

# ANÁLISE DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM CAMARÃO E PESCADO POR CROMATOGRÁFIA A GÁS COM DETECTOR DE MICRO CAPTURA DE ELETRONS (GC- $\mu$ ECD)

VERA L. FERRACINI\*  
SONIA C.N. QUEIROZ \*  
MARIA A. ROSA\*  
DÉBORA R. C. DE SOUZA\*  
JÚLIO F. DE QUEIROZ\*\*  
LOURIVAL COSTA PARAIBA\*\*\*

---

Otimizou-se um método analítico para a determinação de multirresíduos de organoclorados em camarão marinho para a espécie *Litopenaeus vannamei* e em músculo de peixes da espécie *Oreochromis sp.*, chamada popularmente de tilápia-vermelha. Utilizou-se a técnica de extração denominada QuEChERS, empregando cromatografia a gás com detector de micro captura de elétrons (GC- $\mu$ ECD) para análise dos seguintes organoclorados em amostras de camarão e em músculo de peixes: hexaclorobenzeno, lindano, DDE, DDT, clorpirifós, endossulfan sulfato, endossulfan beta, endossulfan alfa, heptacloro, aldrin, endrin e dieldrin. O limite de detecção para todos os compostos foi de 0,0005  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e o limite de quantificação do método foi estabelecido em 0,005  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Os valores de recuperação variaram entre 80 % e 120 % com desvio padrão (RSD) abaixo de 20 % para todos os compostos.

**PALAVRAS-CHAVE:** MULTIRRESÍDUOS; AGROTÓXICOS; TILÁPIA; CAMARÃO.

---

- \* Química, Doutora em Química, Embrapa Meio Ambiente, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP (e-mail: vera.ferracini@embrapa.br; sonia.queiroz@embrapa.br; maria.a.rosa@embrapa.br; debora.cassoli@embrapa.br).
- \*\* Oceanólogo, Doutor em Ciências Agrárias, Embrapa Meio Ambiente, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP (e-mail: julio.queiroz@embrapa.br).
- \*\*\* Matemático, Doutor em Matemática Aplicada, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP (e-mail: lourival.paraiba@embrapa.br).

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta excepcionais vantagens para o desenvolvimento da aquicultura, contando com 8.400 Km de costa marítima, 5.500.000 ha de reservatórios de água doce (aproximadamente 12 % da água doce do planeta), clima favorável para o desenvolvimento dos organismos, mão-de-obra relativamente barata e crescente mercado interno. A rápida expansão da aquicultura no Brasil vem consolidando a importância econômica do setor. De acordo com dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a aquicultura registrou crescimento de aproximadamente 50 % da produção no período de 2008 a 2009 (BRASIL, 2010).

A emissão de substâncias contaminantes em bacias hidrográficas pode provocar sérios impactos sobre a atividade de pesca mediante incorporação de substâncias que, embora não de forma aguda, podem causar significativos decréscimos de produtividade, como agrotóxicos e metais pesados. Portanto, estudos mais detalhados sobre a distribuição de contaminantes em áreas próximas à produção de pescado devem ser incentivados de forma a fornecer subsídios a segurança ambiental e dos alimentos produzidos por essa atividade, garantindo sua sustentabilidade. No intuito de atender a legislação vigente torna-se necessário informar quais medidas serão tomadas para a manutenção dos padrões de qualidade da água estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005). Essa Resolução limita os teores de substâncias potencialmente prejudiciais para os cursos de água destinados para a aquicultura, que implicarão diretamente na contaminação do pescado.

Muitos agrotóxicos, principalmente organoclorados, oriundos tanto de fontes agrícolas como industriais apresentam alta resistência à degradação química e biológica e alta solubilidade em lipídios. A combinação entre a baixa solubilidade em água e a alta capacidade de adsorção na matéria orgânica leva ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar, especialmente nos tecidos ricos em gorduras de organismos vivos (TORRES, 1998). O equilíbrio ecológico pode sofrer alterações pelo uso inadequado de agrotóxicos, com o desaparecimento, principalmente, da fauna de invertebrados aquáticos, de peixes, e algumas espécies de aves (ALMEIDA, 1974). Entre os agrotóxicos que merecem ser estudados destacam-se: DDT, DDE, lindano, aldrin, dieldrin, endrin, hexaclorobenzeno, heptacloro, clorpirifós e endossulfan.

