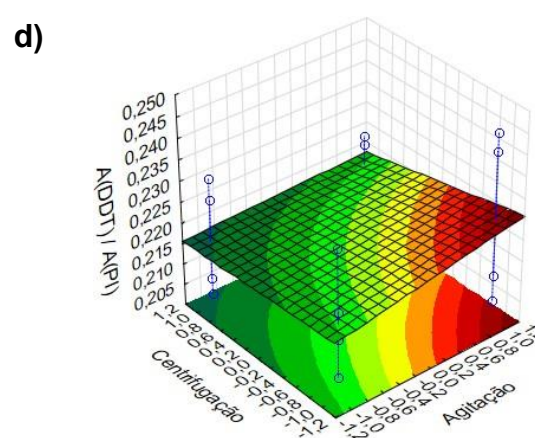
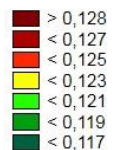
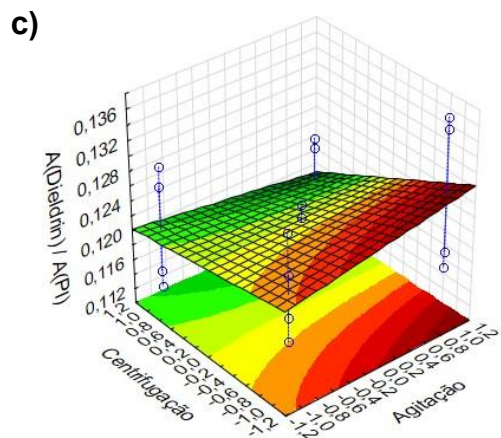
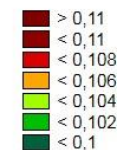
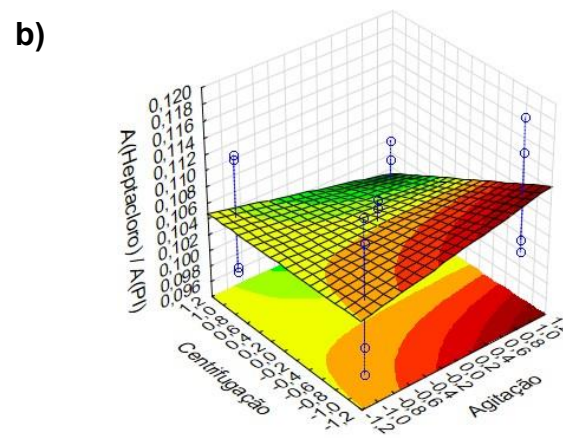
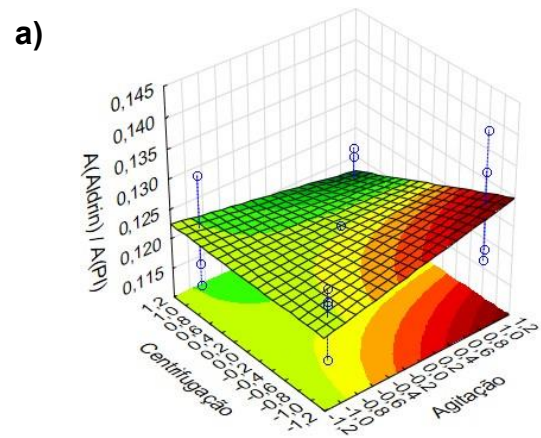
d)



**Figura 17.** Superfície de respostas representando a interação entre o tempo de refrigeração e de agitação para um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo como resposta a razão entre a área do analito e a área do padrão interno. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 18.** Superfície de respostas representando a interação entre o tempo de refrigeração e de centrifugação para um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo como resposta a razão entre a área do analito e a área do padrão interno (PI). Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 19.** Superfície de respostas representando a interação entre o tempo de centrifugação e de agitação para um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo como resposta a razão entre a área do analito e a área do padrão interno. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro, (c) Dieldrin e (d) DDT.

Pelos gráficos de Pareto observa-se que o tempo de refrigeração e de centrifugação foi significativo, contribuindo negativamente para o Aldrin, Heptacloro epóxido e Dieldrin, ou seja, quanto menor esses tempos maiores serão as respostas. Para esses mesmos três agrotóxicos citados anteriormente o tempo de agitação não foi significativo. Para o DDT, nenhuma das variáveis foram significativas.

As interações entre as variáveis podem ser melhor avaliadas pelas superfícies de resposta que podem ser observadas nas Figuras 17,18 e 19. O tempo de refrigeração e de agitação teve uma interação semelhante para os quatro organoclorados, conforme pode ser visto na Figura 17, sendo que para as duas variáveis, menores tempos refletem em um aumento na resposta.

Ao observar a Figura 18, percebe-se que a interação entre a agitação e a centrifugação teve uma mesma tendência para todos os compostos, sendo que maior tempo de agitação e menor tempo de centrifugação aumentam a resposta.

As interações entre o tempo de refrigeração e de centrifugação foram semelhantes para os quatro agrotóxicos, sendo que de maneira geral observa-se uma melhor resposta para eles quando tem-se elevados tempos de refrigeração e baixos de centrifugação ou quando se tem o inverso, elevados tempos de centrifugação e baixos de refrigeração.

Diante desses resultados, optou-se por trabalhar, com menores tempos de agitação, uma vez que esse parâmetro não foi significativo, e também com menores tempos de centrifugação e refrigeração, pois esses parâmetros influenciaram negativamente nas respostas, assim menores tempos, ou seja, 10 segundos de agitação, 1 minuto de centrifugação e 3 horas de refrigeração, resultam em uma extração mais eficiente, além de reduzir o tempo de preparo da amostra.

#### **3.4. Validação do método analítico**

O processo de validação de um método analítico tem como função garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isso deve apresentar seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

Assim, a técnica ESL/PBT foi validada com base nos parâmetros

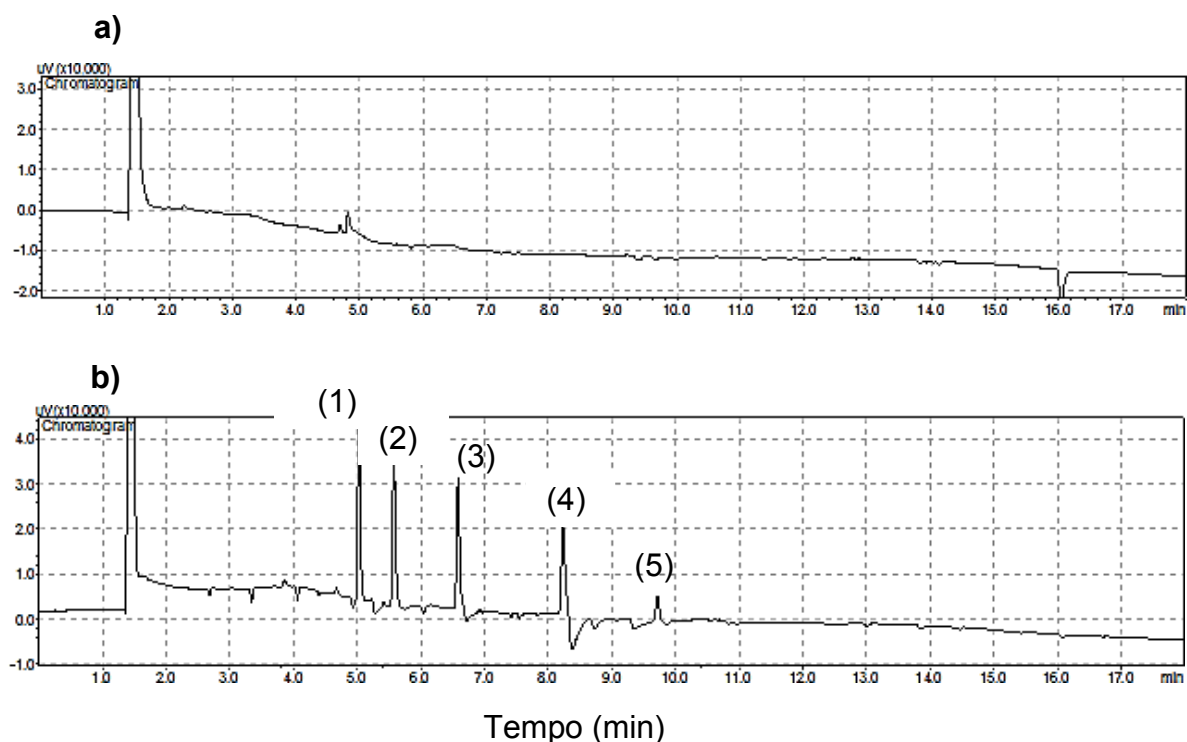
analíticos citados, seguindo as recomendações da ANVISA.

### **3.4.1. Seletividade**

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, uma vez que a seletividade garante que o método possui capacidade de medir exatamente um composto, mesmo que esse esteja na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. (RIBANI et al., 2004 e ANVISA, 2003).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de filés de Tilápia isentos de Aldrin, Heptacloro epóxido e DDT (branco) com os cromatogramas dos extratos das amostras de filés de Tilápia fortificados com os inseticidas. Para obtenção dos extratos as amostras foram submetidas ao procedimento de extração ESL/PBT otimizado.

Os resultados (Figura 20) mostram os cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra isenta dos agrotóxicos (Figura 20a) e para a amostra fortificada com os analitos de interesse (Figura 20b).



**Figura 20.** Cromatogramas, obtidos através do CG/DEC, de extrato das amostras de filé de Tilápia a) isento dos analitos; b) contendo  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de bifentrina (PI): (1) aldrin:  $t_R = 5,026 \text{ min}$ ; (2) heptacloro epóxido:  $t_R = 5,58 \text{ min}$ ; (3) Dieldrin:  $t_R = 6,58 \text{ min}$ , (4) DDT:  $t_R = 8,23 \text{ min}$  e (5) bifentrina:  $t_R = 9,72 \text{ min}$ .

Nota-se que os extratos das amostras de filés de Tilápia não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos analisados. Desta forma, o método otimizado é seletivo para os quatro agrotóxicos analisados e também para o padrão interno.

