



BIANCA MESQUITA COELHO BOTREL

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
EMPREGANDO TÉCNICAS MINIATURIZADAS
DE PREPARO DE AMOSTRAS NA
DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE ANESTÉSICO
EM PEIXES

LAVRAS – MG

2016

BIANCA MESQUITA COELHO BOTREL

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EMPREGANDO TÉCNICAS
MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS NA
DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE ANESTÉSICO EM PEIXES**

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

Orientadora

Dra. Adelir Aparecida Saczk

LAVRAS - MG

2016

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

Botrel, Bianca Mesquita Coelho.

Desenvolvimento de métodos empregando técnicas
miniaturizadas de preparo de amostras na determinação residual de
anestésico em peixes / Bianca Mesquita Coelho Botrel. – Lavras :
UFLA, 2016.

220 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. Mentol. 2. tilápia do Nilo. 3. surubim. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

BIANCA MESQUITA COELHO BOTREL

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS EMPREGANDO TÉCNICAS
MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS NA
DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE ANESTÉSICO EM PEIXES**

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

APROVADA em 26 de agosto de 2016.

Dra. Ana Maria de Resende Machado	CEFET-MG
Dra. Josefina Aparecida de Souza	UFLA-DQI
Dra. Miriany Avelino Moreira Fernandez	UFLA-DQI
Dra. Olga Lúcia Mondragón Bernal	UFLA-DCA

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

LAVRAS - MG

2016

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu filhinho, anjo Cauã, por existir e ser a melhor parte de mim.

Ao homem da minha vida, Carlos Victor, pelo infinito amor.

Aos meus pais, Carlos e Marisa, pelo amor incondicional, encorajamento e ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.

A minha irmã, Sabrina, por tanta amizade, carinho e respeito.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Thiago, por estarem presente em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela dádiva da vida, por tantas bênçãos derramadas. Por tudo que tenho e pelo que sou. Por mais uma etapa concluída. Por me levantar nos momentos mais difíceis e me conduzir na direção correta.

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

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Aos laboratórios de Analítica e Eletroanalítica (LAE), de Catálise e Biocombustível (LCAB), de Gestão de Resíduos Químicos (LGRQ), Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ) e Bioquímica, por me fornecerem os subsídios necessários ao desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora Adelir, por ser um exemplo de profissional. Por ser além de orientadora, uma verdadeira amiga. Por me acalmar nas horas de aflição. Por me ajudar em todos os momentos, me compreender, confiar em mim e aconselhar em todas as decisões tomadas. Pelos anos de convivência, por ter me dado à chance de realizar minha pós-graduação, me aceitando como orientada, confiando em mim para a realização de um trabalho tão importante.

As professoras doutoras membros da banca Ana Maria, Josefina, Miriany e Olga pela disponibilidade de avaliação do trabalho. Pelas contribuições tão válidas.

Aos membros da banca de qualificação, Daniel Okamura e as professoras Maria das Graças e Jaqueline, que fizeram sugestões de grande valia, contribuindo efetivamente para a conclusão do trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu filho, Cauã, por ser um anjinho enviado por Deus no momento certo, trazendo muita luz, bênçãos e alegrias para as nossas vidas,

em especial à minha. Mostrando-me que por maior que seja o amor, sempre existe uma forma de amar ainda mais.

Ao meu amor, Carlos Victor, pelo companheirismo em todos os momentos, pelos sorrisos, pelo cuidado carinhoso e por mostrar que sonhos podem ser reais, por cada gesto terno, gentil e altruísta. Obrigada pela família maravilhosa que me proporcionaste.

Aos meus pais, Carlos e Marisa, pelo amor incondicional e serem exemplos de pessoas do bem. Por me apoiarem em todos os momentos, por me tratarem com tanto carinho e dedicação. Por me permitirem existir e me darem forças. Por secarem minhas lágrimas nos momentos de tristezas e chorarem comigo nos momentos de vitória.

À minha irmã Sabrina, por tanto amor. Por me incentivar em todos os momentos e colaborar de forma efetiva em toda minha vida acadêmica. Pela força e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, caminhando lado a lado, estendendo-me as mãos quando mais precisei.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Thiago, que no decorrer destes anos, tiveram tanta paciência frente a minha impaciência e ansiedade, pelo amor que dedicaram a mim, as palavras de consolo e também de encorajamento.

À minha avó Marília (*in memoriam*), por ser um exemplo de pessoa, demonstrando por mim um amor verdadeiro, mas que ao longo desta caminhada deixou de estar entre nós, mas tenho certeza que ficou em um lugar especial no céu e continuou torcendo por mim.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Analítica e Eletroanalítica: Daiane, Matheus Julien, Rafael, Meryene, Michele, Thallis, Máisa, Matheus Marciano, Josiane, Pedro, Arthur e Elisângela pelas conversas, sorrisos, brincadeiras, enfim, momentos de descontração.

Às amigas que conquistei nesses anos de trabalho na UFLA, Carina e Priscila pelo imenso carinho e por estarem ao meu lado, contribuindo de forma positiva para a realização deste sonho.

À Secretária da pós, Roseni, por sempre me auxiliar nos momentos que precisei.

A todos que de uma alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida, os meus sinceros agradecimentos. AMO VOCÊS!

"Eu pensava que a oração transformava as coisas.
Mas agora eu sei que a oração transforma a gente,
e nós transformamos as coisas"

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO GERAL

A piscicultura é uma atividade de grande expressão na agropecuária, e assim como na maioria das culturas, há determinados manejos que são responsáveis por elevado estresse nos peixes. Inevitavelmente, esse estresse influencia diretamente no desempenho econômico e no bem estar dos animais, e por esse motivo, é recomendada a aplicação de drogas que minimizem esses efeitos. No entanto, cada droga apresenta um período residual, que se mal dimensionado ou não respeitado, geram resíduos no pescado comercializado na indústria alimentícia. Dessa forma, a fim de possibilitar uma melhor padronização do período residual e na fiscalização do pescado, tornando-os mais seguros para o consumo, é fundamental o desenvolvimento de protocolos analíticos para a rápida detecção desses resíduos no filé do pescado. Neste sentido, objetivou-se o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de determinar traços residuais do anestésico mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol em filés de peixes das espécies, tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e surubim (*Pseudoplatystoma sp*), utilizando as técnicas de preparo de amostra: microextração com gota única (SDME), microextração em fase sólida (SPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) juntamente com a cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). Para o desenvolvimento das metodologias de análises, os parâmetros que afetam a eficiência da extração do mentol pelas técnicas de preparo de amostras empregadas foram otimizados para obtenção da melhor sensibilidade, de forma multivariada. No planejamento das análises foi empregado o delineamento composto central rotacional (DCCR), que possibilitou analisar as variáveis de forma conjunta e estratégica, resultando em avaliações precisas com menor quantidade de análises. Após determinadas as melhores condições de trabalho para a determinação do mentol, as metodologias desenvolvidas foram validadas e aplicadas na quantificação residual do anestésico em filés de tilápia e surubim, apresentando precisão e exatidão consideráveis.

Palavras-chave: mentol, análise residual, tilápia do Nilo, surubim, quimiometria.

GENERAL ABSTRACT

Fish farming is an activity of great expression in agriculture, and as in most cultures, there are certain managements who are responsible for high stress in fish. Inevitably, this stress directly influences economic performance and welfare of animals, and therefore, the application of drugs is recommended to minimize these effects. However, each drug has a residual period, which badly scaled or not respected, generate waste in fish sold in the food industry. Thus, in order to allow a better standardization of the residual period and fish monitoring, making them safer for consumption, it is essential the development of analytical protocols for the rapid detection of these residues in fish fillet. In this sense, it aimed to the development of analytical methodologies able to determine residual traces of the anesthetic menthol (1R, 2S, 5R) -2-isopropyl-5-methylcyclohexanol fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Pseudoplatystoma sp*) using the sample preparation techniques: single drop microextraction (SDME), solid phase microextraction (SPME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and gas chromatography with detection by mass spectrometry (GC-MS). For the development of methods of analysis, the parameters that affect the efficiency of extraction of menthol employed by sample preparation techniques were optimized to obtain the best sensitivity, multivariate analysis. In planning the analyzes it used the rotational central composite design (RCCD), which made it possible to analyze the variables jointly and strategically, resulting in accurate measurements with less analysis. After determined the best working conditions for the determination of menthol, the methodologies developed were validated and applied to the quantification of residual anesthetic in tilapia fillets and catfish, with considerable precision and accuracy.