A preocupação referente aos resíduos de agrotóxicos contidos nos alimentos deve-se aos seus efeitos adversos à saúde dos seres humanos. Verifica-se interesse crescente sobre a segurança dos alimentos, gerando a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e exatos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas. Os métodos frequentemente apresentam etapas laboriosas que demandam tempo, custo elevado de material e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos (LEHOTAY, 2002).

Ensaio de proficiência empregando a metodologia QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) mostram que se trata de método robusto, transferido com sucesso entre os laboratórios participantes (LEHOTAY, 2007). Nos Estados Unidos da América, esse método foi oficializado em 2007 pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007). O método QuEChERS também foi oficializado pelo *European Committee for Standardization* (PRESTES *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi otimizar o método QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003 e Lehotay, 2007) para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em camarão marinho para a espécie *Litopenaeus vannamei* e, em músculo de peixes para *tilápia-vermelha* (RIBEIRO *et al.*, 2009 e 2010).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATRIZ

Utilizou-se camarão, como matriz para os testes, coletado em fazenda localizada em

Tibau do Sul, no litoral do Rio Grande do Norte. A propriedade tem 40 ha de área de viveiros e apresenta condições ideais para a prática do monocultivo do camarão do Pacífico, o *Litopenaeus vannamei*. As amostras foram coletadas em sacos plásticos e enviadas ao Laboratório de Resíduos e Contaminantes (LRC) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) em caixa de isopor, contendo sacos de gelo em cubos (chegando ainda congeladas). As embalagens com 1 Kg do camarão foram armazenadas em freezer (-18 a -22 °C).

Para os testes em tilápia utilizou-se como matriz amostras obtidas na Base da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Monte Alegre do Sul, estado de São Paulo, com absoluto controle e confiabilidade quanto à ausência de agrotóxicos. Na APTA só há peixes da espécie *Oreochromis sp.*, chamada popularmente de tilápia-vermelha, criados em tanques com água de mina, equipados com filtro biológico. As amostras, enviadas ao LRC já congeladas e preparadas em filés, foram identificadas e armazenadas em freezer (-18 a -22 °C).

## 2.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As amostras de filé de peixe e de camarão foram congeladas em freezer e processadas com gelo seco, utilizando-se *cutter* de mesa (*robot coupe*) por 1 minuto. No preparo das amostras empregou-se o método QuEChERS, descrito a seguir. Em tubos de centrifuga de 50 mL foram pesados 10 g de amostra e adicionados 10 mL de acetonitrila para cada amostra, seguido de agitação do tubo durante 30 segundos. Acrescentaram-se 4,0 g de MgSO<sub>4</sub> (sulfato de magnésio anidro), 1,0 g de NaCl (cloreto de sódio), 1,0 g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O (citrato de sódio P.A cristalizado) e 0,5 g de HOC(COOH)(CH<sub>2</sub>COONa)2·1.5H<sub>2</sub>O (citrato de sódio PA hidrogeno-sesquihidratado), sempre sob agitação de 1 minuto depois da adição de cada reagente. Após a sonificação por 20 minutos em ultrassom, com gelo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos em temperatura controlada de 10 °C. Alíquota de 7 mL do sobrenadante foi transferida para o tubo concentrador de 10 mL e deixada sob refrigeração por 2 horas para que a camada de gordura pudesse decantar. Transferiu-se alíquota de 5 mL para outro tubo de centrifuga de 50 mL, já contendo 125 mg de Bondesil - PSA e 750 mg de MgSO<sub>4</sub>. Agitou-se o tubo vigorosamente por 30 segundos em agitador Vortex e repetiu-se o processo de centrifugação por 5 minutos. Filtrou-se alíquota de 2 mL do sobrenadante em papel de filtro de 0,45 µm e 1 µL foi injetado em cromatógrafo a gás AGILENT - 6890 Series, equipado com detector microeletron de captura de elétrons (CG-µECD) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003 e PRESTES *et al.*, 2009). A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se coluna capilar tipo DB -5MS com dimensões de 30,0 m (comprimento) x 530 µm (diâmetro interno) x 1,50 µm (espessura). O gradiente de temperatura utilizado na coluna consistiu de temperatura inicial de 190 °C mantida por 1 min, com incremento até 210 °C a 8 °C min<sup>-1</sup> (8 min), incremento até 230 °C a 8 °C min<sup>-1</sup> (8 min), aquecimento até 250 °C a 8 °C min<sup>-1</sup> (8 min) e aquecimento até 270 °C a 8 °C min<sup>-1</sup> (10 min), totalizando 45 minutos de corrida. Utilizou-se injetor splitless a 250 °C com injeções de 1 µL.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 3.1.1 Preparo das soluções analíticas para avaliação da linearidade das curvas analíticas