### 3.4.2. Linearidade de resposta do método

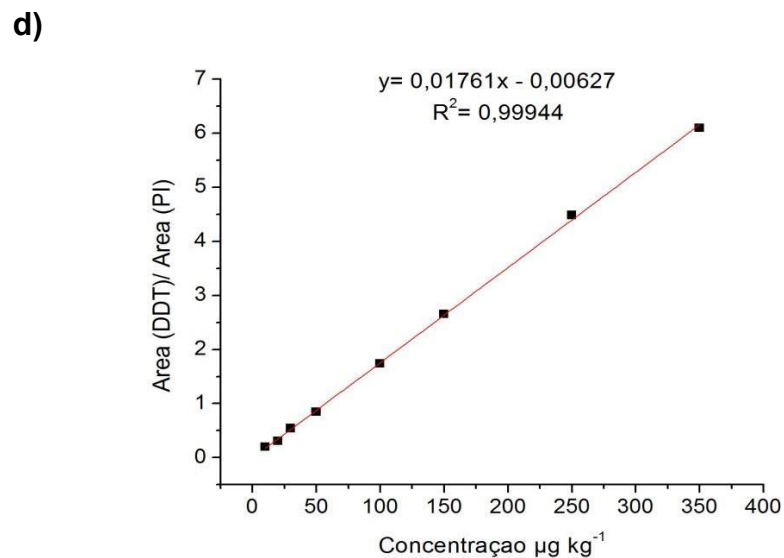
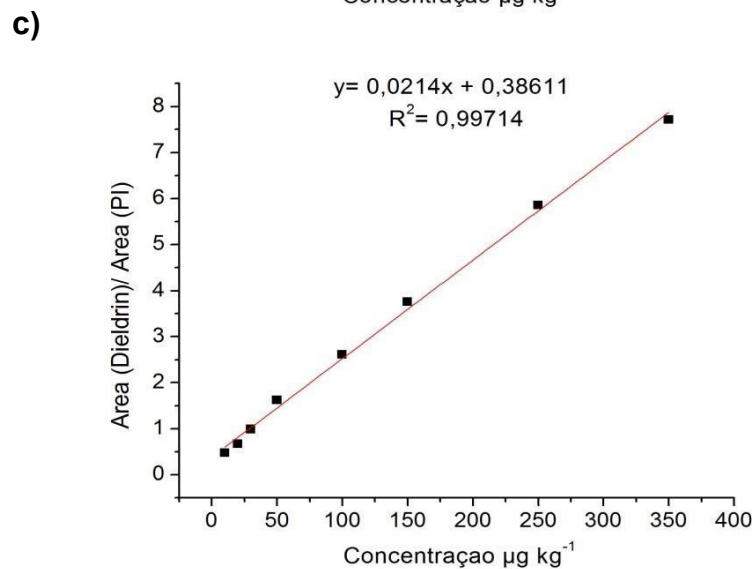
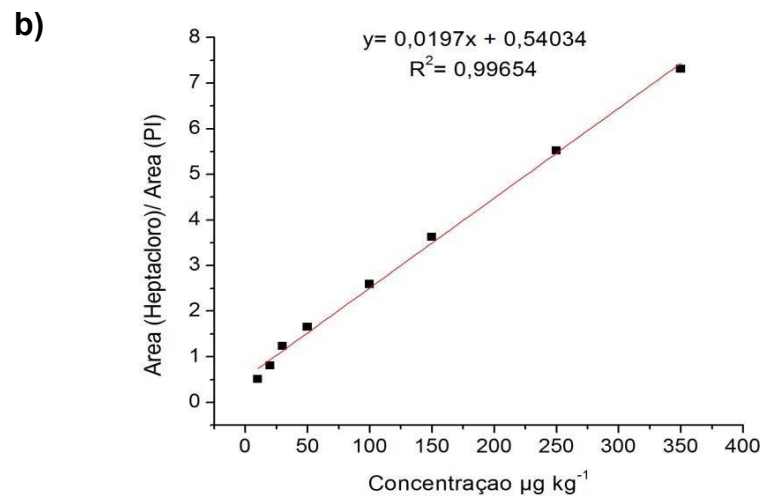
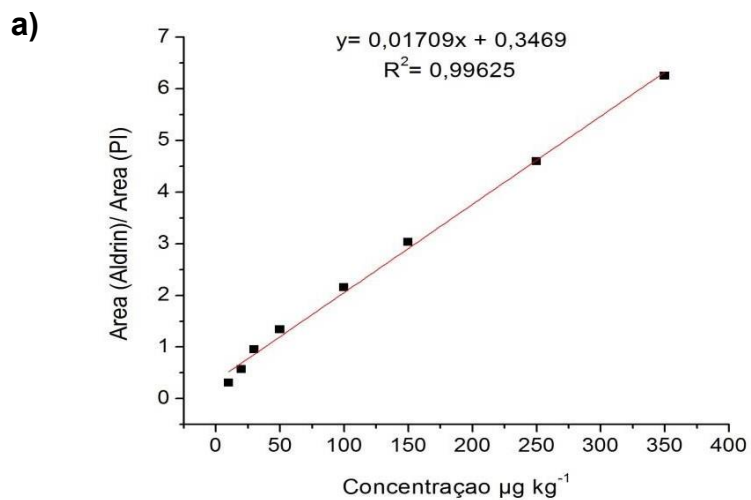
A linearidade indica a capacidade do método em fornecer um resultado diretamente proporcional à concentração do analito. Esse parâmetro está restrito a uma faixa de concentração e pode ser expresso por uma equação da reta, obtida da curva analítica, por meio do coeficiente de correlação (R) (RIBANI *et al*, 2004). As recomendações da ANVISA (2017) determinam que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990.

O método ESL/PBT otimizado foi aplicado em amostras de filés de tilápia fortificados nas concentrações de 10, 20, 30, 50, 100, 150, 250, 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e analisado por CG/DCE. A partir dos dados obtidos foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos e a linearidade destes avaliadas pelo método dos mínimos quadrados.

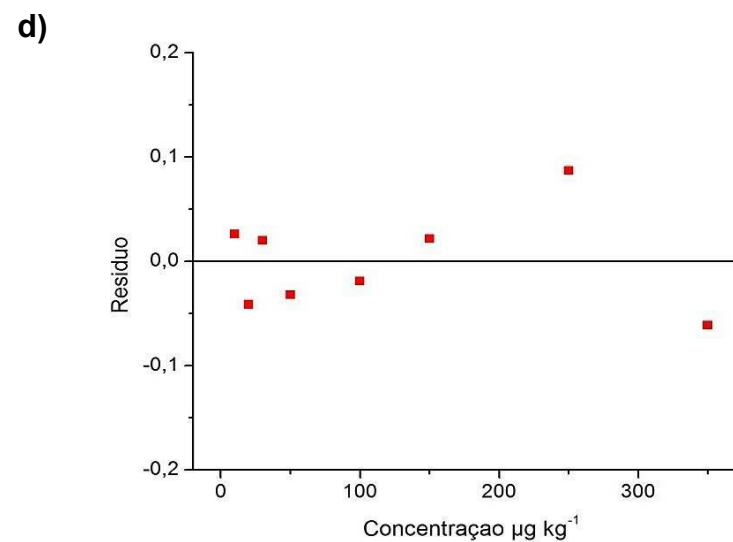
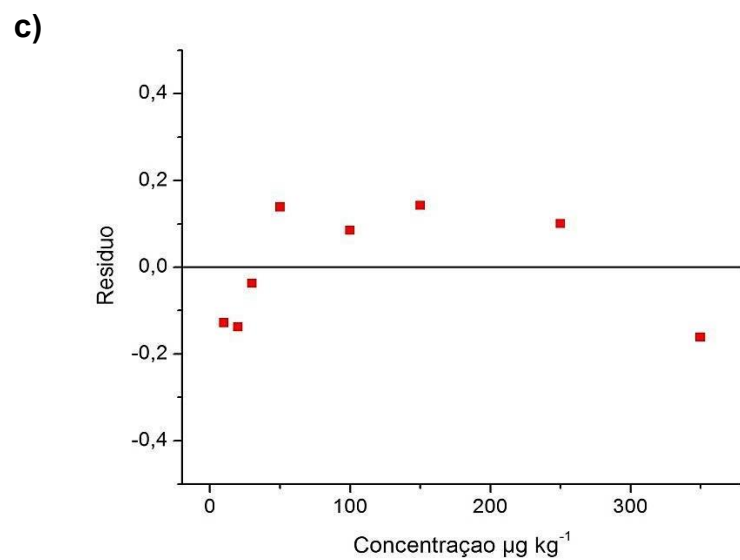
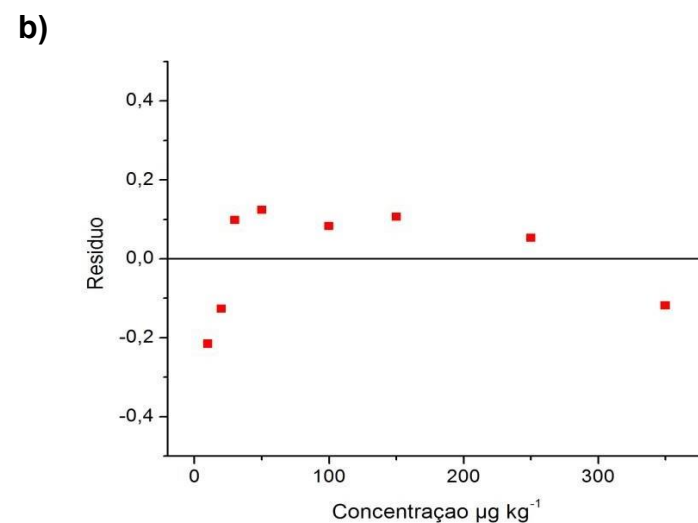
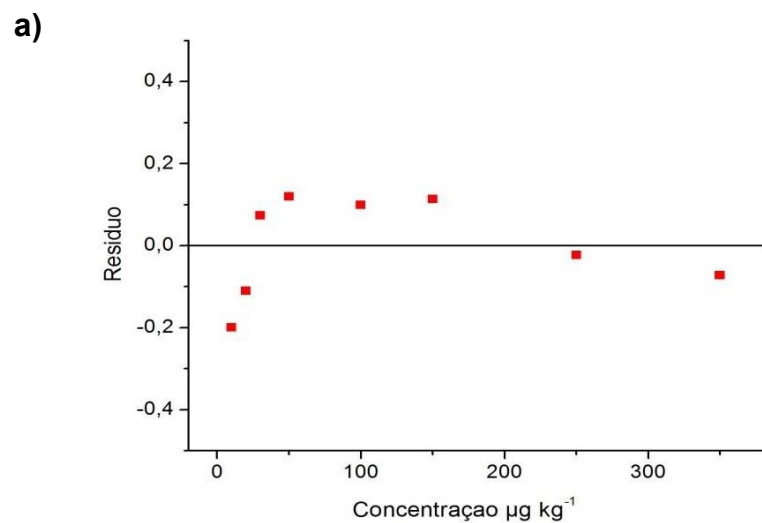
Os valores de R obtidos para a extração dos quatro organoclorados em estudo atendem as exigências da ANVISA, conforme pode ser visto na Tabela 7. Os valores de R foram obtidos extraindo a raiz quadrada dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) conforme mostrados na Figura 21. Aliado a isto, o gráfico de resíduos (Figura 22) demonstra que há uma boa correlação entre as concentrações e a razão entre as áreas dos picos pela área do padrão interno dos inseticidas em análise. Estes resultados indicam que o método desenvolvido é linear para ambos os quatro agrotóxicos, dentro das faixas de concentrações estudadas.

**Tabela 7.** Modelo da curva analítica e coeficientes de correlação do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT, onde x é a concentração em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

<b>Agrotóxico</b>	<b>Equação da curva</b>	<b>Coefficiente de correlação (R)</b>
Aldrin	$A/A_{PI} = 0,01709x + 0,3469$	0,9981
Heptacloro epóxido	$A/A_{PI} = 0,0197x + 0,54034$	0,9983
Dieldrin	$A/A_{PI} = 0,0214x + 0,38611$	0,9986
DDT	$A/A_{PI} = 0,01761x - 0,00627$	0,9997



**Figura 21.** Curvas analíticas preparadas a partir de amostras de filés de tilápia que foram fortificadas com padrão dos analitos, em uma faixa de concentração de 10 a 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , submetidas à ESL/PBT. O extrato foi analisado por CG/DCE. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro epóxido, (c) Dieldrin e (d) DDT.



**Figura 22.** Gráficos de resíduos para as curvas analíticas das amostras de filés de tilápia, em uma faixa de concentração de 10 a 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com extratos analisados por CG/DCE. Sendo: (a) Aldrin, (b) Heptacloro epóxido, (c) Dieldrin e (d) DDT.

### 3.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância a ser analisada que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância a ser analisada que pode ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos foram determinados conforme descrito no item 3.5.3. Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os quatro agrotóxicos em estudo.

Agrotóxico	LD/( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LQ/( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Aldrin	1,91	6,30
Heptacloro epóxido	1,20	3,96
Dieldrin	1,11	3,67
DDT	1,32	4,36

Os valores dos limites de detecção obtidos para os agrotóxicos, utilizando CG/DCE estão entre 1,11 e 1,91  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Enquanto os limites de quantificação estão entre 3,67 e 6,30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Devido a falta de controle e fiscalizações adequadas com relação ao uso de produtos químicos na piscicultura, os limites de detecção e quantificação do método para análise de resíduos de organoclorados em filés de tilápia podem ser comparados com os limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pelo MAPA, para os quatro agrotóxicos em carnes bovinas, suínas, equinas e de aves conforme Tabela 1. Pela comparação pode-se notar que o LD e LQ do método estão bem abaixo dos valores máximos permitidos para as carnes citadas acima, ou seja, aquelas que estão devidamente regulamentadas pelo MAPA.

### 3.4.4. Exatidão

A exatidão pode ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método analítico em estudo em comparação com um valor verdadeiro. Esta deve ser verificada contemplando o intervalo linear do método analítico, sendo que as determinações devem ser realizadas em três concentrações, uma baixa, uma média e uma alta, cada nível em triplicata, totalizando assim nove ensaios (ANVISA, 2017).

A exatidão do método ESL/PBT-CG/DCE proposto neste trabalho foi realizada por meio de ensaios de recuperação conforme as recomendações da ANVISA (2017). Os ensaios foram feitos em triplicata nas concentrações de 30, 100 e 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os quatro organoclorados. A porcentagem de recuperação (%R) e o coeficiente de variação (CV) obtido pela extração de cada um dos analitos presentes nas amostras de filés de Tilápia estão dispostos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de amostras de filés de tilápia fortificadas em três níveis de concentração

<b>Analitos</b>	<b>Concentração Nominal (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>CV</b>	<b>%R</b>
Aldrin	30	11,6	115,1
	100	3,03	101,4
	350	2,26	84,50
Heptacloro	30	13,4	100,5
	100	3,49	98,54
	350	1,53	86,03
Dieldrin	30	8,45	92,49
	100	5,09	98,34
	350	1,99	85,34
DDT	30	10,6	95,78
	100	6,45	90,91
	350	4,04	83,52

Os resultados obtidos possuem uma recuperação entre 83,5 e 115,1%, e

coeficientes de variação menores que 13,4%, ou seja, dentro da faixa aceitável pela ANVISA (2017). Dessa maneira o método desenvolvido apresenta boa exatidão, sendo adequado para extração e análise de aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em amostras de tilápia.