Keywords: menthol, residual analysis, Nile tilapia, surubim, chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	30
Figura 2	Surubim (<i>Pseudoplatystoma sp</i>).....	32
Figura 3	Estruturas químicas dos anestésicos mais utilizados na piscicultura.....	34
Figura 4	Estrutura química do mentol.....	36
Figura 5	Esquema das etapas fundamentais do processo analítico.....	39
Figura 6	Esquema representativo: A) imersão direta e B) modo <i>headspace</i> em SDME.....	44
Figura 7	Representação esquemática do princípio da DLLME: A) solução contendo o(s) composto(s) de interesse; B) introdução dos solventes extrator e dispersor, resultando na formação de uma emulsão; C) centrifugação e D) recolhimento do analito presente na sedimentação formada pelo solvente extrator.....	49
Figura 8	Esquema do procedimento de SPME: A) perfuração do septo; B) exposição da fibra (extração dos analitos) no frasco; C) retração da fibra para o interior da agulha do dispositivo de SPME e D) injeção em um sistema cromatográfico.....	58
Figura 9	Esquema de extração por: A) imersão direta; B) <i>headspace</i> e C) protegida por membrana em SPME.....	63
Figura 10	Gráfico de superfície de resposta em função dos fatores x_1 e x_2	74
Figura 11	Disposição espacial dos experimentos de um planejamento DCCR 2^3	75

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1	Aspecto geral da folha de <i>Mentha</i> (A); Estrutura química do mentol (B).....	99
Figura 2	Cromatogramas obtidos no modo monitoramento de varredura (SCAN) para o extrato de filé de tilápia: A) fortificado com 10 µg L ⁻¹ da solução estoque de mentol; B) sem a fortificação, ou seja, na ausência de anestésico.....	107
Figura 3	Cromatograma obtido no modo monitoramento de íon selecionado (SIM) para o extrato de filé de tilápia fortificado com 10 µg L ⁻¹ da solução estoque de mentol.....	108
Figura 4	Espectro de massas do mentol com prováveis estruturas geradas a partir das fragmentações de maior estabilidade.....	109
Figura 5	Mecanismo de fragmentação proposto para o mentol.....	110
Figura 6	Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto.....	114
Figura 7	Gráficos das superfícies de respostas da área versus o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se 3,0 g de sal; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de 20 minutos e C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 50°C.....	118
Figura 8	Curva analítica obtida para o mentol em tecido de tilápia por SPME.....	119
Figura 9	Concentrações residuais de mentol determinadas em filés de tilápia em diferentes tempos de depuração.....	121

ARTIGO 2

Figura 1	Efeito do volume da gota de solvente extrator (octano) na microextração do mentol. Condições experimentais: concentração de fortificação: $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$, 15 minutos de extração, 2,5 g de sal, temperatura de 30°C e volume de amostra de 5 mL.....	141
Figura 2	Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto.....	144
Figura 3	Gráficos das superfícies de resposta da área versus o efeito da interação entre o tempo de extração e a temperatura, considerando fixos respectivamente: A) 2; B) 2,5 e C) 3 g de sal.....	147
Figura 4	Gráficos das superfícies de resposta da área versus o efeito da interação entre a quantidade de sal e a temperatura, considerando fixos respectivamente os tempos: A) 5; B) 15 e C) 30 minutos.....	148
Figura 5	Gráficos das superfícies de resposta da área versus o efeito da interação entre a quantidade de sal e o tempo de extração, considerando fixas respectivamente as temperaturas: A) 25°C ; B) 30°C e C) 35°C	150
Figura 6	Cromatograma no modo monitoramento de íon selecionado (SIM) para as unidades de massa atômica 71 e 81, em uma amostra de tecido de tilápia fortificado com mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e curva analítica obtida para o mentol por SDME/GC-MS	151
Figura 7	Concentrações residuais de mentol determinadas em filés de tilápia em diferentes tempos de depuração.....	154

ARTIGO 3

Figura 1	Análise do efeito de diferentes solventes extratores e dispersores na extração de mentol por DLLME. Condições experimentais: concentração de fortificação de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, 2 mL de solvente dispersor, 100 μL do solvente extrator, 4 mL de água e 0,2 g de sal.....	171
Figura 2	Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto.....	173
Figura 3	Superfícies de respostas obtidas para a interação das variáveis: A) volume de água com o volume de solvente extrator, fixando 0,1 g de sal, B) quantidade de sal com o volume de solvente extrator, fixando o volume de água em 5 mL e C) quantidade de sal com o volume de água, fixando o volume do solvente extrator em 100 μL	175
Figura 4	Curva analítica obtida pela técnica de DLLME para o mentol.....	176
Figura 5	A) Gráfico das concentrações remanescentes de mentol em filés de tilápia para as concentrações de sedativo de 5; 7,5; 10; 12,5 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$ e tempos de abate de 0, 12, 24 e 48 h pós-anestesia. B) Cromatograma em modo SCAN, obtido para as condições otimizadas aplicadas na extração de mentol em filé de tilápia anestesiada.....	179

ARTIGO 4

Figura 1	Cromatogramas no modo SCAN da extração do padrão de mentol no tecido do surubim por: A) SDME e B) SPME.....	196
Figura 2	Diagramas de Pareto para o efeito das variáveis sobre a área total. A) SDME e B) SPME.....	201
Figura 3	Gráficos das superfícies de resposta da área versus o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se a quantidade de sal em 3 g; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de 15 minutos e C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 30°C respectivamente para a técnica de SDME.....	206
Figura 4	Gráficos das superfícies de resposta da área versus o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se a quantidade de sal em 3 g; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de 20 minutos e C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 50°C respectivamente para a técnica de SPME.....	207
Figura 5	Curvas analíticas obtidas para a extração de mentol por SPME e SDME, respectivamente.....	209
Figura 6	Concentrações residuais de mentol em filés de surubim anestesiados nas concentrações de 3, 6, 9, 12 e 15x10 ⁴ µg L ⁻¹ com tempos residuais de 0, 3 e 6 h pós-anestesia, utilizando técnicas de preparo de amostras. A) SPME e B) SDME.....	213

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Propriedades físico-químicas de possíveis solventes extratores para aplicação na DLLME.....	53
Tabela 2	Propriedades físico-químicas dos solventes dispersores utilizados para aplicação na DLLME.....	54
Tabela 3	Principais etapas das técnicas de preparo de amostras: LLE, SPE, SDME, DLLME e SPME.....	61
Tabela 4	Fibras de SPME disponíveis comercialmente e suas características.....	69
Tabela 5	Combinações entre os níveis codificados dos fatores v_1 , v_2 e v_3	76

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Parâmetros e níveis usados no DCCR.....	102
Tabela 2	Condições experimentais e resultados obtidos (áreas) a partir do planejamento DCCR para a análise do mentol em filés de tilápia.....	113
Tabela 3	Resultados estatísticos da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos dados ao modelo quadrático.....	116
Tabela 4	Coefficientes e testes de significância das variáveis obtidas para a microextração do mentol.....	117

ARTIGO 2

Tabela 1	Parâmetros e níveis usados no planejamento DCCR....	133
Tabela 2	Matriz do DCCR para as variáveis em estudo na SDME para a análise de mentol em filés de tilápia.....	134
Tabela 3	Propriedades dos solventes utilizados no processo de extração do mentol.....	139
Tabela 4	Resultados obtidos a partir do planejamento DCCR para a análise de mentol em filés de tilápia fortificados com concentração de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	143
Tabela 5	Resultados estatísticos da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos dados ao modelo quadrático.....	146
Tabela 6	Recuperação média do mentol em tecidos de peixe pelo método de SDME.....	152

ARTIGO 3

Tabela 1	Propriedades físicas da água e de diferentes solventes orgânicos extratores empregados na otimização da DLLME.....	165
Tabela 2	Propriedades físicas dos diferentes solventes orgânicos dispersores empregados na otimização da DLLME.....	166
Tabela 3	Parâmetros e níveis usados no planejamento DCCR.....	172
Tabela 4	Valores de recuperação e precisões intra e interdía para a validação da metodologia.....	177

ARTIGO 4

Tabela 1	Parâmetros e níveis usados nos planejamentos DCCR para as técnicas SPME e SDME em surubins anestesiados com mentol.....	191
Tabela 2	Matriz do DCCR para as variáveis em estudo na análise de mentol em filés de peixe.....	199
Tabela 3	Resultados obtidos a partir dos planejamentos DCCRs para a análise de mentol em filés de tilápia pelas técnicas de SDME e SPME.....	200
Tabela 4	Coeficientes e testes de significância das variáveis obtidas para a microextração do mentol por SDME e SPME.....	204
Tabela 5	Resultados estatísticos da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos dados ao modelo quadrático.....	205
Tabela 6	Resultados obtidos para as precisões intradia, interdia e recuperação avaliadas para a SPME e SDME.....	211

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C_0	Concentração inicial do analito
C_{aq}^e	Concentração do analito na fase aquosa (no equilíbrio)
C_f^e	Concentração do analito na fibra (no equilíbrio)
C_g^e	Concentração do analito no <i>headspace</i> (no equilíbrio)
C_{org}^e	Concentração do analito na fase orgânica (no equilíbrio)
C_{sed}	Concentração do analito na fase sedimentada
CRM	Material de referência certificado
CV	Coefficiente de variação
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DCCR	Delineamento composto central rotacional
F	Teste F (estatística)
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fator de enriquecimento
GL	Grau de liberdade
GC	Cromatografia em fase gasosa
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas
HDPE	Polietileno de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida modo <i>headspace</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K	Razão de distribuição
Kg	Kilograma
L	Litro
LC	Cromatografia em fase líquida
LD	Limite de detecção
LDS-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva utilizando solventes extratores de baixa densidade
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida
LQ	Limite de quantificação

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS-222	Metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila
MSR	Metodologia de superfície de resposta
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Probabilidade de significância
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	Politetrafluoretileno/silicone
QM	Quadrado médio
SDME	Microextração com gota única
SIM	Monitoramento de íon selecionado
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SQ	Soma dos quadrados
R^2	Coefficiente de determinação
R	Fator de recuperação
RSD	Desvio padrão relativo
SCAN	Monitoramento de varredura
T	Teste T (estatística)
V_{aq}	Volume da fase aquosa
V_f	Volume da fibra
V_g	Volume do <i>headspace</i>
V_{org}	Volume da fase orgânica
V_{sed}	Volume da fase sedimentada
a	Inclinação da reta
b	Intercepto da reta
cm	Centímetro
cm^3	Centímetro cúbico
cP	Centipoise (P/100)
eV	Eletrovolts
g	Gramas
h	Horas
hPa	Hectopascal
k	Número de variáveis independentes
m_0	Massa inicial do analito
m_{aq}	Massa do analito na fase aquosa
m_f	Massa do analito na fibra
m_g	Massa do analito no <i>headspace</i>
min	Minutos

mL	Mililitros
mm Hg	Milímetros de mercúrio
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
n	Número de mols do soluto
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
u.a.	Unidade arbitrária
°C	Graus Celsius
x g	Força gravitacional
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
%	Porcentagem
3D	Terceira Dimensão

