



DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU

DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE 2-FENOXIETANOL EM FILÉ  
DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) POR TÉCNICAS DE  
MICROEXTRAÇÃO ACOPLADAS AO GC-MS

LAVRAS – MG

2015

**DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU**

**DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE 2-FENOXIETANOL EM FILÉ  
DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) POR TÉCNICAS DE  
MICROEXTRAÇÃO ACOPLADAS AO GC-MS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, área de concentração  
Química/Bioquímica, para a  
obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Adelir Aparecida Saczk

**LAVRAS - MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Abreu, Daiane Cássia Pereira.

Determinação residual de 2-fenoxietanol em filé de tilápia  
(*Oreochromis niloticus*) por técnicas de microextração acopladas ao  
GC-MS / Daiane Cássia Pereira Abreu. – Lavras : UFLA, 2016.  
123 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. Anestésico. 2. Peixe. 3. SDME. 4. SPME. 5. Análise traço. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**DAIANE CÁSSIA PEREIRA ABREU**

**DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE 2-FENOXIETANOL EM FILÉ  
DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) POR TÉCNICAS DE  
MICROEXTRAÇÃO ACOPLADAS AO GC-MS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, área de concentração  
Química/Bioquímica, para a  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de dezembro de 2015.

Dra. Ana Maria de Resende Machado                      CEFET-MG

Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães                      UFLA

Dra. Priscila Vieira e Rosa                                      UFLA

Dra. Adelir Aparecida Saczk  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2015**

*A Deus, meu refúgio e minha fortaleza.*

*Aos meus pais, Manoel e Luzia, pelo amor incondicional e por se doarem  
inteiros e renunciarem a seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem  
realizar os meus.*

*Ao meu namorado, Bruno, pelo companheirismo e incentivo.*

*À minha irmã, Thaciane, pelo exemplo de força e superação.*

*Aos meus avós, pelo exemplo de vida e pela sabedoria incansável.*

*A todas as pessoas que influenciaram, direta e indiretamente, para  
que eu pudesse chegar aonde cheguei.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar inúmeras bênçãos, mesmo não sendo merecedora.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Adelir, pela orientação, por ter me recebido em seu grupo depositando confiança no meu trabalho e projeto, e por ter contribuído com o meu crescimento profissional e pessoal.

Às pessoas que conheci nesta etapa e que me trataram com carinho, seja no trabalho, nas aulas e nas atividades fora do laboratório, especialmente para aquelas com quem construí um vínculo de amizade. Obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Bianca, Rafael, Maísa, Michele, Matheus, Pedro, Meryene e Elisângela, pelas conversas, conselhos e apoio para a realização do presente trabalho.

Aos amigos que contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho, Bianca, Matheus, Priscilinha e Lidiany.

Ao Dr. Daniel Okamura, pela orientação e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Às amigas com as quais convivi durante essa etapa de projeto e aulas, Sabrina, Nadiene e Sthefanie, por todo apoio e preocupação.

Aos técnicos do Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos, Hélvia e Éder, pelo apoio, ajuda e compreensão.

Aos laboratórios de Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ), Gerenciamento de Resíduos Químicos (LGRQ), Bioquímica e Catálise e Biocombustíveis (LCAB), por me fornecerem subsídios necessários para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores doutores membros da banca, Adelir, Ana Maria, Jaqueline e Priscila, pela disponibilidade de avaliação do trabalho.

Aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, seja na graduação, na Universidade Federal de São João Del Rei, ou na pós-graduação, na Universidade Federal de Lavras. Principalmente à Stella e ao Paulo, por acreditarem no meu potencial e me motivarem.

Aos meus pais, familiares, amigos e namorado, que, mesmo longe, oraram por mim, me incentivaram, proporcionaram paz e segurança, tornando esta etapa menos árdua.

A todos, os meus sinceros agradecimentos. Sem vocês esta dissertação não teria sido realizada.

"Através da dúvida chegamos ao questionamento e através do questionamento chegamos à verdade. "

Pierre Abelárd, 1127



## RESUMO GERAL

Os peixes são animais sensíveis e suscetíveis ao estresse durante o processo de manejo. A utilização de anestésicos, como o 2-fenoxietanol, é rotineira nos setores de piscicultura, por facilitar o processo e minimizar os efeitos sobre os aspectos fisiológicos e comportamentais nos peixes. No entanto, compostos químicos utilizados durante a produção do pescado podem se acumular no organismo desses animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nenhum alimento destinado ao consumo humano deve conter resíduos de produtos utilizados durante a sua produção. Neste trabalho foi realizada a quantificação residual do anestésico 2-fenoxietanol em filés de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo analisadas concentrações de anestesia entre 450 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e períodos residuais de 0 a 24 horas. Para o preparo de amostras foram empregadas as técnicas de microextrações em fase sólida (SPME) e com gota única (SDME), ambas em modo *headspace*, com separação e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Para o desenvolvimento das metodologias de análise, três parâmetros (quantidade de sal, temperatura e tempo de extração) foram avaliados para ambas as técnicas de forma multivariada, por terem influência na eficiência de extração do 2-fenoxietanol. No planejamento das análises foi empregando o delineamento de composto central (CCD), que possibilitou analisar as variáveis de forma conjunta e estratégica, resultando em avaliações precisas com menor quantidade de análises. As metodologias desenvolvidas foram validadas e aplicadas para a quantificação residual de 2-fenoxietanol em filés de tilápia, apresentando precisão e exatidão consideráveis.

Palavras-chave: Anestésico. Peixe. SDME. SPME. Análise traço.

## GENERAL ABSTRACT

Fish are sensitive animals and susceptible to stress during handling process. The use of anesthesia is routine in fish farming sectors, such as 2-phenoxyethanol for facilitating the process and minimize the effects on the physiological and behavioral aspects in fish. However, chemicals used during the production of fish may accumulate in the organism of the animals. According to the World Health Organization (WHO), no food for human consumption must contain residues of products used during their production. To that end, this work was carried out residual quantification of 2-phenoxyethanol anesthetic in fish fillets of Nile tilapia species (*Oreochromis niloticus*), anesthesia concentrations being analyzed between 450 and 1050  $\mu\text{g L}^{-1}$  and residual periods 0 - 24 h. For the preparation of samples microextraction techniques were employed in solid phase (SPME) and single drop (SDME), both in headspace with separation and detection by chromatography coupled gas phase with mass spectrometry (GC/MS). For the development of analytical methodologies, three parameters (salt content, temperature and extraction time) were evaluated for both multivariate way to have influence on the extraction efficiency of 2-phenoxyethanol. In planning the analysis was employing the central compound design (CCD), which made it possible to analyze the variables jointly and strategically, resulting in accurate measurements with less analysis. The developed methods were validated and applied to the residual quantification of 2-phenoxyethanol in Tilapia fillets, with considerable precision and accuracy.

Keywords: Anesthetic. Fish. SDME. SPME. Trace analysis.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1	Estrutura química dos anestésicos tricaína, benzocaína, quinaldina, 2-fenoxietanol, isoeugenol e mentol.....	7
Figura 2	Estrutura química do 2-fenoxietanol.....	9
Figura 3	Dispositivo de SPME comercializado.....	12
Figura 4	Representação dos processos: A) extração e B) dessorção.....	13
Figura 5	Esquema de extração por imersão direta em SPME.....	15
Figura 6	Esquema de extração por <i>headspace</i> em SPME.....	16
Figura 7	Esquema de extração protegida com membrana em SPME.....	16
Figura 8	Fibras comercialmente encontradas para SPME: (a) 85 $\mu\text{m}$ PDMS, (b) 70 $\mu\text{m}$ CW/DVB, (c) 65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB (d) 50 $\mu\text{m}$ CW, (e) 85 $\mu\text{m}$ PA, (f) 50/30 $\mu\text{m}$ DVB/CAR /PDMS, (g) 75 $\mu\text{m}$ CAR/PDMS (h) 100 $\mu\text{m}$ PDMS.....	20
Figura 9	Representação dos processos: A) extração e B) injeção da gota orgânica com o analito extraído no equipamento analítico.....	24
Figura 10	Esquema de extração por imersão direta em SDME.....	26
Figura 11	Esquema de extração por <i>headspace</i> em SDME.....	26
Figura 12	Disposição espacial dos experimentos de um planejamento CCD.....	33

### Capítulo 2

Figura 1	Cromatograma de íons totais (TIC), no modo SCAN da extração do padrão de 2-fenoxietanol isenta de peixe por SPME na concentração de $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ .....	58
----------	--	----

Figura 2	Cromatograma de íons totais (TIC), obtido para extrato de filé de tilápia enriquecido com 10 µL (3,75 µg mL <sup>-1</sup> ) da solução estoque de 2-fenoxietanol no modo SCAN por SPME.....	59
Figura 3	Cromatograma de íons totais (TIC), obtido para extrato de filé de tilápia enriquecido com 10 µL (3,75 µg mL <sup>-1</sup> ) da solução estoque de 2-fenoxietanol no modo SIM por SPME e seu respectivo espectro de massas.....	60
Figura 4	Cromatograma de íons totais (TIC), obtido para a análise da fibra após análise do 2-fenoxietanol com o tempo de dessorção de 2 minutos.....	61
Figura 5	Análise do efeito das variáveis e suas interações pelo diagrama de Pareto.....	63
Figura 6	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação temperatura e tempo de extração, considerando fixos respectivamente: a) 0,4; b) 0,8 e c) 1,2 g de sal.....	66
Figura 7	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação quantidade de sal e temperatura de extração, considerando fixos respectivamente os tempos: a) 15, b) 30 e c) 45 minutos.....	67
Figura 8	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação quantidade de sal e tempo de extração, considerando fixas respectivamente as temperaturas: a) 40, b) 50 e c) 60 °C.....	68
Figura 9	Curva analítica obtida para o 2-fenoxietanol por SPME.....	69
Figura 10	Concentrações residuais de 2-fenoxietanol em tecidos de peixe para diferentes concentrações administradas e tempos de abate.....	72

### Capítulo 3

Figura 1	Sistema de SDME empregado na extração de 2-fenoxietanol, dispondo de um agitador magnético com temperatura, termômetro, suporte para seringa fixado por garra e banho de gelo.....	84
Figura 2	Efeito do volume da gota de solvente extrator (octano) na extração de 2-fenoxietanol por SDME. Condições experimentais: concentração de fortificação de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 45 minutos de extração, 2,5 g de sal, temperatura de $30^{\circ}\text{C}$ e volume de amostra de 5 mL.....	88
Figura 3	Cromatograma de íons totais (TIC), no modo SIM para os íons 94 e 138 $m/z$ , em uma amostra fortificada com 2-fenoxietanol ( $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).....	90
Figura 4	Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis sobre a área total.....	91
Figura 5	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação temperatura e tempo de extração, considerando fixos respectivamente: a) 2; b) 2,5 e c) 3 g de sal.....	94
Figura 6	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação quantidade de sal e temperatura de extração, considerando fixos respectivamente os tempos: a) 15, b) 30 e c) 45 minutos.....	95
Figura 7	Gráficos da superfície de resposta da área versus o efeito da interação quantidade de sal e tempo de extração, considerando fixas respectivamente as temperaturas: a) 25, b) 30 e c) $35^{\circ}\text{C}$ .....	96
Figura 8	Curva analítica obtida para o 2-fenoxietanol por SDME.....	97
Figura 9	Concentrações residuais de 2-fenoxietanol em filés de tilápia anestesiadas nas concentrações de 450, 600 e $1050 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e abatidas nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h pós-anestesia.....	99

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1	Tipos de fibras disponíveis comercialmente.....	21
----------	---	----

### Capítulo 2

Tabela 1	Parâmetros e níveis usados no planejamento CCD.....	52
Tabela 2	Matriz do planejamento CCD para a análise por SPME do 2-fenoxietanol em tecido de peixe.....	53
Tabela 3	Resultados obtidos a partir do planejamento CCD para a análise 2-fenoxietanol em filés de tilápia enriquecidos na concentração de 3,75 µg mL <sup>-1</sup> .....	62
Tabela 4	Resultados estatísticos da análise de variância do ajuste dos dados ao modelo de interação.....	65
Tabela 5	Dados das precisões intra-dia e inter-dia para análise por SPME-GC-MS. ....	70

### Capítulo 3

Tabela 1	Matriz do planejamento do composto central para as variáveis em estudo na SDME.....	83
Tabela 2	Propriedades dos solventes extratores.....	87
Tabela 3	Resultados estatísticos da análise de variância do ajuste dos dados ao modelo quadrático.....	93

## SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral.....	1
1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1	Pesca e piscicultura .....	4
2.2	Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	5
2.3	Uso de anestésicos em peixes.....	6
2.3.1	2-fenoxietanol como anestésico em peixes .....	8
2.4	Métodos de análise para anestésicos .....	9
2.5	Métodos de preparo de amostras .....	11
2.5.1	Microextração em fase sólida (SPME).....	12
2.5.1.1	Modos de extração em SPME .....	14
2.5.1.1.1	Extração por imersão direta.....	15
2.5.1.1.2	Extração por headspace .....	15
2.5.1.1.3	Extração protegida com membrana.....	16
2.5.1.2	Variáveis que afetam a eficiência da SPME .....	17
2.5.1.2.1	Tempo de extração .....	17
2.5.1.2.2	Temperatura de extração .....	17
2.5.1.2.3	Efeito do sal.....	18
2.5.1.2.4	Solventes orgânicos.....	18
2.5.1.2.5	Agitação da amostra .....	19
2.5.1.2.6	Tipo de fase extratora (fibra).....	19
2.5.1.2.7	pH da amostra.....	21
2.5.1.2.8	Volume de headspace.....	22
2.5.1.2.9	Tempo de dessorção .....	22
2.5.1.3	Limitações em SPME.....	22
2.5.2	Microextração com gota única (SDME) .....	23

2.5.2.1	Modos de extração em SDME .....	25
2.5.2.1.1	Extração por imersão direta.....	25
2.5.2.1.2	Extração por <i>headspace</i> .....	26
2.5.2.2	Variáveis que afetam a eficiência da SDME.....	27
2.5.2.2.1	Propriedades do solvente.....	27
2.5.2.2.2	Volume da gota extratora .....	28
2.5.2.2.3	Agitação da amostra .....	28
2.5.2.2.4	Tempo de extração .....	29
2.5.2.2.5	Temperatura de extração .....	29
2.5.2.2.6	Efeito do sal.....	30
2.5.2.2.7	Volume da amostra e volume do <i>headspace</i> .....	30
2.5.3	Limitações em SDME .....	31
2.6	Otimização de metodologia de preparo de amostra .....	31
2.6.1	Quimiometria .....	32
2.7	Validação do método analítico .....	33
2.7.1	Seletividade e/ou especificidade .....	34
2.7.2	Faixa de trabalho ou Linearidade .....	35
2.7.3	Limites de detecção e de quantificação.....	35
2.7.4	Precisão .....	36
2.7.5	Exatidão.....	37
2.7.6	Robustez.....	37
	REFERÊNCIAS .....	39
	CAPÍTULO 2 Aplicação da técnica SPME para determinação de 2-fenoxietanol em filé de tilápia por GC-MS .....	46
1	INTRODUÇÃO .....	49
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
2.1	Materiais e reagentes .....	50
2.2	Instrumentação .....	51
2.3	Análise de 2-fenoxietanol em filés de tilápia .....	51
2.3.1	Preparo das amostras de filés de peixes .....	52
2.4	Otimização do método de extração por SPME.....	52



2.5	Análise por <i>headspace</i> em microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS) .....	54
2.6	Validação do método analítico de quantificação de 2-fenoxietanol por SPME.....	54
2.6.1	Seletividade .....	55
2.7.2	Linearidade.....	55
2.7.3	Limites de detecção e de quantificação .....	55
2.7.4	Precisão .....	55
2.7.5	Fator de recuperação (Exatidão).....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
3.1	Fibra extratora .....	56
3.2	Condições cromatográficas .....	57
3.3	Dessorção da fibra.....	60
3.4	Análise multivariada dos fatores que afetam a SPME .....	61
3.4.1	Avaliação do efeito das variáveis por diagrama de Pareto.....	62
3.4.2	Análise por Superfície de Resposta.....	64
3.5	Validação do método analítico de quantificação de 2-fenoxietanol.....	69
3.6	Aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia .....	71
4	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS .....	74
	CAPÍTULO 3 Desenvolvimento de metodologia para determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia por SDME-GC-MS .....	76
1	INTRODUÇÃO .....	79
2.1	Soluções e reagentes.....	80
2.2	Equipamentos e materiais.....	81
2.3	Amostras de peixes anestesiados com 2-fenoxietanol.....	81
2.3.1	Preparo de amostras de filés de tilápia .....	82

2.4	Otimização multivariada da técnica de SDME na extração de 2-fenoxietanol.....	82
2.5	Análise por <i>headspace</i> em SDME acoplada ao GC-MS .....	84
2.6	Análise quantitativa do 2-fenoxietanol por SDME .....	85
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	86
3.1	Condições SDME.....	86
3.2	Condições cromatográficas .....	89
3.3	Análise por planejamento de composto central.....	90
3.3.1	Análise de superfície de resposta .....	92
3.4	Validação da metodologia de quantificação do 2-fenoxietanol por SDME .....	97
3.5	Determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia .....	98
4	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS .....	101

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

### **1 INTRODUÇÃO**

A segurança alimentar é um assunto de extrema importância e representa uma área de pesquisa em constante desenvolvimento. Isso se deve ao fato de que alguns alimentos podem ser expostos a processos químicos, físicos e/ou biológicos durante o cultivo e o processamento e, conseqüentemente, apresentar uma contaminação residual, principalmente durante a execução dos processos químicos, representando riscos para a saúde humana. Segundo legislações nacionais e internacionais e, ainda, algumas organizações, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), os alimentos não devem conter traços residuais de qualquer substância utilizada durante sua produção ou, pelo menos, conter limites aceitáveis dentro das legislações vigentes.

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), a aquicultura é uma atividade estratégica para a alimentação humana, pois proporciona alimentos ricos em proteínas e lipídeos poli-insaturados, além de gerar emprego, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. O peixe é um alimento consumido em todo o mundo, com destaque para China, Egito, Filipinas, Brasil, México e Estados Unidos, onde, conseqüentemente, há maior produção do pescado (BRASIL, 2013).

Dentre as espécies produzidas e consumidas é possível destacar a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Este peixe de água doce pertence à família Cichlidae, originária de rios que banham a África, a Jordânia e a Palestina, podendo, ainda, se reproduzir e viver em oceanos. Esta espécie apresenta rápido crescimento, capacidade de adaptar-se a diferentes ambientes e sistemas de produção, é resistente a doenças, desenvolve-se em altas densidades de estocagem, apresenta carne saborosa e com baixo teor de gordura. No Brasil, a produção de tilápia se estende por todo o território

nacional, sendo a espécie mais produzida no país e a segunda mais produzida no mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO, 2013).

No entanto, algumas práticas realizadas durante o cultivo do pescado, como biometria, análises patológicas, implantes hormonais e principalmente o transporte, expõem os peixes a uma variedade de fatores estressantes que podem afetar seu desempenho. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de compostos químicos, como, por exemplo, os anestésicos, que são administrados aos peixes, no intuito principal de facilitar o manejo e minimizar os efeitos sobre os aspectos fisiológicos e comportamentais.

No cenário mundial, os anestésicos artificiais mais utilizados na aquicultura são tricaína, benzocaína, quinaldina, metomidato e 2-fenoxietanol; os anestésicos naturais utilizados são o óleo de cravo (eugenol) e o mentol. Eles são escolhidos de acordo com sua disponibilidade no mercado, eficiência, tempo de indução, custo e destino do peixe após a anestesia.

Estudos apontam o 2-fenoxietanol como um anestésico propício para utilização na aquicultura por apresentar margens seguras de administração e diminuir a mortalidade dos peixes, apesar de apresentar alto custo e ser pouco disponível no mercado. Porém, este anestésico, assim como todos os outros compostos químicos empregados durante o processo de produção do pescado, podem se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo e, para eliminar esses resíduos, é necessário submetê-los a um período residual. Nesse sentido, se faz necessário o desenvolvimento de protocolos que estabeleçam margens seguras para seu consumo pós-manejo, visto que, no Brasil, não existem regulamentações para o uso de anestésicos em peixes.

As técnicas cromatográficas são frequentemente utilizadas para a determinação de anestésicos na carne do pescado. No entanto, a identificação de compostos presentes em matrizes complexas, como o tecido do peixe, requerem processos prévios de preparação (extração e pré-

concentração), cujo objetivo é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise.

Nesse sentido, novas técnicas foram desenvolvidas, tomando como princípio a miniaturização da extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), as quais são frequentemente empregadas no processo de extração. Dentre as técnicas miniaturizadas, destacam-se a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração com gota única (SDME), por reduzir significativamente o consumo de solventes orgânicos, além de tornar a etapa de preparo de amostras simples e rápida.

A SDME e a SPME são métodos de extração alternativos que vêm se destacando no campo de preparo de amostras. O princípio, em ambas as técnicas, consiste no particionamento dos analitos de interesse analítico entre a fase extratora e a amostra. Na SDME, a fase extratora é uma microgota de solvente orgânico suspensa ou imersa na solução da amostra em um sistema fechado no qual ocorre a migração dos analitos. Na SPME, a extração ocorre por uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou um sólido adsorvente (fase extratora), que também pode ser imersa ou suspensa na solução (*headspace*). Em ambas as técnicas, o modo de disposição da fase extratora (imersão direta ou *headspace*) deve ser selecionado de acordo com as propriedades físicas e químicas do analito e da fase extratora, e também da complexidade da amostra. Essas técnicas podem ser utilizadas para a extração de analitos apolares, de média polaridade e para aqueles cuja polaridade possa ser alterada previamente à extração.

As eficiências das técnicas SDME e SPME estão interligadas a diversos fatores que podem influenciar, de forma positiva ou negativa, a extração, como o efeito da força iônica na solução, o tempo e a temperatura de extração, a agitação da amostra, o pH da solução e o volume do *headspace*, dentre outros. Assim, tornam-se indispensáveis modelos estatísticos que possibilitem a análise de diversos parâmetros e suas

interações, obtendo-se um volume reduzido de ensaios e resultados com alta confiabilidade.