### **3.4.5. Precisão**

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios independentes com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (ANVISA, 2017). O experimento foi realizado seguindo as normas da ANVISA, sendo realizadas triplicatas de três ensaios de diferentes concentrações (30, 100 e 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Em validação de métodos, a precisão pode ser considerada em níveis de repetitividade e precisão intermediária, podendo ser expressa através do desvio padrão (DV) ou coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD). Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos coeficientes de variação de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2002).

#### **3.4.5.1. Repetitividade**

A repetitividade expressa a dispersão dos resultados nas mesmas condições de operação e em pequenos intervalos de tempo, sendo também chamada de precisão intra-dia. (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004). A repetitividade foi avaliada com nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações contendo três replicatas cada. Os resultados podem ser observados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Coeficientes de variação (CV) obtidos a partir de ensaios realizados em um mesmo dia. As amostras de filés de tilápia foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração.

Analitos	Concentração Nominal	
	(µg kg <sup>-1</sup> )	
Aldrin	30	7,18
	100	6,29
	350	1,65
Heptacloro	30	9,34
	100	4,32
	350	3,84
Dieldrin	30	12,8
	100	11,4
	350	4,73
DDT	30	15,8
	100	5,87
	350	5,92

Os resultados obtidos mostram uma boa repetitividade dos dados, tendo em vista que se trata de amostras complexas.

### 3.4.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária, também conhecida como precisão inter-dia, indica o efeito das variações que ocorre quando se usa o mesmo método analítico, dentro do mesmo laboratório. Sendo essas variações devido a eventos como diferentes dias ou diferentes equipamentos ou diferentes analistas ou uma combinação destes fatores (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

Para este estudo optou-se por avaliar a precisão intermediária do método, variando-se apenas o tempo, ou seja, determinou-se a porcentagem de recuperação do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT por ESL/PBT, no primeiro, terceiro e quinto dia de testes realizados, todos feitos pelo mesmo analista nas mesmas condições.

As porcentagens de recuperação e os coeficientes de variação obtidos para cada composto foram utilizados para a análise da precisão intermediária, e estão apresentados na Tabela 11.

Os resultados obtidos mostram uma boa precisão inter-dia dos dados, pois os valores dos coeficientes de variação variaram de 3,32 a 15,2% e os de recuperação de 89,23 a 112,3%. Como se trata de amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% e recuperações entre 70-120% (RIBANI *et al.*, 2004).

Resultados satisfatórios também foram obtidos por Wang *et al.*, 2017 ao desenvolver um método para análise de organoclorados em peixes empregando QuEChERS seguido de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO). O método obteve recuperações entre 88,1% e 121,2%, com desvios padrão relativos menores que 15%. Os limites de quantificação e os limites de detecção para variou de  $1,94 \times 10^{-3}$  a  $4,93 \times 10^{-3}$  mg kg<sup>-1</sup> e  $6,50 \times 10^{-4}$  a  $1,58 \times 10^{-3}$  mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Wang *et al.*, 2017).

**Tabela 11.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de filé de tilápia fortificadas em três níveis de concentração. Estes ensaios inter-dia foram obtidos após análise no primeiro, terceiro e quinto dia.

	Concentração Nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	% CV	Média %R
<b>Aldrin</b>	30	8,18	112,3
	100	5,69	103,1
	350	4,65	90,15
<b>Heptacloro epóxido</b>	30	15,2	99,24
	100	3,32	102,8
	350	3,00	91,20
<b>Dieldrin</b>	30	9,86	91,19
	100	7,36	100,3
	350	6,53	91,22
<b>DDT</b>	30	10,5	98,52
	100	6,89	93,13
	350	8,85	89,23

## 4. Conclusões

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura otimizada e validada para a determinação simultânea dos organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em filés de tilápia por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE) se mostrou eficiente, com porcentagens de recuperação acima de 83%.

O método foi seletivo, com ótimos valores de precisão e exatidão, boa linearidade e baixos limites de detecção e de quantificação. Além disso, o método pode ser considerado simples, eficaz, com baixo consumo de solvente, baixo custo, não havendo necessidade da etapa de purificação para que o extrato seja analisado por cromatografia.

## 5. Referências bibliográficas

Ag Sólve-Monitoramento Ambiental, 2017. Disponível em: <<https://www.agsolve.com.br/noticias/agrotoxicos-e-a-poluicao-das-aguas>> Acessado em: 03/05/2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003, seção1, p. 56-59.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, nº 141, 25 jul. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

ALBERO, B.; BRUNETE, C. S.; TADEO, J. L. Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 1007, p. 137-143, 2003.

ALMEIDA, F. V.; ALBERTO, J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, B. W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1985-1985, 2007.

BARANOWSKA, I.; BARCHAŃSKA, H.; PACAK, E. Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. **Environmental Pollution**, v. 143, n. 2, p. 206–211, 2006.

BRANCO, S. M.; O Meio Ambiente em Debate, Ed. Moderna: São Paulo, 1988.

CARLOS, E. A.; ALVES, R. D.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Simultaneous Determination of the Organochlorine and Pyrethroid Pesticides in Drinking Water by Single Drop Microextraction and Gas Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1217, 2013.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009

CONTE, L. *et al.* Stocking densities and performance of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* in cages. **World Aquaculture**, v. 1, p. 201, 2003.

ELER, M. N.; MILLANI, T. J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. Suplemento Especial, p. 33-44, 2007.

FIGUEIREDO, C. A. Jr.; VALENTE, A. S. V. Jr. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco, Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 15, p. 1320-1323, 2008.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Atlas de Saneamento. 2011. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas\\_saneamento/default.zip.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default.zip.shtm)> Acessado em 04/05/2017.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, 2ª ed., 2000.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

KAIPPER, B. I. A.; MADUREIRA, L. A. S.; CORSEUIL, H. X. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique for analysis of pesticide residues in tomatoes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 514-518, 2001.

KUBITZA, F. Tilápia (*Oreochromis sp.*): tecnologia e planejamento na produção comercial. Divisão de Biblioteca e Documentação, Jundiaí, São Paulo, 2000. 285 p.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2004.

LANÇAS, F.M. Cromatografia em Fase Gasosa, 1ª ed., Acta: São Carlos, 1993.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

LUND, V. X.; FIGUEIRA, M. L. O. A. Criação de tilápias. São Paulo: Livraria Nobel. p. 63, 1989.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 9. **Diário Oficial da União**, 04 de abril de 2007, Seção 1, p. 7.

MORAIS, E. H. DA C.; RODRIGUES, A. A. Z.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; MORAIS, P. H. D. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, p. 9-17, 2014.

NETTO, P. T.; JÚNIOR, O. J. T.; CAMARGO, J. L. V.; RIBEIRO, M. L.; MARCHI, M. R. R. A rapid, environmentally friendly, and reliable method for pesticide analysis in high-fat samples. **Talanta**, v. 101, p. 322–329, 2012.

Panorama da Aquicultura, v. 25, n. 150, 2015. Disponível em: <<http://www.ferrazmaquinas.com.br/en/imagens/uploads/conteudos/42/arquivo/20151009160433oLNAngD3p.pdf>> Acessado em: 10/02/2017.

PATEL, K.; FUSSELL, R. J.; HETMANSKI, M.; GOODALL, D. M.; KEELY, B. J. Evaluation of gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1068, n. 2, p. 289–296, 2005.

PEREIRA, A. C.; SILVA, R. F. **Produção de Tilapias**. Manual técnico 31. Niterói-RJ, 2012.

PINHO, G. P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid–liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251–256, 2010.

POPMA, J. T.; LOVSHIN, L. L. Worldwide prospects for commercial production of Tilapia. **Research and Development Series**, v. 41, p. 15–17, 1996.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.; **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Application**. Hemisphere Publishing. New York, 1985.

REVISTA RURAL. Tilápia: Um verdadeiro “bovino” de água doce! 2017 <<http://www.revistarural.com.br/edicoes/item/5859-tilapia-um-verdadeira-bovino-de-agua-doce>> Acessado em: 22/10/2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLIN, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80–92, 2013.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052–2056, 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**., v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

VIEIRA, H. P. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.

WAGNER, P. M. *et al.* Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2004.

WANG, X. C.; SHU, B.; LI, S.; YANG, Z. G.; QIU, B. QuEChERS followed by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. **Talanta**, v. 162, p. 90-97, 2017.

# POTENCIAL DO OZÔNIO NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOCLORADOS E SEU EFEITO NA QUALIDADE DO PESCADO

## 1. Introdução

Os agrotóxicos organoclorados são em sua maioria persistentes e foram de ampla aplicação no controle de pragas agrícolas. Esses compostos em contato com o solo podem ser transportados em grandes quantidades através das águas das chuvas, atingindo, principalmente, águas superficiais como rios e lagos (DORIGATTI, 1987; RIGITANO & BARBOSA, 1994).

Esses compostos são altamente estáveis, sendo assim, ficam no ambiente por um longo período. A maioria desses agrotóxicos possui alta resistência à degradação química e biológica e alta solubilidade em lipídios. A baixa solubilidade em água e a alta capacidade de adsorção na matéria orgânica, leva ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar, principalmente nos tecidos ricos em gorduras dos organismos vivos, como nos peixes. Por percorrerem rapidamente a cadeia alimentar, esses compostos que são lipossolúveis, podem gerar consequências negativas não somente para os peixes, mas também para o homem, que ocupa o topo da cadeia alimentar (TORRES, 1998; MATUO et al., 1990).

Assim, tem crescido a exigência dos consumidores, ocasionando um aumento na demanda por produtos que sejam isentos de resíduos de agrotóxicos (TIWARI et al., 2010; WAKIL et al., 2013). Como resultado, tem surgido um aumento significativo no interesse de desenvolvimento de métodos para remover agrotóxicos dos alimentos antes de serem consumidos (IKEURA et al., 2011).

Alguns métodos que estão sendo usados com o objetivo de degradar resíduos de agrotóxicos utilizam radiação ultra-violeta (UV), óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), e o gás ozônio (O<sub>3</sub>) (LIN et al., 2012). Porém, o uso do gás ozônio vem se destacando, devido ao elevado poder de oxidação, alto poder de desinfecção, facilidade de obtenção deste gás e também pelo fato do ozônio se degradar a oxigênio, não deixando resíduos da sua redução nos alimentos.

Os trabalhos que utilizam ozônio na degradação de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem mostrado que essas contaminações são removidas mantendo a qualidade dos alimentos, conforme pode ser visto no trabalho desenvolvido por HELENO *et al.*, 2015, onde o ozônio foi usado para remoção de resíduo clorotalonil em uvas, removendo cerca de 60% de clorotalonil sem alterar os parâmetros de qualidade como: sólidos solúveis, perda de massa, intensidade de cor, e de diferença de cor total.

Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial do ozônio para degradar resíduos de quatro organoclorados, aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em filés de tilápia do Nilo. Além de avaliar o efeito do processo de ozonização sobre a qualidade do pescado por meio das análises de pH, cor e firmeza.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Preparo de soluções-padrão e reagentes**

A partir de padrões analíticos dos agrotóxicos Aldrin (pureza, 98,5% m/m), DDT (pureza, 98,8% m/m), Heptacloro epóxido (pureza, 99,5% m/m) obtidos da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, EUA) e do Dieldrin (pureza, 97,9% m/m) obtido da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha), foi preparada uma solução estoque dos padrões dos agrotóxicos nas concentrações de 1000 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA). Uma solução de trabalho, na concentração de 12 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da solução estoque, por meio de diluição. Uma solução de bifentrina (92,2% m/m, FMC do Brasil) a 10,0 mg L<sup>-1</sup> utilizada como padrão interno foi preparada em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA), a partir de uma solução de 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Estas soluções foram armazenadas em freezer vertical (Continental-Brasil) à temperatura de aproximadamente – 20 °C.

Para quantificação do ozônio, realizada por titulação iodométrica, foram preparadas soluções de iodeto de potássio (KI) a 20 g L<sup>-1</sup>, solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na concentração de 0,5 mol L<sup>-1</sup>, solução de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a qual foi adequadamente padronizada e também solução de amido 5 g L<sup>-1</sup> usado como indicador.

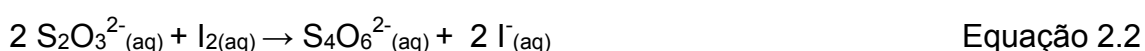
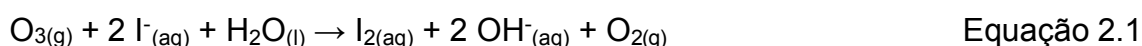
## 2.2. Obtenção e quantificação do ozônio

O ozônio foi obtido de um gerador de ozônio produzido pela empresa Ozone & Life (São José dos Campos, Brasil), conforme mostrado na Figura 2.1. Para a geração do ozônio utilizou-se o gás oxigênio (Linde Gases, Canoas, Brasil, 99,5% de pureza), que ao receber uma descarga elétrica, contendo elétrons com energia suficiente para causar colisões e consequentes quebras das moléculas de oxigênio, forma então átomos de oxigênio que irão se juntar com outras moléculas de oxigênio para formação do ozônio (USEPA, 1999).