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	26
1	INTRODUÇÃO.....	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	30
3.1	A piscicultura no Brasil.....	30
3.2	Espécies de peixes cultivados.....	30
3.2.1	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	30
3.2.2	Surubim (<i>Pseudoplatystoma sp.</i>).....	32
3.3	Uso de anestésicos em peixes.....	33
3.3.1	Mentol como anestésico em peixes.....	36
3.4	Segurança alimentar.....	38
3.5	Métodos analíticos para determinação de anestésicos....	39
3.6	Técnicas de preparo de amostras.....	40
3.6.1	Técnica de microextração com gota única (SDME).....	41
3.6.1.1	Modos de extração na SDME.....	44
3.6.1.2	Fatores que influenciam a extração na SDME.....	45
3.6.2	Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	49
3.6.2.1	Fatores que influenciam na eficiência da DLLME.....	51
3.6.3	Técnica de microextração em fase sólida (SPME).....	58
3.6.3.1	Modos de extração na SPME.....	63
3.6.3.2	Fatores que influenciam a extração na SPME.....	65
3.7	Quimiometria.....	72
3.7.1	Planejamento experimental na metodologia de preparo de amostras.....	73
3.7.1.1	Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	73

3.7.1.2	Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	75
3.8	Validação de metodologia analítica.....	78
3.8.1	Seletividade e/ou especificidade.....	79
3.8.2	Faixa de trabalho (linearidade).....	79
3.8.3	Limite de Detecção (LD).....	80
3.8.4	Limite de Quantificação (LQ).....	81
3.8.5	Exatidão.....	82
3.8.5.1	Recuperação.....	82
3.8.6	Precisão.....	83
3.8.6.1	Repetibilidade.....	83
3.8.6.2	Precisão Intermediária.....	84
3.8.6.3	Reprodutibilidade.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	96
	ARTIGO 1.....	96
	ARTIGO 2.....	128
	ARTIGO 3.....	160
	ARTIGO 4.....	186
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	219

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade que se destaca, assumindo papel fundamental no desenvolvimento econômico do país, representando fonte vital de alimentos. Dentre as espécies de peixes cultivadas, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), peixe de escamas, é uma das mais populares no mundo, sendo a espécie de pescado mais produzida e consumida no Brasil. Espécies nativas também vêm ganhando espaço nesse cenário, dentre estas, o surubim (*Pseudoplatystoma sp*), peixe de couro, considerado um dos peixes de água doce de maior valor comercial, devido seu grande potencial produtivo.

No entanto, é bastante comum o relato de prejuízos econômicos em razão da mortalidade decorrente de deficiências no processo de produção. Para facilitar o manejo e reduzir o estresse, a utilização de anestésicos tem se tornado uma prática comum nos sistemas modernos de produção. Porém, o uso destes compostos podem se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo, diminuindo a qualidade do alimento.

Neste sentido, a análise de compostos anestésicos em peixes é uma ferramenta importante para a definição de protocolos que envolvam desde os parâmetros de aplicação até o abate e o processamento final do pescado, estabelecendo margens seguras para seu consumo pós-manejo, melhorando a qualidade do produto final.

No Brasil, ainda não existem regulamentações quanto ao uso de anestésicos em peixes. As substâncias mais utilizadas para este propósito são a triclaína, benzocaína, óleo de cravo, quinaldina, 2-fenoxietanol e o mentol. Cada um destes compostos vai exigir uma concentração diferente de acordo com o estágio de sedação desejado, que vai desde a sedação leve até uma sedação profunda. A escolha de um anestésico está relacionada com o custo,

disponibilidade no mercado, eficiência, finalidade e o destino do animal após a aplicação da droga.

O mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol é um dos constituintes do óleo essencial extraído de plantas do gênero *Mentha*, com conhecidas propriedades anestésica e anti-inflamatória. É facilmente encontrado em farmácias de manipulação a baixo custo, além de ser de fácil utilização.

As técnicas frequentemente utilizadas para separação e determinação de compostos residuais presentes em matrizes biológicas são as cromatográficas. No entanto, a identificação de compostos presentes em matrizes complexas como o tecido do peixe requerem processos de preparação bem elaborados (extração e pré-concentração), cujo objetivo é a obtenção de uma sub-fração 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.

Neste sentido, novas técnicas foram desenvolvidas tomando como princípio à miniaturização da extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), destacando-se a microextração com gota única (SDME), microextração em fase sólida (SPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) por reduzirem significativamente o consumo de solventes orgânicos, além de tornar a etapa de preparo de amostras simples e rápida. Estas são técnicas alternativas de extração que apresentam algumas vantagens em comum, como, utilização de menores quantidades de amostras, análises de traços, maior seletividade e especificidade na extração e utilização de quantidades mínimas (desprezíveis) de solventes orgânicos, tornando-as menos agressivas ao meio ambiente.

A SDME, SPME e DLLME são métodos de extração alternativos que vêm se destacando, no qual o princípio das 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 onde ocorre a partição 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, da fase extratora e também da complexidade da amostra.

Na DLLME, uma mistura de dois solventes é injetada na amostra aquosa, ocasionando na transferência dos analitos para a fase orgânica. A mistura obtida pela injeção rápida e simultânea dos dois solventes, no qual um solvente é miscível tanto na fase aquosa quanto na orgânica, promove a dispersão do solvente orgânico na forma de microgotas com elevada área superficial ocasionando na partição dos analitos de interesse. 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.

A eficiência das técnicas está interligada a diversos fatores que podem influenciar de forma positiva ou negativa na extração, como o efeito da força iônica na solução, tempo e temperatura de extração, agitação da amostra, pH da solução, volume do *headspace*, natureza e volume de solventes extrator e dispersor, dentre outros. Tornando necessário o uso de modelos estatísticos que possibilitem a análise de diversos parâmetros e suas interações, obtendo um número reduzido de ensaios e resultados com alta confiabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para a determinação e quantificação residual do mentol em filés de tilápia do Nilo e surubim utilizando SDME, SPME e DLLME.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar as condições ótimas para obtenção dos parâmetros das técnicas miniaturizadas, como, quantidade de sal, tempo e temperatura de extração para SDME e SPME, quantidade de sal, volume de solvente extrator e volume de solução aquosa para DLLME. Para obtenção das condições ótimas, empregar a quimiometria como ferramenta estatística;
- II. Validar as metodologias desenvolvidas obtendo-se parâmetros como limites de detecção e quantificação, precisão, faixa linear dinâmica, seletividade, sensibilidade e exatidão;
- III. Aplicar as metodologias desenvolvidas na determinação e quantificação residual de mentol em amostras reais de peixes (tilápia do Nilo e surubim) anestesiados.
- IV. Comparar as técnicas de SDME e SPME na determinação residual de mentol em peixes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A piscicultura no Brasil

A produção mundial de pescado no ano de 2013 foi de, aproximadamente, 160 milhões de toneladas. Desta produção, o Brasil foi responsável por 0,75%, o equivalente a 1,25 milhões de toneladas de peixe, gerando um PIB de cerca de 5 bilhões, assumindo a 19^a posição no *ranking* dos maiores produtores (BRASIL, 2014).

O Brasil possui grande potencial para ser um dos maiores produtores mundiais de pescado. O que se deve principalmente a disponibilidade hídrica existente, aproximadamente 13% da reserva de água doce do mundo e 8,5 mil quilômetros de extensão marítima. Outros fatores apontados como propícios para o desenvolvimento da atividade são as vantagens climáticas, a diversidade de espécies cultiváveis e a demanda crescente por alimentos de elevado teor nutricional (FAO, 2010).

O crescimento pela procura e criação de peixes deve-se principalmente pela busca da população por alimentos mais saudáveis, uma vez que, o pescado apresenta alto valor nutritivo. Este alimento é rico em micronutrientes minerais, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, responsáveis por numerosos benefícios no organismo humano, como, funções estruturais nas membranas, equilíbrio homeostático, formação dos tecidos cerebrais e nervosos, além de estar relacionado com o sistema imunológico e evitar doenças cardiovasculares (BRASIL, 2009).

3.2 Espécies de peixes cultivados

3.2.1 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo é hoje a espécie de peixes mais produzida e consumida no Brasil, apresentando uma grande capacidade de adaptação.

Originária da África, pertence à família Cichlidae, gênero *Oreochromis* e espécie *Oreochromis niloticus* (FITZSIMMONS; MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011).

Os peixes desta espécie apresentam coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequena e listras verticais na nadadeira caudal (Figura 1). É um peixe de água quente (21 a 35°C), sendo a reprodução favorecida nesta faixa de temperatura. Em 2013, sua produção atingiu cerca de 170 mil toneladas (IBGE, 2014). Este número significativo deve-se, ao seu palativo sabor e principalmente a boa qualidade da carne (BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

Figura 1- Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Própria autora (fotografia).

O interesse pelo cultivo dessa espécie é dado principalmente em decorrência de possuírem excelentes características de produção e adaptação às condições brasileiras, rápido crescimento, precocidade da maturação sexual, resistência a doenças e pela capacidade de suportarem baixos teores de oxigênio dissolvido, apresentando hábito alimentar onívoro e desova parcelada durante todo o ano (FITZSIMMONS; MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011). Além disso, possuem boas características sensoriais e nutricionais, tais como, carne branca de textura firme, sabor delicado e agradável, baixo teor de gordura e de calorias, ausência de espinhos em forma de “Y”(mioceptos), excelentes índices de conversão

alimentar e ótimo rendimento de filé (35 – 40%), o que as potencializa como peixes para industrialização, resultado da elevada aceitação dos consumidores nacionais e internacionais (PEREIRA; GAMEIRO, 2007).