Com base no exposto, este trabalho foi realizado no intuito de desenvolver metodologias analíticas para a determinação residual do 2-fenoxietanol em filés de tilápia-do-nilo, empregando as técnicas SPME e SDME e utilizando a quimiometria como ferramenta estatística na otimização do processo.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Pesca e piscicultura**

Não se têm muitas informações das atividades pesqueiras no Brasil até meados do século XX. Em 1912 foram registrados os primeiros atos legais perante inspeções de pesca da Marinha. Após 1933, essa atividade passou a ser supervisionada pelo Ministério da Agricultura, sendo essencialmente artesanal. Em 1950, praticamente inexistia a aquicultura em escala comercial, com produção mundial na ordem de 17 milhões de toneladas de pescado por captura. Em 1961, a produção passou a ser de 34,9 milhões de toneladas, mais que o dobro do pescado de uma década atrás. Em 1983, os valores quadruplicaram, quando comparados aos do ano de 1950, passando para 68,3 milhões de toneladas (PIZAIA et al., 2008).

Só a partir de 1990 a aquicultura passou a destacar-se, com 13,1 milhões de toneladas de pescado, contra 85,9 milhões de toneladas por captura em ambiente natural (águas marinhas e continentais). Desde então, tem tido crescente participação na produção mundial de organismos aquáticos, em águas doces e salgadas. Em virtude disso, em 26 de junho de 2009, a Lei nº 11.958 criou o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e, a partir daí, a aquicultura passou a ser definida como a atividade de cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, enquanto a pesca refere-se somente ao

processo de captura desses organismos em seu habitat natural (BRASIL, 2009, 2012).

Dentro da aquicultura pode-se citar a piscicultura, atividade de cultivo de peixes, cuja carne é a mais consumida no mundo. No Brasil, esta atividade alcançou uma produção histórica em 2013, conforme estabelecido pelas estimativas e metas do Plano Safra da Pesca e Aquicultura, quando o volume da produção de pescado seria de 2,5 milhões de toneladas no final do ano de 2014. Mas, este volume foi alcançado já no ano de 2013, gerando um PIB de cerca de R\$ 5 bilhões, fazendo com que o país ocupasse a 19ª posição mundial de produção de pescado (BRASIL, 2014).

O crescimento pela procura e a criação de peixes deve-se, principalmente, à busca da população por alimentos mais saudáveis, uma vez que a carne de peixe é rica em proteínas, vitaminas e minerais, além de apresentar elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, oferecendo muitos benefícios à saúde humana (BRASIL, 2009).

## **2.2 Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Dentre as espécies de peixes mais produzidas e consumidas no Brasil, destaca-se a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), que pertence à família Cichlidae, originária de rios que banham a África, a Jordânia e a Palestina. Esta espécie foi trazida para o Brasil em 1952 e teve sua produção mais efetiva em meados de 1971 (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008).

Nos últimos anos, a produção de tilápias em viveiros foi disseminada em todas as regiões do país, disponibilizando o pescado em locais onde a pesca extrativa é inviável. A tilápia é a espécie com maior distribuição de unidades produtivas em quase todo o território nacional, correspondendo a 13% de todo o pescado produzido no Brasil, totalizando 165.061 toneladas, das quais 94% são provenientes da aquicultura (BRASIL, 2013).

O interesse pelo cultivo dessa espécie é decorrente de fatores como rápido crescimento, fácil adaptação, ser resistente a doenças e a baixos teores de oxigênio dissolvido proveniente de superpovoamentos, apresentar hábito alimentar onívoro e apresentar fácil aceitação de rações (BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

Além disso, a carne do pescado apresenta baixo teor de gordura (0,9 g.100 g<sup>-1</sup>), rendimento médio equivalente a 35%-40% em carne e seu palatável sabor, tornando-se um produto de grande interesse comercial (BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

### **2.3 Uso de anestésicos em peixes**

Os anestésicos vêm sendo introduzidos na produção aquícola há mais de 40 anos, no intuito de minimizar as alterações fisiológicas e comportamentais nos peixes durante o manejo. Com isso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, a fim de se obter métodos e substâncias capazes de proporcionar a sedação com eficiência e segurança para os animais (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004). O anestésico ideal deve apresentar características como facilidade de administração, eficiência em baixas doses, rápida indução ao estado desejado, segurança para os operadores, fácil obtenção, baixo custo e segurança para o peixe (ROSS; ROSS, 2008).

Na piscicultura, os anestésicos podem ser administrados por ingestão, injeção ou imersão. Na anestesia por ingestão utiliza-se alimento como condutor da substância sedativa, no entanto, não é possível prever o quanto do fármaco o animal consumiu, tornando-se um método inadequado. A injeção é a aplicação direta do anestésico, porém, esse método pode acarretar em lesão e escoriação, levando à perda do muco e de escamas, sendo prejudicial ao peixe, além de ser inviável para a sedação de grande quantidade de peixes. A imersão dos animais em soluções contendo a substância é o método mais eficiente e seguro dentre os apresentados, apesar



de estas substâncias orgânicas serem pouco solúveis em água (SUN et al., 2010).

Em geral, para a sedação dos peixes utilizam-se anestésicos locais, devido à rápida absorção e ação no organismo do animal, além da rápida metabolização, sendo eliminado com maior velocidade que a anestesia geral. Quando se conhece o tempo de metabolização do anestésico é possível determinar níveis seguros para o consumo da carne do pescado. Um dos prováveis mecanismos de ação dos anestésicos locais em decorrência de sua estrutura química anfifílica é o bloqueio dos canais de sódio nas células nervosas, que impede o fluxo de impulsos nervosos (KIESSLING et al., 2009).

Neste contexto, são conhecidos diversos fármacos destinados à anestesia de peixes, como tricaína, benzocaína, quinaldina, 2-fenoxietanol, isoeugenol e mentol. Suas respectivas estruturas químicas estão representadas na Figura 1.

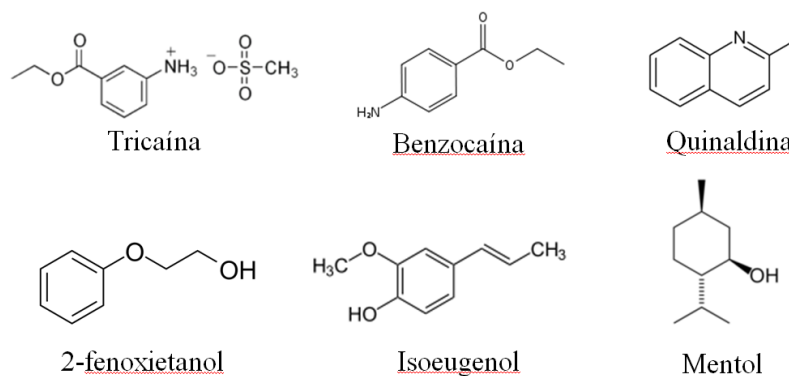


Figura 1 Estrutura química dos anestésicos tricaína, benzocaína, quinaldina, 2-fenoxietanol, isoeugenol e mentol

Nos Estados Unidos, o único anestésico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) é a tricaína metanosulfonato (MS-222). Naquele país, assim como no Canadá e no Reino Unido, é regulamentado um período residual de 21 dias antes da liberação para o abate de algumas espécies de peixes anestesiadas com tricaína. Na Noruega, esse período residual vale

tanto para tricaina quanto para a benzocaína (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile têm regulamentação para o uso de anestésicos contendo o princípio ativo isoeugenol (AQUI-S®). Nestes países não é necessário período residual, desde que sejam respeitados os parâmetros indicados pelos fabricantes (TUCKEY; FORGAN, 2012; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

No Brasil, apesar de já estar disseminada a utilização de anestésicos entre os piscicultores, ainda não existem protocolos completamente caracterizados para a utilização deles nas espécies cultivadas e ainda são necessárias informações acerca da eficiência das drogas disponíveis no mercado nacional. O anestésico pode ser considerado ideal quando tem tempo de indução da anestesia de aproximadamente 3 a 5 minutos. Esse parâmetro é definido por estudos da eficiência destes compostos em diferentes métodos de aplicação, bem como a determinação de possíveis traços residuais na composição do pescado. Assim, é possível definir margens seguras para seu consumo conhecendo o tempo necessário para a eliminação destes anestésicos (KIESSLING et al., 2009).

### **2.3.1 2-fenoxietanol como anestésico em peixes**

O composto 2-fenoxietanol, cuja estrutura está representada na Figura 2, é um líquido oleoso, opaco em condição ambiente e apresenta baixa solubilidade em água, porém, solúvel em etanol e pode ser facilmente obtido por meio de síntese. São diversas as aplicações do 2-fenoxietanol e, dentre elas, estão utilização em procedimentos cirúrgicos por apresentar propriedades bactericidas e fungicidas e auxiliar na conservação de produtos biológicos, como vacinas, inibindo o crescimento microbiano, presente em uma grande quantidade de cosméticos e preservativos. Além disso, em alguns estudos, o 2-fenoxietanol é apontado como um potencial anestésico em peixes, devido à sua ação e recuperação rápida. O nível máximo de

resíduo presente no pescado ainda não está definido, tornando seu uso ilegal (KLIMÀNKOVÁ et al., 2008; SHARMA; JOSEPH; SOOD, 2008).

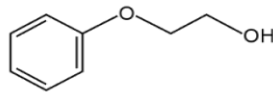


Figura 2 Estrutura química do 2-fenoxietanol

A molécula de 2-fenoxietanol pode ser dividida em três partes: a hidroxila (OH), que proporciona a hidrossolubilidade ao composto; o grupo aromático, que confere a propriedade lipofílica, essencial para a sua penetração nas fibras nervosas e a cadeia intermediária (O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), que separa a parte hidrofílica da lipofílica. Essas três partes conferem ao 2-fenoxietanol capacidade anfifílica responsável pelo bloqueio dos canais de sódio, ocasionando a sedação (KIESSLING et al., 2009).

Apesar de não estar regulamentado, o 2-fenoxietanol está entre os anestésicos mais empregados na piscicultura, pelo seu efeito de supressão da atividade neurológica. No entanto, alguns efeitos adversos são observados, tais como diminuição dos batimentos cardíacos e pressão arterial, diminuição do pH do sangue devido à diminuição de CO<sub>2</sub>, além de elevação nos níveis de adrenalina e glicose no plasma do animal (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Anestésicos, quando administrados nos peixes pouco antes do abate, podem deixar resíduos do mesmo, não sendo apropriado para o consumo. Os efeitos da substância 2-fenoxietanol na saúde humana são pouco conhecidos, sendo as dermatites e as irritações nas mucosas as mais relatadas, embora este composto seja facilmente metabolizado quando absorvido pela pele (LOCKLEY; HOWES; WILLIAMS, 2005; SCOGNAMIGLIO et al., 2012).

#### 2.4 Métodos de análise para anestésicos

A Organização Mundial da Saúde (OMS) monitora todo o processo de produção, garantindo a segurança alimentar. Segundo esta organização, o

produto final deve estar isento de qualquer contaminação, seja ela biológica, química ou física (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). No Brasil, compete ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscalizar e investigar, garantindo a segurança e a qualidade dos alimentos (BRASIL, 2009).

A pesquisa de agentes químicos em alimentos de origem animal, dentre eles os anestésicos, é assunto de interesse em todo o mundo, enfatizando a busca por métodos de identificação e quantificação de tais compostos. Dessa forma, diversos estudos envolvendo a farmacocinética e a farmacodinâmica dos anestésicos estão sendo desenvolvidos, sendo avaliados, geralmente, os parâmetros de temperatura, tempo de anestesia e recuperação, dosagem, período do dia, tamanho do peixe, diferenças de metabolismo das espécies e teor de gordura, dentre outros (BURKA et al., 1997).

Outros parâmetros importantes a serem avaliados são o tempo residual e a eliminação do anestésico pelo organismo do peixe, devido à persistência do fármaco no organismo dos animais. No Brasil, esses parâmetros não estão completamente caracterizados, tornando necessário o desenvolvimento de metodologias que possibilitem o estabelecimento de protocolos do uso de anestésicos nos setores de piscicultura.

Em trabalhos disponíveis na literatura há relatos do monitoramento residual dos anestésicos isoeugenol, tricaína e benzocaína, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e GC-MS. Nesses trabalhos, os autores, geralmente, empregam a LLE e SPE como técnicas de tratamento e pré-concentração dos analitos (KIESSLING et al., 2009; MEINERTZ et al., 1999, 2006; PEREIRA et al., 2014; SCHERPENISSE; BERGWERFF, 2007; STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 1998).

Estudos envolvendo a análise residual de 2-fenoxietanol foram desenvolvidos por Klimànková et al. (2008), os quais determinaram concentrações remanescentes de 2-fenoxietanol em filés e plasma sanguíneo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em diferentes tempos após a

anestesia, por SPME em modo *headspace*, analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa/massa (GC-MS/MS).

## 2.5 Métodos de preparo de amostras

A identificação de compostos presentes em matrizes complexas, como as amostras biológicas, geralmente requer processos prévios de preparação. Dessa forma, os métodos de separação e pré-concentração são parte integrante da preparação, tendo como principal objetivo separar compostos diferentes e aumentar a concentração do analito (QUEIROZ et al., 2001). Os métodos inicialmente utilizados com essa finalidade foram LLE e SPE (XU; BASHEER; LEE, 2007).

A LLE é uma técnica de preparo de amostras que necessita de solvente orgânico de alta pureza, requer várias etapas para a execução e para a formação de emulsão entre as fases, o que pode resultar na perda do analito e exigir o manuseio de substâncias perigosas para a saúde do analista e para o meio ambiente, o que torna seu uso menos vantajoso (XU; BASHEER; LEE, 2007).

A SPE apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos, o que favorece a seletividade analítica, possibilitando a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações, como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz biológica, a utilização de solventes orgânicos para eluição, as variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para extração (BERIJANI et al., 2006; XU; BASHEER; LEE, 2007).

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas alternativas tem sido impulsionado, visando, principalmente, à minimização na quantidade de solvente, à simplicidade de operação, além de baixo custo e consumo de tempo. Dentre estas técnicas, podem-se citar a microextração líquido-líquido

(LLME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), SDME e a SPME (ALOTHMAN et al., 2012; BERIJANI et al., 2006; DENG et al., 2012; JAIN; VERMA, 2011; PINHEIRO; ROCHA; ANDRADE, 2011; REZAEI et al., 2006; ZHAO et al., 2006).

### 2.5.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME (do inglês *solid phase micro-extraction*) foi introduzida em 1990, por Pawliszyn e colaboradores que, em seus primeiros experimentos, utilizaram fibra ótica com revestimento de fases poliméricas líquidas e sólidas. Devido ao grande potencial da técnica, ela foi se desenvolvendo e, atualmente, resulta na incorporação de uma fibra de sílica recoberta por uma camada de adsorvente a um dispositivo semelhante a uma seringa, conforme pode ser observado na Figura 3. A movimentação do êmbolo permite expor a fibra durante a extração/dessorção e protegê-la dentro da agulha durante a estocagem e a perfuração do septo (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990; BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

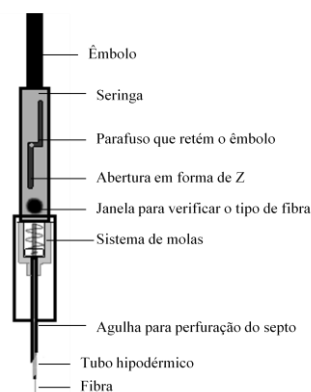


Figura 3 Dispositivo de SPME comercializado

São envolvidas duas etapas de manipulação na SPME. A primeira etapa consiste em expor a fibra revestida à amostra, ocorrendo a extração (adsorção/absorção) dos analitos. A segunda etapa consiste na dessorção dos analitos da fibra para o injetor do instrumento analítico. Na Figura 4 estão

representadas ambas as etapas de manipulação (EISERT; LEVSEN, 1996; MOTLAGH; PAWLISZYN, 1993).

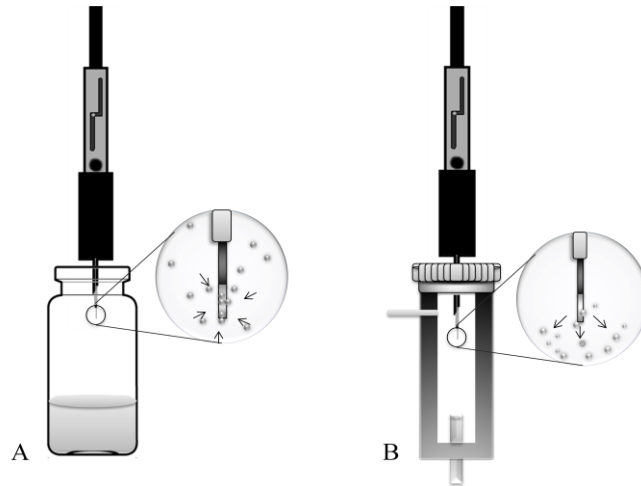


Figura 4 Representação dos processos: A) extração e B) dessorção

Na etapa de extração ocorre o equilíbrio de partição do analito entre três fases quando em modo *headspace*: a aquosa (amostra homogênea), a fibra extratora e a fase gasosa. Considerando esse sistema trifásico como sendo ideal, o equilíbrio de partição é atingido após a migração do analito entre as três fases. Dessa forma, a massa extraída da amostra pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema, permanecendo constante a massa total da amostra durante a extração, podendo ser expressa pela equação 1.

$$C_i V_{aq} = C_f^e V_f + C_g^e V_g + C_{aq}^e V_{aq} \quad (1)$$

em que  $C_i$  indica a concentração inicial do analito na amostra,  $C_f^e$  e  $V_f$  são a concentração no estado de equilíbrio e o volume da fibra extratora,  $C_g^e$  e  $V_g$  são a concentração no estado de equilíbrio e o volume da fase gasosa, e  $C_{aq}^e$  e  $V_{aq}$  são a concentração no estado de equilíbrio e o volume na fase aquosa (amostra).

A razão entre as concentrações de uma determinada espécie química presente em duas fases distintas em equilíbrio termodinâmico ( $C_f^e/C_g^e$  e  $C_g^e/C_{aq}^e$ ) é definida como coeficiente de partição ou constante de distribuição (K), conforme equações 2 e 3.

$$K_{fg} = C_f^e / C_g^e \quad (2)$$

$$K_{g\ aq} = C_g^e / C_{aq}^e \quad (3)$$

Pelo coeficiente de partição é possível prever, por meio de cálculos, a quantidade de analito extraído pela fibra após atingir o equilíbrio do sistema ( $n_f$ ), sendo este diretamente proporcional à concentração e ao volume da fibra. A dinâmica de extração desse processo está descrita na equação 4 (ARTHUR et al., 1992; PAWLISZYN, 2000; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

$$n_f = \frac{K_{fg} K_{g\ aq} V_f V_{aq} C_i}{K_{fg} K_{g\ aq} V_f + K_{g\ aq} V_g + V_{aq}} \quad (4)$$

Na segunda etapa, a fibra contendo os analitos é transferida para o instrumento analítico em que ocorre a dessorção térmica, para posterior separação e determinação dos analitos extraídos. Nesta etapa, os analitos, geralmente, são dessorvidos, expondo a fibra no injetor aquecido do cromatógrafo (EISERT; LEVSEN, 1996; MOTLAGH; PAWLISZYN, 1993).

### 2.5.1.1 Modos de extração em SPME

Durante o procedimento de extração, três modos de operação podem ser escolhidos utilizando SPME de acordo com a matriz a ser analisada. São eles a extração direta, a extração em *headspace* e a extração envolvendo a proteção por membrana (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).



### 2.5.1.1.1 Extração por imersão direta

No modo de extração direta (Figura 5), a fibra revestida é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente a partir das matrizes aquosas “limpas” para a fase extratora, sendo este modo de extração o mais utilizado para compostos de baixa volatilidade. Uma limitação do modo direto é o fato de que a exposição da fibra aos constituintes da matriz pode ocasionar na extração indesejada da sua superfície, danificando-a ou exigindo etapa adicional de limpeza da fibra (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).



Figura 5 Esquema de extração por imersão direta em SPME

### 2.5.1.1.2 Extração por *headspace*

O modo de extração *headspace* consiste no aquecimento de amostras aquosas ou sólidas contidas em um frasco fechado para provocar a volatilização dos compostos, concentrando-os no espaço vazio do frasco. Em seguida, a fibra é posicionada acima da amostra, ou seja, no *headspace* (Figura 6) e os analitos se distribuem entre a amostra, o *headspace* e a fibra. Este modo é, geralmente, empregado para a extração de compostos voláteis, mas também pode ser aplicado a compostos pouco voláteis, desde que sejam adotados procedimentos que favoreçam a transferência dos mesmos para a fase gasosa (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008; PAWLISZYN, 1997, 2000).



Figura 6 Esquema de extração por *headspace* em SPME

### 2.5.1.1.3 Extração protegida com membrana

Para as amostras contendo ambos os analitos, compostos voláteis, não voláteis e de alto peso molecular e, ainda, compostos interferentes, a aplicação da técnica direta ou *headspace* pode ser um desafio. Em tais casos, o uso de uma membrana para SPME protegida resulta em melhor reprodutibilidade e precisão, pelo fato de ser seletiva, separando a amostra dos interferentes. Na amostragem por membrana, a fibra é inserida em uma membrana imersa na amostra (Figura 7). Este método é o menos utilizado em SPME, pois, nesta forma, a extração é mais lenta quando comparada aos outros modos, uma vez que os analitos precisam se difundir na membrana (PAWLISZYN, 1997, 2000).



Figura 7 Esquema de extração protegida com membrana em SPME

### **2.5.1.2 Variáveis que afetam a eficiência da SPME**

A quantidade de analitos extraídos pela fibra em SPME pode ser afetada por alguns parâmetros, tais como as características do revestimento, a temperatura e o tempo do processo de extração, a adição de sal ou de um solvente orgânico na amostra, as modificações de pH, a agitação e o volume de *headspace* (PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.1 Tempo de extração**

A SPME é uma técnica de equilíbrio entre a fase aquosa contendo a amostra, a fibra extratora e a fase gasosa, sendo, portanto, muito importante a determinação do tempo necessário para que o sistema alcance tais condições. Analitos com elevada massa molecular necessitam de um tempo maior para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. Fora do equilíbrio haverá baixo desempenho, comprometendo diretamente a detectabilidade do método (PEÑALVER et al., 1999).

Quando se analisam as frações volátil e semivolátil de uma amostra com mais de um analito de interesse, o tempo para que estes analitos alcancem o equilíbrio pode ser distinto. Geralmente, nestes casos se fixa um tempo de extração que abranja ambos os tempos de equilíbrio, o que torna muito importante o controle do tempo de extração em benefício da repetibilidade, já que pequenas oscilações podem variar consideravelmente a quantidade de analito extraída (PAWLISZYN, 1997).