**Figura 2.1.** Gerador de ozônio da marca Ozone & Life utilizado no processo de ozonização.

O método iodométrico indireto foi utilizado para quantificar a concentração do gás ozônio (APHA *et al.*, 2005). Para quantificar a concentração do gás que entra ou sai da câmara por esse método basta direcionar o fluxo de ozônio para dentro de uma proveta contendo 50,0 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 20 g L<sup>-1</sup>, durante 30 segundos. Após o borbulhamento do gás, adiciona-se nessa solução 2,5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A quantidade de I<sub>2</sub> formada será proporcional ao ozônio borbulhado, conforme pode ser visto nas Equações 2.1 e 2.2. Para calcular essa quantidade a solução deve ser titulada com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, usando como indicador o amido (5 g L<sup>-1</sup>). A titulação só é cessada após o desaparecimento da coloração azul, indicando o ponto de viragem, onde a quantidade de O<sub>3</sub> é igual à quantidade de iodo.



### **2.3. Fortificação das amostras de filés de tilápia**

Os filés de tilápia do Nilo, isentos de agrotóxicos foram adquiridos no comércio de Viçosa, cortados em pedaços com tamanhos uniformes de aproximadamente 20,0 g e acondicionados em bandejas. Em seguida, com auxílio de um borrifador de vidro com capacidade de 50 mL, uma solução padrão contendo os agrotóxicos aldrin, dieldrin, DDT e heptacloro epóxido, todos na concentração de  $12,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foi pulverizada sobre os pedaços de peixe mantendo sempre uma distância aproximada de 10 cm entre o pedaço de filé e o borrifador. Foram realizadas 2 borrifadas em cada amostra, uma de cada lado, totalizando  $280 \text{ }\mu\text{L}$  de solução padrão borrifada em cada pedaço de peixe. Após a aplicação, as amostras foram deixadas por 2 horas em ambiente ventilado para evaporação do solvente e para melhor fixação dos organoclorados no pescado.

### **2.4. Câmara de fumigação**

Uma câmara de vidro com dimensões  $0,25 \text{ m} \times 0,18 \text{ m} \times 0,40 \text{ m}$  ( $0,018 \text{ m}^3$ ) foi acoplada ao gerador de ozônio. A câmara possui conexões para entrada e saída do gás. A concentração do gás  $\text{O}_3$  na câmara foi determinada usando o método iodométrico indireto conforme descrito no item 2.2.



**Figura 2.2.** Câmara de fumigação (ozônio gasoso).

### **2.5. Ozonização do pescado e avaliação da remoção dos agrotóxicos**

A ozonização do pescado foi realizada de duas maneiras diferentes, com ozônio gasoso e ozônio borbulhado em água, a fim de avaliar qual destes

tratamentos iria favorecer uma melhor remoção dos resíduos de agrotóxicos. Antes e após a ozonização, os filés de tilápia foram submetidos ao processo de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) e os extratos foram analisados por cromatografia gasosa, pelo método otimizado e validado, para determinação dos resíduos de organoclorados, conforme descrito no capítulo 1.

### **2.5.1. Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)**

Para detectar possíveis produtos de degradação dos resíduos de aldrin, heptacloro epóxido e DDT, nos filés de tilápia foram realizadas análises em um sistema de CG/EM composto por um cromatógrafo a gás 7820A acoplado a um espectrômetro de massas 5977B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). O GC/MS foi operado em modo de varredura total (faixa de aquisição de massa  $m/z$  50–450) usando uma energia de ionização de 70 eV. O cromatógrafo a gás foi operado nas seguintes condições:

- Gás de arraste: Hélio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Volume injetado: 1,0 µL
- Razão de split: 1:5
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Programação de aquecimento da coluna:

140 °C (1 min)  $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$  200 °C  $\xrightarrow{4\text{ °C min}^{-1}}$  240 °C  $\xrightarrow{20\text{ °C min}^{-1}}$   
290 °C

- Temperatura do detector: 300 °C
- Tempo total de análise: 18 min

O tempo inicial de corte do solvente foi de 2,9 min. Para análise foi usada uma coluna capilar HP-5ms (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) 30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm de espessura de filme com fase estacionária 5% de difenil / 95% de dimetilpolissiloxano. O espectro MS foi comparado com o banco de dados de espectros de massa NIST.

### **2.5.2. Ozônio gasoso**

O primeiro experimento consistiu em aplicar o ozônio gasoso diretamente nos pedaços de peixe. Assim, a câmara de ozonização recebia o

gás ozônio com fluxo de  $1,00 \text{ L min}^{-1}$  durante 20 minutos para que o gás se espalhasse de maneira uniforme por toda câmara. Após esse tempo os pedaços de peixe eram colocados na câmara que recebia o gás ozônio continuamente. Foram realizados dois estudos, no primeiro variou-se o tempo de ozonização, mantendo a concentração de ozônio fixada em  $23 \text{ mg L}^{-1}$ . Assim, nos tempos 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos de exposição ao gás os pedaços de peixes eram recolhidos e analisados. Foram utilizados 15 pedaços de peixe no total, pois para cada tempo, dois pedaços de peixe eram recolhidos e no tempo zero, ou seja, antes de ozonizar, 3 pedaços eram usados como amostra controle. As análises em cada pedaço de peixe eram realizadas em triplicata.

No segundo estudo foi realizado mantendo o tempo de ozonização fixo em 30 minutos, variando a concentração do gás em 18, 23 e  $28 \text{ mg L}^{-1}$ . Nesse estudo utilizou-se 9 pedaços de peixe, 2 para cada concentração e 3 amostras controle. As análises eram realizadas em triplicata.

As 6 amostras controle foram separadas e em seguida aplicando o método de extração (ESL/PBT) e análise por cromatografia gasosa, obteve-se uma média de concentração inicial dos agrotóxicos nos pedaços. Os outros pedaços fortificados com os organoclorados eram colocados na câmara, que permaneceu sendo ozonizada no fluxo de  $1 \text{ L min}^{-1}$  durante todo experimento. Os pedaços eram sustentados por anzóis amarrados em linhas de nylon com objetivo de facilitar a retirada destes de dentro da câmara de forma que a câmara de ozonização ficasse aberta o menor tempo possível.

### **2.5.3. Ozônio borbulhado em água**

Já no segundo experimento, a ozonização ocorreu borbulhando o ozônio com fluxo de  $1,00 \text{ L min}^{-1}$  em 2 litros de água destilada que foram colocados dentro da câmara de ozonização. O gás era borbulhado na água por 20 minutos e após esse tempo os filés de tilápia foram colocados nessa água que era constantemente ozonizada. Para que o gás ficasse distribuído uniformemente na água, foram utilizados dois agitadores magnéticos.

O experimento foi realizado em temperatura ambiente, aproximadamente  $24^\circ\text{C}$ . Foram realizados os mesmos estudos variando o tempo de ozonização (10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos), mantendo a

concentração constante em 23 mg L<sup>-1</sup> e variando a concentração do gás (18, 23 e 28 mg L<sup>-1</sup>), mantendo o tempo constante em 30 minutos. Para cada tempo e concentração foram utilizados dois pedaços de peixe, sendo que as análises foram realizadas em triplicata.

O experimento prosseguiu da mesma forma que o anterior, primeiro separava-se 3 pedaços de peixe (amostra controle), sem ozonizar, para obter uma média de concentração inicial dos agrotóxicos nos pedaços. Os demais pedaços eram colocados na câmara em contato com a água, sendo também sustentados por anzóis amarrados em linhas de nylon. A água foi ozonizada no fluxo de 1 L min<sup>-1</sup> durante todo experimento. A foto da Figura 2.3 foi obtida durante o desenvolvimento do experimento.



**Figura 2.3.** Processo de ozonização em água.

Para garantir que a degradação não seria resultado apenas do contato dos peixes contaminados com a água, foi realizado um experimento onde os filés eram colocados em contato com água sem ozônio por 60 min. Assim, avaliou-se também a remoção dos agrotóxicos dos filés pelo contato direto da amostra com a água.

## **2.6. Efeito da aplicação do ozônio na qualidade do pescado**

A avaliação da qualidade dos filés foi realizada antes e após os processos de ozonização, em três repetições. Os parâmetros de qualidade avaliados foram cor, pH e firmeza.

### **2.6.1. Avaliação da cor**

A avaliação da cor dos filés de tilápia foi realizada com o auxílio de um colorímetro Konica Minolta (Ramsey, EUA), modelo CR-400 (iluminante C e ângulo 10°) pelo sistema CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), com

leitura direta de reflectância das coordenadas “L\*” (luminosidade), “a\*” (relativa de verde a vermelho) e “b\*” (relativa de amarela a azul). De posse dos valores das coordenadas L\*, a\* e b\* foi possível obter a diferença total de cor,  $\Delta E$  (Equação 2.3) (Meir *et al.*, 1992; Macdougall, 2002).

$$\Delta E = \sqrt{((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)}$$

Equação 2.3



**Figura 2.4.** Colorímetro da Minolta (modelo CR-400), usado para análise de cor.

### 2.6.2. Medida do pH

As medidas de pH foram, realizadas utilizando-se pHmetro de bancada da Mitter Toledo e um elétrodo Digimed, modelo DME-CF1, próprio para carne (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Eletrodo Digimed usado para fazer as medidas de pH.

### 2.6.3. Firmeza

Para a firmeza, foi usando um penetrômetro INSTRUTHERM, modelo PTR-300 (Figura 2.6) com ponteira de 6 mm de diâmetro.



**Figura 2.6.** Penetrômetro usado para análises de firmeza.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Remoção dos organoclorados em filés de tilápia

Para cada tratamento, ozônio gasoso e ozônio borbulhado em água, foram realizados dois estudos, do tempo de exposição ao ozônio e da concentração do mesmo. A porcentagem de remoção foi calculada tendo como base amostras controle, que não foram ozonizadas. As concentrações dessas amostras foram usadas como valores de referência.

#### 3.1.1. Influência do tempo de exposição na remoção

Na Tabela 2.1 estão dispostos os valores das concentrações do aldrin, heptacloro, dieldrin e DDT nos filés de tilápia antes de serem colocados em contato com ozônio gasoso (tempo zero) e após a ozonização (tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min). Já na Tabela 2.2 são apresentados os valores das concentrações dos agrotóxicos antes e após serem ozonizados, porém, nesse caso, os peixes foram imersos em água borbulhada continuamente com ozônio.

**Tabela 2.1-** Concentração dos agrotóxicos nos filés de tilápia antes (tempo zero) e após (tempos de 10 a 60 min) serem tratados com ozônio gasoso, na concentração de 23 mg L<sup>-1</sup>.