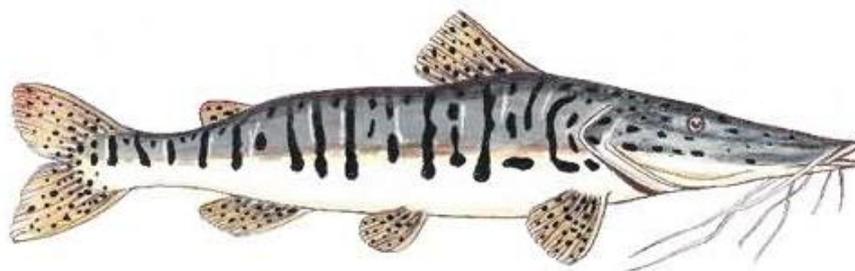
Em virtude de todas as características citadas, desde 2005 a tilápia é a espécie com maior distribuição de unidades produtivas compreendida em quase todo território nacional, na qual a produção corresponde a 13% de todo o pescado produzido no Brasil. A produção de tilápias é seguida pela produção de tambaqui, camarão marinho, surubim/pintado e carpas (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

3.2.2 Surubim (*Pseudoplatystoma sp*)

O surubim é um peixe carnívoro, predominantemente piscívoro, da ordem siluriforme e gênero *Pseudoplatystoma sp*, que habita as zonas bênticas dos rios. Os peixes desta espécie podem alcançar mais de 120 kg, sendo que as fêmeas crescem mais que os machos (CESTAROLLI, 2005).

Suas principais características são a ausência de escamas, pele espessa, sendo popularmente denominados de “peixes de couro” (BRITSKI; SILIMON; KEVE, 1999). Geralmente, o aspecto morfológico desta espécie é o corpo alongado com a cabeça achatada (Figura 2), mandíbula mais curta que a maxila superior e dentes viliformes no palato, reproduzem-se em ambientes lóticos entre novembro e fevereiro e tem hábito preferencialmente noturno (COELHO, 2005).

Figura 2- Surubim (*Pseudoplatystoma sp.*).



Fonte: Adaptado de Okamura (2009).

No Brasil, o surubim também é conhecido como bagre neotropical e pode ser encontrado nas bacias hidrográficas do Rio Prata e do São Francisco, considerado um dos mais nobres entre os peixes teleósteos brasileiros. É um dos peixes de maior valor comercial e preferência na maioria dos estados, em decorrência da boa qualidade do filé, que apresenta baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares. Essas características atendem às preferências atuais do mercado de peixe, despertando grande demanda do mercado consumidor brasileiro, tornando este gênero um grande potencial para a aquicultura nacional, além de ser um produto com grandes possibilidades de exportação (PRADO et al., 2012; CREPALDI et al., 2006).

3.3 Uso de anestésicos em peixes

O primeiro relato da utilização de anestésicos em peixes ocorreu na década de 1930 e a partir de então, diferentes compostos químicos e procedimentos foram desenvolvidos com o intuito de minimizar o estresse e possibilitar diversos manejos, tornando cada vez mais comum o uso destas substâncias nas estações de piscicultura (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004). De uma forma geral, os anestésicos são classificados como compostos químicos que com o aumento da exposição ou concentração, num primeiro

momento apresentam efeito calmante, seguido por perda de equilíbrio, mobilidade e consciência (ROSS; ROSS, 2008).

A anestesia é um processo reversível, que provoca perda completa (anestésico geral) ou parcial (anestésico local) dos movimentos corporais devido à diminuição das funções nervosas, uma vez que, um dos mecanismos de ação dos anestésicos está relacionado ao bloqueio dos canais de sódio nas células nervosas, além de sua distribuição em outras áreas da membrana celular em virtude de sua estrutura química anfifílica. Ao bloquear os canais de sódio e potássio os anestésicos bloqueiam o fluxo do impulso nervoso, evitando a despolarização da membrana (ARAÚJO; DE PAULA; FRACETO, 2008).

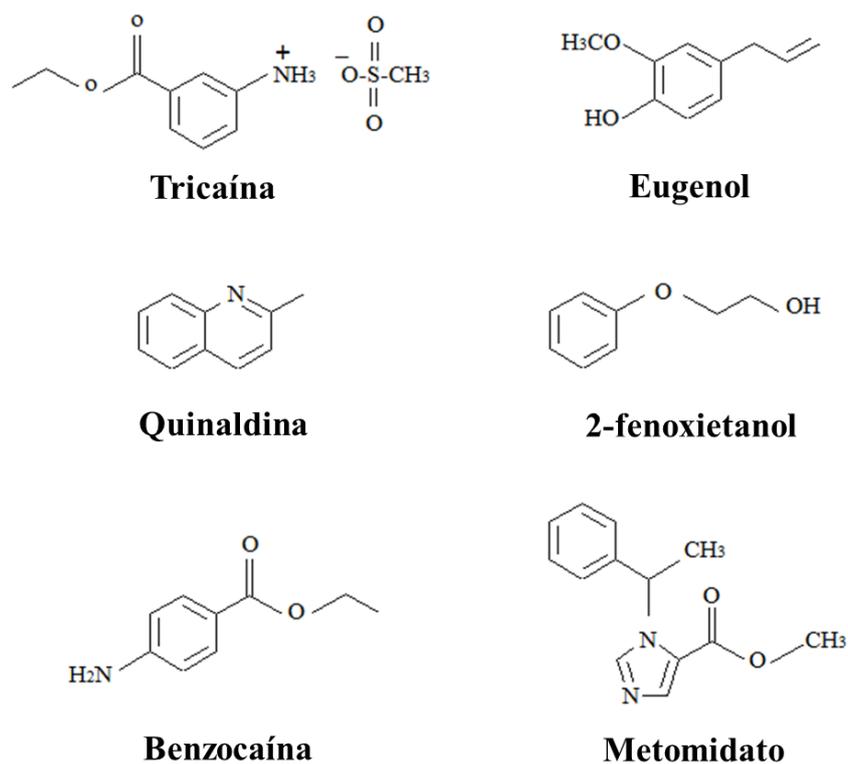
Nas estações de piscicultura, os anestésicos frequentemente são administrados por imersão, que consiste em imergir os peixes em soluções contendo a substância. Este método de anestesia se destaca por ser o mais eficiente e seguro, não acarretando em danos aos animais. Para isso, os anestésicos devem ser solubilizados em água, no entanto, como alguns destes agentes são insolúveis, primeiro eles são dissolvidos em solventes orgânicos para depois serem diluídos na mesma (ROSS; ROSS, 2008; NEIFFER; STAMPER, 2009; SUN et al., 2010).

A escolha do anestésico na maioria das vezes está relacionada com a viabilidade econômica, considerações legais, facilidade de administração, eficiência em baixas doses, rápida indução ao estado desejado (em torno de 3 minutos), um tempo de recuperação curto (cerca de 5 minutos), segurança aos operadores, fácil obtenção e segurança ao peixe (ROSS; ROSS, 2008; SUN et al., 2010). Quando se conhece o tempo de metabolização do anestésico, é possível determinar o período residual seguro para o consumo da carne do pescado (KIESSLING et al., 2009).

São conhecidos diversos anestésicos destinados à analgesia de peixes, e as formulações com propriedades sedativas mais utilizadas na aquicultura contêm tricafina, benzocaína, quinaldina, metomidato, 2-fenoxietanol, óleo de cravo ou seu princípio ativo, o eugenol (OLIVEIRA;

CARMO; OLIVEIRA, 2009). Suas respectivas estruturas químicas estão representadas na Figura 3.

Figura 3-Estruturas químicas dos anestésicos mais utilizados na piscicultura.



Fonte: Oliveira, Carmo e Oliveira (2009).

No Brasil apesar de já estar disseminada a utilização de anestésicos nos setores de piscicultura, ainda não existem leis específicas regulamentando a utilização desses compostos. Nos Estados Unidos o único anestésico aprovado é a tricaína (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222). Neste país assim como no Canadá e Reino Unido é regulamentado um período residual de 21 dias antes da liberação para o abate de algumas espécies de peixes anestesiadas. Na Noruega este período residual vale tanto para tricaína quanto para a benzocaína (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

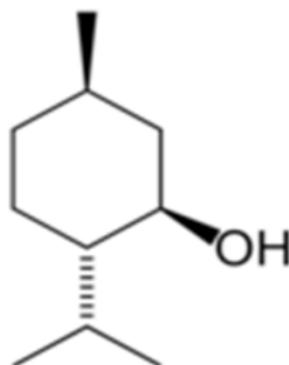
Como cada anestésico exige uma concentração diferente para atingir o estágio de anestesia desejado, é necessário testar várias concentrações. No entanto, um anestésico deve ser eficiente em baixas doses e apresentar toxicidade em doses muito superiores às recomendadas, proporcionando uma grande margem de segurança (ROSS; ROSS, 2008).

Desta forma, a necessidade da utilização de compostos que ofereçam custos reduzidos, devido à ampla disponibilidade, facilidade no processo de obtenção e principalmente segurança para aos peixes, tem estimulado pesquisas para obtenção de novos produtos, dentre eles, os anestésicos alternativos, como por exemplo, o mentol, por apresentar características promissoras no processo de sedação (IVERSEN et al., 2003; GUÉNETTE et al., 2007).