#### **2.5.1.2.2 Temperatura de extração**

A variação da temperatura de extração tem grande influência sobre a microextração em fase sólida. A temperatura pode influenciar de forma positiva e/ou negativa a extração; o aumento da temperatura atenua a maior difusão dos analitos, melhorando a eficiência de extração. Em contrapartida,

com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição do coeficiente de partição, reduzindo a quantidade de analito extraído (PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.3 Efeito do sal**

A adição de sal está diretamente relacionada com o aumento da força iônica da solução, observando-se um aumento no rendimento da extração com o aumento da concentração do sal. No entanto, o excesso de sal, após o rendimento máximo, provocará uma diminuição na massa extraída. Este fato pode ser explicado levando-se em consideração dois processos que ocorrem simultaneamente (LORD; PAWLISZYN, 2000).

Primeiro, com o aumento da quantidade de sal, ocorre a diminuição da solubilidade do composto de interesse, tornando-o mais hidrofóbico, favorecendo a sua migração para a fase extrativa e, com isso, aumentar a extração devido ao fenômeno *salting out*, no qual moléculas de água formam uma esfera de hidratação em torno das moléculas iônicas do sal, reduzindo moléculas de água disponíveis para solubilizar os analitos na amostra. Dessa maneira, uma quantidade maior do analito migra para a fase extratora. Por outro lado, os analitos polares podem participar de interações eletrostáticas com as moléculas de sal, reduzindo a difusão deles para a fase extratora (PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.4 Solventes orgânicos**

A presença de solventes orgânicos na amostra aquosa usualmente reduz a quantidade de analito extraído, devido à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fibra de SPME (PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.5 Agitação da amostra**

A agitação da amostra é um dos parâmetros que afetam a eficiência da SPME por possibilitar o equilíbrio termodinâmico em tempo reduzido, ou seja, quando a amostra é agitada o tempo necessário para alcançar o equilíbrio é reduzido devido ao aumento da difusão dos analitos ao redor da fibra, ocasionado pela diminuição da camada estática, tanto para imersão direta quanto para exposição ao *headspace*. Antes das extrações também é importante manter a agitação da amostra por influenciar a reprodutibilidade dos resultados, especialmente no modo *headspace* (PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.6 Tipo de fase extratora (fibra)**

Existe uma variedade de polímeros disponíveis comercialmente, tais como polidimetilsiloxano (PDMS), polietilenoglicol (PEG), poliacrilato (PA), carbowax (CW) e divinilbenzeno (DVB). A fibra ainda pode ser revestida por um sólido adsorvente, como o carvão ativo microparticulado (Carboxen ou CAR). Essas fibras podem apresentar variações desses polímeros que, combinados, possibilitam a modificação da superfície delas, como, por exemplo, DVB/PDMS e CAR/DVB/PDMS. Na Figura 8 podem ser observadas algumas fibras comerciais, as quais têm diferentes colorações de acordo com o tipo de revestimento e a espessura (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

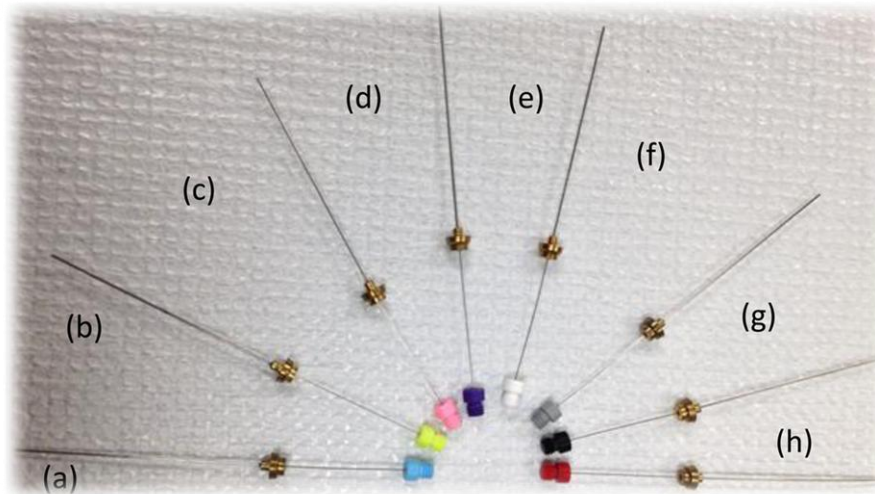


Figura 8 Fibras comercialmente encontradas para SPME: (a) 85  $\mu\text{m}$  PDMS, (b) 70  $\mu\text{m}$  CW/DVB, (c) 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (d) 50  $\mu\text{m}$  CW, (e) 85  $\mu\text{m}$  PA, (f) 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR /PDMS, (g) 75  $\mu\text{m}$  CAR/PDMS (h) 100  $\mu\text{m}$  PDMS  
Fonte: Soso et al. (2014).

A escolha correta de cada uma das fibras deve ser realizada de acordo com a polaridade dos compostos presentes na matriz a ser analisada (semelhante dissolve semelhante) e do modo de extração. Logo, a escolha correta do tipo de fibra a ser utilizada no desenvolvimento de cada metodologia, empregando a SPME, será crucial na obtenção de dados que sejam considerados válidos (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Outro aspecto que deve ser avaliado para a escolha da melhor fibra para análise é sua espessura. Filmes mais espessos apresentam maiores taxas de extração, no entanto, requerem maior tempo para atingir o equilíbrio de partição. De acordo com Pawliszyn (1997), é necessária a utilização da menor espessura que permita a extração de uma massa detectável. Esta escolha é ainda importante para evitar problemas relacionados à danificação do material de revestimento, como a remoção do material por raspagem, quando a fibra é retraída. Na Tabela 1 constam algumas fibras e suas respectivas especificidades/seletividades.

Tabela 1 Tipos de fibras disponíveis comercialmente

<b>Tipos de fibras</b>	<b>Tipos de analitos</b>	<b>Tipo de extração</b>
PDMS 100 $\mu\text{m}$	Voláteis	Absorção
PDMS 30 $\mu\text{m}$	Não polares semivoláteis	Absorção
PDMS 7 $\mu\text{m}$	Não polares de alto peso molecular	Absorção
PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$	Voláteis, aminas e compostos nitroaromáticos	Adsorção
CAR/PDMS 75/80 $\mu\text{m}$	Gases e compostos de baixo peso molecular	Adsorção
DVB/CAR/PDMS 50/30 $\mu\text{m}$	Voláteis e semivoláteis	Adsorção
PA 85 $\mu\text{m}$	Polares semivoláteis	Absorção
PEG (CW/DVB) 60 $\mu\text{m}$	Polares, p. ex. álcoois	Adsorção

Fonte: Adaptado de Spietelun et al. (2011).

O processo de extração pode ser classificado em absorção ou adsorção, de acordo com a fibra utilizada em SPME. Em ambos os processos ocorre a difusão das moléculas do composto de interesse para a fase polimérica. No processo de absorção, os analitos se difundem na superfície do revestimento por um processo não competitivo, no qual a extração do analito de interesse não é afetada pela presença de compostos interferentes na matriz. Na adsorção, o processo de extração ocorre na superfície do revestimento polimérico, o que pode ocasionar uma maior competição entre os interferentes presentes na matriz e o analito de interesse, acarretando na diminuição da eficiência da extração (PAWLISZYN, 1997).

#### **2.5.1.2.7 pH da amostra**

Geralmente, o pH da matriz deve ser ajustado para aumentar a extração do analito sobre a fibra, tanto no modo direto quanto no modo *headspace*. O ajuste deve ser feito de acordo com a natureza do analito, no qual somente suas formas não dissociadas são extraídas pelos revestimentos

que compõem a fibra utilizada na SPME. Logo, frequentemente, é utilizada solução tampão para controlar o pH da amostra, mantendo constante a forma não dissociada e dissociada (LORD; PAWLISZYN, 2000).

#### **2.5.1.2.8 Volume de *headspace***

O volume de *headspace* é um importante parâmetro a ser otimizado em SPME, por estar diretamente relacionado com a eficiência do método, ou seja, com a diminuição do volume do *headspace*, a sensibilidade aumenta consideravelmente. Além disso, um menor volume de *headspace* resulta em uma extração mais rápida dos compostos de interesse (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008; PEÑALVER et al., 1999).

#### **2.5.1.2.9 Tempo de dessorção**

Logo após a extração, os analitos presentes na fibra são transferidos para o instrumento analítico no qual ocorrem a dessorção, a separação e a determinação. Durante a dessorção, os analitos difundem-se do revestimento da fibra para o injetor. Portanto, as variáveis, como tempo e temperatura de dessorção, devem ser avaliadas para eliminar o efeito memória, que pode interferir nas análises subsequentes e na repetibilidade dos resultados (PAWLISZYN, 1997).

#### **2.5.1.3 Limitações em SPME**

A SPME vem sendo apontada como uma técnica promissora em decorrência de suas vantagens, tais como o fato de não ser necessária a utilização de solventes de extração, apresentar baixo custo e facilidade de operação (podendo ser utilizada em amostragens *in situ*), boa reprodutibilidade nas análises de traços e baixo tempo de extração (NERIN et al., 2009; SPIETELUN et al., 2011).



Por outro lado, a SPME é limitada por alguns fatores, como a não seletividade dos analitos extraídos pela fase polimérica, a fragilidade da fibra que pode ser facilmente quebrada e o fato de que compostos de elevada massa molecular podem ficar retidos irreversivelmente na fibra, ocasionando alteração de suas propriedades, inutilizando-a. Além disso, o condicionamento térmico das fibras pode causar sangramento do revestimento (NERIN et al., 2009; ULRICH, 2000).

### **2.5.2 Microextração com gota única (SDME)**

A técnica de preparo de amostras SDME (do inglês *Single Drop Microextraction*) foi desenvolvida por Jeannot e Cantwell, em 1996, como técnica alternativa para extração e pré-concentração de compostos orgânicos. A técnica passou por um rápido desenvolvimento desde então, sendo amplamente aplicada na determinação de compostos orgânicos e também inorgânicos. Assim como a SPME, a SDME também é uma técnica baseada em equilíbrio, mas, nesse caso, a fase extratora é uma gota (volume na ordem de  $\mu\text{L}$ ) de solvente orgânico suspensa na ponta de uma agulha de uma microsseringa. A extração ocorre pela partição dos analitos entre a amostra (fase aquosa) e o solvente extrator (fase orgânica), podendo ser empregado o modo de imersa direta ou por suspensão da gota no espaço vazio (*headspace*) acima da amostra. Após um período de extração, o êmbolo da microsseringa é puxado de forma a recolher a microgota e imediatamente introduzido no sistema cromatográfico (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; TOR, 2006). Na Figura 9 está representado o processo de extração e injeção no equipamento instrumental de análise.

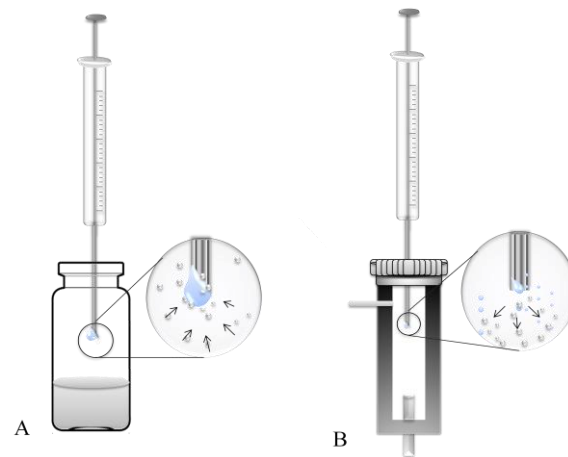


Figura 9 Representação dos processos: A) extração e B) injeção da gota orgânica com o analito extraído no equipamento analítico

O aspecto termodinâmico da SDME ocorre de forma semelhante à SPME. Durante a extração dos analitos da amostra, o sistema tende ao equilíbrio de partição entre as três fases (aquosa, orgânica e gasosa) em modo *headspace* ou entre as duas fases (aquosa e orgânica) no modo de imersão direta. Considerando o sistema trifásico, o equilíbrio de massas pode ser descrito pela equação 5, no qual a massa total permanece constante.

$$C_i V_{aq} = C_{org}^e V_{org} + C_g^e V_g + C_{aq}^e V_{aq} \quad (5)$$

em que  $C_i$  indica a concentração inicial do analito na amostra;  $C_{org}^e$  e  $V_{org}$  são a concentração no estado de equilíbrio e o volume da gota orgânica;  $C_g^e$  e  $V_g$  são a concentração no estado de equilíbrio e o volume da fase gasosa e  $C_{aq}^e$  e  $V_{aq}$  são a concentrações no estado de equilíbrio e o volume na fase aquosa.

Segundo trabalho descrito por Jeannot, Przyjazny e Kokosa (2010), a partição do analito entre as fases do sistema pode ser expressa como coeficiente de distribuição ou razão de distribuição, conforme representado nas equações 6 e 7.

$$K_{org\ g} = C_{org}^e / C_g^e \quad (6)$$

$$K_{g\ aq} = C_g^e / C_{aq}^e \quad (7)$$

Logo, a constante partição entre a fase aceptora e a doadora pode ser expressa pela equação 8.

$$K_{org\ aq} = K_{org\ g} \times K_{g\ aq} \quad (8)$$

Pelo coeficiente de partição é possível prever, por meio de cálculos, a quantidade de analito extraída pela gota após atingir o equilíbrio do sistema. Esta quantidade pode ser descrita como demonstrado na equação 9 (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

$$C_{org}^e = \frac{K_{org\ aq} C_i}{1 + (K_{org\ aq} V_g / V_{aq}) + (K_{org\ aq} V_{org} / V_{aq})} \quad (9)$$

### 2.5.2.1 Modos de extração em SDME

Similar à técnica de SPME, na SDME as análises também podem ser realizadas por imersão direta ou no *headspeace* da amostra, podendo ser determinado o melhor modo de extração e pré-concentração pelas propriedades das substâncias a serem analisadas e também o tipo de matriz (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; ZHANG et al., 2008).

#### 2.5.2.1.1 Extração por imersão direta

Na SDME, a extração por imersão direta é convencionalmente utilizada para amostras aquosas consideradas limpas, por se tratar de uma técnica não específica, mas seletiva ao analito de interesse, podendo ser amplamente utilizada para compostos menos voláteis que sejam solúveis tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica.

A técnica consiste em uma microgota com volume pré-determinado, geralmente entre 1 e 3  $\mu\text{L}$  de solvente orgânico, a qual é exposta no seio da solução da amostra por uma microsseringa, formando uma gota suspensa na ponta da agulha. Para que ocorra o equilíbrio entre solução aquosa e a fase extratora mais rapidamente, o sistema é mantido sob constante agitação por um determinado tempo. Após extração, a microgota é recolhida para a seringa; em seguida, a fase extratora contendo o analito de interesse é submetida à análise cromatográfica. Um desenho representativo da extração por imersão direta em SDME pode ser observado na Figura 10 (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).



Figura 10 Esquema de extração por imersão direta em SDME

#### 2.5.2.1.2 Extração por *headspace*

A extração por *headspace* (Figura 11) é um processo semelhante à extração por imersão direta.



Figura 11 Esquema de extração por *headspace* em SDME

Este modo consisti na introdução de uma microsseringa no septo de um frasco, sendo posicionada de forma que a microgota não seja exposta diretamente em contato com a amostra, ocasionando na distribuição do analito entre a amostra, o *headspace* e a gota orgânica. Sendo assim, este modo de extração é recomendado para análises de compostos voláteis, semivoláteis ou que o produto de sua derivatização forneça essa propriedade. Este modo de extração apresenta algumas vantagens, como a eliminação de interferentes em matrizes complexas e material particulado (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

#### **2.5.2.2 Variáveis que afetam a eficiência da SDME**

A eficiência da extração por SDME pode ser influenciada por diversos fatores, como o volume da fase extratora e suas propriedades, espaço do *headspace*, tempo e temperatura de extração, agitação da amostra e efeito da força iônica (sal).

##### **2.5.2.2.1 Propriedades do solvente**

Existem diversos solventes que podem ser utilizados como extratores na SDME, devido às suas propriedades físicas e químicas. Estes solventes devem ser imiscíveis em água, ter alta pressão de vapor para que não evapore durante a extração e também devem ser compatíveis com sistemas cromatográficos. A viscosidade do solvente deve ser alta o suficiente para que a gota se fixe na ponta da agulha da seringa, e não tão alta ao ponto de diminuir a taxa de difusão do analito, afetando o tempo de extração. A fase extratora deve apresentar características compatíveis com o analito, como as interações intermoleculares: forças de Van der Waals, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; SARKHOSH et al., 2011).

#### 2.5.2.2.2 Volume da gota extratora

A eficiência da extração está diretamente relacionada ao volume da gota do solvente, uma vez que a quantidade de analito a ser extraída é proporcional ao volume da fase extratora. Porém, gotas com volumes superiores a 3  $\mu\text{L}$  são instáveis por serem mais susceptíveis à queda, principalmente quando se utiliza o modo de extração por imersão direta, sendo preferencial a reprodução de gotas com o volume entre 1-2  $\mu\text{L}$  (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

Quando solventes extratores são expostos a elevadas temperaturas, longos tempos de extração e vigorosas agitações, parte da gota evapora ou dissolve na amostra, sendo recolhido um volume menor que o exposto. Caso ocorra de o volume recolhido ser igual ou superior ao utilizado na extração, possivelmente o solvente encontra-se contaminado pela matriz da amostra, fato esse observado no modo de imersão direta em matrizes complexas (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

#### 2.5.2.2.3 Agitação da amostra

Normalmente, a agitação da amostra é um dos parâmetros utilizados para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos para a fase extratora, conseqüentemente reduzindo o tempo de extração. Taxas de agitação entre 300-600 rpm para o modo de imersão direta são recomendadas para se evitar perda da gota por deslocamento ou diminuição de seu tamanho por dissolução na amostra. No modo *headspace* recomenda-se velocidade de agitação de até 1.000 rpm; velocidades muito superiores podem provocar espalhamento da amostra interferindo na extração. Antes das extrações também é importante manter a agitação da amostra, por influenciar a reprodutibilidade dos resultados, especialmente no modo

*headspace* (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

#### **2.5.2.2.4 Tempo de extração**

Um dos parâmetros de maior relevância na SDME é o tempo de extração, que é o tempo necessário para se atingir o equilíbrio entre as duas fases do sistema no modo de imersão direta (fases aquosa e orgânica) ou entre as três fases no modo *headspace* (fase aquosa, *headspace* e fase orgânica). Apesar do aumento da eficiência com o tempo de extração, tempos muito elevados podem resultar na perda da gota. Além do mais, tempos de extração maiores que 60 minutos não são viáveis para o desenvolvimento de protocolos (SARKHOSH et al., 2011; WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

#### **2.5.2.2.5 Temperatura de extração**

A temperatura é um parâmetro de grande influência na SDME, especialmente para as extrações por *headspace*. Alguns analitos de polaridade moderada tornam-se mais solúveis em soluções aquosas com o aumento da temperatura, diminuindo a concentração desses analitos no *headspace*. Inversamente a este fato, analitos não polares migram em maior concentração para o espaço de *headspace* com o aumento da temperatura. No entanto, temperaturas elevadas ocasionam solubilidade e/ou volatilização do solvente extrator, diminuindo a eficiência da técnica. Portanto, uma temperatura de extração ideal deve ser encontrada, de forma a minimizar seu efeito sobre a gota e possibilitar extrair eficientemente os analitos de interesse (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

#### 2.5.2.2.6 Efeito do sal

Semelhante à técnica de SPME, na SDME a adição de sal também influencia a eficiência da extração, pelo fato de ele estar diretamente relacionado com o aumento da força iônica da solução, efeito conhecido como *salting out*. De acordo com Jeannot, Przyjazny e Kokosa (2010), a adição de sal tem efeito, principalmente, em analitos com polaridade moderada, baixos pesos moleculares e voláteis. Porém, a extração de analitos apolares e semivoláteis, tais como os HPAs, que têm constante de dissociação superior a 1.000, não é beneficiada com o aumento da força iônica. A alta força iônica também pode diminuir a solubilidade do solvente de extração e, conseqüentemente, diminuir a volatilização e/ou a dissociação da gota, obtendo maior reprodutibilidade direta (ALOTHMAN et al., 2012; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

O sal mais comumente utilizado para a mudança da força iônica da solução é o cloreto de sódio, no entanto, o sulfato de sódio anidro pode ser utilizado nas mesmas proporções, com a vantagem de não interferir em soluções halogenadas. Porém, este sal deve ser utilizado em quantidades e condições ideais, uma vez que soluções saturadas apresentam partículas não dissolvidas que podem deslocar a gota em imersão direta (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

#### 2.5.2.2.7 Volume da amostra e volume do *headspace*

Os volumes da amostra e do *headspace* estão diretamente relacionados com a eficiência do método, uma vez que a quantidade máxima de analito extraído é dependente dos valores de coeficiente de distribuição do sistema. Logo, volumes maiores requerem tempos de extração mais longos (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

Segundo Wardencki, Curyło e Namiesnik (2007), os volumes do *headspace* e da amostra devem ser maiores que o necessário, sendo o



suficiente para expor a gota sem que a mesma tenha contato com a amostra (modo *headspace*) e para evitar o contato da amostra com a tampa (imersão direta).

### **2.5.3 Limitações em SDME**

Trabalhos reportados na literatura evidenciam que a técnica de SDME vem sendo consolidada a cada dia. Vários equipamentos automatizados têm sido desenvolvidos, melhorando a precisão e a reprodutibilidade da técnica. Porém, estes equipamentos são de elevado custo, tornando mais viável trabalhar com análises manuais quando o número de amostras é reduzido. No entanto, pode-se diminuir drasticamente a precisão da técnica quando analistas não hábeis conduzem os experimentos, além de alguns inconvenientes que podem ocorrer no decorrer da prática, como queda da gota e volatilização, dentre outros. A determinação das condições para os analitos a serem identificados utilizando-se a SDME deve ser realizada de forma criteriosa, pois a eficiência da técnica esta diretamente relacionada a estes parâmetros (ALOTHMAN et al., 2012; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

## **2.6 Otimização de metodologia de preparo de amostra**

Com o intenso desenvolvimento e aprimoramento das técnicas instrumentais e dos métodos de preparo de amostra, tornou-se fundamental, e praticamente indispensável, a otimização dos dados, a fim de maximizar as respostas analíticas. Logo, o uso de tratamentos mais complexos, do ponto de vista matemático e estatístico, demonstrou ser mais viável, obtendo respostas mais precisas e interpretações mais completas (SANTOS; SANTOS; FERREIRA, 2003).

Duas formas de otimização são mais comumente utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, os métodos univariados e os

multivariados. Na estatística univariada cada variável é avaliada separadamente, fixando-se condições para as demais. Este tipo de otimização é de fácil interpretação dos dados obtidos, principalmente por se tratar de gráficos bidimensionais, relacionando a resposta analítica com a variável que está sendo otimizada. Entretanto, esta forma de otimização se tornou limitada pelo fato de não considerar a presença de interação entre as variáveis avaliadas, além de obter consideravelmente um número maior de experimentos com o aumento do número de fatores (SANTOS; SANTOS; FERREIRA, 2003).