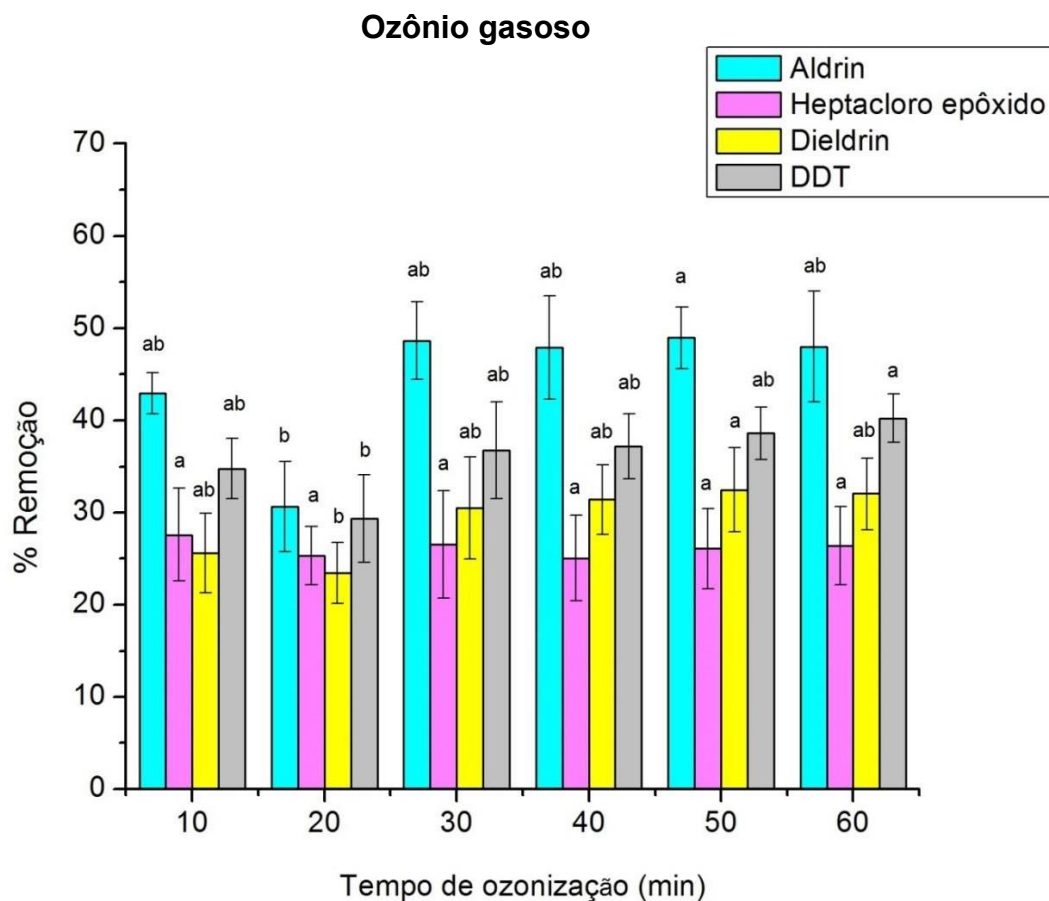
<b>Ozônio gasoso</b>				
<b>Tempo ozonização/(min)</b>	<b>Concentração/(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>0</b>	96,78 ± 6,56	108,18 ± 4,84	52,93 ± 5,65	44,65 ± 5,23
<b>10</b>	55,25 ± 2,15	78,35 ± 5,44	25,60 ± 4,34	29,13 ± 1,47
<b>20</b>	67,10 ± 4,74	80,82 ± 3,42	23,44 ± 3,33	31,56 ± 2,12
<b>30</b>	49,70 ± 4,09	79,48 ± 6,31	30,45 ± 5,54	28,25 ± 2,34
<b>40</b>	50,42 ± 5,46	81,08 ± 5,03	31,41 ± 3,76	28,06 ± 1,57
<b>50</b>	49,42 ± 3,26	79,96 ± 4,69	32,47 ± 4,56	28,13 ± 1,27
<b>60</b>	50,34 ± 5,83	80,24 ± 3,95	32,02 ± 3,88	25,76 ± 1,18

**Tabela 2.2-** Concentração dos agrotóxicos nos filés de Tilápia antes (tempo zero) e porcentagem de remoção após (tempos de 10 a 60 minutos) serem tratados com ozônio dissolvido em água, na concentração de 23 mg L<sup>-1</sup>.

<b>Ozônio dissolvido em água</b>				
<b>Tempo ozonização/(min)</b>	<b>Concentração/(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>0</b>	64,03 ± 5,44	85,47 ± 4,22	83,85 ± 4,72	67,43 ± 4,76
<b>10</b>	51,61 ± 2,58	65,79 ± 5,54	67,18 ± 3,61	53,83 ± 5,02
<b>20</b>	47,39 ± 3,98	58,48 ± 4,99	65,63 ± 3,25	56,58 ± 1,50
<b>30</b>	39,86 ± 3,81	48,45 ± 4,70	55,08 ± 3,55	43,21 ± 1,47
<b>40</b>	34,12 ± 2,39	41,29 ± 1,82	50,67 ± 3,05	41,60 ± 1,83
<b>50</b>	32,91 ± 3,08	39,67 ± 2,53	49,58 ± 1,75	42,32 ± 2,13
<b>60</b>	30,83 ± 4,42	33,43 ± 3,72	48,38 ± 2,20	36,75 ± 1,39

Observa-se que os tratamentos com ozônio gasoso e dissolvido em água fez com que a concentração dos organoclorados diminuisse, indicando que houve remoção dos resíduos de agrotóxicos. Para melhor analisar a

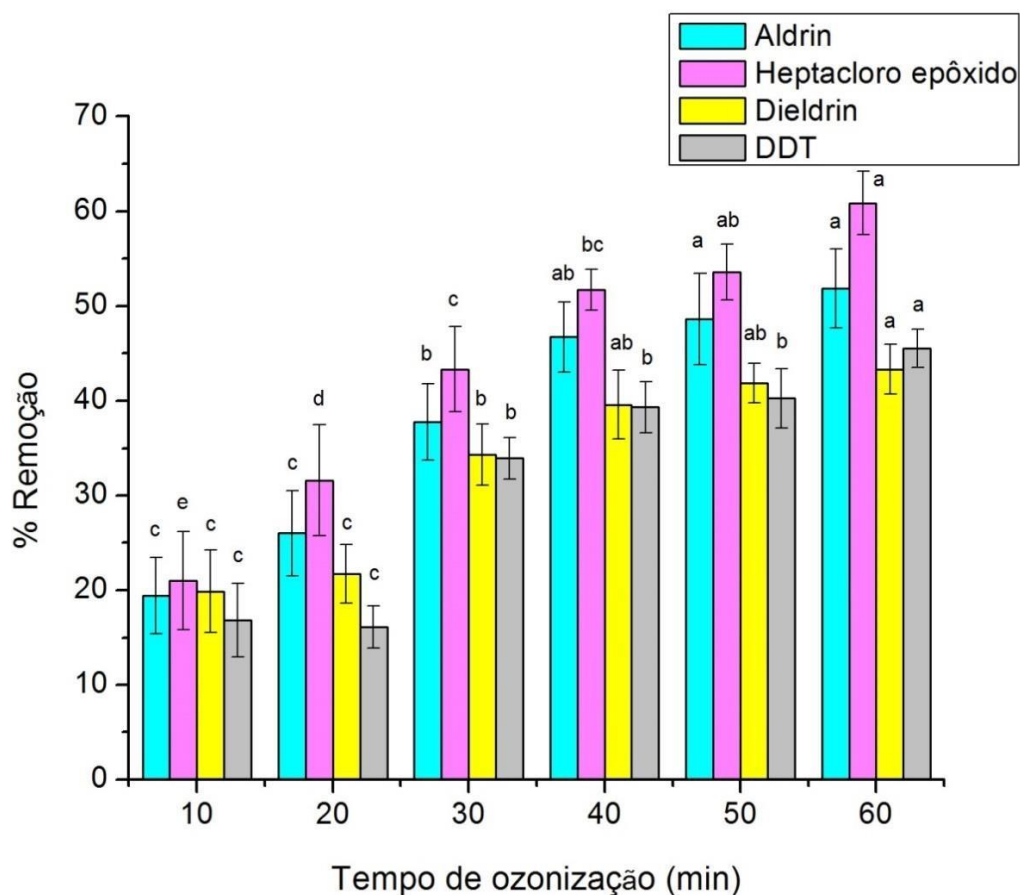
eficiência da remoção calculou-se as porcentagens de remoção dos organoclorados presentes nos filés de tilápia. Os valores das porcentagens podem ser observados nas figuras 2.7 e 2.8.



**Figura 2.7:** Porcentagem de remoção do aldrin, heptachloro epóxido, dieldrin e DDT em função do tempo de exposição dos filés de tilápia contaminados em ozônio gasoso na concentração de 23 mg L<sup>-1</sup>. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).

Os resultados obtidos com o ozônio gasoso mostraram que a maior eficiência de remoção obtida foi para o aldrin, variando de 30,7% a 48,9%, em seguida para o DDT, de 29,3% a 40,3%, dieldrin, de 23,4% a 32,5% e heptachloro epóxido, de 25,1% a 26,4%. Em geral, para todos os compostos o tempo de ozonização não resultou em variações significativas das porcentagens de remoção dos resíduos. Para todos os agrotóxicos o tempo de 20 minutos foi o único que apresentou diferença significativa entre outros tempos, conforme indicado pelo teste estatístico de Tukey a 95% de significância.

## Ozônio borbulhado em água

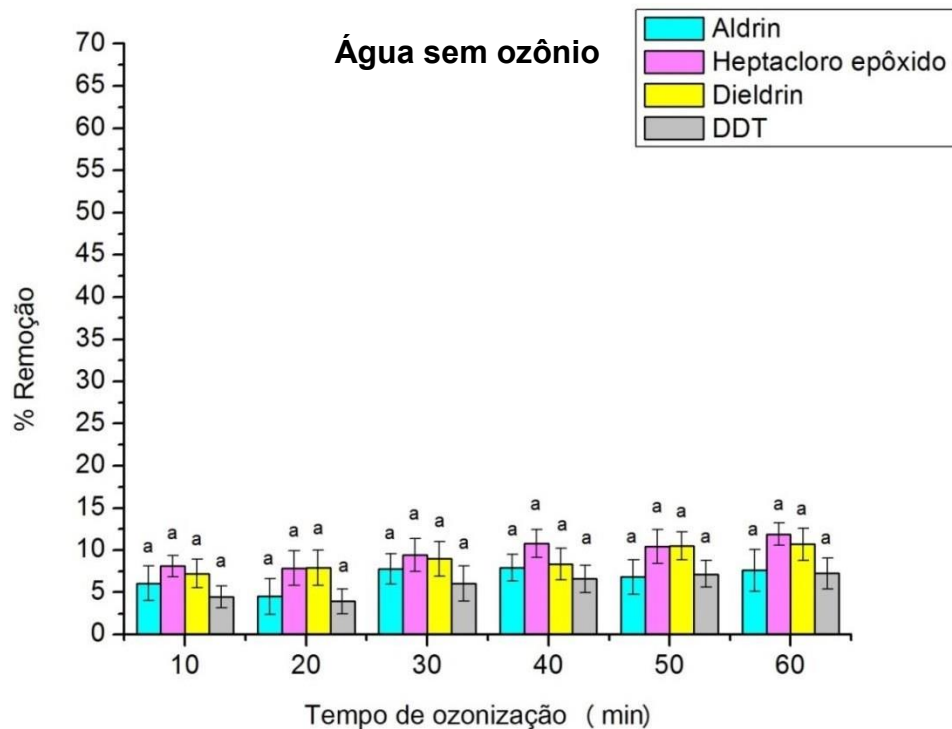


**Figura 2.8:** Porcentagem de remoção do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em função do tempo de exposição dos filés de tilápia contaminados em água com ozônio na concentração de 23 mg L<sup>-1</sup>. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).

Para o experimento realizado em água borbulhada com ozônio o tempo de ozonização influenciou na porcentagem de remoção dos organoclorados, sendo que quanto maior o tempo, maior quantidade removida. O aldrin teve a porcentagem remoção variando de 19,4% a 51,9%, o heptacloro epóxido de 20,9% a 60,9%, o dieldrin de 19,9% a 42,3% e o DDT de 16,8% a 45,5%.

Para o aldrin e dieldrin, houve diferença significativa na porcentagem de remoção entre os tempos de 20 e 30 min. Para o heptacloro entre os tempos de 10, 20 e 30 min é possível observar diferenças significativas na quantidade de agrotóxico removida dos filés. Já para DDT houve diferença significativa entre os tempos de 20 e 30 min e também entre 50 e 60 min.

Avaliou-se a remoção dos resíduos de agrotóxicos quando os filés foram imersos em água não tratada com ozônio, os resultados são apresentados na Figura 2.9.



**Figura 2.9:** Porcentagem de remoção do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT em função do tempo de contato dos filés de Tilápia contaminados em água. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA ( $p < 0,05$ ).

O processo de lavagem dos filés em água removeu uma pequena porcentagem dos agrotóxicos, 4,5% a 7,9% para o aldrin, 7,9% a 11,9% para o heptacloro epóxido, 7,2% a 10,7% para o dieldrin e de 3,9% a 7,3% para o DDT. Porém, a remoção foi baixa em relação à porcentagem obtida quando os peixes foram colocados em contato com a água ozonizada. Sem a ozonização, a remoção dos agrotóxicos dos filés de tilápia foram as mesmas, independente do tempo de exposição.

### 3.1.2. Influência da concentração de ozônio na remoção

A eficiência de remoção também foi avaliada em função da concentração de ozônio aplicada. Na Tabela 2.3 estão dispostos os valores das concentrações dos agrotóxicos aldrin, heptacloro, dieldrin e DDT nos filés de tilápia antes de serem colocados em contato com ozônio gasoso (tempo zero) e após contato com ozônio nas concentrações de 18, 23 e 28 mg L<sup>-1</sup>. Já na Tabela 2.4 estão os resultados das porcentagens de remoção.

**Tabela 2.3-** Concentração dos agrotóxicos nos filés de tilápia antes (tempo zero) e após serem tratados com ozônio gasoso, nas concentrações de 18, 23 e 28 mg L<sup>-1</sup>, durante 30 min.