As soluções analíticas em cinco níveis de concentração (0,025; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 µg mL<sup>-1</sup>) foram preparadas em acetonitrila e obtidas pela diluição da solução mistura de agrotóxicos (concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>) com acetonitrila. Foram determinados os seguintes parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão (repetitividade) e recuperação.

As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação ( $r^2$ ) > 0,99 para todos os

agrotóxicos estudados. O limite de detecção do aparelho encontrado para os agrotóxicos foi de  $0,0005 \mu\text{g g}^{-1}$  e o limite de quantificação do método estabelecido em  $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$  (sendo  $10 \times \text{LOD}$ ).

Os ensaios de fortificação e recuperação têm por objetivo a avaliação da exatidão do método que consiste no cálculo da concentração real medida (no final do procedimento) em comparação com a concentração conhecida adicionada à matriz. Com os cálculos dos valores de RSD (%) pode-se obter informações acerca da repetitividade (precisão) dos dados encontrados com valores de  $\text{RSD} \leq 20 \%$ .

Verificou-se a precisão do método por meio da repetitividade nas mesmas condições de trabalho pelo mesmo analista e em três dias diferentes (inter-dias), sendo dois níveis de fortificação  $2 \times \text{LOQ}$  com concentração final de  $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $10 \times \text{LOQ}$  com concentração final de  $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Os valores de recuperação variaram entre  $80 \%$  e  $120 \%$  (Tabela 1), enquadrando-se no intervalo aceitável de recuperação para análises de resíduos, geralmente entre  $70 \%$  e  $120 \%$  (GARP,1999).

**TABELA 1 - MÉDIA TRIPLICATA DA RECUPERAÇÃO (%) DOS AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM TILÁPIA E CAMARÃO**

	Tilápia		Camarão	
	2 X LOQ	10 X LOQ	2 X LOQ	10 X LOQ
Padrões				
Hexaclorobenzeno	80,41	85,98	92,56	84,14
Lindano	81,49	97,92	107,80	110,81
Heptacloro	82,53	103,59	98,92	102,29
Clorpirifós	86,76	93,80	108,85	94,56
Aldrin	82,15	98,65	89,46	92,84
Endossulfan alfa	83,98	97,00	92,86	97,17
DDE	83,64	98,98	88,27	88,93
Dieldrin	84,91	98,80	90,03	98,15
Endrin	98,35	120,73	93,02	96,72
Endossulfan beta	83,64	95,86	100,69	101,34
DDT	88,08	109,90	96,30	94,08
Endossulfan sulfato	108,65	111,04	97,93	95,72