O modelo estatístico dos métodos multivariados vem sendo amplamente utilizado nos últimos anos, por considerar a correlação entre as amostras, entre as variáveis e entre amostras e variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação, com um número reduzido de ensaios, com alta confiabilidade dos resultados obtidos (CRAMER et al., 2005). Porém, a interpretação dos resultados torna necessária a utilização de recursos matemáticos. Com isso, a análise multivariada na avaliação e na interpretação de dados químicos deu origem a uma nova área da Química, denominada quimiometria (FERREIRA et al., 2002; ZOUGAGH et al., 2000).

### **2.6.1 Quimiometria**

A notação quimiometria foi introduzida pelo sueco Svante Wold e pelo americano Bruce R. Kowalski, em 1972 e tem se difundido nas mais diversas áreas da química e ciências afins. De forma geral, pode ser definida como a parte da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais, a fim de planejar e selecionar procedimentos de medidas e experimentos otimizados, disponibilizando ferramentas para o processamento dos dados químicos estudados, obtendo o máximo de informação química relevantes (FERREIRA et al., 2002).

Os métodos quimiométricos vêm sendo empregados no preparo de amostras. No planejamento fatorial, os fatores que mais influenciam o preparo de amostra são selecionados no intuito de verificar a influência das variáveis e de suas interações sobre o sinal analítico (área e intensidade do pico e relação sinal/ruído, dentre outros). Frequentemente, é utilizada superfície de resposta para encontrar o ponto ótimo da metodologia analítica obtida por delineamentos estatísticos, como planejamento do composto central (CCD-*Composite Central Design*), matriz de Doehlert e Box-Behnken (ZOUAGH et al., 2000).

Dentre os delineamentos padrões, o CCD é considerado um delineamento eficiente e requer poucos ensaios para a sua realização. Este planejamento consiste em  $2^k$ , sendo  $k$  o número de fatores, com  $2k$  fatores axiais e um ponto central  $C_0$ , conforme representado na Figura 12. O total de experimentos pode ser dado por  $N = 2^k + 2k + C_0$ , no qual o ponto central é uma alternativa que deve ser explorada para avaliar os erros do planejamento, tornando mais confiáveis os dados obtidos (FERREIRA et al., 2002).

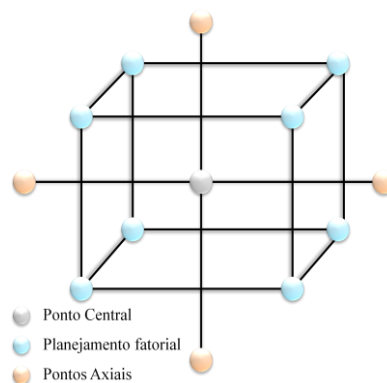


Figura 12 Disposição espacial dos experimentos de um planejamento CCD

Fonte: Arquivo pessoal

## 2.7 Validação do método analítico

A validação de um método analítico é um processo necessário para garantir sua confiabilidade na determinação de compostos. Para isso, um conjunto de verificações deve ser realizado, desejando-se resultados cientificamente coerentes e que atendam às exigências das agências regulamentadoras. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalizações e Qualidade Industrial (INMETRO) são os órgãos credenciados para avaliar a competência destes ensaios (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA - INMETRO, 2011).

Os parâmetros de validação, na maioria das agências regulamentadoras, são seletividade e/ou especificidade, faixa de trabalho ou linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez (RIBANI et al., 2004).

### **2.7.1 Seletividade e/ou especificidade**

As definições de seletividade e especificidade são muito semelhantes. Específico é o método que produz resposta para apenas um analito e seletivo, o método que produz respostas para vários analitos. Ambos definem de forma inequívoca a capacidade do método instrumental de separação em identificar e distinguir um analito na presença de outros compostos ou interferentes presentes na matriz, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Este parâmetro deve ser o primeiro a ser avaliado, para não comprometer a linearidade, a exatidão e a precisão do método (RIBANI et al., 2004).

A análise de seletividade e/ou especificidade para matrizes complexas pode ser avaliada por testes de comparação das respostas da matriz isenta do composto de interesse com a matriz enriquecida com padrão. Quando a matriz não é isenta do composto de interesse, deve ser realizada uma comparação entre as curvas analíticas do padrão e do padrão

na matriz, averiguando se a matriz não interfere na determinação do composto (RIBANI et al., 2004).

### **2.7.2 Faixa de trabalho ou linearidade**

Neste parâmetro avalia-se a capacidade do método analítico de demonstrar que o sinal obtido é diretamente proporcional à massa do composto de interesse. Dessa forma, a espécie poderá ser quantificada por uma relação matemática, relação que, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Segundo normas referidas, recomenda-se que a curva analítica tenha, no mínimo, cinco pontos e que não incluam o ponto zero, devido aos possíveis erros associados. A linearidade do método pode ser avaliada por padronização externa e interna, superposição de matriz e adição padrão. Cada opção deve ser escolhida de acordo com a necessidade da análise (RIBANI et al., 2004).

Para a confecção da curva analítica, devem ser preparadas soluções do padrão em diferentes concentrações conhecidas, que serão analisadas nas condições do método proposto. Na curva analítica, o eixo vertical (y) é definido como a medida instrumental (área ou altura do pico cromatográfico) e o eixo horizontal (x), a concentração dos padrões de interesse. A partir do método matemático de regressão linear é possível estimar os coeficientes de regressão a e b da curva e também o coeficiente de determinação  $r^2$ , que permite avaliar a qualidade da curva obtida. Segundo órgãos regulamentadores, são satisfatórios valores de  $r^2$  de 0,99 e 0,9, para ANVISA e INMETRO, respectivamente (CASSIANO et al., 2009; RIBANI et al., 2004).

### **2.7.3 Limites de detecção e de quantificação**

Os limiares analíticos de um método são definidos pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ). O LD representa a menor

concentração da substância em análise que pode ser detectada obtida por um sinal instrumental diferente do sinal do branco num dado intervalo de confiança estatística. Este parâmetro pode ser calculado pelo método visual, relação sinal-ruído e também se baseando na curva analítica. Dentre esses métodos, o baseado nos parâmetros da curva analítica pode ser mais satisfatório, o qual pode ser calculado pela equação 10.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (10)$$

em que  $s$  pode ser estimado pelo desvio padrão do coeficiente linear da reta e  $S$  pelo coeficiente angular da curva analítica.

O LQ corresponde à menor concentração da faixa de trabalho que é possível quantificar a substância de interesse, na qual o coeficiente de variação do sinal deve estar reduzido a valores inferiores a 10%, compreendendo a menor concentração do padrão da faixa de trabalho acima desse limite. O LQ pode ser calculado pela equação 11, a partir dos resultados da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (11)$$

#### 2.7.4 Precisão

A precisão de um método analítico é definida pela proximidade dos resultados das replicatas de ensaios laboratoriais em mesmas condições de análise. Este parâmetro pode ser avaliado pelo desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) das medidas de, no mínimo, três replicatas em três diferentes níveis de concentração, determinando a dispersão entre os resultados que podem estar associados a erros aleatórios ou contínuos (MILLER; MILLER, 1993).

Em testes de validação, a precisão deve ser considerada em três parâmetros: intradia (repetibilidade), interdia (precisão intermediária) e

intralaboratorial (reprodutibilidade). O parâmetro intradia expressa a precisão de um método realizado a partir de várias medições sucessivas da mesma amostra em condições de operação idênticas, em um curto intervalo de tempo. A precisão interdia é semelhante à anterior, porém, as análises são realizadas em dias distintos e não consecutivos. De preferência, as análises devem ser realizadas por analistas diferentes. A precisão intralaboratorial é avaliada utilizando-se as mesmas amostras em diferentes laboratórios e com outros analistas e equipamentos (CASSIANO et al., 2009; RIBANI et al., 2004).

### **2.7.5 Exatidão**

A exatidão de um método analítico pode ser avaliada por ensaios de recuperação. Por este parâmetro é possível inferir a eficiência do método de preparo de amostra, comparando-se as respostas obtidas para o padrão isento de matriz com uma matriz enriquecida com o padrão nas mesmas concentrações. Os resultados obtidos são tratados em termos de porcentagem e os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70% e 120%, podendo ter variações nesses valores de acordo com a complexidade da amostra. Apesar da maior dificuldade de ser obtida, a exatidão também pode ser avaliada por comparação de resultados com os materiais de referência certificados (CRM). A exatidão pode ser avaliada pelo método de adição de padrão quando for impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

### **2.7.6 Robustez**

A robustez pode ser definida como a capacidade de um método analítico de resistir a pequenas alterações experimentais. Este parâmetro pode ser avaliado pela variação da força iônica ou pH da solução, pela troca de analista, temperatura, entre outros. A avaliação da robustez ajuda a

identificar problemas que podem afetar a resposta dada pelo equipamento ao método estudado. Outro teste utilizado para avaliar a robustez do método é o teste de Youden, que também permite avaliar a variação entre os dados, podendo, então, serem comparados resultados interlaboratoriais para o mesmo tipo de amostras. Pode inferir também que quanto maior a robustez de um método, maior sua precisão (MILLER; MILLER, 1993).



## REFERÊNCIAS

ALOTHMAN, Z. A. et al. Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 739, p. 14-24, Aug. 2012.

ARTHUR, C. L. et al. Automation and optimization of solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 64, n. 17, p. 1960-1966, Sept. 1992.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 62, n. 2145, p. 2145-2148, Oct. 1990.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) de piretroides em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 172-175, mar./abr. 2001.

BERIJANI, S. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1123, p. 1-9, May 2006.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Série 1, 15 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Acordo de cooperação técnica**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/acordo-de-cooperacao-tecnica-mpa-mapa>>. Acesso em: 22 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatística da pesca e aquicultura**. Brasília, 2014. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc)>. Acesso em: 22 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Cartilha do pescador e aquicultor**. Brasília, 2013. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha\\_pescador\\_aqui\(finalS Ep.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha_pescador_aqui(finalS Ep.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília, 2009. 440 p.

BURKA, J. F. et al. Drugs in salmonid aquaculture: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, New York, v. 20, n. 5, p. 333-349, Oct. 1997.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1021-1030, fev. 2009.

CRAMER, A. J. et al. Analysis of volatile compounds from various types of barley cultivars. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 7526-7531, Aug. 2005.

DENG, D. L. et al. Monolithic molecular imprinted polymer fiber for recognition and solid phase microextraction of ephedrine and pseudoephedrine in biological samples prior to capillary electrophoresis analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1219, p. 195-200, Jan. 2012.

DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 4, n. 7, p. 1-7, jul. 2008.

EISERT, R.; LEVSEN, K. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 733, n. 1/2, p. 143-157, May 1996.

FERREIRA, S. L. C. et al. Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of experimental variables associated with preconcentration and determination of molybdenum in sea-water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal Analytical Atomic Spectrometric**, London, v. 17, p. 115-120, Jan. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Food safety and quality**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136-1142, Mar. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2011. 35 p.

JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 706, p. 37-65, Nov. 2011.

JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction: development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 2326-2336, Apr. 2010.

KIESSLING, A. et al. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*Salmosalar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, p. 301-308, Jan. 2009.

KLIMÀNKOVÁ, E. et al. Development of an SPMEGC/MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish. **Talanta**, London, v. 75, p. 1082-1088, May 2008.

LOCKLEY, D. J.; HOWES, D.; WILLIAMS, F. M. Cutaneous metabolism of glycol ethers. **Archives of Toxicology**, New York, v. 79, n. 3, p. 160-168, Mar. 2005.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 17-63, Nov. 2000.

MEINERTZ, J. R. et al. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, p. 347-354, Apr. 2006.

MEINERTZ, J. R. et al. Liquid chromatographic determination of benzocaine and N-acetylbenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, n. 1, p. 255-260, Sept. 1999.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. Ellis Hordwood: Prentice Hall, 1993. 297 p.

MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 265-273, Dec. 1993.

NERIN, C. et al. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 393, p. 809-833, Feb. 2009.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 251 p.

PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography Science**, Oxford, v. 38, p. 270-278, July 2000.

PEÑALVER, A. et al. Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 557-568, Aug. 1999.

PEREIRA, R. A. et al. Quantification of residual clove oil, benzocaine and tricaine in fish fillets using SPE and UPLC-DAD. **Journal of Advances in Chemistry**, Punjab, v. 10, p. 2661-2668, Sept. 2014.

PINHEIRO, A. S.; ROCHA, G. O.; ANDRADE, J. B. A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Microchemical Journal**, London, v. 99, p. 303-308, Nov. 2011.

PIZAIA, M. G. et al. A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de "Oreochromis niloticus". In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Resumos Expandidos...** Rio Branco: SOBER, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/497.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

QUEIROZ, M. E. C. et al. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal Environmental Science Health**, New York, v. 36, n. 5, p. 517-527, Sept. 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 24-68, jan./fev. 2001.

- REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1116, p. 1-9, May 2006.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236 p.
- SANTOS, W. N. L. do; SANTOS, C. M. C.; FERREIRA, S. L. C. Application of three-variables Doehlert matrix for optimization of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Journal Microchemical**, London, v. 75, p. 211-221, Dec. 2003.
- SARKHOSH, M. et al. Single drop microextraction of biphenyl and biphenyl oxide in aqueous samples by gas chromatography-flame ionization detection. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 2, p. 689-696, Oct. 2011.
- SCHERPENISSE, P.; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, p. 407-410, Mar. 2007.
- SCOGNAMIGLIO, J. et al. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. S244-S255, Sept. 2012.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Aquicultura e pesca: tilápias: estudos de mercado** Sebrae/ESPM. São Paulo, 2008. 13 p.
- SHARMA, B.; JOSEPH, A.; SOOD, A. A simple and rapid method for quantifying 2-phenoxyethanol (2-PE) in Diphtheria, Tetanus and w-Pertussis (DTWP) vaccine. **Biologicals**, London, v. 36, n. 1, p. 61-63, Jan. 2008.
- SOSO, S. B. et al. Analytical methods for chemical and sensory characterization of scent-markings in large wild mammals: a review. **Sensors**, New York, v. 14, n. 3, p. 4428-4465, Mar. 2014.
- SPIETELUN, A. et al. Polyethylene glycol-coated solid-phase microextraction fibres for the extraction of polar analytes: a review. **Talanta**, London, v. 87, p. 1-7, Dec. 2011.
- SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico,

legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 2091-2106, dez. 2009.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, New York, v. 21, p. 121-127, Apr. 1998.

SUN, Y. X. et al. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 309, p. 82-85, Nov. 2010.

TOR, A. Determination of chlorobenzenes in Water by drop-based liquid phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1125, p. 129-132, Aug. 2006.

TUCKEY, N. P. L.; FORGAN, L. G. A rapid and simple fluorometric method for quantifying isoeugenol in seawater and in plasma and white muscle from Australasian snapper (*Pagrus auratus*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 133, n. 4, p. 1664-1670, Aug. 2012.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 167-194, Nov. 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

WARDENCKI, W.; CURYŁO, J.; NAMIESNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal Biochemical. Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 275-288, Mar. 2007.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1152, n. 1/2, p. 184-192, June 2007.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 201-218, Feb. 2012.

ZHANG, M. et al. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, London, v. 74, p. 599-604, Jan. 2008.

ZHAO, E. et al. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1114, p. 269-273, May 2006.

ZOUGAGH, M. et al. Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of experimental variables associated with reconcentration and determination of zinc by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal Analytical Atomic Spectrometric**, London, v. 15, p. 1589-1594, Jan. 2000.

## **CAPÍTULO 2**

### **APLICAÇÃO DA TÉCNICA SPME PARA DETERMINAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL EM FILÉ DE TILÁPIA POR GC-MS**



## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a quantificação residual do anestésico 2-fenoxietanol em filés de peixe da espécie tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), utilizando como técnica de preparo de amostra a microextração em fase sólida em modo *headspace* acoplada ao cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas. Foram avaliadas cinco concentrações de anestesia (450, 600, 750, 900 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em cinco períodos residuais (0, 3, 6, 12 e 24 horas). Os parâmetros (quantidade de sal, temperatura e tempo de extração) que afetam a eficiência de extração do analito foram otimizados de forma multivariada, empregando-se o planejamento composto central, para a obtenção da melhor sensibilidade do método. De acordo com os dados obtidos, todas as variáveis e suas interações mostraram-se significativas, indicando, pela análise do ajuste para as superfícies de resposta, que os dados se adequaram ao modelo de interação com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,7103 e valor de probabilidade de significância (p) de 0,0396. Pela análise das superfícies de resposta foi possível prever que a melhor condição de trabalho foi composta por 1,2 g de sal, 45 minutos de extração e 40 °C de temperatura. Depois de determinar as melhores condições de análise para o 2-fenoxietanol, o método proposto foi validado, obtendo-se os limites de detecção e de quantificação de 0,18 e 0,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, precisão e exatidão, dentro do aceitável por órgãos regulamentadores numa faixa linear de 0,125 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O método foi aplicado na quantificação residual do anestésico, no qual apresentou eliminação de aproximadamente 91% do fármaco nas primeiras três horas, porém, sendo necessário o período residual de 24 horas para as concentrações de 900 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de 12 horas para as concentrações de 450, 600 e 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Palavras-chave: Anestésico. Análise residual. Peixe. Microextração.

## ABSTRACT

This work was carried out to quantify the residual 2-phenoxyethanol anesthetic in fillets of fish in the Nile tilapia species (*Oreochromis niloticus*) using as microextraction sample preparation technique in solid phase headspace coupled to gas chromatography and mass spectrometry. Anesthesia five concentrations were assessed (450, 600, 750, 900 and 1050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in five residual periods (0, 3, 6, 12 and 24 h). The parameters (salt content, temperature and extraction time) that affect analyze extraction efficiency were optimized multivariate way, using the central composite design to obtain the best sensitivity of the method. According to the data obtained, all the variables and their interactions were significant, indicating the analysis of response surfaces for setting the data that are suited to the interaction model with a correlation coefficient ( $R^2$ ) value of 0.7103, and significance probability (p) of 0.0396. By analyzing the response surfaces was possible to predict that the best working condition was: 1.2 g of salt, 45 minutes and extraction temperature 40°C. Once determined the best conditions of analysis for the 2-phenoxyethanol, the proposed method was validated by obtaining the limits of detection and quantification of 0.18 and 0.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, precision and accuracy within acceptable by regulatory bodies on a linear track the 0.125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The method was applied to the residual quantification of anesthetic, which presented disposal of approximately 91% of the drug in the first three hours, but it is necessary, the residual period of 24 hours to concentrations of 900 and 1050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 12 hours for concentrations of 450, 600 and 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Keywords: Anesthetic. Residual analysis. Fish. Microextraction.

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade em constante crescimento, no qual a produção de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) tem sido reconhecida como uma importante atividade agroindustrial, capaz de gerar grande retorno financeiro para os produtores. No entanto, em sistemas intensivos de produção, os animais passam por diversas situações que podem prejudicar seu desenvolvimento e deixá-los mais susceptíveis a doenças e, até, à morte.

No intuito de minimizar efeitos adversos nos animais, os anestésicos são administrados aos peixes. Porém, os anestésicos podem se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo, sendo necessário um tempo de eliminação residual desses. Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), os alimentos comercializados para o consumo humano não devem conter traços residuais de qualquer substância utilizada durante sua produção ou, pelo menos, conter limites aceitáveis dentro das legislações vigentes.

No Brasil não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos para peixes, portanto, assim seguem as recomendações da Food and Drug Administration (FDA). O único anestésico aprovado pelo FDA para uso na piscicultura é a triclaína, substância que não é produzida no Brasil, o que a torna de difícil acesso aos produtores. Com isso, cresceu a necessidade de desenvolver protocolos que possibilitem a regularização do uso de outros anestésicos, como o 2-fenoxietanol, que tem se demonstrado propício para a sedação de peixes, por apresentar margens seguras de administração, diminuindo a mortalidade dos peixes.

Nesse sentido, as técnicas cromatográficas são ferramentas que possibilitam definir a persistência dos resíduos de anestésico no pescado pós-manejo, podendo, assim, ser estipuladas margens seguras para o consumo. No entanto, são necessários processos prévios de preparação de

amostras por se tratar de uma matriz complexa. Usualmente, técnicas como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) são empregadas para esse fim, porém, elas demandam grande quantidade de solventes orgânicos, além de serem técnicas muito dispendiosas. Como alternativa, as técnicas de miniaturização vêm sendo empregadas, tornando o processo de extração mais simples, rápido e reduzindo significativamente o consumo de solventes orgânicos.

Nesta perspectiva, a microextração em fase sólida (SPME) vem se destacando. O princípio da técnica consiste na extração dos analitos de um meio aquoso ou sólido para uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente ou absorvente (fase extratora). A fibra pode ser exposta diretamente na solução da amostra ou no *headspace*, dependendo da volatilidade do analito e da complexidade da amostra. Essa técnica pode ser utilizada para a extração de analitos apolares, de média polaridade e para aqueles cuja polaridade possa ser alterada previamente à extração.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de promover o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação residual do 2-fenoxietanol em filés de tilápia-do-nilo, empregando a técnica SPME, utilizando a quimiometria como ferramenta estatística na otimização do processo.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais e reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A solução estoque de 2-fenoxietanol (99,0%, Sigma Aldrich) foi preparada utilizando-se acetato de etila (99,7%, Sigma Aldrich). A concentração da solução estoque foi de 1 g L<sup>-1</sup>. Esta solução foi armazenada à temperatura de +4 °C, sendo preparada uma nova solução a cada dia. O sulfato de sódio (99,0%,

Sigma Aldrich) foi utilizado para a mudança da força iônica do extrato das amostras. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore).

Para o procedimento de microextração foi utilizado um *holder* automático equipado com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100  $\mu\text{m}$ , obtido da Supelco. Antes das análises, as fibras foram condicionadas nas condições recomendadas pelo fabricante (250  $^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos).

Foram utilizados frascos de vidro transparentes (vial) para SPME com capacidade para 20 mL (Agilent), selados, com tampa com septo de PTFE (politetrafluoretileno)/silicone) e tubos de centrifuga cônico de 50 mL com tampa HDPE, plug à prova de vazamento (Ciencor, EUA).

## 2.2 Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas modelo (QP2010) Plus da Shimadzu (Shimadzu, Japão). A coluna analítica utilizada foi a DB-5MS Shimadzu (30 m x 0,25 mm id x 0,25  $\mu\text{m}$ ), composição da fase estacionária 5% difenil-95-dimetil-polisiloxano. Para o preparo de amostras foi empregado um amostrador de SPME automático, AOC-5000 Shimadzu (Shimadzu, Japão). Todas as análises foram realizadas no laboratório do Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ).