3.3.1 Mentol como anestésico em peixes

O mentol (Figura 4) é um dos constituintes do óleo essencial extraído de plantas do gênero *Mentha* originária do Brasil, também conhecida como hortelã (LORENZO et al., 2002). Possui propriedades anestésicas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, antiúlcera e antivirais. É um álcool terpênico monocíclico, de fórmula molecular $C_{10}H_{20}O$ e apresenta três carbonos assimétricos em sua estrutura, os quais geram oito isômeros opticamente ativos.

Figura 4- Estrutura química do mentol.



Fonte: Kamatou et al. (2013).

Suas propriedades químicas incluem baixa solubilidade em água (0,04% a 20°C), temperatura de ebulição de 212°C, temperatura de fusão de 43°C e densidade de 0,89 g mL⁻¹. Como os demais monoterpenos, apresenta aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, com grande importância econômica, por ser facilmente encontrado e de baixo custo em farmácias de manipulação, além de apresentar agradável sensação de frescor quando adicionado às formulações (GONÇALVES et al., 2008; SIMÕES; GOMES, 2009).

Este anestésico é amplamente utilizado em algumas espécies de invertebrados marinhos, por apresentar características que o qualificam, como, eficácia e boa margem de segurança para o peixe e para o operador (GONÇALVES et al., 2008).

Contudo, apesar da utilização consolidada de mentol em espécies marinhas e já existirem estudos com sua administração em tambaqui (FAÇANHA; GOMES, 2005), pacu (GONÇALVES et al., 2008), tilápia do Nilo (SIMÕES; GOMES, 2009; MELLO et al., 2012) e dourado (PÁDUA et al., 2010), o mentol não está regulamentado para uso em peixes, por não se conhecer seu período de carência no tecido dos animais, ou de alteração do

sabor, bem como sobre alterações fisiológicas nos peixes em virtudes de sua utilização (GONÇALVES et al., 2008).

No entanto, existe regulamentação que autoriza a sua utilização em concentrações mais elevadas em humanos, viabilizando sua utilização no pescado. Desta forma, para que o mentol seja aprovado como anestésico para uso em peixes, é necessário conhecer e definir o tempo residual desta substância no tecido do pescado (FAÇANHA; GOMES, 2005).

3.4 Segurança alimentar

Práticas realizadas na piscicultura, durante o processo de produção do pescado são responsáveis por elevado estresse nos peixes. Este pode influenciar diretamente no desempenho econômico da atividade, assim como no bem estar dos animais, podendo ser minimizado com a utilização de anestésicos. No entanto, cada uma destas substâncias apresenta um período residual específico, que se mal dimensionado ou não respeitado, geram resíduos nos alimentos comercializados.

Nos dias atuais, a preocupação com a qualidade dos alimentos é um desafio crescente dos governos e também dos agentes responsáveis pela padronização e certificação, no que se refere à segurança do produto, uma vez que, ao ocorrer algum problema durante o processamento, a saúde do consumidor pode ser comprometida, trazendo ameaças à segurança alimentar. Desta forma, esforços são direcionados para maximizar a percepção dos consumidores quanto aos muitos atributos de um produto alimentar (DIAS et al., 2010; PERETTI; ARAÚJO, 2010).

Dessa forma, a fim de possibilitar uma melhor padronização do período residual e da fiscalização do pescado, tornando-os mais seguros para o consumo, é fundamental o desenvolvimento de protocolos analíticos para a rápida detecção desses resíduos no filé do pescado. A Organização Mundial da Saúde (OMS) monitora todo o processo de produção, garantindo a segurança alimentar (WHO, 2013). Segundo descrições dessa 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, investigar e realizar auditorias para garantir a segurança e qualidade dos alimentos de origem animal (BRASIL, 2009).

3.5 Métodos analíticos para determinação de anestésicos

A utilização de compostos químicos em produtos de origem animal deve envolver estudos desde a farmacocinética até a depleção dos resíduos, de forma a estabelecer valores limitativos, não constituindo riscos à saúde. Dentre os compostos utilizados durante a cadeia produtiva do pescado, os anestésicos vêm sendo amplamente empregados, garantindo a integridade dos animais, enfatizando a busca por metodologias de identificação e quantificação residuais de tais compostos (PEREIRA et al., 2014).

Desta forma, diversos estudos envolvendo a farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos estão sendo desenvolvidos, avaliando-se geralmente os parâmetros de temperatura, tempo de anestesia e recuperação, dosagem, período do dia, tamanho do peixe, diferenças de metabolismo das espécies, teor de gordura dentre outros (WOODY; NELSON; RAMSTAD, 2002).

Além disso, outros estudos importantes são a depuração e eliminação dos anestésicos pelo organismo do peixe, tornando-se necessário a determinação da persistência dessas drogas nos tecidos, assim como a concentração residual limite, definindo margens seguras para seu consumo pós-manejo, possibilitando a regulamentação desses compostos no Brasil.

São relatados diversos trabalhos com o monitoramento residual de anestésicos, tais como: isoeugenol, tricaína, 2-fenoxietanol e benzocaína, determinados por cromatografia em fases líquida e gasosa. Nesses trabalhos os autores geralmente empregam a LLE e SPE como técnicas de tratamento e pré-concentração dos analitos (MEINERTZ et al., 2006; MEINERTZ;

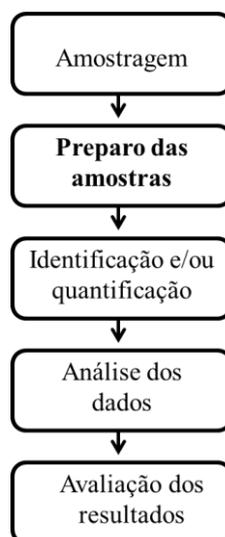
SCHREIER, 2009; KILDEA; ALLAN; KEARNEY, 2004; KIESSLING et al., 2009; SCHERPENISSE; BERGWERFF, 2007; KLIMÀNKOVÁ et al., 2008; PEREIRA et al., 2014).

Embora existam trabalhos evidenciando a administração de mentol como anestésicos em peixes (FAÇANHA; GOMES, 2005; GONÇALVES et al., 2008; SIMÕES; GOMES, 2009; PÁDUA et al., 2010; MELLO et al., 2012), não foram encontrados trabalhos a cerca da disposição residual de mentol no pescado.

3.6 Técnicas de preparo de amostras

O processo analítico, de uma forma geral é constituído por cinco etapas fundamentais, conforme representado na Figura 5. Dentre estas etapas, a preparação da amostra, é o componente chave no desenvolvimento de metodologia analítica, no qual é realizada a extração, purificação (*clean up*) e pré-concentração da amostra (DIONÍSIO et al., 2010).

Figura 5- Esquema das etapas fundamentais do processo analítico.



Fonte: Própria autora

Quando se trata da separação, identificação e quantificação de compostos presentes em matrizes complexas (matrizes biológicas contendo inúmeros componentes), os processos prévios de preparação tornam-se indispensáveis. Considerando a complexidade das matrizes biológicas, as vantagens em realizar a preparação das amostras estão diretamente relacionadas ao fato de:

- tornar a matriz compatível com a técnica de análise;
- proteger o sistema cromatográfico de contaminação por material de elevada massa molecular, ocasionando no aumento da vida útil da coluna, conseqüentemente menor gasto com manutenção, devido à diminuição de problemas operacionais;
- remover interferentes, simplificando a extração, diminuindo o tempo de análise;
- concentrar compostos de interesse, conseqüentemente aumentar a sensibilidade (detectabilidade) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Neste sentido, técnicas de microextração vêm sendo utilizadas, no propósito de atender a demanda analítica, acompanhando de forma surpreendente o aumento da eficiência cromatográfica, aumentando a produtividade analítica, concomitantemente, diminuindo a geração de resíduos.

3.6.1 Técnica de microextração com gota única (SDME)

A SDME, (do inglês *Single Drop Microextraction*) foi desenvolvida por Jeannot e Cantwel (1996) como um procedimento de pré-tratamento de amostra. É uma técnica analítica alternativa que vem se destacando, principalmente por integrar extração e concentração das amostras. O princípio da técnica é baseado no particionamento dos analitos de interesse analítico entre a fase extratora e a amostra. A fase extratora consiste em uma

microgota de solvente orgânico suspensa (*headspace*) ou imersa na solução da amostra suportada na ponta da agulha de uma microsseringa, a qual é exposta em um sistema fechado (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; JAIN; VERMA, 2011).

Na extração por SDME o analito presente na amostra tende ao equilíbrio de partição entre as fases do sistema, essa distribuição do analito pode ser descrita por meio dos termos, coeficiente de distribuição e razão de distribuição. O coeficiente de distribuição corresponde à constante de equilíbrio que descreve a distribuição do analito “A” entre as duas fases (aquosa e orgânica, quando em modo de imersão direta) ou as três fases (aquosa, orgânica e gasosa, quando em modo *headspace*) do sistema (XU; BASHEER; LEE, 2007; ZHANG et al., 2008). Considerando o sistema trifásico, o equilíbrio pode ser representado pela seguinte equação (1).

$$A_{(aq)} + A_{(org)} + A_{(g)} \quad (1)$$

No equilíbrio a razão de distribuição (K) do analito é estabelecida pela seguinte relação:

$$K_{org/g} = \frac{C_{org}^e}{C_g^e} \quad (2)$$

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

onde C_{org} é a concentração do analito na fase orgânica, C_g é a concentração do analito no *headspace*, e C_{aq} é a concentração do analito na fase aquosa, todas no equilíbrio. Logo, a constante de distribuição entre a fase doadora e a doadora pode ser expressa pela equação 4.

$$K_{org/aq} = K_{org/g} \times K_{g/aq} \quad (4)$$

Pelo coeficiente de distribuição 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 5 (JAIN; VERMA, 2011; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

$$C_{org}^e = \frac{K_{org/aq} C_i}{1 + (K_{org/aq} V_g/V_{aq}) + (K_{org/aq} V_{org}/V_{aq})} \quad (5)$$

onde C_i é a concentração original do analito na amostra, V_{aq} é o volume da fase aquosa, V_{org} o volume do solvente orgânico e V_g o volume no *headspace*.