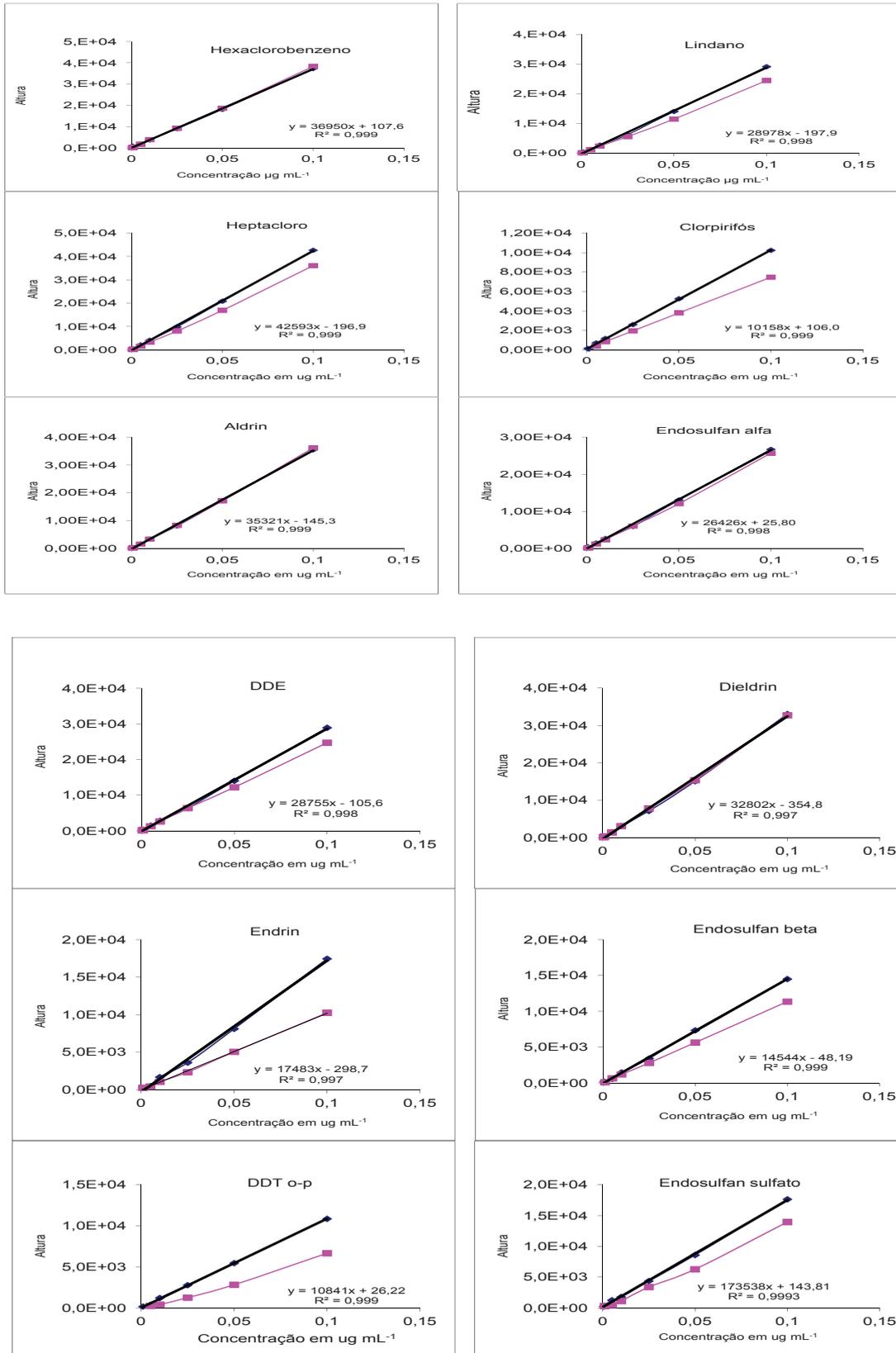
### 3.1.2 Efeito matriz

Os analitos injetados no sistema cromatográfico interagem com a fase estacionária da coluna cromatográfica e com outras superfícies, sendo responsáveis pelos picos com cauda. Esses efeitos podem ser reduzidos utilizando-se os componentes da matriz provenientes do extrato na solução de injeção, comportamento conhecido por efeito matriz.

A avaliação do efeito matriz foi realizada para tilápia pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas, plotadas a partir das injeções da solução padrão e do extrato da matriz fortificado com os padrões (Figura 1). As curvas indicaram efeito matriz para alguns dos clorados como: lindano, heptacloro, clorpirifós, DDE, endossulfan beta, DDT-o-p e endossulfan sulfato. Para os demais padrões fica bem evidenciado que não há diferença nos coeficientes angulares das curvas no padrão e na matriz, indicando ausência de efeito matriz.