## 2.3 Análise de 2-fenoxietanol em filés de tilápia

Para a quantificação residual do 2-fenoxietanol nas amostras reais de filés de tilápia foram avaliados peixes com tempos de abate de 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a anestesia, nas concentrações de 450, 600, 750, 900 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Após o abate, os peixes foram congelados (-20  $^{\circ}\text{C}$ ) até o procedimento de preparo da amostra. As amostras foram fornecidas pelo

Departamento de Zootecnia/Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.3.1 Preparo das amostras de filés de peixes

A extração do 2-fenoxietanol foi uma adaptação do trabalho de Klimànková et al. (2008): 2 g de filés de tilápia foram macerados em um almofariz e transferidos, juntamente com 2 mL de água ultrapura, para um tubo de centrífuga cônico de 50 mL com tampa de rosca. As amostras foram agitadas por 5 minutos, utilizando-se um vórtex e, depois, centrifugadas, a 15.000 g por 10 minutos. O extrato foi transferido para o vial com capacidade de 20 mL. O tecido foi novamente submetido ao processo de extração e o extrato obtido foi adicionado à primeira fração recolhida, obtendo-se um volume de 4 mL de amostra. Em seguida, adicionaram-se 1,2 g do sal sulfato de sódio ao extrato do peixe, sendo o mesmo submetido ao processo de microextração em fase sólida.

### 2.4 Otimização do método de extração por SPME

O delineamento de composto central (CCD) foi empregado na otimização da metodologia de análise do 2-fenoxietanol por SPME. Na Tabela 1 estão os parâmetros e os respectivos níveis avaliados na técnica de microextração.

Tabela 1 Parâmetros e níveis usados no planejamento CCD

Parâmetros	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)
Temperatura (°C)	40	50	60
Tempo de extração (min)	15	30	45
Quantidade de sal (g)	0,4	0,8	1,2

O planejamento foi obtido pela soma de  $2^k$  pontos fatoriais com 2k pontos axiais e 2 pontos centrais, sendo k o número de variáveis

independentes, obtendo-se um total de 16 experimentos, os quais estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Matriz do planejamento CCD para a análise por SPME do 2-fenoxietanol em tecido de peixe

Ensaio	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Sal (g)
1	40	15	0,4
2	40	15	1,2
3	40	45	0,4
4	40	45	1,2
5	60	15	0,4
6	60	15	1,2
7	60	45	0,4
8	60	45	1,2
9	33,2	30	0,8
10	66,8	30	0,8
11	50	5,17	0,8
12	50	55,23	0,8
13	50	30	0,13
14	50	30	1,47
15	50	30	0,8
16	50	30	0,8

Para o delineamento experimental, bem como a obtenção das condições ideais para a otimização do sistema, por meio da estimativa dos parâmetros estatísticos, foi empregado o programa Chemoface versão 1.4.

Para a realização das análises, 2 g de filés de tilápia isenta de anestésico foram enriquecidos com 10 µL da solução estoque de 2-fenoxietanol (3,75 µg mL<sup>-1</sup>). Em seguida, o tecido foi submetido à obtenção do extrato e, posteriormente, analisado.

Testes de dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo foram realizados nos tempos de 2, 4 e 6 minutos, com 1 minuto de limpeza, observando-se se haveria efeito memória de uma análise para outra.

## **2.5 Análise por *headspace* em microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS)**

Antes do processo de extração do 2-fenoxietanol pela fibra, as amostras foram submetidas a um período de estabilização do sistema por 10 minutos, com agitação de 250 rpm e temperatura de 40 °C. Após a estabilização, a agulha protetora rompeu o septo do vial e a fibra foi exposta com uma penetração de 40 mm no *headspace*, por 45 minutos, para extração do analito, tempo este determinado no planejamento experimental. Em seguida, a fibra foi retraída para dentro da agulha e injetada no cromatógrafo em fase gasosa. A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C; a fibra ficou exposta, dessorvendo por 2 minutos.

O fluxo de gás no cromatógrafo em fase gasosa foi ajustado para 1 mL min<sup>-1</sup>, no modo splitless, utilizando-se um injetor split-splitless. A temperatura inicial do programa foi de 80 °C, com 3 minutos de retenção. Em seguida, aumentou-se a uma taxa de 7 °C min<sup>-1</sup> até 140 °C, a partir da qual se aumentou a uma taxa de 20 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C. A temperatura da interface foi mantida em 280 °C. O detector do espectrômetro de massas operou em modo íon selecionado (SIM), de 5 a 18,5 minutos. O detector foi programado para ler as unidades de massa atômica de 94 e 138.

## **2.6 Validação do método analítico de quantificação de 2-fenoxietanol por SPME**

Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão (intradia e interdia), fator de recuperação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), de acordo com as recomendações



descritas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia - INMETRO (2011).

### 2.6.1 Seletividade

Devido à complexidade da matriz utilizada neste trabalho, tornou-se necessário avaliar o 2-fenoxietanol em tecido de tilápia. Para a seletividade foram comparadas as análises da matriz isenta e fortificada com 10 µL da solução estoque de 2-fenoxietanol na concentração de 3,75 µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.7.2 Linearidade

A verificação da linearidade do método desenvolvido para o analito foi realizada numa faixa dinâmica compreendida entre 0,125-10 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções para a confecção da curva analítica foram preparadas em triplicatas nas concentrações por fortificação da matriz: 0,125; 0,625; 1,25; 1,875; 2,5; 3,75; 5,0; 7,5 e 10 µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.7.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o composto foi obtido estimando-se o desvio padrão (s) da equação da linha de regressão pelo coeficiente angular (S) da curva analítica, conforme equações 1 e 2. Foram realizadas triplicadas para cada ponto da curva.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (2)$$

### 2.7.4 Precisão

A avaliação da precisão do método foi realizada por experimentos de precisões intradia e interdia. A precisão intradia foi avaliada realizando-se três extrações consecutivas em extrato do peixe enriquecidas com 2-fenoxietanol em três níveis de concentrações (1,25; 3,75; 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), empregando-se a técnica de preparo de amostra. A precisão interdia foi realizada repetindo-se a análise intradia em três dias distintos. As respostas obtidas foram expressas como coeficiente de variação (CV%).

### 2.7.5 Fator de recuperação (exatidão)

A exatidão do método foi determinada pelo fator de recuperação do composto na matriz e na ausência da matriz, utilizando a técnica de microextração. As análises foram realizadas nas concentrações de 1,25; 3,75; 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de 2-fenoxietanol em triplicata. A recuperação (R) foi calculada de acordo com a equação (3).

$$R (\%) = \frac{[\text{padrão na matriz}]}{[\text{padrão na ausência da matriz}]} \times 100\% \quad (3)$$

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Fibra extratora

A fibra empregada nas extrações do 2-fenoxietanol foi a PDMS (100  $\mu\text{m}$ ), a qual apresentou resultados satisfatórios, o que pode ser explicado pela espessura do revestimento da fibra pois, com o aumento da espessura, aumenta-se a eficiência de extração. Além disso, a fibra PDMS permitiu analisar uma maior gama de concentrações (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Rivera et al. (2014) empregaram a fibra PDMS (100  $\mu\text{m}$ ) na análise de cosméticos para a determinação de alguns compostos, dentre estes o 2-fenoxietanol. Além da fibra PDME, os autores também testaram a PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ), PA (85  $\mu\text{m}$ ), CAR/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ) e

DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ), no qual todas as fibras apresentaram grande eficiência na extração exceto a PA.

Klimànková et al. (2008) analisaram 2-fenoxietanol em matrizes de peixe da espécie truta arco-íris. Em seus experimentos eles empregaram as fibras DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ), PA (85  $\mu\text{m}$ ) e CW/DVB (65  $\mu\text{m}$ ). A fibra escolhida para as análises subsequentes foi a DVB/CAR/PDMS, por apresentar melhores resultados. Apesar de esses pesquisadores não terem testado a fibra PDMS (100  $\mu\text{m}$ ), Rivera et al. (2014) apresentaram resultados promissores de sua utilização na determinação do 2-fenoxietanol.

Para garantir a durabilidade da fibra, optou-se por trabalhar com extração por *headspace*, uma vez que as análises foram realizadas em matriz biológica e em modo direto os constituintes da matriz poderiam ficar fortemente absorvidos na superfície da fibra, danificando-a.

### **3.2 Condições cromatográficas**

Foram testadas diversas rampas para o composto 2-fenoxietanol e a condição ótima obtida para a corrida cromatográfica possibilitou um tempo de 18,5 minutos. Na Figura 1 mostra-se o cromatograma do padrão de 2-fenoxietanol no modo SCAN obtido da extração por SPME em solução aquosa.

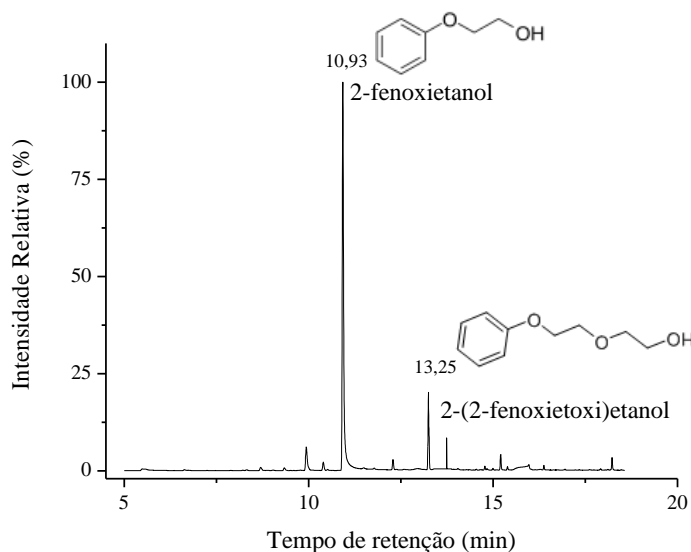


Figura 1 Cromatograma de íons totais (TIC), no modo SCAN da extração do padrão de 2-fenoxietanol isenta de peixe por SPME, na concentração de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$

Pelo cromatograma da Figura 1 pode-se perceber que o padrão de 2-fenoxietanol apresentou dois picos de maior intensidade, o principal correspondente ao 2-fenoxietanol no tempo de retenção de 10,93 minutos e um constituinte secundário, o 2-(2-fenoxietoxy)etanol com tempo de retenção de 13,25 minutos. De acordo com o trabalho de Laporte et al. (2004), um padrão de 2-fenoxietanol pode conter até 10% do constituinte secundário, porém, os autores relataram níveis acima de 21%, o que pode ser atribuído a diferentes fornecedores. Apesar da presença do constituinte 2-(2-fenoxietoxy)etanol no padrão de 2-fenoxietanol, no presente trabalho não foram conduzidos estudos acerca do composto minoritário.

Após todas as condições cromatográficas bem estabelecidas, conduziu-se a análise utilizando-se a matriz de peixe fortificada com 2-fenoxietanol, a fim de observar algum tipo de interferente, como reações e comportamento inadequado do padrão frente à matriz de filé de peixe. Na Figura 2 apresenta-se o cromatograma obtido para a análise.

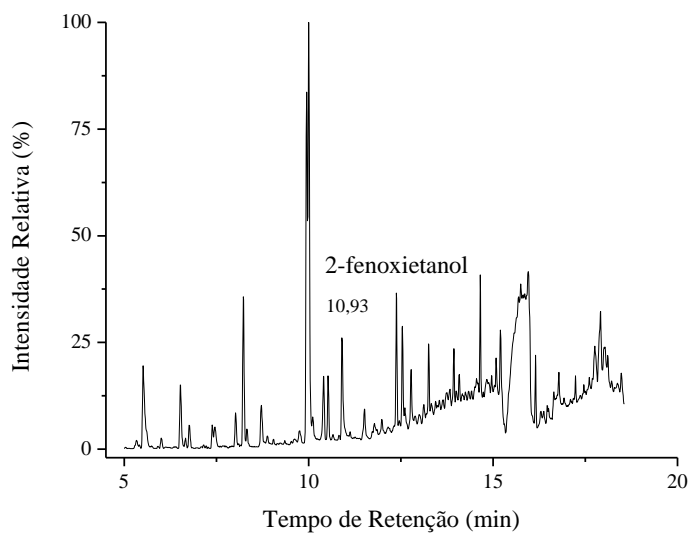


Figura 2 Cromatograma de íons totais (TIC), obtido para extrato de filé de tilápia enriquecido com 10  $\mu\text{L}$  ( $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) da solução estoque de 2-fenoxietanol no modo SCAN, por SPME

Pode-se observar, pelo gráfico da Figura 2, que o pico correspondente ao 2-fenoxietanol encontra-se bem separado dos picos obtidos para o tecido de peixe, o que mostra uma boa seletividade do método cromatográfico proposto.

Para facilitar a identificação do 2-fenoxietanol, optou-se por trabalhar com análises em modo SIM, por ser mais sensível e seletivo. Dessa forma, analisou-se o espectro de massas do 2-fenoxietanol, e os íons precursores 94  $m/z$  ( $\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) e 138  $m/z$  (íon molecular) foram selecionados. Na Figura 3 mostra-se o cromatograma em modo SIM e o espectro de massas do 2-fenoxietanol.

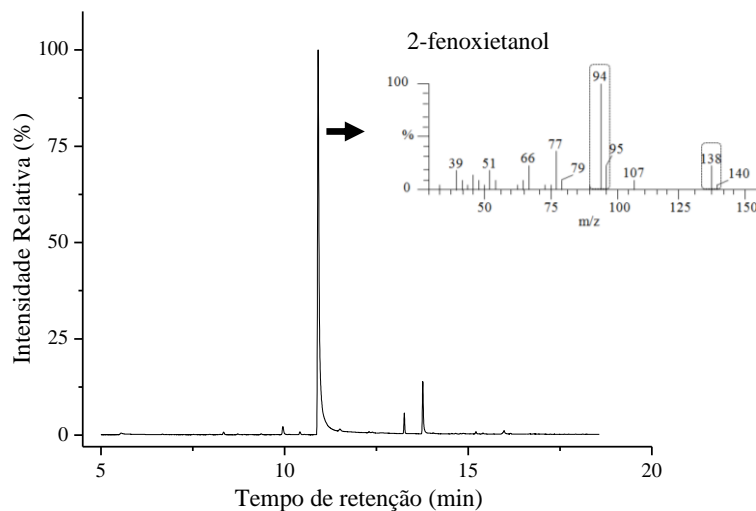


Figura 3 Cromatograma de íons totais (TIC), obtido para extrato de filé de tilápia enriquecido com 10  $\mu\text{L}$  ( $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) da solução estoque de 2-fenoxietanol no modo SIM por SPME e seu respectivo espectro de massas

### 3.3 Dessorção da fibra

O tempo e a temperatura de dessorção da fibra no injetor são de vital importância na análise por SPME, uma vez que, ao se aumentar a temperatura, a afinidade do composto pela fibra diminui, ocorrendo a dessorção, tornando necessário um tempo menor de exposição da fibra no injetor, minimizando o efeito matriz e, conseqüentemente, aumentando a precisão do método (PAWLISZYN, 1997).

Apesar da temperatura de ebulição do 2-fenoxietanol ser de  $248 \text{ }^\circ\text{C}$  e o ideal da temperatura do injetor ser acima da temperatura de ebulição do composto, para garantir total volatilização do composto, a temperatura do injetor utilizada foi de  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma vez que temperaturas maiores poderiam diminuir a vida útil da fibra. O tempo de dessorção adotado foi de 2 minutos, visto que nele não foi observado efeito significativo da matriz na fibra. Na

Figura 4 apresenta-se um cromatograma obtido pela análise da fibra após uma extração do 2-fenoxietanol.

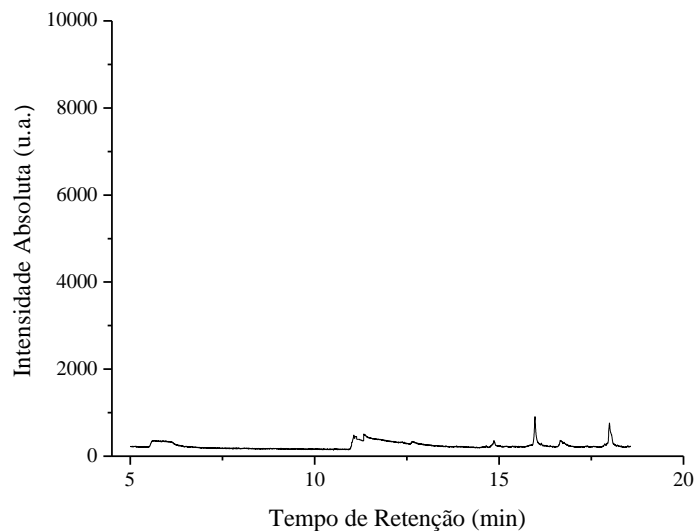


Figura 4 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para a análise da fibra após análise do 2-fenoxietanol com o tempo de dessorção de 2 minutos

Pode-se verificar, na Figura 4, um pico de baixa intensidade no tempo de retenção equivalente ao 2-fenoxietanol, indicando que o tempo de dessorção de 2 minutos da fibra no injetor do cromatógrafo, após cada dessorção, apresenta baixo efeito memória, ou seja, uma pequena fração do composto estudado fica absorvida na fibra, o que não interfere de forma significativa nas análises.

### 3.4 Análise multivariada dos fatores que afetam a SPME

Diversos parâmetros podem afetar a eficiência da técnica SPME, porém, em testes prévios, os que apresentaram maior significância na extração foram temperatura de extração, tempo de adsorção e quantidade de sal. Logo, no intuito de avaliar o efeito destes parâmetros na análise residual de 2-fenoxietanol em filés de tilápia, os experimentos foram conduzidos

empregando-se o CCD. Na Tabela 3 estão os resultados obtidos em área para os 16 ensaios da otimização de metodologia analítica.

Tabela 3 Resultados obtidos a partir do planejamento CCD para a análise 2-fenoxietanol em filés de tilápia enriquecidos na concentração de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$

Ensaio	Área do composto 2-fenoxietanol (u.a)
1	177.931
2	414.606
3	438.236
4	3.222.846
5	251.524
6	437.735
7	113.367
8	792.706
9	268.523
10	190.529
11	212.897
12	148.138
13	32.600
14	814.619
15	429.606
16	406.532

Pelos resultados obtidos apresentados na Tabela 3 foi possível averiguar a influência de cada parâmetro estudado e suas interações na extração de 2-fenoxietanol por SPME, o que pode ser avaliado com precisão empregando-se a análise por diagrama de Pareto.

#### 3.4.1 Avaliação do efeito das variáveis por diagrama de Pareto



Na Figura 5 mostra-se o diagrama de Pareto que representa os efeitos de cada variável estudada na SPME do composto 2-fenoxietanol.

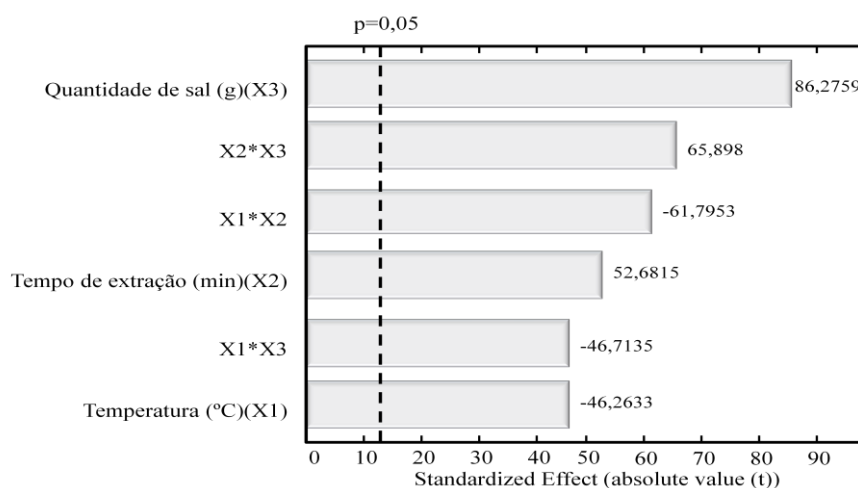


Figura 5 Análise do efeito das variáveis e suas interações pelo diagrama de Pareto

Analisando-se o diagrama de Pareto, foi possível inferir que todos os parâmetros analisados e suas interações apresentaram significância, com 95% de confiança, em um teste estatístico, indicando que a melhor forma de tratar os dados é de forma multivariada.

Em relação aos sinais dos efeitos, pode-se observar que valores positivos de efeitos estimados correspondem a um aumento no sinal analítico quando a variável segue para seu nível máximo, enquanto valores negativos correspondem a maiores sinais analíticos, quando em níveis inferiores das variáveis. Para as interações das variáveis, os valores positivos indicam que ocorre aumento no sinal analítico quando ambas as variáveis forem na mesma direção. Por outro lado, os valores negativos indicam que o sinal analítico aumenta quando os níveis das variáveis forem em direções contrárias.

Analisando-se os parâmetros individualmente, constata-se que a quantidade de sal aparece como o fator de maior influência, uma vez que ele apresenta um efeito positivo sobre a extração do composto estudado. Tal

resultado permite inferir que a adição de sal favorece a extração do 2-fenoxietanol. De acordo com abordagens encontradas na literatura, o fenômeno observado pode ser atribuído ao fato de que a força iônica diminui a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meio aquoso, facilitando a difusão do analito para o *headspace* (LORD; PAWLISZYN, 2000).

Os resultados ainda revelaram que, dentre os parâmetros avaliados, a temperatura de extração, bem como a sua interação com os demais parâmetros, apresentou efeito negativo na extração em estudo, tendo esse parâmetro sido o menos influenciável quando comparado à quantidade de sal e ao tempo de extração. Trabalhos encontrados na literatura reportam que o aumento da temperatura de extração ocasiona um aumento na difusão dos analitos em direção à fibra, diminuindo o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio de partição entre os analitos e a fase extratora. Porém, foi observado que, em temperaturas próximas a 60 °C, a área do pico caiu drasticamente. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da solubilidade do analito que dificulta sua extração pela fibra. Desse modo, em elevadas temperaturas ocorre a redução do coeficiente de partição, diminuindo a massa de analito extraída (BUDZIAK; MARTENDAL; CARASEK, 2007; JIA; ZHANG; MIN, 1998).

A avaliação do parâmetro tempo de extração mostra que ele exibe um efeito positivo sobre a extração do composto avaliado, sendo possível inferir que tempos maiores favorecem os resultados obtidos, devido ao tempo necessário para atingir o equilíbrio do sistema frente ao composto em estudo. A interação entre os parâmetros tempo de extração e quantidade de sal também mostrou efeito positivo na estimativa dada pelo diagrama de Pareto, indicando que, em ambas as variáveis, os níveis máximos favorecem a extração do 2-fenoxietanol.