<b>Ozônio gasoso</b>				
<b>Concentração ozônio/(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração/(µg kg<sup>-1</sup>)</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>Sem ozonizar</b>	96,8 ± 6,6	108 ± 4,8	52,9 ± 5,6	44,7 ± 5,2
<b>18</b>	56,5 ± 1,5	87,3 ± 2,0	34,2 ± 4,9	28,9 ± 1,5
<b>23</b>	49,7 ± 3,9	79,5 ± 4,3	36,8 ± 5,1	28,3 ± 2,3
<b>28</b>	33,6 ± 3,7	58,9 ± 3,4	18,9 ± 2,8	14,4 ± 1,4

**Tabela 2.4-** Porcentagem de remoção dos organoclorados presentes nos filés de tilápia após serem submetidos ao tratamento com ozônio gasoso em três diferentes concentrações durante 30 min. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).

<b>Ozônio gasoso</b>				
<b>Concentração ozônio/(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Remoção</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>18</b>	41,6 ± 2,1c	19,2 ± 3,1b	35,3 ± 5,4b	35,4 ± 2,8b
<b>23</b>	48,7 ± 4,6b	26,5 ± 4,8b	30,5 ± 4,3b	36,7 ± 3,9b
<b>28</b>	65,3 ± 5,4a	45,5 ± 3,9a	64,2 ± 3,5a	66,7 ± 2,7a

Ao tratar os filés de tilápia com ozônio gasoso observou-se que para o agrotóxicos aldrin houve um pequeno aumento na porcentagem de remoção quando a concentração de ozônio passou de 18 para 23 mg L<sup>-1</sup>. Já para os demais não houve aumento significativo na remoção. Porém a remoção teve aumento significativo para os quatro organoclorados quando a concentração passou de 23 para 28 mg L<sup>-1</sup>.

Já na Tabela 2.5 estão dispostos os valores das concentrações dos agrotóxicos aldrin, heptacloro, dieldrin e DDT nos filés de tilápia antes de serem colocados em contato com a água borbulhada com ozônio (tempo zero) e após contato com a água borbulhada com ozônio nas concentrações de 18, 23 e 28 mg L<sup>-1</sup>. Na Tabela 2.6 estão os resultados das porcentagens de remoção.

**Tabela 2.5-** Concentração dos agrotóxicos nos filés de tilápia antes (tempo zero) e após serem submetidos ao tratamento com água ozonizada, nas concentrações de 18, 23 e 28 mg L<sup>-1</sup>, durante 30 min.

<b>Ozônio gasoso</b>				
<b>Concentração ozônio/(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração/(µg kg<sup>-1</sup>)</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>Sem ozonizar</b>	64,0 ± 5,4	85,5 ± 4,2	83,9 ± 4,7	67,4 ± 4,8
<b>18</b>	46,0 ± 1,5	58,5 ± 2,0	61,5 ± 4,9	42,8 ± 1,5
<b>23</b>	45,7 ± 3,9	57,5 ± 4,3	58,7 ± 5,1	41,5 ± 2,3
<b>28</b>	38,0 ± 3,7	48,6 ± 3,4	50,6 ± 2,8	37,0 ± 1,4

**Tabela 2.6-** Porcentagem de remoção dos organoclorados presentes nos filés de tilápia após serem submetidos ao tratamento com água ozonizada em três diferentes concentrações de ozônio durante 30 minutos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).

<b>Ozônio em água</b>				
<b>Concentração ozônio/(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Remoção</b>			
	<b>Aldrin</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>DDT</b>
<b>18</b>	28,2 ± 3,4b	31,6 ± 1,1b	26,6 ± 4,3b	36,5 ± 4,6b
<b>23</b>	28,7 ± 4,6b	32,7 ± 3,2b	30,0 ± 4,1b	38,5 ± 2,1ab
<b>28</b>	40,7 ± 2,9a	43,1 ± 4,6a	39,7 ± 1,7a	45,1 ± 3,9a

O tratamento dos peixes por imersão em água borbulhada continuamente com ozônio não alterou a porcentagem de remoção dos agrotóxicos quando a concentração de ozônio passou de 18 para 23 mg L<sup>-1</sup>. Porém, a remoção dos quatro compostos aumentou significativamente com aumento da concentração de ozônio de 23 para 28 mg L<sup>-1</sup>.

Ao manter a concentração do ozônio constante em 23 mg L<sup>-1</sup> e variando o tempo de exposição dos filés de tilápia observou-se que para degradar o aldrin e heptacloro epóxido o tratamento com ozônio gasoso foi mais eficiente. Já para degradação do dieldrin e do DDT o tratamento dos filés em água ozonizada foi melhor (Figuras 2.7 e 2.8). Para o tratamento com ozônio gasoso o tempo de exposição de 30 minutos é suficiente para obtenção de altas porcentagens de remoção, uma vez que, em tempos maiores do que 30 minutos o aumento da degradação não foi significativo, já para o tratamento

com ozônio borbulhado em água o tempo de 40 minutos seria o ideal. A concentração do ozônio em 28 mg L<sup>-1</sup>, foi a mais eficiente na degradação dos agrotóxicos nos dois tipos de tratamento.

As eficiências na degradação do aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT podem ser explicadas pelo fato do ozônio ser um poderoso agente oxidante, tendo o segundo maior potencial de oxidação (2,07 V) (MANLEY e NIEGOWSKI, 1967). Estes organoclorados apresentam em suas estruturas anéis aromáticos e radicais com duplas ligações. Assim o ozônio, como forte oxidante, reage com essas moléculas, interagindo com as cadeias aromáticas e com as duplas ligações (CHIRON *et al.*, 2000; VON GUNTEN, 2003).

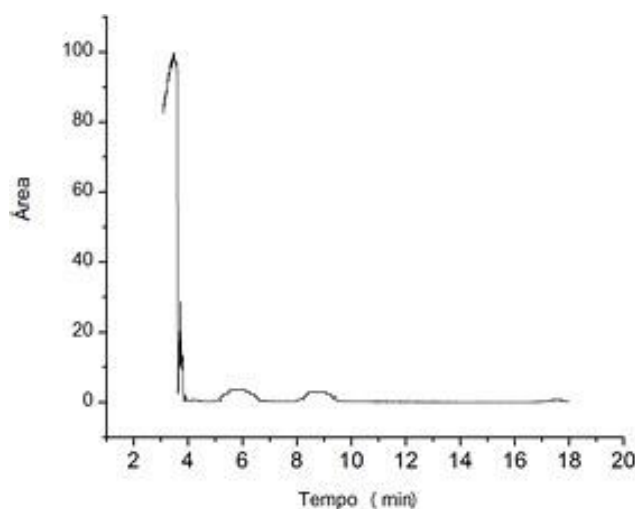
Em diversos trabalhos, utilizando diferentes matrizes como vegetais e água, a eficiência do ozônio na degradação de vários agrotóxicos vem sendo relatada, incluindo organoclorados (WU *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2014). Derco e colaboradores, por exemplo, obtiveram cerca de 90% de remoção dos organoclorados presentes em água, utilizando ozônio (DERCO *et al.*, 2015).

A degradação de cada composto por ozônio depende da sua estrutura química. Esta degradação pode ser realizada por duas vias. Na via direta ou molecular o ozônio molecular reage diretamente com o substrato dando origem a reações seletivas, principalmente com hidrocarbonetos insaturados e aromáticos com grupos -OH, -CH<sub>3</sub> e -NH<sub>2</sub>. Já na via indireta ou radical a degradação ocorre por meio de reações em que as espécies reagentes são radicais, principalmente o radical hidroxila, gerados na decomposição do ozônio. Estas reações são muito rápidas e não seletivas. Hidrocarbonetos alifáticos, solventes clorados e um grande número de agrotóxicos clorados reagem pela via radical (HOIGNÉ E BADER, 1976 e 1983; HOIGNÉ 1982; HOIGNÉ *et al.*, 1985; BELTRÁN 1997 ).

O tipo de reação que irá ocorrer entre o ozônio e os compostos orgânicos depende principalmente da concentração de ozônio e de radicais hidroxilas sendo que em meio ácido (pH < 4) predomina mecanismos de reação direta, ou seja, via ozônio molecular. À medida que o valor do pH aumenta, maior quantidade de radicais hidroxila são formados. Para valores de pH acima de 10 a decomposição do ozônio em radicais hidroxila é instantânea e o mecanismo de reação indireta predomina. Contudo, em pH em torno de 7 podem ocorrer as duas reações, tanto direta quanto indireta (HELENO *et al.*, 2015).

### 3.1.3. Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

As análises realizadas no sistema de CG/EM para detectar possíveis produtos de degradação mostraram que não foi possível observar produtos de degradação. Na Figura 2.10, tem-se um cromatograma de uma das análises feitas, conforme descrito no item 2.5.1.



**Figura 2.10** : Cromatograma do CG/EM para extrato obtido do filé de tilápia após ozonização. O peixe havia sido previamente fortificado com os agrotóxicos, aldrin, heptacloro, dieldrin e DDT. O cromatograma foi obtido no modo TIC.

Neste trabalho a avaliação da qualidade do pescado foi realizada com base nos parâmetros de cor, pH e firmeza.

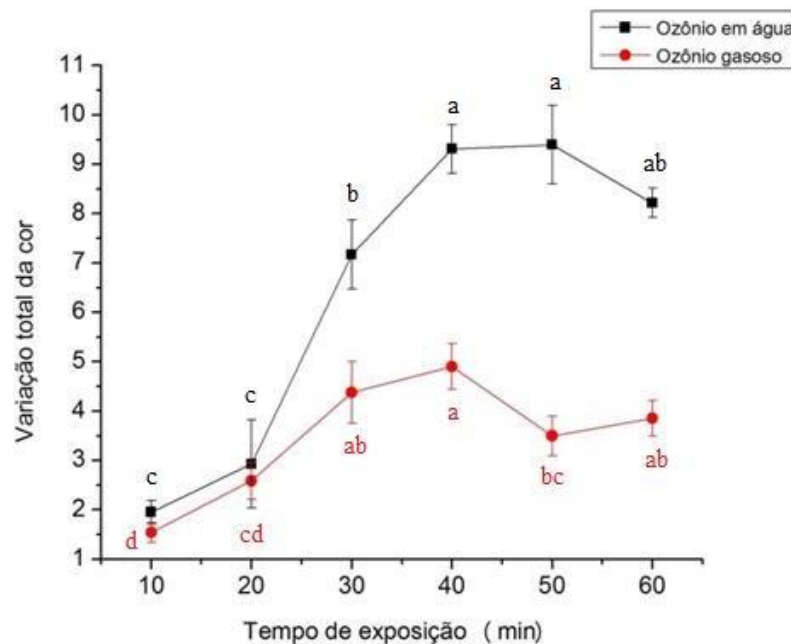
#### 3.2.1. Cor

A cor é um importante parâmetro de qualidade que pode ser usado como um indicador de transformações naturais de alimentos frescos ou de mudanças ocorridas durante o processamento. Os consumidores frequentemente avaliam os peixes, principalmente com base na cor, portanto, o parâmetro de cor apoiaria escolha de um pescado de qualidade (SKJERVOLD *et al.*, 2001).

Assim, de posse dos valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  obtidos instrumentalmente, calculou-se a diferença total de cor ( $\Delta E$ ), por meio da Equação 2.4, dos filés de tilápia submetidos aos tratamentos com ozônio gasoso e com água borbulhada

continuamente com ozônio. Quanto maior a diferença total de cor, mais distante a cor estará do valor inicial usado como referência.

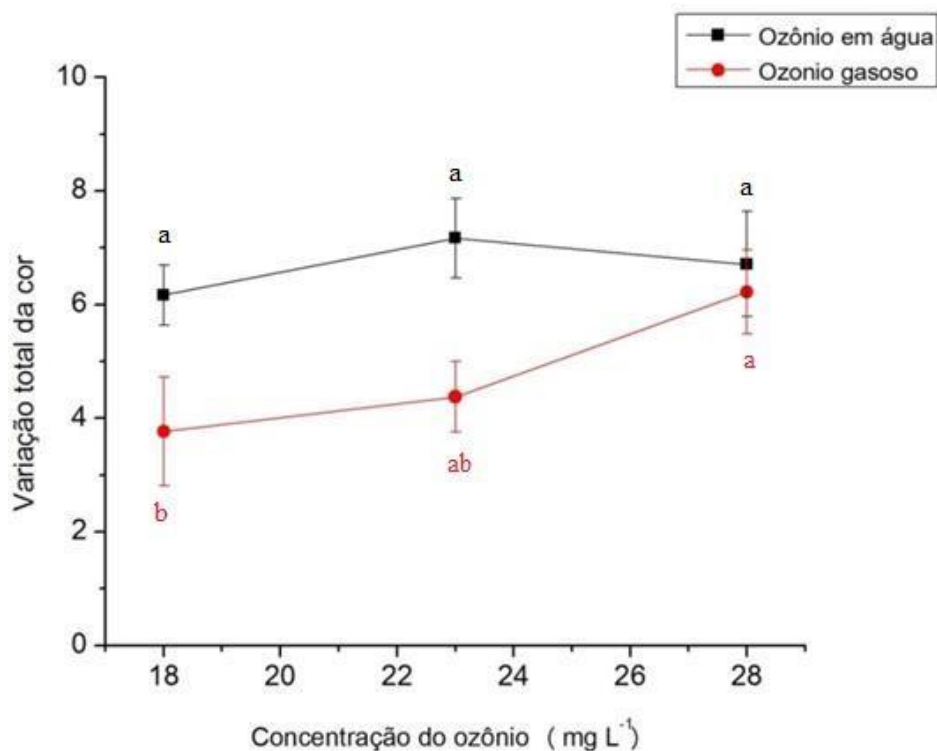
Os valores da diferença total de cor dos filés tratados com ozônio gasoso em diferentes tempos estão dispostos na Figura 2.11.