A razão entre os volumes das fases afeta diretamente a distribuição do analito entre as mesmas. A utilização de uma microgota de solvente na SDME torna o processo extremamente eficiente para o pré-enriquecimento do analito, pois aumenta de forma considerável a razão entre os volumes da fase aquosa (doadora) e da fase orgânica (aceptora). Desta forma, o fator de enriquecimento (FE) pode ser definido como a razão entre a concentração do analito na fase orgânica no equilíbrio (C_{org}) e a concentração original do analito na amostra (C_i).

Na SDME, o mecanismo de transferência de massa do analito da fase aquosa para a fase orgânica se dá por meio do processo conhecido como “teoria do filme”. Essa teoria foi proposta inicialmente por Nernst e assume que, à distância de uma molécula, não há movimentação da solução imediatamente adjacente à interface formada entre a gota suspensa e a amostra, e que o movimento da solução aumenta gradualmente com as correntes de convecção, na medida em que se afasta da interface. A agitação forçada causa um distúrbio no filme diminuindo sua espessura diminuindo o tempo de equilíbrio no processo de extração na SDME (JEANNOT; CANTWELL, 1997).

Esta técnica pode ser utilizada para a extração de analitos apolares, analitos de média polaridade, e para aqueles cuja polaridade possa ser reduzida previamente à extração. A principal observação que deve ser feita, objetivando a pré-concentração e conseqüentemente uma efetiva extração é a imiscibilidade e a menor volatilidade dos solventes utilizados no processo (JEANNOT; CANTWELL, 1997).

3.6.1.1 Modos de extração na SDME

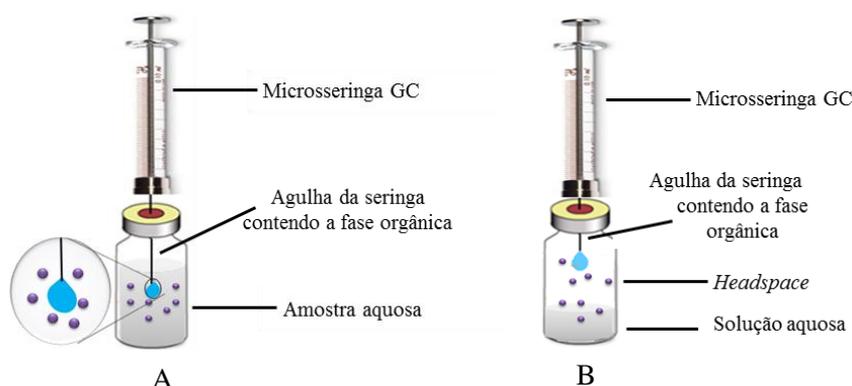
Na SDME, as análises podem ser realizadas por imersão direta ou por *headspeace*. As propriedades das substâncias a serem analisadas irão determinar qual desses dois modos será empregado. Desta forma, deve-se considerar a volatilidade (temperatura de ebulição), ionização (para ácidos e bases) e também a polaridade da substância (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; JAIN; VERMA, 2011).

Na extração por imersão direta, uma microseringa contendo o solvente orgânico é penetrada no septo do frasco até que a ponta da agulha se projete abaixo da superfície da solução da amostra. O êmbolo é pressionado para que se forme uma gota do solvente orgânico suspenso na ponta da agulha, conforme representado na Figura 6A (JAIN; VERMA, 2011).

Neste, o sistema de microextração é mantido sob constante agitação, por um intervalo de tempo pré-determinado, até que ocorra o equilíbrio, em seguida a gota é recolhida para a seringa e imediatamente injetada no instrumento analítico. A imersão direta é aplicável a amostras contendo analitos que sejam miscíveis tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica, na qual, este deve apresentar maior afinidade (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; JAIN; VERMA, 2011). Na extensão da SDME para análise por *headspeace*, a microseringa é introduzida no septo de um frasco, de modo que a agulha permaneça acima da superfície da solução (Figura 6B), desta forma, a gota não entra em contato com a amostra, os analitos são

transportados por meio da barreira de ar (LANÇAS, 2004).

Figura 6- Esquema representativo: A) imersão direta e B) modo *headspace* em SDME.



Fonte: Própria autora

No modo *headspace* os analitos são distribuídos entre as três fases, a amostra aquosa, o *headspace* e a gota orgânica. Assim como na imersão direta, a solução permanece sob constante agitação, só que a grande vantagem do modo *headspace* em comparação a imersão direta é que a velocidade pode ser bem maior, uma vez que, a gota orgânica não entra em contato com a solução, desta forma, a alta velocidade não causa impacto sobre a estabilidade da gota (JAIN; VERMA, 2011).

Este modo de extração é indicado para elementos voláteis ou pouco voláteis, compostos pouco polares e apolares, de baixa massa molecular, sendo o método mais utilizado por apresentar muitas vantagens, incluindo a eliminação de interferentes em matrizes complexas e material particulado (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010; JAIN; VERMA, 2011).

3.6.1.2 Fatores que influenciam a extração na SDME

Vários fatores influenciam a eficiência da extração por SDME, tais como:

- **Propriedades do solvente**

A técnica SDME está diretamente associada ao conceito de que semelhante dissolve semelhante. Logo, as substâncias a serem analisadas devem ter mais afinidade no solvente de extração do que na solução de suporte da amostra. A escolha do solvente para extração deve se basear na eficiência da extração, incidência de perda da gota e taxa de dissolução da mesma, devem apresentar baixa pressão de vapor para não evaporar durante o processo de extração e ser apropriado para aplicação em cromatógrafos, além de apresentar boa força coesiva e adesiva (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007; SARKHOSH et al, 2011; JAIN; VERMA, 2011).

- **Volume da gota do solvente**

A eficiência da extração está intimamente associada ao volume da gota do solvente, pois a quantidade de analito a ser extraído é proporcional ao volume da gota do solvente extrator. Porém, gotas com volumes maiores que 3 μL são pouco estáveis por serem mais susceptíveis ao gotejamento, sendo preferencial a reprodução de gotas com o volume entre 1 e 2 μL (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

- **Agitação da amostra**

A agitação da amostra é um dos parâmetros que afeta a eficiência da SDME por possibilitar o equilíbrio termodinâmico em tempo reduzido, facilitando a difusão dos analitos para a fase extratora. Porém, a velocidade de agitação deve ser relativamente baixa para a técnica em modo imersão direta para que não ocorra formação de bolhas, que podem provocar a perda ou deslocamento da gota, além de diminuir o tamanho da mesma pela dissolução na amostra, interferindo no processo de extração. No modo

headspace, recomenda-se agitações mais vigorosas, pelo fato da gota não estar imersa na solução (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

- **Tempo de extração**

O equilíbrio entre as fases do sistema é fundamental no processo de extração na SDME, tornando o tempo de extração um parâmetro relevante da técnica, uma vez que, a eficiência aumenta com o tempo de extração (SARKHOSH et al, 2011). Porém um tempo de extração muito longo para alcançar o equilíbrio completo pode resultar em perda da gota (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007; SARKHOSH et al., 2011).

- **Temperatura de extração**

A temperatura é um dos parâmetros que exerce maior influência na SDME, em especial para as extrações no modo *headspace*. Os analitos que apresentam 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 apolares migram em maior concentração para o *headspace* com o aumento da temperatura. Porém, elevadas temperaturas podem causar perda da gota do solvente extrator e diminuição da reprodutibilidade do processo de extração, além disso, apresenta efeito deletério na formação de bolhas. 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 (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007; JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

- **Efeito do sal**

A adição de sal no processo de SDME ocasiona em diferentes efeitos no processo de extração, uma vez que, o sal pode mudar as propriedades físicas da difusão do analito para a microgota. Em teoria, o aumento da força iônica da solução contendo a amostra pode levar a diminuição da solubilidade de espécies hidrofóbicas no meio aquoso, devido ao fenômeno “*salting out*”, onde moléculas de água formam uma esfera de hidratação em torno dos íons do sal, reduzindo sua disponibilidade para solubilizar os analitos na amostra e, conseqüentemente, aumentar a transferência de massa dos compostos de interesse da fase aquosa para a microgota extratora.

No entanto, com a adição de concentrações muito elevadas de sal pode haver um decréscimo no processo de extração pelo fato da difusão do analito ser cada vez mais dificultada. Isto pode ser explicado pelo aumento da viscosidade causado pela dissolução do sal, que reduz a taxa de difusão dos analitos na fase aquosa (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

- **Volume da solução de suporte da amostra e do *headspace***

Cálculos teóricos indicam que o espaço do *headspace*, tanto na imersão direta como no modo *headspace*, não devem ser maiores que o necessário, para maximizar a eficiência da extração, ou seja, o espaço deve ser suficiente para permitir a exposição da gota e não haver contato da mesma com a solução da amostra sob agitação quando empregado modo *headspace* e suficiente para evitar o contato da amostra com a tampa de septo para imersão direta (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

Se o espaço vazio presente, quando utilizado o modo de imersão direta for maior que o suficiente, o equilíbrio tende as três fases, ocasionando em menor extração do composto de interesse pelo solvente extrator imerso na solução aquosa, pelo fato da menor disponibilidade do

analito na solução no momento da extração (WARDENCKI; CURYŁO; NAMIESNIK, 2007).