### 3.1.3 Análises cromatográficas

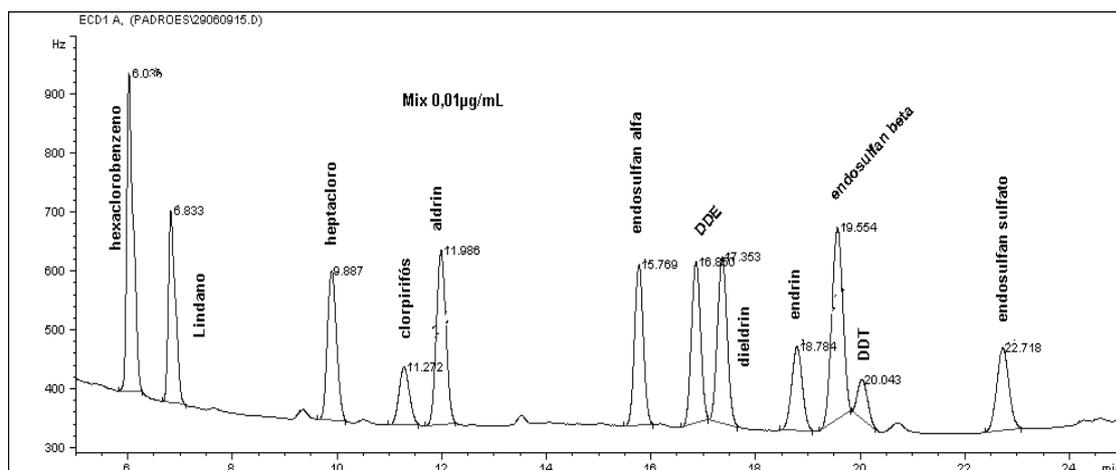
A Figura 2 apresenta os cromatogramas referentes aos padrões dos analitos, da amostra fortificada e da testemunha. Pode-se observar a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos compostos, mostrando a seletividades do método.



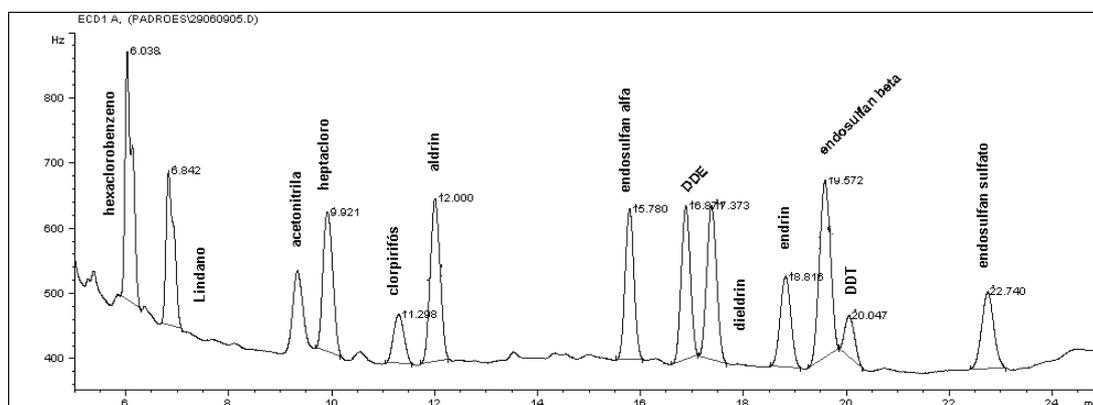
**FIGURA 1- CURVAS ANALÍTICAS PLOTADAS COM SOLUÇÃO PADRÃO EM SOLVENTE E PADRÃO MATRIZADO PARA VISUALIZAR A OCORRÊNCIA DE EFEITO MATRIZ**

As equações de reta referem-se à curva padrão matrizado; — Matriz — Solvente.

A) Padrões na concentração 0,01µg.mL<sup>-1</sup>



B) Amostra fortificada ( 2 x LOQ )



C) Testemunha

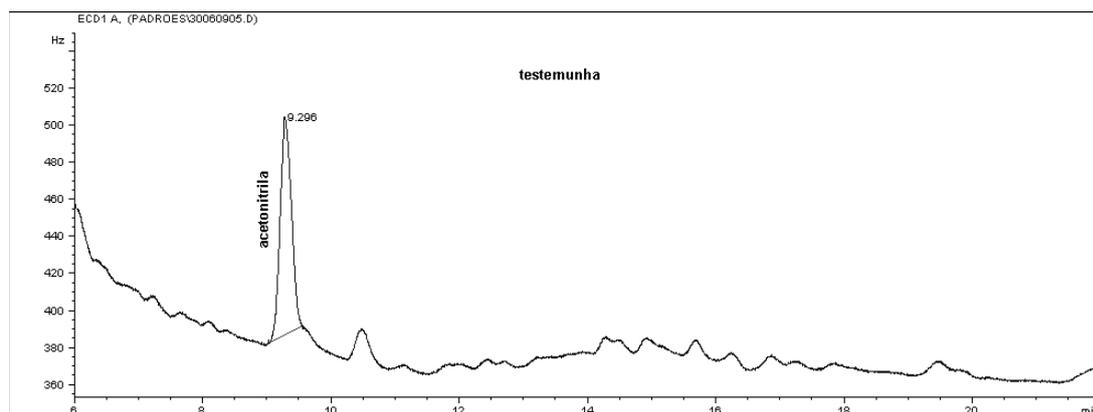


FIGURA - 2 CROMATOGRAMA DOS PADRÕES (A); AMOSTRA FORTIFICADA (B) E AMOSTRA TESTEMUNHA (C)