**Figura 2.11:** Variação total de cor ( $\Delta E$ ) em função do tempo de exposição dos filés de tilápia em água ozonizada (—) e em ozônio gasoso (—). A concentração do ozônio foi a mesma nos dois casos ( $23 \text{ mg L}^{-1}$ ). Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Com os valores das variações totais da cor, pode-se observar que os tratamentos com ozônio, causaram variações na cor dos filés de tilápia. Assim, observa-se que as variações nas cores aumentaram à medida que se aumentou o tempo de exposição, sendo que a variação máxima ocorreu nos tempos de 30 minutos para o ozônio gasoso e 40 minutos para o tratamento com água ozonizada. Após esses tempos não houve aumento significativo nas variações totais da cor.

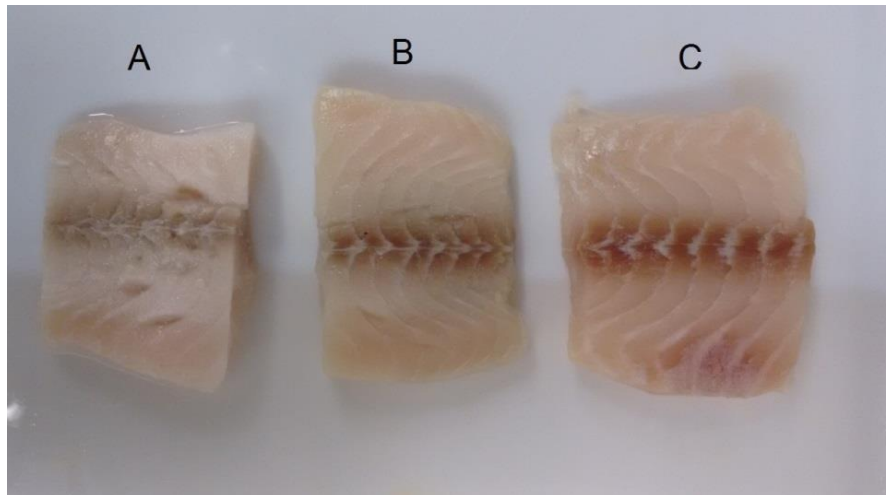
Os resultados da diferença total de cor dos filés tratados com ozônio borbulhado em água são mostrados na Figura 2.12.



**Figura 2.12:** Variação total de cor ( $\Delta E$ ) em função da concentração de ozônio usada para tratar os filés de tilápia em água ozonizada (—) e em ozônio gasoso (—). O tempo de exposição foi de 30 minutos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Mantendo-se o tempo de exposição fixo em 30 minutos e alterando as concentrações do ozônio percebe-se que no tratamento dos filés com ozônio gasoso não houve aumento significativo na variação total de cor quando a concentração do ozônio varia de 18 para 23 mg L<sup>-1</sup> e nem de 23 para 28 mg L<sup>-1</sup>, porém houve aumento considerável na cor ao comparar as concentrações de 18 e 28 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto no tratamento com ozônio borbulhado em água não houve mudança significativa da cor com aumento da concentração.

Nota-se também que o tratamento dos pescados com água ozonizada resultou em uma alteração de cor bem mais expressiva do que aquelas observadas no tratamento com ozônio gasoso, conclusão que pode ser observada também pela Figura 2.13.



**Figura 2.13:** Foto dos filés de tilápia após o tratamento com água ozonizada (A), após o tratamento com ozônio gasoso (B) e antes de serem tratados com ozônio (C). A foto foi tirada após 30 minutos de tratamento com a concentração do ozônio em 23 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 pH

Com objetivo de avaliar o efeito do ozônio sobre o pH, foi preciso identificar qual valor de pH referência para os filés de tilápia, ou seja, o pH dos filés antes de serem tratados com ozônio e também os valores de pH dos filés de tilápia após os tratamentos com ozônio gasoso e borbulhado em água. Para isso, foi feita uma média dos valores obtidos para cada pedaço antes de serem expostos ao ozônio. O valor obtido foi de  $6,22 \pm 0,06$ , estando em concordância com o valor obtido por Reddy *et al.* (1994) de aproximadamente 6,22. Os valores de pH obtidos antes e após ozonização em função da concentração do ozônio são apresentados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5** Valores de pH em função da concentração do ozônio em água borbulhada e gasoso. O tempo de exposição foi de 30 min. Comparação com o controle feita pelo teste estatístico de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Concentração do Ozônio/ (mg L <sup>-1</sup> )	pH (Água ozonizada)		pH (Ozônio gasoso)	
	Valores de pH	Comparação com o controle	Valores de pH	Comparação com o controle
Sem ozônio (controle)	$6,22 \pm 0,06$	-	$6,22 \pm 0,06$	
18	$6,51 \pm 0,04$	Significativo	$6,26 \pm 0,03$	não significativo
23	$6,76 \pm 0,05$	Significativo	$6,19 \pm 0,02$	não significativo
28	$6,69 \pm 0,05$	Significativo	$6,35 \pm 0,03$	significativo

Os valores de pH dos filés em função da concentração de ozônio (Tabela 2.5) não variou maneira proporcional. Porém, ao tratar os filés com água ozonizada nota-se que os valores de pH aumentaram significativamente em comparação com o valor inicial (controle), o que já não ocorreu no tratamento com ozônio gasoso, com exceção da concentração de 28 mg L<sup>-1</sup>, que teve um aumento significativo quando comparado com o controle.

O estudo da variação do pH com o tempo de exposição ao ozônio nos diferentes tratamentos também foi realizado e os resultados se encontram na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6:** Valores de pH em função do tempo de exposição dos filés de tilápia em água borbulhada com ozônio e em ozônio gasoso. A concentração do ozônio foi a mesma nos dois tratamentos (23 mg L<sup>-1</sup>). Comparação com o controle feita pelo teste estatístico de Dunnett (p<0,05).

Tempo de ozonização/ (min)	pH (Água com ozônio)		pH (Ozônio gasoso)	
	Valores de pH	Comparação com o controle	Valores de pH	Comparação com o controle
0 (controle)	6,22 ± 0,06	-	6,22 ± 0,06	-
10	6,57 ± 0,04	Significativo	6,38 ± 0,02	Significativo
20	6,74 ± 0,05	Significativo	6,25 ± 0,02	não significativo
30	6,76 ± 0,04	Significativo	6,19 ± 0,02	não significativo
40	6,56 ± 0,05	Significativo	6,27 ± 0,01	não significativo
50	6,69 ± 0,04	Significativo	6,24 ± 0,02	não significativo
60	6,58 ± 0,05	Significativo	6,19 ± 0,02	não significativo

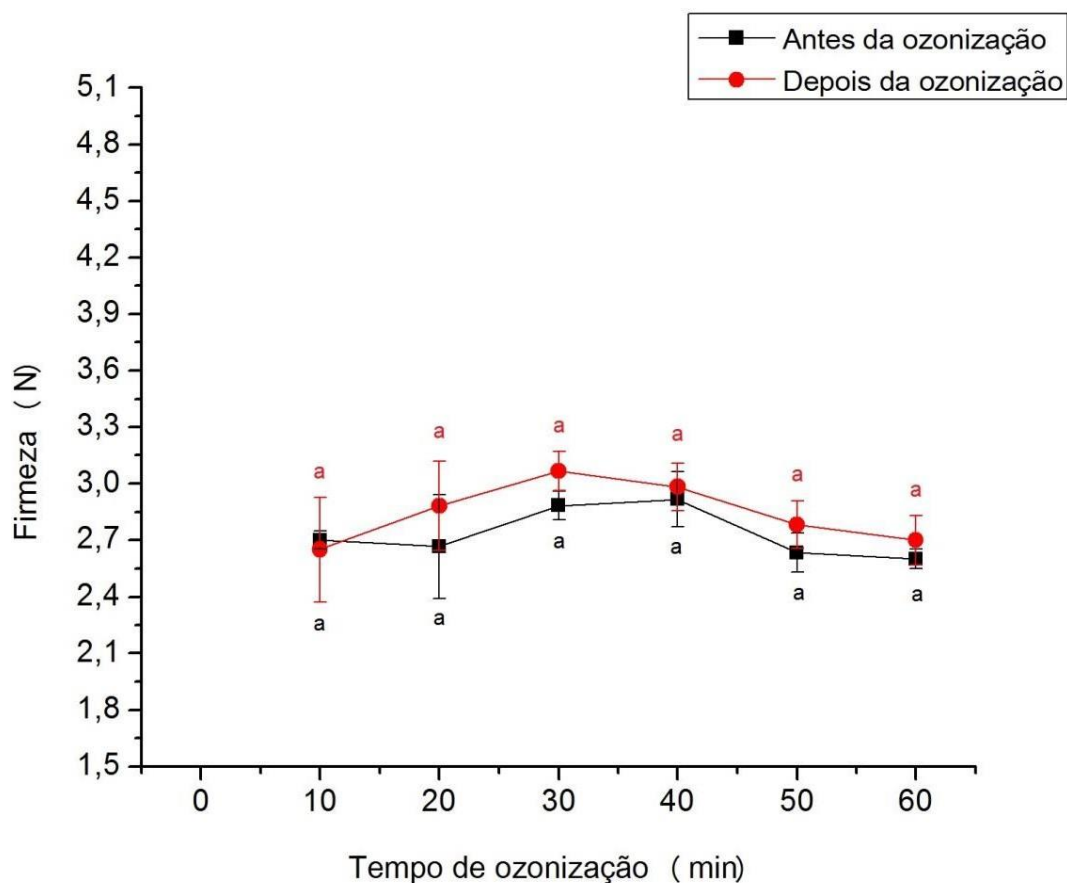
Após mensurar o pH dos filés em função do tempo de exposição destes a água ozonizada e ao ozônio gasoso (Tabela 2.6) observou-se que o aumento do tempo de ozonização não interferiu de maneira proporcional nos valores de pH. Porém, ao tratar os filés com água ozonizada nota-se que os valores de pH aumentaram significativamente, distanciando-se do valor inicial (controle), o que já não ocorreu no tratamento com ozônio gasoso, com exceção do tempo de 10 min, que teve um aumento no pH significativo.

A legislação brasileira considera deteriorado e, portanto, impróprio para o consumo, o pescado que tiver o pH da carne externa superior ou igual a 6,8, e da carne interna superior ou igual a 6,5 (BRASIL, 1952). Assim, ao tratar os

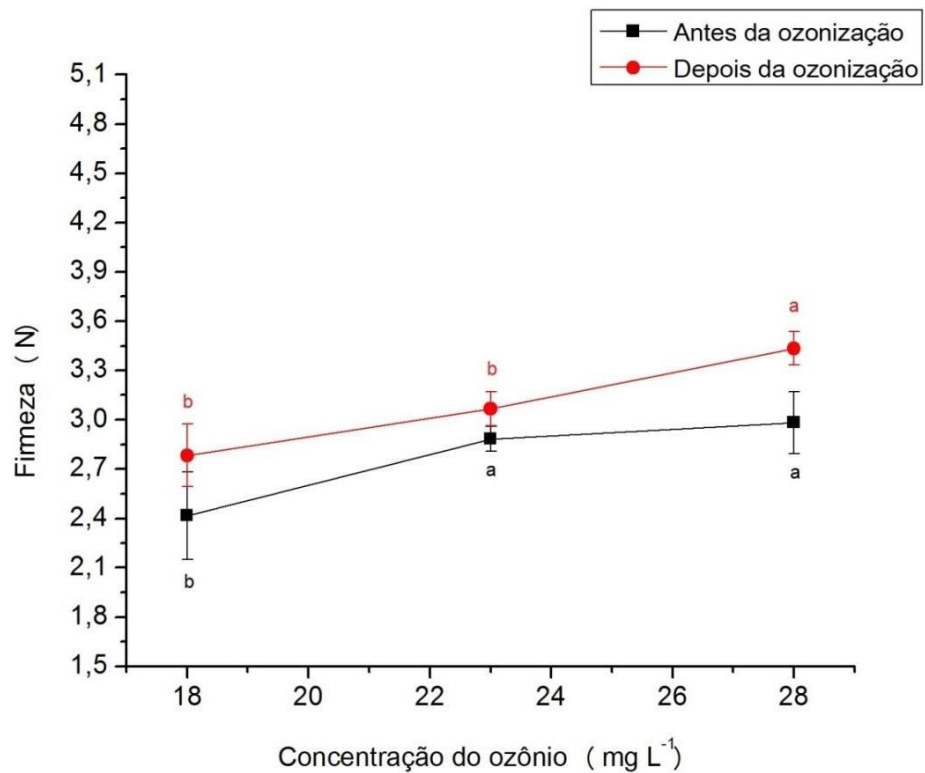
filés de tilápia com água ozonizada, estes estariam impróprios para o consumo, uma vez que o pH destes foram superiores a 6,5.