### **3.4.2 Análise por superfície de resposta**

Para a determinação da condição ótima para a análise do 2-fenoxietanol em matriz de peixe pelo sistema de extração SPME, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta. Dentre os modelos de ajuste de resposta (linear, quadrático, quadrático puro e de interação), as respostas analíticas foram as que mais bem se adequaram ao modelo de interação. Este modelo está descrito pela equação de segunda ordem (3), no qual os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Chemoface (CHATTERJEE et al., 2012).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

em que  $y$  é a resposta predita;  $\beta_0$  é o ponto de interseção;  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação;  $\beta_i$  é o coeficiente linear;  $k$  é o número de fatores;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis referentes aos fatores e  $\varepsilon$  é o erro associado com o modelo. Os resultados obtidos para esse modelo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Resultados estatísticos da análise de variância do ajuste dos dados ao modelo de interação

	GL	DP	QM	F	P
Regressão	6	6,0435x10 <sup>12</sup>	1,0073x10 <sup>12</sup>	3,6777	0,0396
Residual	9	2,4649x10 <sup>12</sup>	2,7388x10 <sup>11</sup>		
Falta de ajuste	8	2,4647x10 <sup>12</sup>	3,0809x10 <sup>11</sup>	1,1573x10 <sup>3</sup>	0,0227
Erro puro	1	2,6662x10 <sup>9</sup>			
Total	15	8,5085x10 <sup>12</sup>			
R <sup>2</sup>		0,7103			

A análise da qualidade do ajuste para as superfícies de resposta avaliada por análise de variância indica que a regressão foi significativa para o modelo de interação, uma vez que o valor do coeficiente de correlação foi de 0,7103. O valor de probabilidade de significância (p) correspondente a 0,0396, validando a utilização do modelo para se estudar a otimização da extração de 2-fenoxietanol em filés de tilápia.

Nas Figuras 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados obtidos para a análise da superfície de resposta, levando em consideração as interações entre as variáveis estudadas. Para cada interação estão apresentados também os três níveis da terceira variável (a que não está sendo considerada na interação), a fim de avaliar sua influência sobre a resposta obtida.

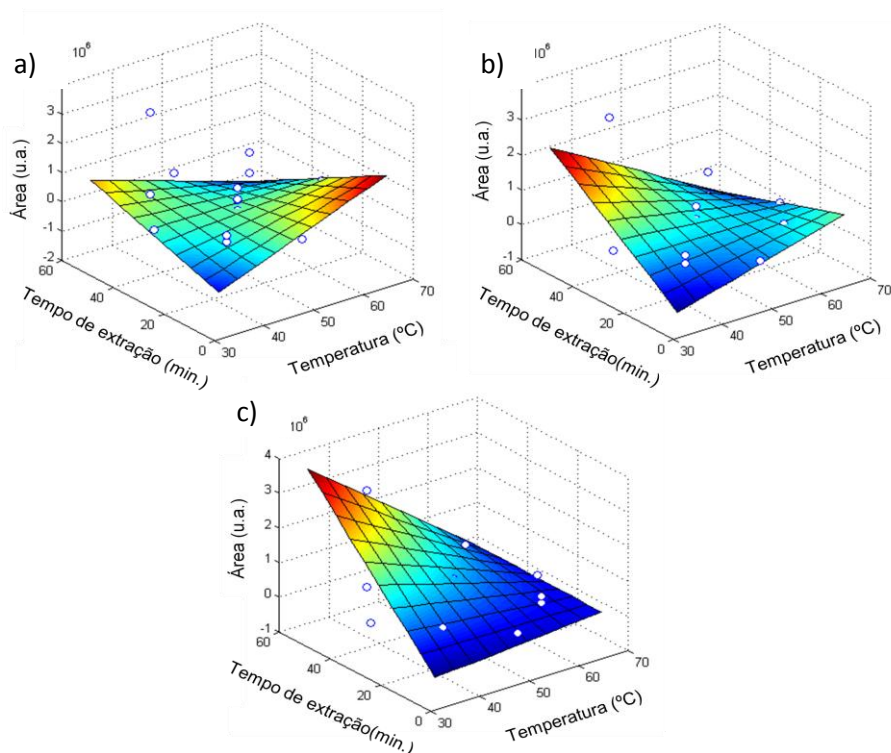


Figura 6 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação temperatura e tempo de extração, considerando fixos respectivamente, a) 0,4; b) 0,8 e c) 1,2 g de sal

Na Figura 6 observam-se três gráficos em terceira dimensão, sendo as respostas obtidas para as áreas representadas pelo eixo z, os efeitos do tempo de extração pelo eixo x e da temperatura pelo eixo y. Em cada gráfico foi considerada uma quantidade de sal fixa, sendo elas: 0,4 (a); 0,8 (b) e 1,2 (c) g, respectivamente. Pela observação das áreas apresentadas na Figura é possível inferir que em maiores quantidades de sal são obtidos

melhores resultados, implicando que a quantidade de 1,2 g de sal foi ideal para as análises desse trabalho.

Na Figura 7 estão apresentados três gráficos, constando as interações obtidas para os efeitos da quantidade de sal (eixo x) em função da temperatura (eixo y), fixando-se os tempos de extração em 15 (a), 30 (b) e 45 (c) minutos, respectivamente.

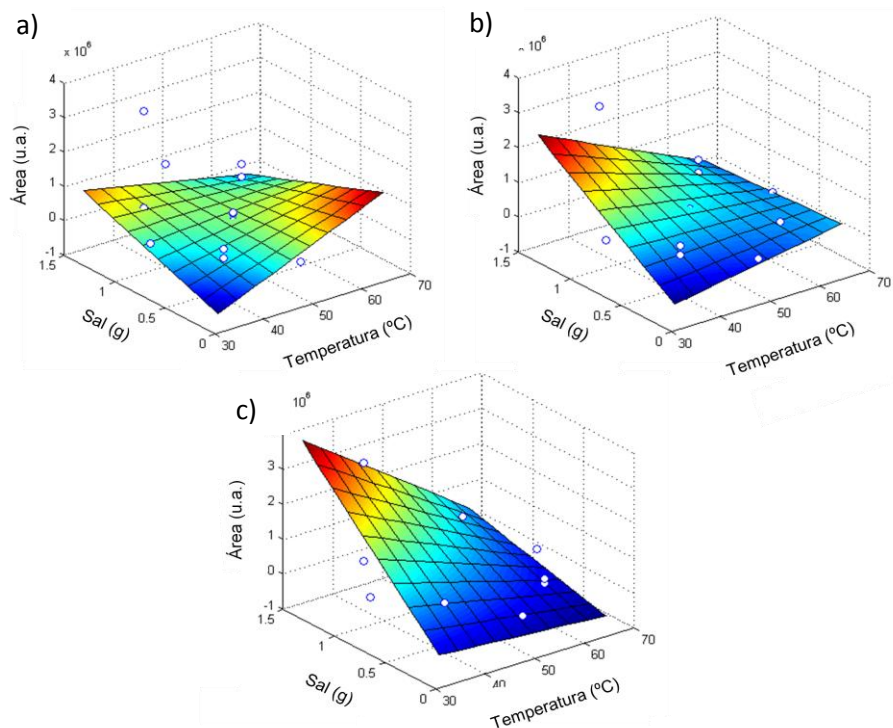


Figura 7 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação quantidade de sal e temperatura de extração, considerando fixos os tempos de a) 15, b) 30 e c) 45 minutos

Analisando-se a Figura 7 foi possível prever que o tempo de adsorção de 45 minutos foi o mais adequado para se trabalhar, devido ao maior sinal analítico. Observou-se também que, com o aumento do tempo de extração, aumenta significativamente a influência da força iônica na extração. Com os parâmetros controlados foi possível trabalhar fora do

tempo de equilíbrio, devido à contribuição cinética neste caso. Como a detectabilidade desejada foi alcançada, a opção por trabalhar fora do equilíbrio foi mais viável, uma vez que tempos de extração maiores que 60 minutos não são adequados para protocolos experimentais (PAWLISZYN, 1997).

Na Figura 8 os parâmetros avaliados foram os efeitos da quantidade de sal (eixo x) em função do tempo de extração (eixo y), fixando-se as temperaturas de 40 (a), 50 (b) e 60 °C (c), respectivamente.

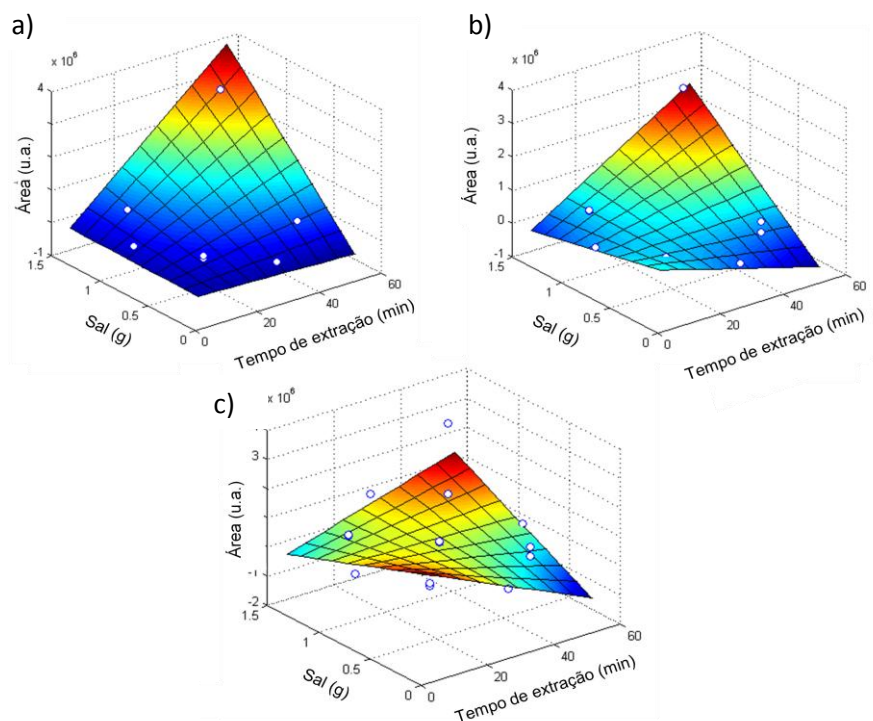


Figura 8 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação quantidade de sal e tempo de extração, considerando fixas as temperaturas de a) 40, b) 50 e c) 60 °C

Observando-se as Figuras 6, 7 e 8 é possível inferir que, para valores inferiores às condições ótimas obtidas para a quantidade de sal (1,2 g) e do tempo de extração (45 minutos), o aumento da temperatura atenua um aumento do sinal analítico. Porém, as influências da quantidade de sal, do

tempo de extração e da interação de ambos na área obtida apresentaram maior significância em relação à influência da temperatura. Dessa forma, adotou-se 40 °C como temperatura de trabalho.

Levando em consideração os resultados obtidos no CCD e nos gráficos de superfície de resposta envolvendo a interação entre os fatores, foram consideradas como ótimas as condições de temperatura correspondente a 40 °C, tempo de extração de 45 minutos, empregando-se 1,2 g de sal para a análise de 2-fenoxietanol em tecidos de tilápia.

### 3.5 Validação do método analítico de quantificação de 2-fenoxietanol

O estudo de linearidade para a quantificação residual do anestésico 2-fenoxietanol foi realizado em extratos de peixe da espécie tilápia, pelo método de padronização externa. O intervalo linear de trabalho obtido neste estudo foi de 0,125 a 10 µg mL<sup>-1</sup> e, dentro dessa faixa, foi construída a curva analítica, como mostrado na Figura 9.

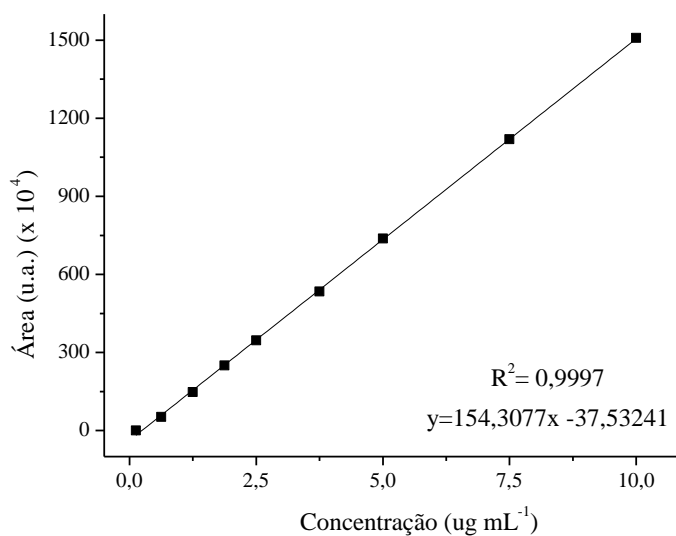


Figura 9 Curva analítica obtida para o 2-fenoxietanol por SPME

A equação da curva analítica foi calculada pelo método dos mínimos quadrados pelas medidas dos sinais analíticos (área) em função das concentrações do composto em estudo, obtendo-se os valores de 154,3077 e -37,53241, para inclinação e intercessão da reta, respectivamente. Pelo coeficiente de correlação obtido ( $R^2 = 0,9997$ ) foi possível inferir que o método obteve forte correlação linear entre as áreas e as concentrações, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

LD e LQ foram estimados a partir dos parâmetros da curva analítica e os resultados encontrados foram de 0,18 e 0,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Klimànková et al. (2008) quantificaram 2-fenoxietanol em filés de peixes da espécie truta arco-íris, obtendo limites de detecção (0,03  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e quantificação (0,1  $\text{mg kg}^{-1}$ ) numa faixa linear de 0,1 a 250  $\text{mg kg}^{-1}$ . Estes valores foram obtidos pelo método de menor ponto da curva por um modo de detecção MS/MS. Apesar de o detector MS/MS ser mais sensível que o MS, os valores obtidos neste trabalho foram semelhantes aos descritos por Klimànková et al. (2008), quando utilizado o método de menor ponto da curva, com valores de detecção de 0,038  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,049  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e quantificação de 0,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,16  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Os resultados para as precisões intradia e interdia, para os três níveis de concentração e seus respectivos coeficientes de variação (CV%), estão descritos na Tabela 5. Estes resultados foram comparados com os requisitos gerados por órgãos regulamentadores, como a ANVISA (BRASIL, 2003) e INMETRO (2011), apresentando variação dentro do recomendado por esses guias.

Tabela 5 Dados das precisões intradia e interdia para análise por SPME-GC-MS

Anestésico	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Precisão intradia (CV%)	Precisão interdia (CV%)
2-fenoxietanol	1,25	3,9	4,8
	3,75	3,7	2,4
	7,5	0,8	1,6



A avaliação da recuperação foi estudada comparando-se as concentrações do 2-fenoxietanol na matriz e na ausência da matriz em três níveis (1,25; 3,75 e 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); os valores de recuperação encontrados foram de 94,7%, 104,0% e 97,0%. Estes resultados indicam que a metodologia desenvolvida apresenta exatidão, uma vez que eles estão situados na faixa estimada pelos órgãos regulamentadores.

### **3.6 Aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia**

Depois de validar o método desenvolvido, ele foi aplicado na determinação residual em tecidos de tilápia anestesiados com 2-fenoxietanol em diferentes concentrações e tempos de abate. Para cada concentração e tempo de abate foram avaliados três peixes, nos quais realizaram-se análises em triplicata. Na Figura 10 podem ser observados os resultados das médias obtidas nas análises das amostras dos peixes, sendo possível salientar que, nas três primeiras horas após a anestesia, os níveis de resíduos remanescentes nos tecidos caíram drasticamente ( $91\pm 1\%$ ). Para o tempo de abate subsequente observa-se que a eliminação residual permanece praticamente constante, quando comparada ao tempo de abate de três horas.

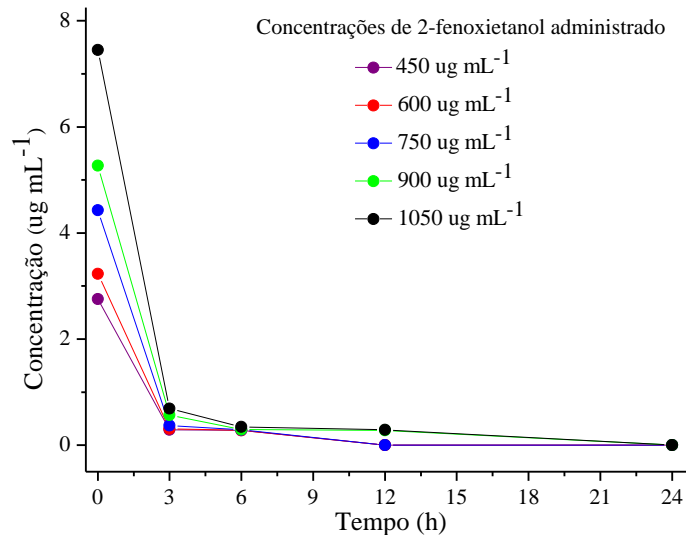


Figura 10 Concentrações residuais de 2-fenoxietanol em tecidos de peixe para diferentes concentrações administradas e tempos de abate

Pode-se observar, no gráfico da Figura 10, que, nas concentrações de 900 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o período de depuração de 12 horas foi insuficiente para eliminar todo o resíduo dos tecidos, tendo sido obtidas concentrações residuais de 0,28 e 0,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para tanto, um período de 24 horas para abate pós-anestesia foi necessário, para garantir a total eliminação desse fármaco do organismo dos animais. Porém, para as concentrações de 450, 600 e 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no tempo de abate de 12 horas, não foram detectáveis concentrações remanentes do anestésico.

Apesar da ampla utilização e das diversas vantagens observadas pelo uso de 2-fenoxietanol na aquicultura, ele ainda não foi aprovado para administração em peixes destinados ao consumo, por não existirem limites residuais definidos, tornando seu uso ilegal (KLIMÁNKOVÁ et al., 2008). O único anestésico aceito para administração em peixes e animais de sangue frio pela Food and Drug Administration (FDA) é a triclaína, com um intervalo de segurança de 21 dias, apesar de não serem detectados resíduos a

partir de 6 horas após o tratamento de algumas espécies de peixes estudadas (SCHERPENISSE; BERGWERFF, 2007).

Os países que seguem a regulamentação da FDA são Estados Unidos da América, Canadá, Noruega e Reino Unido. Na Noruega, a benzocaína também é aprovada para utilização, contudo, os peixes devem ser submetidos a um período residual de 21 dias. Países como Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile regulamentaram o uso de anestésicos que contenham o princípio ativo isoeugenol, não sendo necessário tempo de depuração, desde que sejam seguidas as recomendações de utilização do anestésico proposto pelos fabricantes (PEREIRA et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÕES

Em decorrência da complexidade da amostra estudada, a técnica de SPME mostrou-se viável por possibilitar a análise do 2-fenoxietanol em modo *headspace*, eliminando possíveis interferentes. A metodologia analítica de preparo de amostra proposta mostrou-se sensível e eficaz na extração do composto em estudo, apresentando limites de detecção e quantificação de 0,18 e 0,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis, numa faixa linear de 0,125 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como não existem leis vigentes que regulamentem a utilização do anestésico em estudo na piscicultura, não é possível estimar níveis residuais desse composto que sejam seguros para o consumo. Com isso, para se garantir que o produto a ser consumido esteja isento de 2-fenoxietanol, é necessário um período residual de 24 horas para as concentrações de 900 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de 12 horas para as concentrações de 450, 600 e 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise-um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, nov. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Série 1, 15 p.

BUDZIAK, D.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Preparation and application of NiTi alloy coated with ZrO<sub>2</sub> as a new fiber for solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1164, p. 18-24, Sept. 2007.

CHATTERJEE, S. et al. Application of response surface methodology for methylene blue dye removal from aqueous solution using low cost adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 181/182, p. 289-299, Feb. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2011. 35 p.

JIA, M.; ZHANG, H.; MIN, D. Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 2744-2747, June 1998.

KLIMÁNKOVÁ, E. et al. Development of an SPMEGC/MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish. **Talanta**, London, v. 75, p. 1082-1088, May 2008.

LAPORTE, G. M. et al. The identification of 2-phenoxyethanol in ballpoint inks using gas chromatography/mass spectrometry- relevance to ink dating. **Journal Forensic Science**, Lausanne, v. 49, n. 1, p. 155-164, Jan. 2004.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 17-63, Nov. 2000.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 251 p.

PEREIRA, R. A. et al. Quantification of residual clove oil, benzocaine and tricaine in fish fillets using SPE and UPLC-DAD. **Journal of Advances in Chemistry**, Punjab, v. 10, p. 2661-2668, Sept. 2014.

RIVERA, G. A. et al. Development of a multi-preservative method based on solid-phase microextraction-gas chromatography- tandem mass spectrometry for cosmetic analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1339, p. 13-25, Apr. 2014.

SCHERPENISSE, P.; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, p. 407-410, Mar. 2007.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

### **CAPÍTULO 3**

#### **DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL EM FILÉS DE TILÁPIA POR SDME-GC-MS**

## RESUMO

A piscicultura é uma atividade de grande importância econômica para o Brasil, que é o sexto maior produtor da espécie tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) do mundo. Com a finalidade de facilitar o manejo, os peixes são submetidos a agentes químicos, como anestésicos. O 2-fenoxietanol apresenta-se como um dos anestésicos de utilização disseminada por apresentar margens seguras de administração e diminuir a mortalidade dos peixes. No entanto, esse composto pode se acumular no organismo desses animais por um determinado período, sendo necessários estudos para determinar níveis residuais e garantir a segurança alimentar do consumidor. Neste trabalho foi realizada a quantificação residual dos anestésicos 2-fenoxietanol em filés de peixe da espécie tilápia, utilizando como técnica de preparo de amostra a SDME em modo *headspace* acoplada a GC-MS. As concentrações de anestesia avaliadas foram 450, 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nos períodos residuais de 0, 6, 12 e 24 horas. Para a otimização da metodologia de análise foi empregado o planejamento experimental de composto central, resultando em avaliações precisas com menor quantidade de análises. A metodologia desenvolvida apresentou boa precisão e exatidão numa faixa linear de 0,1 a 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com limites de detecção e quantificação de 0,2 e 0,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Nas amostras analisadas foram detectados níveis entre 1,45 e 5,96  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as amostras de menor (450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e maior (1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) concentração administrada, no período residual de 0 hora. Para tempos de depuração de 12 horas não foram detectados limites quantificáveis.

Palavras-chave: Anestésico. Peixe. Análise residual. Técnica de microextração.