A SDME apresenta algumas limitações, tais como:

- agitações muito rápidas levarem ao desprendimento da microgota suspensa na microsseringa, acarretando em perda do ensaio experimental;
- algumas vezes, o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio é maior do que o tempo que a microgota de solvente orgânico suporta, levando a volatilização do mesmo;
- formação de bolhas de ar, que acabam interferindo no processo de microextração;
- elevada viscosidade da solução aquosa (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010).

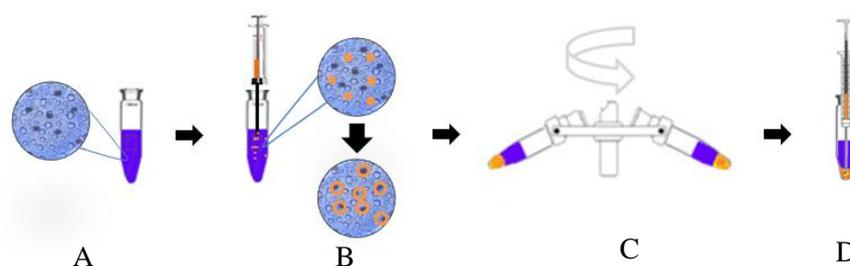
3.6.2 Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME (do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) foi introduzida em 2006 por Rezaee e colaboradores, desde então a técnica vem sofrendo diversas modificações, a fim de melhorar sua aplicabilidade e reduzir o consumo de solventes orgânicos de maior toxicidade. Esse método de microextração é baseado em um sistema ternário de solventes, no qual os solventes extrator (imiscível em água) e dispersor (miscível em água) são injetados simultaneamente em uma amostra aquosa contendo os analitos de interesse, dando origem a uma solução turva pela dispersão do solvente extrator.

Após a extração, é geralmente feita uma centrifugação para a separação das fases, na qual a fase extratora pode ser recolhida na parte sedimentada (DLLME convencional) ou na superfície da solução aquosa (solvente menos denso, LDS-DLLME) dependendo da densidade do solvente orgânico. A fase extratora é então recolhida com auxílio de uma microsseringa e submetida a um instrumento de análise (ZANG et al., 2009; REZAEI et al., 2006; REZAEI et al., 2008; YAMINI; REZAEI; FARAJI,

2010; HUO et al., 2011; MASHAYEKHI; REZAEI, 2012). Na figura 7 está representado esquematicamente o princípio da técnica.

Figura 7- Representação esquemática do princípio da DLLME. A) solução contendo o (s) composto (s) de interesse; B) introdução dos solventes extrator e dispersor, resultando na formação de uma emulsão; C) centrifugação e D) recolhimento do analito presente na sedimentação formada pelo solvente extrator.



Fonte: Adaptado de Berijani et al. (2006).

Assim como a SDME, a DLLME também consiste no equilíbrio de partição do analito entre as fases doadora (amostra) e aceptora (solvente orgânico), a solubilização dos analitos em qualquer uma das fases é dependente da polaridade relativa do sistema, no qual os analitos geralmente apresentam propriedades lipofílicas ($K > 500$). A alta aplicabilidade da técnica se deve ao particionamento da fase extratora ocasionado pela sua adição simultânea com o solvente dispersor aumentando a área superficial entre o solvente e a amostra. Desta maneira, a transferência de massa dos analitos da amostra para o solvente de extração ocorre rapidamente e o estado de equilíbrio é atingido quase que instantaneamente (HUO et al., 2011).

A eficiência da técnica de DLLME pode ser demonstrada como fator de enriquecimento (FE), que informa o grau de concentração do analito obtido na extração ou recuperação (R), que representa o total em porcentagem de analito extraído (REZAEI et al., 2008). Neste caso, o fator

de enriquecimento é definido como a razão entre a concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração inicial do analito presente na amostra (C_0), conforme representado na equação 6:

$$FE = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (6)$$

A recuperação (%) é a quantidade do analito, que é transferida para o solvente extrator ao final da extração (Equação 7):

$$R = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \quad (7)$$

As vantagens evidentes da DLLME assim como das outras técnicas miniaturizadas em relação aos métodos convencionais de extração estão relacionadas à simplicidade de operação, baixo custo, rapidez, baixo consumo de solventes orgânicos e altas recuperações (FARAJZADEH et al., 2009; LEONG; HUANG, 2009). Além disso, a DLLME apresenta uma vantagem adicional, o fato do processo de extração acontecer quase que instantaneamente quando adicionados os solventes extrator e dispersor, não sendo necessários tempos de extração (KOKOSA, 2012).

3.6.2.1 Fatores que influenciam na eficiência da DLLME

As principais variáveis que influenciam de maneira efetiva a eficiência do procedimento de extração em DLLME são:

- **Tempo de extração**

Na DLLME, o intervalo entre a injeção dos solventes extrator e dispersor e a centrifugação é definido como tempo de extração. De acordo com Rezaee e colaboradores (2006), o fato do tempo de extração apresentar

pouco efeito no processo de extração, é explicado, pela área superficial infinitamente grande entre as fases aquosa e orgânica, tornando o equilíbrio de partição do analito entre elas quase que instantâneo. Esta não dependência do tempo é a principal vantagem deste método (YAMINI; REZAEI; FARAJI, 2010; DARIAS et al., 2010; SHI; LEE, 2010).

- **Natureza do solvente extrator**

O parâmetro de maior relevância na DLLME é o tipo de solvente extrator empregado durante o procedimento de extração, no qual, a escolha deve ser baseada em alguns requisitos, tais como, sua densidade deve ser maior que a da água permitindo assim a formação de uma fase sedimentada na parte inferior do frasco, entretanto, alguns trabalhos reportados na literatura demonstram aplicações utilizando solventes extratores com densidade menor que a água, denominados LDS-DLLME (do inglês *low density solvent*) (LEONG; HUANG, 2008).

Os solventes devem apresentar pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, evitando perdas significativas durante o processo de extração; baixa solubilidade em água, permitindo a separação entre as fases do sistema; capacidade de extração dos analitos de interesse e compatibilidade com a técnica cromatográfica escolhida. Na Tabela 1 estão listados os solventes extratores possíveis de serem utilizados na DLLME e suas propriedades físico-químicas.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas de possíveis solventes extratores para aplicação na DLLME

Solventes Extratores	Solubilidade em água (g L ⁻¹ a 20°C)	Temperatura de fusão (°C)	Densidade (g cm ³ a 20°C)	Temperatura de ebulição (°C a 1 atm)	Pressão de vapor (mm Hg a 20°C)
Tetracloroeto de carbono	0,8	-23	1,59	76,7	90
Clorofórmio	8	-83	1,47	61	158
Diclorometano	20	-95	1,33	40	356
1,2-Dicloroetano	8,7	-35,5	1,25	83,5-84,1	65
Acetato de etila	85,3	-83	0,90	77	73
1- Clorobutano	0,5	-123	0,886	79	83
Benzeno	1,8	5,5	0,88	80,1	76
Tolueno	0,52	-95	0,87	110,6	22
Butan-1-ol	77	-89	0,81	116-118	5
Éter terc-butil-metílico	42	-108,6	0,74	55,3	201
Ciclohexano	0,055	6	0,78	81	77
Isooctano	0,00058	-107	0,69	99	38
Heptano	0,05	-90,5	0,68	97-98	36
Hexano	0,0096	-94,3	0,66	69	120
Octano	0,0007-0,0025	-56,8	0,703	125,6	22

Fonte: Merck, 2010.

- **Natureza do solvente dispersor**

Considerando a eficiência da extração, outro parâmetro relevante é o solvente dispersor, uma vez que contribui efetivamente para a formação das pequenas gotículas do solvente extrator na amostra aquosa. O principal critério na escolha do solvente dispersor é a sua miscibilidade intermediária entre o meio aquoso (polar) e o solvente extrator (apolar ou fracamente polar). Desta maneira, a interface formada serve como meio de transferência de massa da fase aquosa para a fase orgânica (MASHAYEKHI; REZAEI, 2012; KOHLER et al., 2013). Na Tabela 2 estão descritos os solventes dispersores frequentemente utilizados na DLLME e suas propriedades físico-químicas.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos solventes dispersores utilizados na DLLME

Solvente Dispersores	Solubilidade em água (g L ⁻¹ a 20°C)	Temperatura de fusão (°C)	Densidade (g cm ³ a 20°C)	Temperatura de ebulição (°C a 1 atm)	Pressão de vapor (mm Hg a 20°C)
Tetrahidrofurano	Solúvel	-108,5	0,89	65-66	-
1,4-Dioxano	Solúvel	12	1,03	101,5	31
Propan-1-ol	Solúvel	-127	0,80	96,5-98	14
Metanol	Solúvel	-98	0,792	64,5	96
Etanol	Solúvel	-114,5	0,79	78,3	44
Acetona	Solúvel	-95,4	0,79	56,2	175
Acetonitrila	Solúvel	-45,7	0,786	81,6	73
Propan-2-ol	Solúvel	-89,5	0,786	82,4	32

Fonte: Merck, 2010.

Dentre os solventes dispersores descritos acima, os mais comuns são, acetona, acetonitrila, metanol, e o tetrahidrofurano.

- **Condições de pH**

Trabalhos realizados por Jofré e colaboradores (2010), demonstraram que diferentes valores de pH influenciam o fator de enriquecimento dos analitos na fase orgânica. De acordo com as observações para que ocorra a transferência de massa entre as duas fases (aceptora e doadora) do sistema de maneira efetiva é necessário que os analitos estejam na forma não ionizada (KOHLENER et al., 2013), pois a forma ionizada é solúvel em água dificultando sua passagem para a fase extratora, enquanto que, a forma não ionizada é facilmente transferida para o solvente extrator. Logo, o valor de pH deve se escolhido de forma a tornar o analito menos solúvel na fase aquosa, favorecendo sua migração para a fase de extração, melhorando a eficiência da DLLME (CAMPONE et al., 2012).