### 3.2.3. Firmeza

A firmeza esta relacionada a uma determinada força necessária para se obter uma deformação. A firmeza nesse estudo foi medida com auxilio de um penetrômetro, equipamento que registra a força necessária para que uma ponteira de 6 mm de diâmetro penetre um determinado pedaço de filé de tilápia, deformando-o. Os resultados do tratamento com ozônio gasoso ao variar o tempo de exposição e a concentração do gás podem ser observados nas Figuras 2.14 e 2.15, respectivamente.



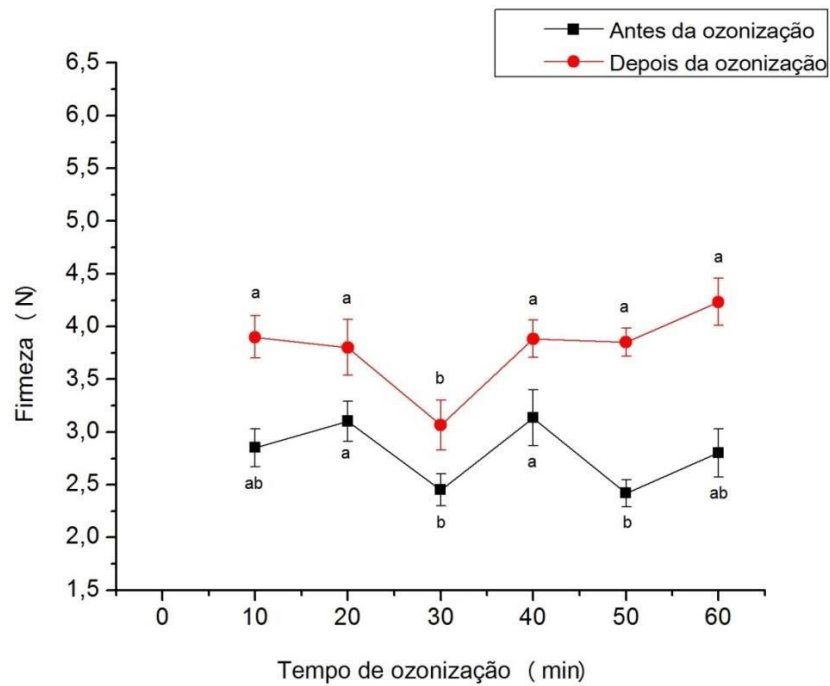
**Figura 2.14:** Firmeza dos filés de tilápia antes de serem tratados com ozônio gasoso (—) e após o tratamento (—) com ozônio gasoso a  $23 \text{ mg L}^{-1}$  em função do tempo de exposição. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA ( $p < 0,05$ ).



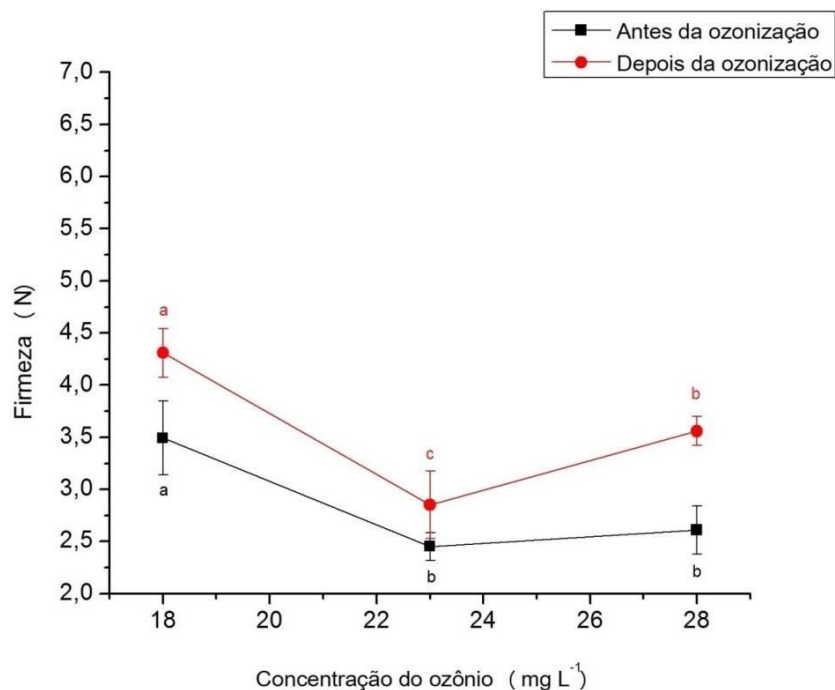
**Figura 2.15:** Firmeza dos filés de tilápia antes de serem tratados com ozônio gasoso (—) e após o tratamento (—) em diferentes concentrações. O tempo de exposição foi de 30 minutos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Ao variar o tempo de exposição dos filés em ozônio gasoso, os valores de firmeza permaneceram constantes, o mesmo aconteceu quando variou-se as concentrações de ozônio de 18 para 23 mg L<sup>-1</sup>. Porém, ao aumentar a concentração de 23 para 28 mg L<sup>-1</sup>, houve um aumento significativo na firmeza do filé de tilápia (Figuras 2.14 e 2.15).

Os resultados do tratamento dos filés em água borbulhada com ozônio podem ser observados nas figuras 2.16 e 2.17.



**Figura 2.16:** Firmeza dos filés de tilápia antes de serem tratados com água ozonizada (—) e após o tratamento (—) em função do tempo de exposição. A concentração do ozônio foi de 23 mg L<sup>-1</sup>. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).



**Figura 2.17:** Firmeza dos filés de tilápia antes de serem tratados com água ozonizada (—) e após o tratamento (—) em função da concentração do ozônio. O tempo de exposição foi de 30 minutos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste estatístico Tukey com post-hoc da ANOVA (p<0,05).

O tratamento dos filés em água borbulhada com ozônio resultou em um aumento da firmeza. Entretanto ao comparar a variação da firmeza com aumento do tempo de exposição pode-se perceber que o tempo de 30 min foi o único que teve o valor de firmeza significativamente menor que os demais. Porém essa diferença significativa nesse tempo foi também observada nesse mesmo pedaço de peixe antes da ozonização, indicando que a alteração não foi devido ao tempo de exposição ao ozônio.

Ao variar a concentração de ozônio é possível notar pela aplicação de teste estatístico que houve uma alteração significativa na firmeza dos filés de tilápia.

Dessa maneira, acredita-se que o aumento na firmeza ocorreu devido ao contato do peixe com a água, não tendo relação direta com o ozônio, uma vez que, esse fato só foi observado quando os filés de tilápia foram submersos em água ozonizada.

#### **4. Conclusão**

A exposição dos filés de tilápia ao ozônio gasoso e em água borbulhada reduziu os resíduos de aldrin, heptacloro epóxido, dieldrin e DDT. A degradação dos resíduos tratados com ozônio em água aumentou com aumento do tempo de exposição, mas não aumentou com aumento da concentração de ozônio. Esse tratamento alterou as características do pescado que foram analisadas, aumentando a diferença total de cor, a firmeza e o pH, sendo que o pH foi maior do que o valor permitido pela legislação brasileira, tornando os filés impróprios para o consumo.

Já a degradação pelo tratamento com ozônio gasoso, a partir de 30 min não teve um aumento na remoção com aumento do tempo de exposição, porém ao aumentar a concentração do ozônio de 23 para 28 mg L<sup>-1</sup>, a porcentagem de remoção aumentou expressivamente. O tratamento com ozônio gasoso não alterou os parâmetros de pH e firmeza, porém houve uma pequena mudança na cor. Pode-se concluir, em função disso, que o ozônio gasoso tem potencial para ser utilizado na a remoção de resíduos de agrotóxicos em filés de tilápia sem prejudicar a qualidade destes peixes.

## 5. Referências bibliográficas

APHA; AWWA; WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005. 937 p.

BORGHEI, S.M.; HOSSEINI, S.N. Comparison of furfural degradation by different photooxidation methods. **Chemical Engineering Journal**, v.139, n.3, p.482-488, 2008.

BRASIL. Decreto no. 30691 de 29/03/52. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: SIPA, DICAR, Ministério da Agricultura, 1952.

CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; RODRIGUEZ, A.; GARCIA-CALVO, E. Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art. **Water Research**, v. 34, n. 2, p. 366-377, 2000.

DERCO J.; DUDÁŠ J.; VALICKOVÁ M.; ŠIMOVICOVÁ K.; KECSKÉS J. Removal of micropollutants by ozone based processes. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 94, p. 78-84, 2015.

DORIGATTI, A. Aplicação de cromatografia gasosa em estudos de dissipação de herbicidas em solos brasileiros. Dissertação de Mestrado, Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1987.

FREITAS R. S.; QUEIROZ M. E. L. R.; FARONI L. R. D.; HELENO F. F.; MOURA V. V. Desenvolvimento do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de inseticidas em grãos de milho ozonizados. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 238-243, 2014.

HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, F. A.; OLIVEIRA, A. F. Ozone Treatment for the Removal of Residual Chlorothalonil and Effects on the Quality of Table Grapes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 4, p. 687-694, 2015.

HOIGNÉ, J. **Mechanism, rates and selectivities of oxidations of organic compounds initiated by ozonation in water**. Handbook of Ozone Technology and Applications, vol. 1, Ann Arbor Science (1982), pp. 341-379.

HOIGNÉ, J., BADER, H. **Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. I: Non-dissociating organic compounds. II: Dissociating organic compounds**. Water Research, v. 17, p. 173-194, 1983.

HOIGNÉ, J.; BADER, H. **The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions**. Water Research, v. 10, p. 337-386, 1976.

HOIGNÉ, J.; BADER, H.; STAEHELIN, J. **Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. III: Inorganic compounds and radicals**. Water Research, v. 19, p. 993-1004, 1985.

IKEURA, H.; KOBAYASHI, F.; TAMAKI, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, n.1, p.956-959, 2011.

LIN, L.; XIE, M.; LIANG, Y.; HE, Y.; CHAN, G.Y.S.; LUAN, T. Degradation of cypermethrin, malathion and dichlorovos in water and on tea leaves with O<sub>3</sub>/UV/TiO<sub>2</sub> treatment. **Food Control**, v.28, n.2, p.374-379, 2012.

MACDOUGALL, D. B. **Color in food: Improving Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. 388 p.

MANLEY, T. C.; NIEGOWSKI, S. J. Ozone. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York, v. 14, p. 410-432, 1967.

MATUO, Y.K.; LOPES, J.N.C. & MATUO, T. Contaminação do leite humano por organoclorados DDT, BHC e Ciclodienos. Jaboticabal: Editora da FUNEP, 1990.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; GLOTER, P.; AHARONI, N. Nondestructive assessment of chlorophyll content in watercress leaves by a tristimulus reflectance colorimeter. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 2, p. 117-124, 1992.

REDDY, N. R.; SCHREIBER, C. L.; BUZARD, K. S.; SKINNER, G. E.; ARMSTRONG, D. J. Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 2, p.260-264, 1994.

RIGITANO, R.L.O. & BARBOSA, T.M.L., Influência da classe e profundidade do solo na degradação do inseticida-nematicida aldicarb. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.955-960, 1994.

SKJERVOLD P.O., RORA A.M.B., FJAERA S.O., VEGUSDAL A, VORRE A, EINEN O. Effects of pre-, in-, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.194, p. 315–26, 2001.

TIWARI, B.K.; BRENNAN, C.S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, n.3, p.248-255, 2010.

TORRES, J.P.M. Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

USEPA. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. 1999. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockkey=2000229L.txt> . Acesso em: setembro de 2017.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, n. 7, p. 1443-1467, 2003.

WAKIL, W.; RIASAT, T.; LORD, J.C. Effects of combined thiamethoxam

and diatomaceous earth on mortality and progeny production of four Pakistani populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on wheat, rice and maize. **Journal of Stored Products Research**, v.52, n.1, p.28-35, 2013.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T. W. H.; CHAN, G. Y. S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v. 18, p. 466-472, 2007.