## ABSTRACT

Fish farming is an activity that is great economic importance to Brazil, being the sixth largest producer of Nile tilapia species (*Oreochromis niloticus*) in the world. In order to facilitate handling, the fish are subjected to chemical agents, such as anesthetics. In which the 2-phenoxyethanol is presented as an anesthetic for use disseminated by having safe boundaries for administration and reducing fish mortality. However, this compound may accumulate in the organism of the animals for a certain period, and studies to determine residual levels, ensuring the food safety of the consumer. This work was carried out to quantify the residual anesthetics 2-phenoxyethanol in fish fillets of tilapia species using as SDME sample preparation technique headspace coupled to GC-MS. The anesthetic concentrations were evaluated: 450, 600 and 1050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the residual periods of 0, 6, 12 and 24 h. To optimize the analysis methodology has been using the central composite experimental design, resulting in accurate measurements with less analysis. The methodology showed good precision and accuracy in a linear range of 0.1 to 6.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , with limits of detection and quantification of 0.2 and 0.62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. All samples were detected levels between 1.45 and 5.96  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for the smaller samples (450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and larger (1050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) given concentration, the residual period from 0 for 12 hour clearance times were not detected quantifiable limits.

Keywords: Anesthetic. Fish. Residual analysis. Microextraction technique.



## 1 INTRODUÇÃO

Uma das atividades que mais crescem no Brasil é a piscicultura, o que se deve à boa lucratividade, com rápido retorno do capital investido. A tilápia-do-nilo é a espécie de maior importância econômica no país, devido ao rápido desenvolvimento, à fácil reprodução em cativeiro e por atingir tamanho comercial em poucos meses de criação. Por outro lado, adultos de tilápia têm raios duros nas nadadeiras dorsais que podem facilmente ocasionar ferimentos em operadores e em outros peixes. Com isso, um dos procedimentos mais importantes na piscicultura é a anestesia, utilizada para facilitar o manejo, evitar a possibilidade de ferimentos e, possivelmente, reduzir o estresse dos peixes.

Os anestésicos são agentes farmacológicos capazes de conduzir os peixes a um estado de perda parcial ou completa da percepção dos estímulos externos. A escolha do anestésico, geralmente, se deve a critérios como a eficácia, o custo, a disponibilidade no mercado, a segurança durante o uso e os possíveis efeitos colaterais aos peixes, aos seres humanos e ao meio ambiente. Nesse sentido, o uso do fármaco 2-fenoxietanol torna-se propício para a finalidade de anestesia, por apresentar margens seguras de administração e proporcionar menor mortalidade dos peixes.

Entretanto, existe a preocupação de que resíduos anestésicos possivelmente deixados na carne possam comprometer a segurança alimentar e também alterar as características organolépticas (aroma e sabor) do pescado. No Brasil não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos para peixes, sendo necessários estudos que possibilitem a determinação do tempo residual para que o mesmo seja submetido à depuração adequada, uma vez que nenhum alimento comercializado deve apresentar contaminação de qualquer substância utilizada durante a sua produção.

Nesse sentido, as técnicas geralmente empregadas com a finalidade de detectar contaminantes em alimentos são as cromatográficas que

possibilitam a determinação e a quantificação desses resíduos. Contudo, matrizes complexas como tecidos de peixes requerem processos prévios à determinação, de forma a se obter uma separação cromatográfica livre de interferentes.

No entanto, os métodos analíticos convencionalmente empregados com a finalidade de preparar amostras, como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE), demandam longos tempos de análises, preparo complexo de amostra e grande volume de solventes orgânicos, aumentando a busca por técnicas alternativas que apresentem, além de rapidez, viabilidade econômica. Nesse sentido, a microextração com gota única (SDME) torna-se promissora por reduzir significativamente o consumo de solventes orgânicos, além de tornar a etapa de preparo de amostras simples e rápida.

A SDME é uma técnica miniaturizada de extração e pré-concentração, na qual a fase extratora consiste em uma microgota de solvente orgânico, que pode estar suspensa (*headspace*) ou imersa em solução por uma microsseringa. Nesse processo ocorre a difusão dos analitos para a fase extratora, ocasionando a pré-concentração dos compostos de interesse.

Na SDME, alguns parâmetros devem ser avaliados para melhorar a eficiência de extração e a precisão da técnica, como quantidade de sal, volume da fase extratora, temperatura e tempo de extração, dentre outros. Com isso, neste trabalho o objetivo foi desenvolver e otimizar metodologia de análise para o 2-fenoxietanol em filés de tilápia empregando a SDME.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Soluções e reagentes**

O padrão de 2-fenoxietanol (99,0%), os solventes acetato de etila (99,7%), octano (99,0%) e hexano (95%) e o sulfato de sódio (99,0%) foram

adquiridos da Sigma Aldrich; o solvente tolueno (99,9%) foi adquirido da Merk. Água ultrapura foi fornecida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

A solução estoque de 2-fenoxietanol foi preparada de forma similar à descrita para a SPME, diluindo-se 9,0 µL do padrão em estudo em 10 mL de acetato de etila, resultando em uma concentração de 1 g L<sup>-1</sup>, a qual foi preparada a cada dia e armazenada em um frasco âmbar, à temperatura de +4 °C. Para as análises de microextração do 2-fenoxietanol foram realizadas diluições da solução estoque em água ultrapura, resultando em concentrações na faixa de 0,1 a 6,0 µg mL<sup>-1</sup>.

## 2.2 Equipamentos e materiais

Foi utilizado um GCMS-QP2010 Plus Shimadzu (Shimadzu, Japão), juntamente com coluna DB-5MS da Shimadzu (30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm) de composição da fase estacionária de 5% difenil-95-dimetilpolisiloxano. Todas as análises cromatográficas foram realizadas no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ).

Para a agitação das amostras foi utilizado um Vórtex Mixer (Vixar<sup>®</sup>) e um agitador magnético com aquecimento da Fisatom modelo 753A (Brasil). A centrífuga utilizada foi a QUIMIS modelo Q-222TM.

Frascos de vidro transparentes (vials) com capacidade para 10 mL, (Agilent) selados com tampa com septo de politetrafluoretileno (PTFE), foram utilizados para a microextração. Tubos de centrífuga cônico de 50 mL com tampa HDPE, plug à prova de vazamento (Ciencor, EUA), foram utilizados na obtenção do extrato.

Nas extrações foram utilizadas microseringas de 10 µL com agulha de aço (701 N, Hamilton, USA).

## 2.3 Amostras de peixes anestesiados com 2-fenoxietanol

A quantificação residual do 2-fenoxietanol em filés de tilápia foi realizada nos tempos de abate de 0, 6, 12 e 24 horas após a anestesia, nas concentrações de 450, 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Após o abate, os peixes foram congelados (-20 °C) até o procedimento de preparo da amostra. As amostras foram fornecidas pelo Departamento de Zootecnia/Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.3.1 Preparo de amostras de filés de tilápia**

As amostras foram preparadas de forma semelhante ao proposto por Klimànková et al. (2008): 2 g de filés de peixes da espécie tilápia foram macerados e transferidos para um tubo cônico de 50 mL com 2,5 mL de água ultrapura. Em seguida, o tubo foi selado com tampa de rosca. As amostras foram vigorosamente agitadas em um vórtex, por 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 15.000 g, por 10 minutos e, imediatamente, o extrato foi transferido para um vial com capacidade de 10 mL. Ao tecido, o qual foi extraído previamente o 2-fenoxietanol, adicionaram-se mais 2,5 mL de água ultrapura e repetiu-se o mesmo processo de agitação e centrifugação. O extrato obtido foi acrescentado ao extrato já coletado anteriormente, resultando em uma solução de 5 mL. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de SDME.

### **2.4 Otimização multivariada da técnica de SDME na extração de 2-fenoxietanol**

O planejamento do composto central foi empregado na otimização da metodologia de determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia pela técnica de SDME, com auxílio do software Chemoface versão 1.4. Dentre os parâmetros que têm influência na eficiência da técnica estudada, três deles (temperatura, tempo de extração e quantidade de sal) foram avaliados de forma multivariada em três níveis (+1, 0, -1), obtendo-se um total de 17

experimentos, sendo 8 pontos fatoriais obtidos de acordo com um planejamento fatorial completo de dois níveis. Foram realizadas análises em triplicatas do ponto central (nível 0) para obter a estimativa do erro puro e foram obtidos 6 pontos axiais ( $\alpha$ ), a uma distância de  $\pm\sqrt[4]{2^k}$  do ponto central, em que k é o número de variáveis (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A matriz do planejamento experimental não codificada está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Matriz do planejamento do composto central para as variáveis em estudo na SDME

Ensaio	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Sal (g)	
1	25	15	2	Pontos fatoriais
2	25	15	3	
3	25	45	2	
4	25	45	3	
5	35	15	2	
6	35	15	3	
7	35	45	2	
8	35	45	3	
9	21,5910	30	2,5	Pontos axiais
10	38,4090	30	2,5	
11	30	4,7731	2,5	
12	30	55,2289	2,5	
13	30	30	1,6591	
14	30	30	3,3409	Pontos centrais
15	30	30	2,5	
16	30	30	2,5	
17	30	30	2,5	

Para essas análises, amostras de 2 g de filés de tilápia isentas de anestésico foram enriquecidas com 15  $\mu\text{L}$  ( $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) da solução estoque e mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, extratos

das amostras enriquecidas foram submetidos ao processo descrito na Tabela 1.

## 2.5 Análise por *headspace* em SDME acoplada ao GC-MS

Na Figura 1 está representado o sistema utilizado na extração por SDME, que dispõe de equipamentos de fácil acesso, simples e de baixo custo.

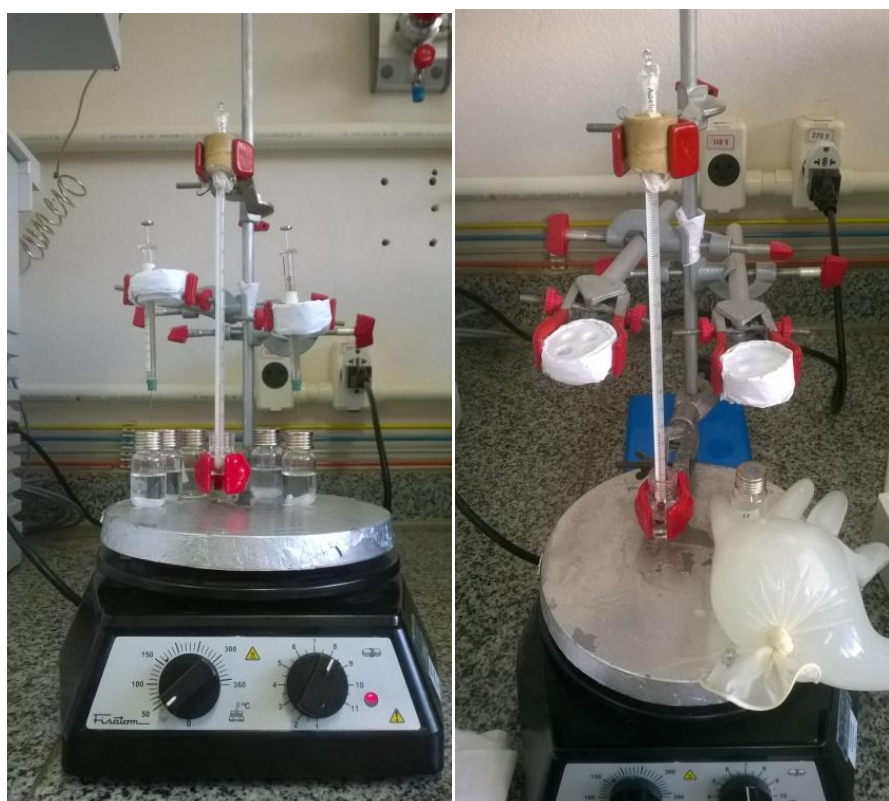


Figura 1 Sistema de SDME empregado na extração de 2-fenoxietanol, dispondo de um agitador magnético com temperatura, termômetro, suporte para seringa fixado por garra e banho de gelo

Antes do processo de extração, as amostras passaram por um período de estabilização do sistema, com agitação controlada e temperatura de 35 °C, por 10 minutos. Em seguida, rompeu-se o septo do vial com a ponta da

agulha da microseringa, mantendo-a a uma distância de 1,5 cm da solução (*headspace*). A microgota de solvente orgânico selecionado com volume de 1,8  $\mu\text{L}$  foi exposta, pressionando-se o êmbolo. Após o período de 30 minutos de extração, a microgota foi recolhida e injetada diretamente no injetor do cromatógrafo em fase gasosa. Para eliminar possível efeito memória e presença de bolhas dentro do cilindro da microseringa, antes de cada extração, a microseringa foi lavada 10 vezes com o solvente de extração.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa com fluxo ajustado para 1  $\text{mL min}^{-1}$ , no modo splitless, utilizando-se um injetor split-splitless. A temperatura inicial do programa foi de 80  $^{\circ}\text{C}$ , durante 3 minutos, aumentando para 140  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de 7  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . A partir dessa temperatura aumentou-se para 280  $^{\circ}\text{C}$ , à taxa de 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , totalizando 18,5 minutos de corrida. O volume de injeção foi de 0,5  $\mu\text{L}$ , à temperatura de 280  $^{\circ}\text{C}$ ; a temperatura de interface também foi mantida em 280  $^{\circ}\text{C}$  e a da fonte de íons, em 150  $^{\circ}\text{C}$ . O detector do espectrômetro de massas operou em modo íon selecionado (SIM), de 5 a 18,5 minutos. O detector foi programado para ler as unidades de massa atômica de 94 e 138, em uma energia eletrônica de 70 eV.

## 2.6 Análise quantitativa do 2-fenoxietanol por SDME

A validação do método de quantificação do 2-fenoxietanol foi realizada em filés de tilápia isenta de anestésico, pelo método de padronização externa, enriquecendo-se as amostras a partir da solução estoque de 2-fenoxietanol, resultando nas concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A curva analítica foi obtida por regressão linear e as análises foram realizadas em triplicata, empregando-se a técnica de microextração. Para garantir a confiabilidade dos resultados, os parâmetros linearidade, precisão (intradia e interdia), fator de recuperação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados de acordo com as

recomendações de órgãos regulamentadores (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA - INMETRO, 2011).

A linearidade do método desenvolvido foi verificada numa faixa dinâmica compreendida entre 0,1 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo expressa pela curva analítica, considerando-se como ajuste ideal o valor do coeficiente de correlação superior a 0,9900 (RIBANI et al., 2004).

LD e LQ foram calculados com base na razão entre o desvio padrão da equação da linha de regressão e o coeficiente angular da curva analítica multiplicados por três e dez, respectivamente.

A precisão intradia foi avaliada por análises sucessivas em três níveis de concentrações (1,0; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), em triplicata. A precisão interdia foi realizada repetindo-se a análise intradia em três dias consecutivos. Ambas as respostas foram expressas em termos de coeficiente de variação.

O fator de recuperação foi obtido pela razão do composto na matriz e na ausência da matriz. Para isso, as análises foram realizadas nos níveis de concentrações de 1,0; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de 2-fenoxietanol em triplicata.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Condições SDME**

Alguns parâmetros considerados de suma importância na técnica de SDME, como solvente extrator, volume da gota, volume da solução e agitação da amostra, foram avaliados individualmente, devido a algumas limitações de equipamentos específicos e à instabilidade do sistema de extração.


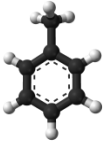
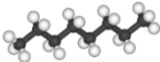
Três solventes extratores foram testados (Tabela 2) em modo *headspace*, apresentando pré-concentração significativa do composto 2-fenoxietanol. Os solventes extratores hexano e tolueno apresentaram alta taxa de perda da gota, enquanto para o octano ela foi desprezível.



Por observações, as microgotas que não apresentavam forma esférica, ao serem expostas no *headspace*, eram mais susceptíveis à evaporação. Logo, para diminuir a incidência de perda da gota, tornou-se necessário que a mesma fosse exposta a uma velocidade constante. Este fato pode estar associado à viscosidade e à volatilidade do solvente (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

Sendo assim, solventes mais viscosos formam gotas mais esféricas, com menor área superficial, conseqüentemente diminuindo a evaporação. Portanto, o solvente extrator selecionado para as análises do 2-fenoxietanol foi o octano.

Tabela 2 Propriedades dos solventes extratores

Solventes	Hexano	Tolueno	Octano
Estrutura tridimensional			
Temperatura de ebulição (°C)	68,7	110,6	125,6
Viscosidade (cP)	0,32	0,58	0,54
Pressão de vapor (mm Hg a 31,5 °C)	200	40	22

Pode-se perceber que, com o aumento na quantidade de sal, aumentou-se a estabilidade da gota. Quando se aumentou a quantidade de sal de 30% para 60% (m/v), a volatilização parcial da gota passou a ser de 89%, ou seja, para 1,8 uL de gota exposta podem ser recolhidos 1,6 uL. Segundo Jeannot, Przyjazny e Kokosa (2010), o aumento da força iônica leva a uma maior viscosidade do solvente orgânico, quando em imersão direta. Porém, em nenhum trabalho relata-se a influência do efeito do sal no solvente quando em modo *headspace*. Possivelmente, o efeito do sal na estabilidade da gota está relacionada à diminuição do vapor de água no *headspace*, o que acarreta numa maior tensão superficial da gota orgânica (PEÑALVER et al., 1999).

Logo, por ter influência direta na estabilidade da gota, aumentando assim a precisão da técnica, as quantidades de sal de 2 a 3 g foram avaliadas de forma multivariada, para a extração do composto em estudo, quantidades essas superiores a trabalhos reportados na literatura (CHISVERT et al., 2009; PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2010; ZHAO et al., 2006).

De acordo com Jeannot, Przyjazny e Kokosa (2010), o volume da gota do solvente extrator está diretamente relacionado com a eficiência do método de análise por SDME, predizendo que, quanto maior o volume da gota, maior a quantidade de analito extraída. Porém, conforme pode ser observado na Figura 2, quanto menor o volume da gota extratora, maior a quantidade de 2-fenoxietanol extraída.

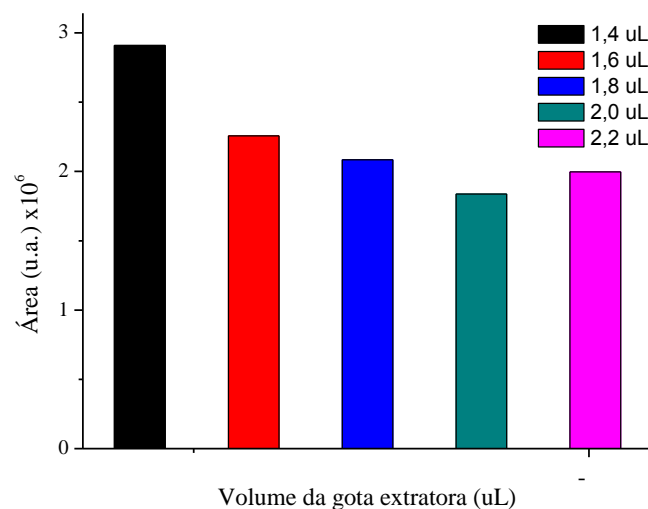


Figura 2 Efeito do volume da gota de solvente extrator (octano) na extração de 2-fenoxietanol por SDME. Condições experimentais: concentração de fortificação de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 45 minutos de extração, 2,5 g de sal, temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e volume de amostra de 5 mL

O fato observado pode estar associado à necessidade de maior tempo para que o sistema alcance o equilíbrio para volumes maiores de gota, devido ao processo de difusão do analito (THEIS et al., 2001). No entanto, tempos de extração muito elevados são inviáveis para o desenvolvimento de metodologias analíticas (SARKHOSH et al., 2011; WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007). Apesar de, no tempo de extração de 45 minutos, os volumes de gotas menores (1,4 e 1,6) terem obtido melhores resultados, estas apresentaram maior instabilidade e, por isso, foi adotado o volume de 1,8 uL nas análises.

As condições de análise fixadas para a técnica de SDME foram: solvente extrator (octano), volume da gota extratora (1,8 µL), volume de amostra (5 mL) e agitação. O volume e a agitação foram fixados de forma a garantir um espaço seguro para que a gota não tivesse contato com a solução.

### 3.2 Condições cromatográficas

Trabalhar com solventes orgânicos com maior peso molecular, consequentemente com grande quantidade de fragmentos iônicos, pode afetar a vida útil do filamento do equipamento de detecção por espectrometria de massas. Para isso, um teste de corte de solvente foi efetuado, aplicando-se o vapor do solvente octano no equipamento GC-MS, nas condições cromatográficas previamente definidas. Nessas condições, o solvente obteve um tempo de retenção de 2,7 minutos. Logo, foi realizado um corte de solvente no tempo de 5 minutos, garantindo, assim, que todo solvente fosse eliminado antes de o filamento ser ligado, obtendo-se uma corrida de 5 a 18,5 minutos.

As análises para o composto 2-fenoxietanol foram realizadas em modo SIM e o monitoramento foi aplicado para os íons 94 e 138 *m/z*. O tempo de retenção do fármaco em estudo foi de 10,92 minutos, conforme apresentado na Figura 3.

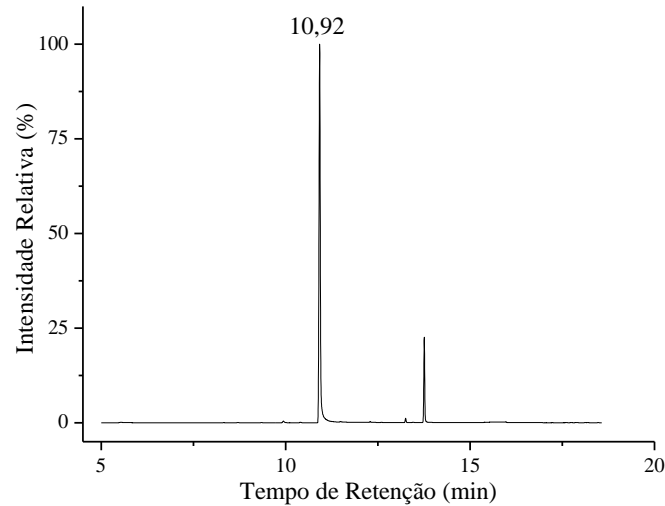


Figura 3 Cromatograma de íons totais (TIC) no modo SIM, para os íons 94 e 138  $m/z$ , em uma amostra fortificadas com 2-fenoxietanol ( $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

### 3.3 Análise por planejamento de composto central

Os parâmetros selecionados para análise de forma multivariada foram temperatura, tempo de extração e quantidade de sal, selecionados por apresentarem maior influência na eficiência da SDME para o composto 2-fenoxietanol. No intuito de avaliar o efeito das três variáveis na análise residual, os experimentos foram conduzidos empregando-se o planejamento CCD, obtendo-se um total de 17 experimentos, sendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, conforme apresentado na Tabela 1.