### 3.1.4 Amostra real

Após a otimização do método, dez amostras de filé de peixe obtidas na Base APTA em

Monte Alegre do Sul foram analisadas nas condições estabelecidas. Os resultados foram negativos para todos os compostos analisados, indicando que as amostras não oferecem riscos à saúde dos consumidores considerando a faixa de concentração otimizada pelo método analítico. No caso do camarão, foram analisadas apenas cinco amostras coletadas na fazenda localizada em Tibau do Sul no litoral do Rio Grande do Norte. Os resultados foram negativos para todos os doze compostos analisados.

#### 4 CONCLUSÃO

O método cromatográfico apresentou rápida e eficaz separação dos doze compostos organoclorados em uma única injeção. O procedimento de preparo de amostra, utilizando-se o método QuEChERS, apresentou recuperação na faixa aceitável de 70 a 120 % para todos os compostos, estando de acordo com os valores sugeridos na literatura. Os limites de quantificação e demais parâmetros se mostraram adequados e em conformidade com critérios já estabelecidos.

Para a tilápia observou-se o efeito matriz para alguns dos clorados, ficando assim comprovada a necessidade de quantificação desses compostos utilizando as curvas analíticas no extrato da matriz.

#### ABSTRACT

##### ANALYSIS OF THE ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN MARINE SHRIMP AND FISH BY GAS CROMATOGRAPH WITH MICROELECTRON CAPTURE DETECTOR (GC- $\mu$ ECD)

The aim of this study was to optimize an analytical method for the determination of multiresidue organochlorine pesticides for *Litopenaeus vannamei* marine shrimp and muscle of fish species *Oreochromis sp.*, popularly called red tilapia. It was used a technique called QuEChERS extraction, using gas chromatography with microelectron capture detector (GC- $\mu$ ECD) for analysis of the following organochlorines: hexachlorobenzene, lindane, DDE, DDT, chlorpyrifos, endosulfan sulfate, beta endosulfan, alpha endosulfan, heptachlor, aldrin, endrin and dieldrin. The detection limit for all compounds was 0.0005  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  and quantification limit of the method was established in 0.005  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Mean recoveries ranged from 80 % to 120 %, with relative standard deviations (RSDs) lower than 20 % for all pesticides.

**KEY-WORDS:** MULTIRESIDUE; PESTICIDE; TILAPIA; SHRIMP.

#### REFERÊNCIAS

- 1 ALMEIDA, W.F. Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. **Biológico**, v.40, p.171-83, 1974.
- 2 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v.86, n.2, p.412-431, 2003.
- 3 Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Agrotóxicos (GARP). **Manual de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. S.l., 1999. p. 66-73. (Apostila).
- 4 BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, n. 053, de 18 março de 2005, p. 58-63.
- 5 BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: 2008 – 2009**. Brasília, 2010.
- 6 LEHOTAY, S.J. Determination of pesticides residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.90, p.485-520, 2007.
- 7 LEHOTAY, S.J. Determination of pesticides residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography mass spectrometry, collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, n. 5, p. 1148-1166, 2002.
- 8 PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.6, p.1620-1634, 2009.

- 9 RIBEIRO, L.C.S.; FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N. de; ROSA, M.A.; QUEIROZ, J. F. Multirresíduos de organoclorados em pescado empregando extração QuEChERS. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, CIIC 2009, 3., Campinas, 2009. **Anais ...** Campinas, SP: Instituto Agrônômico (IAC), 2009. CD-ROM.
- 10 RIBEIRO, L.C.S.; FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N. de; ROSA, M.A.; QUEIROZ, J. F. de. Multirresíduos de organoclorados em camarão empregando extração QuEChERS. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, CIIC 2010, 4., Campinas, 2010. **Anais ...** Campinas, SP: Instituto Agrônômico (IAC), 2010. CD-ROM.
- 11 TORRES, J.P.M. **Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais.** 1998. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.