Nas análises pelo CCD não foram realizadas repetições dos pontos fatoriais e axiais porque, nesse planejamento, estimam-se os erros de efeitos supondo que interações de altas ordens para  $k \geq 3$  não são significativas e, portanto, são erros experimentais nos valores dos efeitos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Assim, substitui-se o erro experimental pela estimativa do erro puro, dada pela repetição do ponto central, significando que qualquer oscilação em torno da média é ao acaso e não efeito do tratamento.

A partir das respostas em área obtidas nas análises de acordo com a matriz proposta no planejamento, foi construído um diagrama de Pareto (Figura 4), representando os efeitos de cada variável estudada e suas interações.

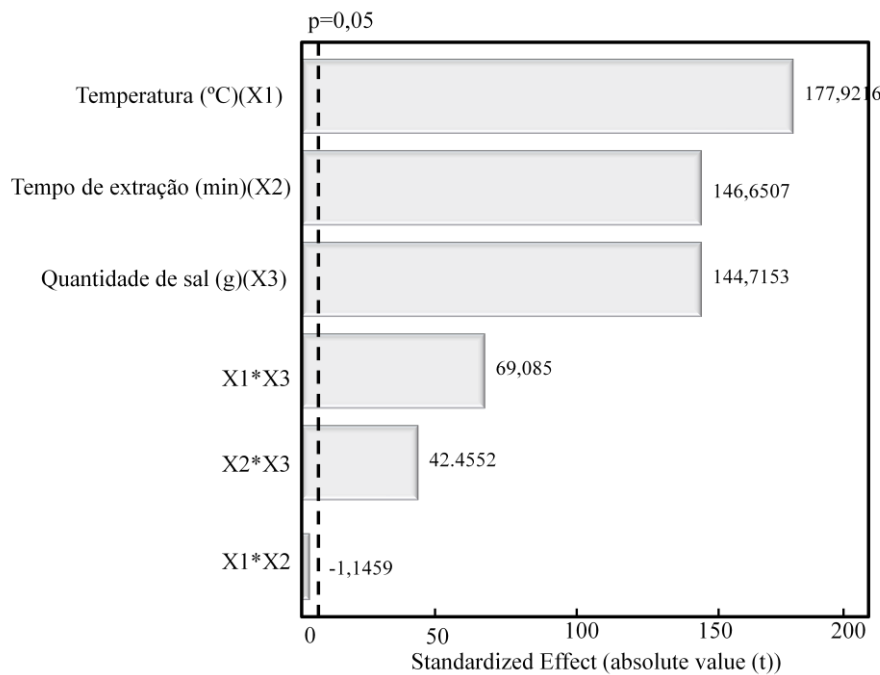


Figura 4 Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis sobre a área total

Analisando-se o diagrama de Pareto foi possível inferir que todos os parâmetros analisados com exceção da interação da temperatura com o tempo de extração apresentaram significância com 95% de confiança, em um teste estatístico (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Estes também apresentaram sinal algébrico positivo, o que significa que, quando as variáveis seguem para seu nível máximo, ocasiona em um aumento no sinal analítico. O sinal positivo para os efeitos das interações indica que ambas as variáveis seguem em mesmo sentido, obtendo-se um aumento no sinal analítico. Já a interação da temperatura com o tempo de extração apresentou sinal negativo, indicando que, para um aumento no sinal analítico, estas variáveis devem seguir sentido contrário.

Pelo gráfico de Pareto foi possível observar que a temperatura exibiu maior influência para a análise de 2-fenoxietanol pela técnica de SDME, indicando que o aumento da temperatura de 25 para 35 °C favorece a extração do composto. Este fato pode estar relacionado ao aumento da volatilidade do composto, o que acarreta o aumento da difusão do analito para a fase extratora, diminuindo o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio de partição entre as fases do sistema (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

A avaliação do parâmetro tempo de extração indica que tempos maiores de extração favorecem o aumento do sinal analítico. Além disso, o controle do tempo de extração deve ser rigoroso, principalmente quando se trabalha fora do tempo de equilíbrio, uma vez que este parâmetro está diretamente relacionado à repetibilidade do método (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

Analisando-se o parâmetro quantidade de sal, individualmente, observa-se que ele aponta grande influência na resposta analítica. Este fato pode estar associado à diminuição da solubilidade do 2-fenoxietanol na solução pelo aumento da força iônica, tornando-o mais hidrofóbico, conseqüentemente facilitando sua difusão para o *headspace* (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; LORD; PAWLISZYN, 2000).

As interações do parâmetro quantidade de sal com tempo de extração e temperatura também mostraram efeito positivo na estimativa dada pelo diagrama de Pareto, indicando que os níveis máximos favorecem a extração do 2-fenoxietanol.

### **3.3.1 Análise de superfície de resposta**

Para a determinação das condições mais adequadas para a quantificação residual de 2-fenoxietanol foi empregada a análise por metodologia de superfície de resposta. Esta metodologia baseia-se na

construção de modelos matemáticos empíricos que, geralmente, empregam funções polinomiais lineares, quadráticas, quadráticas puras ou de interações para descrever o sistema estudado, dando condições para otimizá-lo (CHATTERJEE et al., 2012).

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Chemoface e os resultados encontram-se na Tabela 3. A análise da qualidade do ajuste para as superfícies de resposta avaliada por análise de variância indica que a regressão foi significativa para o modelo quadrático (Equação 1).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

em que  $y$  é a resposta predita;  $\beta_0$  é o ponto de interseção;  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação;  $\beta_i$  é o coeficiente linear;  $\beta_{ii}$  é o coeficiente quadrático;  $k$  é o número de fatores;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis referentes aos fatores e  $\varepsilon$  é o erro associado com o modelo.

Este modelo é dado como adequado para as análises de 2-fenóxiolanol em filés de tilápia, uma vez que o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,8369 e o valor de probabilidade de significância ( $p$ ) correspondente a 0,0058 (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Tabela 3 Resultados estatísticos da análise de variância do ajuste dos dados ao modelo quadrático

	GL	SQ	QM	F	P
Regressão	7	1,5435x10 <sup>17</sup>	2,2050x10 <sup>16</sup>	6,5986	0,0058
Residual	9	3,0075x10 <sup>16</sup>	3,3417x10 <sup>15</sup>		
Falta de ajuste	7	3,0072x10 <sup>16</sup>	4,2959x10 <sup>15</sup>	2,5958x10 <sup>3</sup>	3,8515x10 <sup>-4</sup>
Erro puro	2	3,3100x10 <sup>12</sup>	1,6550x10 <sup>12</sup>		
Total	16	1,8443x10 <sup>17</sup>			
$R^2$		0,8369			

A partir da escolha do modelo apropriado para analisar os dados, foram obtidas as superfícies de resposta, conforme representado a seguir.

Nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 5 foi fixada a variável quantidade de sal em 2; 2,5 e 3 g, respectivamente. Observando-se a área em cada superfície de resposta foi possível inferir que em maiores quantidades de sal são obtidas melhores resultados. Neste trabalho optou-se por não utilizar quantidades superiores a 3 g de sal, por levar à saturação do sistema.

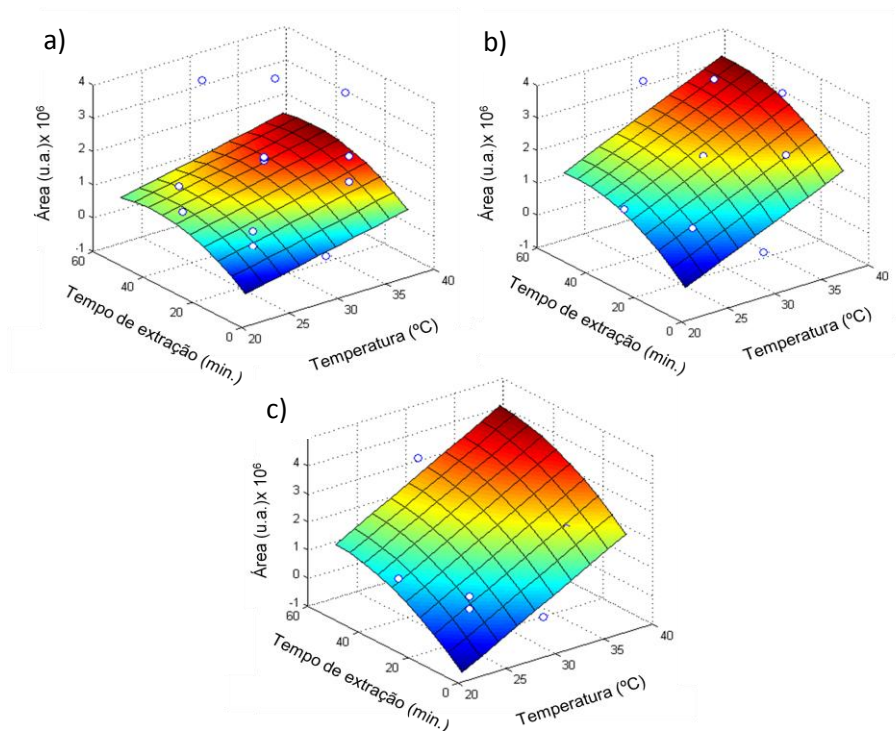


Figura 5 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação temperatura e o tempo de extração, considerando fixos a) 2; b) 2,5 e c) 3 g de sal.

Na Figura 6 estão apresentados três gráficos de superfície de resposta da interação da quantidade de sal em função da temperatura, fixados os tempos de extração em 15, 30 e 45 minutos, respectivamente.



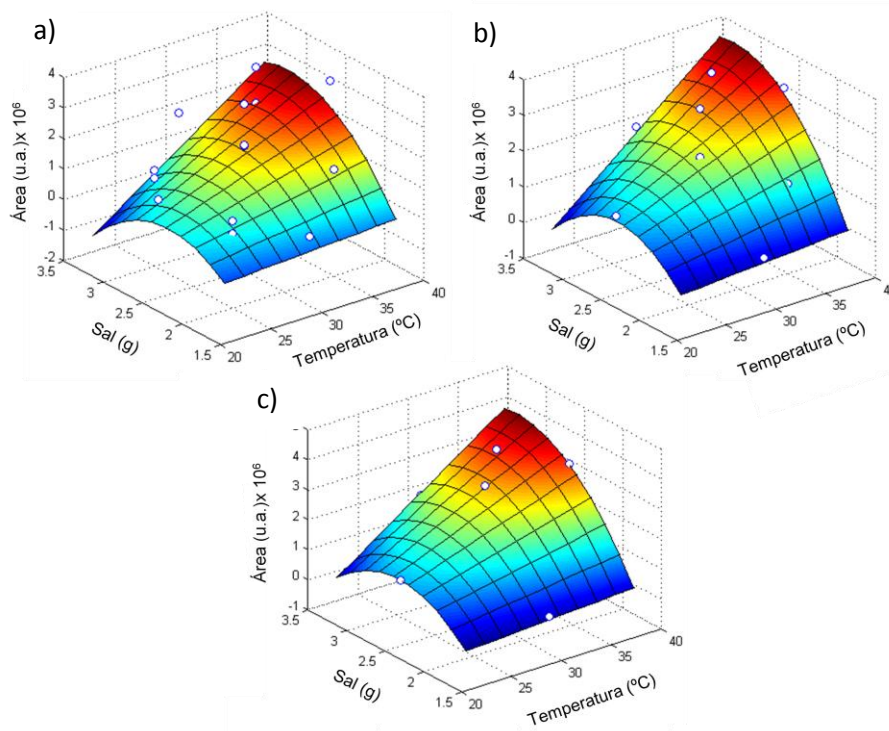


Figura 6 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação quantidade de sal e temperatura de extração, considerando fixos os tempos de a) 15, b) 30 e c) 45 minutos

Analisando-se as Figura 6a, 6b e 6c é possível perceber que a superfície de resposta obtida para os tempos de 30 e 45 minutos tem perfis semelhantes, o que possibilitou trabalhar fora do tempo de equilíbrio, com tempo de extração de 30 minutos, diminuindo a perda da gota extratora devido ao longo tempo de exposição. Logo, para minimizar erros inerentes a se trabalhar fora da condição ideal, todos os parâmetros foram vigorosamente controlados (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

Na Figura 7 os parâmetros avaliados foram os efeitos da quantidade de sal em função do tempo de extração, fixando-se as temperaturas de 25, 30 e 35 °C, respectivamente. Observando-se as Figuras 7a, 7b e 7c é possível perceber que o aumento da temperatura teve grande influência no sinal

analítico para a extração do composto em estudo, o que está de acordo com o resultado mostrado pelo diagrama de Pareto. Dessa forma, adotou-se 35 °C como temperatura de trabalho, não se optando por temperaturas mais elevadas por ocasionar perda da fase extratora por volatilização.

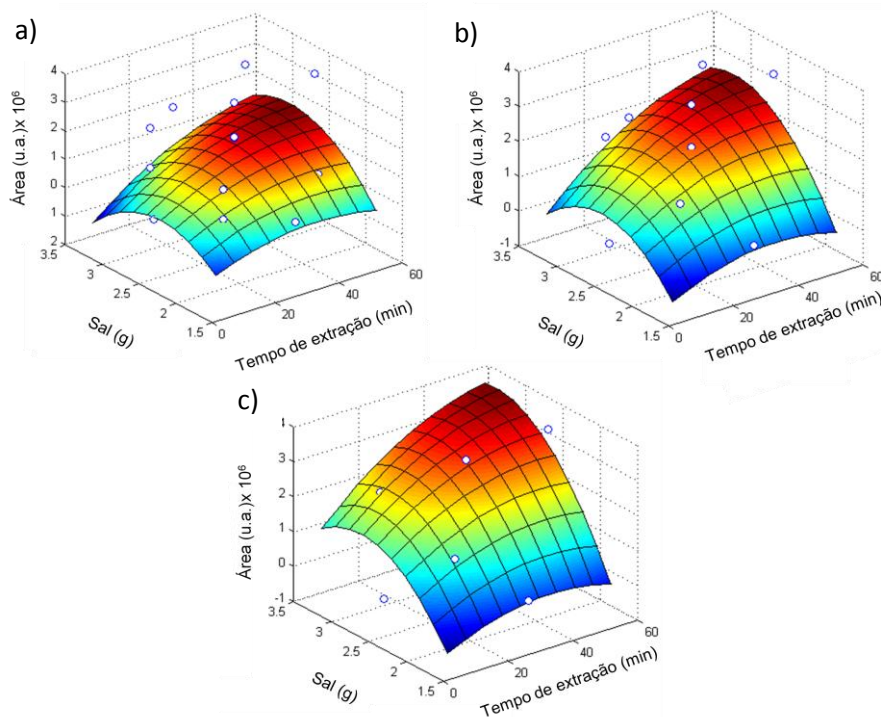


Figura 7 Gráficos da superfície de resposta da área *versus* o efeito da interação quantidade de sal e tempo de extração, considerando fixas as temperaturas de a) 25, b) 30 e c) 35 °C.

Considerando-se a análise dos gráficos de superfície de resposta envolvendo a interação entre os fatores, adotaram-se, como condições de trabalho, a temperatura de 35 °C e o tempo de extração de 30 minutos, empregando-se 3 g de sal, para a análise de 2-fenoxietanol em tecidos de tilápia.

### 3.4 Validação da metodologia de quantificação do 2-fenoxietanol por SDME

Para a verificação da linearidade da metodologia desenvolvida para determinação residual de 2-fenoxietanol em peixes, empregou-se o método de padronização externa. O intervalo linear de trabalho obtido neste estudo foi de 0,1 a 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no qual foi construída a curva analítica apresentada na Figura 8.

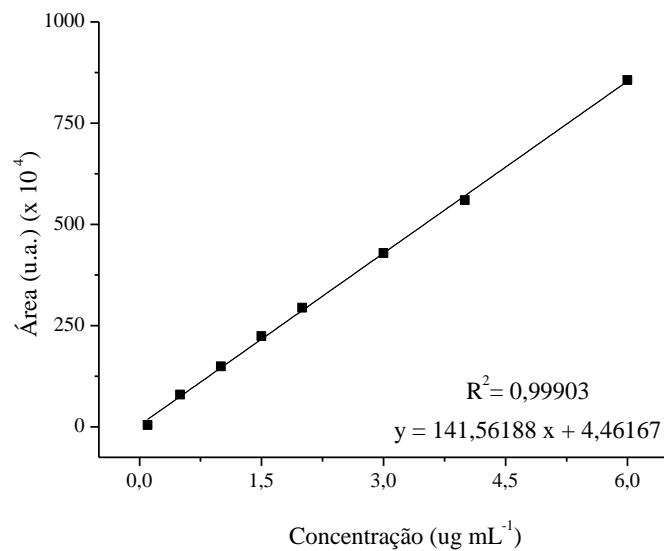


Figura 8 Curva analítica obtida para o 2-fenoxietanol por SDME

A equação encontrada para o composto 2-fenoxietanol, obtida pelo método dos mínimos quadrados pela curva analítica, foi  $y = 141,56188x + 4,46167$ , calculada pela regressão linear, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99903, indicando forte correlação linear entre as concentrações e as áreas. LD e LQ foram estimados a partir dos parâmetros da curva analítica e os resultados encontrados foram de 0,2 e 0,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (RIBANI et al., 2004).

Os resultados obtidos para a precisão intradia, nas concentrações de 1,0; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , expressos pelo coeficiente de variação (CV%), foram, respectivamente, 4,67%, 4,31% e 1,50%. Os valores obtidos para os mesmos níveis da precisão intradia, porém, em dias diferentes (interdia) foram de 1,33%, 5,13% e 2,19%, do menor nível para o maior, respectivamente. Os resultados obtidos revelaram que o método proposto apresentou precisão aceitável.

Similar à precisão, a avaliação da recuperação também foi realizada em três níveis e os valores encontrados foram 97,74% (1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 102,42% (3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 100,47% (6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e seus respectivos coeficientes de variação foram de 5,65%, 4,08%, 1,93%. Esses resultados indicaram que a metodologia desenvolvida apresentou exatidão confiável, estando a faixa de recuperação recomendada por Ribani et al. (2004) compreendida entre 70% e 110% para análise residual.

### **3.5 Determinação de 2-fenoxietanol em filés de tilápia**

O método validado foi aplicado na determinação residual em filés de tilápias anestesiadas com 2-fenoxietanol, nas concentrações de 450, 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nos tempos de abate pós-anestesia de 0, 6, 12 e 24 horas. Conforme pode ser observado na Figura 9, nos tempos de abate de 12 e 24 horas, em todas as concentrações analisadas, os valores foram abaixo do limite de quantificação. Observa-se também que, no tempo de abate de 6 horas, para a menor concentração administrada, o valor encontrado foi abaixo do limite de quantificação, para as concentrações de 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nesse mesmo tempo de abate foram encontradas concentrações de 0,1 e 0,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, obtendo-se um decaimento residual de 100% (450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 97,6% (600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 91,3% (1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), para peixes abatidos 6 horas pós-anestesia.

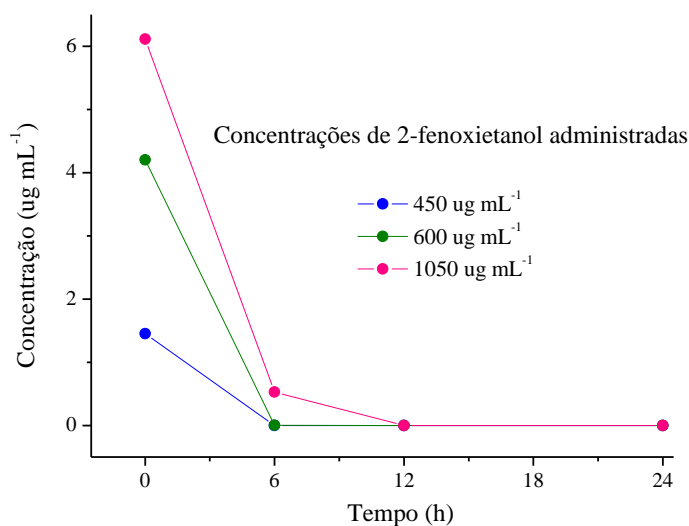


Figura 9 Concentrações residuais de 2-fenoxietanol em filés de tilápia anestesiadas nas concentrações de 450, 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e abatidas nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas pós-anestesia

Não existem leis vigentes que regulamentem a utilização do anestésico 2-fenoxietanol em peixes, por não existir estimativas de níveis residuais desse composto que sejam seguros para o consumo. Portanto, não são aceitáveis resíduos de 2-fenoxietanol na carne do pescado (KLIMÀNKOVÁ et al., 2008). Segundo Food and Drug Administration (FDA), 2-fenoxietanol é tóxico para recém-nascidos pela ingestão, tornando-o perigoso caso consumido por lactantes.

#### 4 CONCLUSÕES

A metodologia analítica de preparo de amostra proposta mostrou-se promissora na determinação do 2-fenoxietanol, por apresentar baixo custo e diminuir consideravelmente o consumo de solventes. A técnica apresentou boa precisão e exatidão numa faixa linear de 0,1 a 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com limites

de detecção e quantificação de 0,2 e 0,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com a OMS, nenhum alimento deve conter qualquer traço de contaminante. Para isso, constatou-se que, para as concentrações de 600 e 1.050  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de anestesia para peixes da espécie tilápia, é necessário tempo de depuração igual ou superior a 12 horas e, para a concentração de 450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o tempo deve ser de 6 horas.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Série 1, 15 p.
- CHATTERJEE, S. et al. Application of response surface methodology for methylene blue dye removal from aqueous solution using low cost adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 181/182, p. 289-299, Feb. 2012.
- CHISVERT, A. et al. Simple and commercial readily-available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 1290-1295, Feb. 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2011. 35 p.
- JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 706, p. 37-65, Nov. 2011.
- JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction: development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 2326-2336, Apr. 2010.
- KLIMÁNKOVÁ, E. et al. Development of an SPMEGC/MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish. **Talanta**, London, v. 75, p. 1082-1088, May 2008.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 17-63, Nov. 2000.
- MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.
- PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in fish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, p. 402-407, Mar. 2010.

PEÑALVER, A. et al. Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 557-568, Aug. 1999.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

SARKHOSH, M. et al. Single drop microextraction of biphenyl and biphenyl oxide in aqueous samples by gás chromatography-flame ionization detection. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 2, p. 689-696, Oct. 2011.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, mar./abr. 2006.

THEIS, A. L. et al. Headspace solvent microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, p. 5651-5654, Dec. 2001.

WARDENCKI, W.; CURYŁO, J.; NAMIESNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal Biochemical. Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 275-288, Mar. 2007.

ZHAO, E. et al. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1114, p. 269-273, May 2006.