- **Adição de sal**

De acordo com Zgola-Grzékowiaka e Kaczorekb (2011) o pH e a força iônica da solução desempenham papéis cruciais na eficiência da extração líquido-líquido, uma vez que, a adição de sal pode ocasionar em melhora no rendimento de extração, devido à diminuição dos compostos de interesse na fase aquosa e aumento de sua transferência para a fase orgânica, favorecendo a recuperação do processo de extração. Entretanto, o aumento da força iônica também promove redução na solubilidade do solvente extrator na amostra, ocasionando aumento no volume de fase sedimentada e consequentemente diminuição do fator de enriquecimento (BIRJANDI et al., 2008; ZANG et al., 2009).

- **Volumes dos solventes extrator e dispersor**

Além de todos os parâmetros já citados, os volumes dos solventes extrator e dispersor são críticos para a formação da fase sedimentada. O volume do solvente extrator utilizado na extração é responsável pela determinação do fator de pré-concentração, uma vez que, o volume de solvente extrator é proporcional ao volume da fase sedimentada obtida com a centrifugação, resultando em um menor fator de pré-concentração para volumes maiores de solventes utilizados. Neste sentido, o volume utilizado deve ser suficiente para que a fase a ser recolhida possa ser posteriormente analisada. Ao manter o volume de solvente de extração na ordem de alguns microlitros atinge-se um fator de enriquecimento muito elevado (YAMINI; REZAEI; FARAJI, 2010).

Por outro lado, o volume do solvente dispersor afeta diretamente a formação do sistema trifásico (água/solvente dispersor/solvente extrator) e o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, conseqüentemente, o fator de enriquecimento. Logo, o volume adequado de solvente dispersor para a formação de uma solução turva com características apropriadas (microgotas) depende do volume da fase aquosa, assim como do volume do solvente extrator (YAMINI; REZAEI ; FARAJI, 2010).

A DLLME, assim como todas as outras técnicas de microextração apresenta algumas desvantagens, tais como, toxicidade dos solventes orgânicos utilizados, geralmente halogenados; não ser uma técnica seletiva, logo, matrizes complexas podem não ser compatíveis com o processo utilizado na técnica devido às possíveis interações entre os componentes da matriz com o solvente extrator e, além disso, a etapa de centrifugação, que é necessária para separação da fase sedimentada, impede que o processo seja totalmente automatizado (CAMPONE et al., 2012).

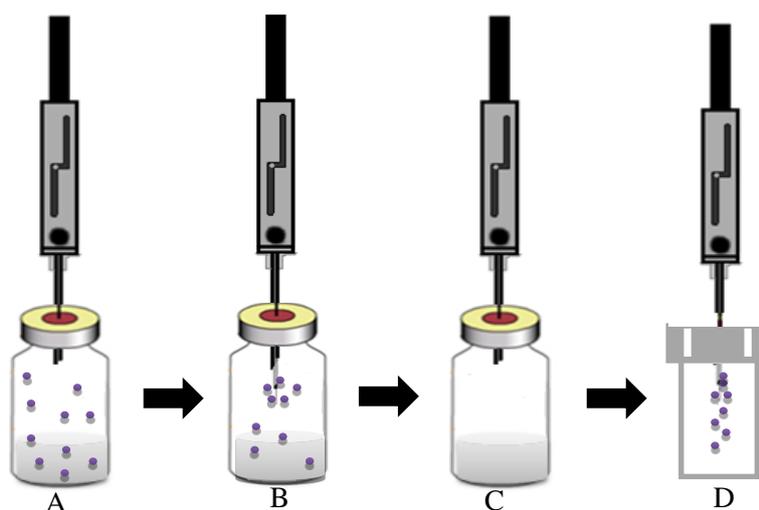
3.6.3 Técnica de microextração em fase sólida (SPME)

Pawliszyn e colaboradores desenvolveram em 1990 a SPME (do inglês *Solid Phase Microextraction*) como um método de extração e pré-concentração não exaustivo, inicialmente empregada na determinação de compostos clorados em águas contaminadas na tentativa de reduzir as limitações inerentes à SPE (VAS; VÉKEY, 2004). A aplicação da SPME revolucionou a análise de compostos orgânicos, por se tratar de uma técnica na qual os analitos são extraídos na ausência de solventes orgânicos (PAWLISZYN, 1997).

O princípio da técnica baseia-se na concentração dos analitos por processos de absorção ou adsorção (dependendo da fibra utilizada), diretamente na fibra ou fase estacionária que consiste em um ou mais polímeros extratores. O procedimento na SPME é composto por duas etapas principais, a primeira consiste em expor a fibra revestida à amostra, ocorrendo à extração dos analitos e a segunda etapa consiste na dessorção destes da fibra para o injetor do instrumento analítico (PAWLISZYN et al., 2012).

Para a execução da técnica, a fibra é incorporada a um aparato semelhante a uma seringa que atua como dispositivo (composto por um tubo de aço inoxidável, semelhante a uma agulha, no qual a fibra pode ser exposta e recolhida sem sofrer danos) permitindo a perfuração do septo do frasco contendo a amostra (Figura 8A) e também a movimentação do êmbolo, expondo a fibra diretamente na amostra ou no *headspace* do frasco (Figura 8B), durante o processo de extração das substâncias. Após a extração, ou seja, logo após o equilíbrio de partição do analito ter sido atingido entre as fases, a fibra é novamente retraída para o interior da agulha do dispositivo de SPME (Figura 8C) para posterior introdução em um sistema cromatográfico (Figura 8D), no qual ocorre a dessorção dos analitos (PAWLISZYN et al., 2012).

Figura 8- Esquema do procedimento de SPME. A) perfuração do septo; B) exposição da fibra (extração dos analitos) no frasco; C) retração da fibra para o interior da agulha do dispositivo de SPME e D) injeção em um sistema cromatográfico (dessorção dos analitos).



Fonte: Própria autora.

A extração baseia-se no processo de equilíbrio de partição do analito entre as fases aquosa, polimérica (fibra) e gasosa (quando no modo *headspace*), na qual, durante o processo de extração, os analitos migram entre as três fases, até que o equilíbrio seja atingido (PAWLISZYN et al., 2012). Deste modo a teoria de extração por SPME é baseada na aplicação de fundamentos de transferência de massa e na termodinâmica de equilíbrio das fases, onde, durante a extração, os componentes migram entre as múltiplas fases vencendo as resistências existentes. A transferência de massa ocorre até que a igualdade de potenciais químicos seja atingida, quando o equilíbrio é alcançado (PAWLISZYN, 1997).

Conforme descrito por Pawliszyn (1999), de acordo com a lei da conservação das massas, a quantidade de soluto presente na amostra inicial é igual à somatória das quantidades individuais do soluto nas diferentes fases do sistema após ter atingido o equilíbrio de partição (Equação 8):

$$m_0 = m_{aq} + m_g + m_f \quad (8)$$

onde m_0 é a quantidade de massa inicial da amostra e m_{aq} , m_g e m_f são as quantidades de massa na fase aquosa, no *headspace* e na fibra, respectivamente.

Sendo assim, a massa extraída está diretamente relacionada com o equilíbrio de massas do analito nas fases do sistema, na qual, quanto maior a afinidade do analito pela fase polimérica, maior a concentração de analito extraída (QUEIROZ, 2009). A massa total do composto permanece constante durante o processo de extração, podendo ser representada pela equação 9:

$$C_0 V_{aq} = C_f^e V_f + C_g^e V_g + C_{aq}^e V_{aq} \quad (9)$$

onde, C_0 é a concentração inicial do soluto na amostra, C_f^e , C_g^e , C_{aq}^e as concentrações do analito após atingir o equilíbrio de partição nas fases, polimérica (fibra), gasosa (*headspace*) e aquosa (amostra), respectivamente. V_f , V_g , V_{aq} , os volumes das fases polimérica, gasosa e aquosa, respectivamente.

Após a extração os analitos são desorvidos da fibra, o que pode ocorrer de duas maneiras distintas, por dessorção térmica, quando a SPME permanece acoplado a um GC, neste procedimento a fibra é inserida diretamente em um injetor que apresente temperatura suficiente alta para que ocorra a dessorção dos analitos. A outra possibilidade é por adição de solventes orgânicos, para a SPME acoplada a cromatografia em fase líquida (LC), ocasionando na dessorção dos analitos com a própria fase móvel. O método utilizado para analitos que não apresentam volatilidade suficiente para que ocorra a dessorção térmica (PAWLISZYN, 1997).

O número de mols do soluto (n) sorvido pela fase polimérica e as constantes de partição do analito entre as fases polimérica/gasosa (K_{fg}) e gasosa/aquosa ($K_{g,aq}$) podem ser definidos segundo as equações:

$$n = C_f^e V_f \quad (10)$$

$$K_{fg} = C_f^e / C_g^e \quad (11)$$

$$K_{g,aq} = C_g^e / C_{aq}^e \quad (12)$$

$$K_{f,aq} = C_f^e / C_{aq}^e \quad (13)$$

Após rearranjos matemáticos, a quantidade de analito extraída (número de mols), após atingir o equilíbrio de partição poderá ser expressa por meio da equação 14:

$$n = \frac{K_{fg} K_{g,aq} V_f V_{aq} C_0}{K_{fg} K_{g,aq} V_f + K_{g,aq} V_g + V_{aq}} \quad (14)$$

De acordo com a equação 11, a quantidade de analito extraído pela fibra, após atingir o equilíbrio de sorção, é linearmente relacionada à concentração inicial do analito na amostra, permitindo a análise quantitativa (QUEIROZ, 2009).

As vantagens da técnica estão relacionadas principalmente à simplicidade, uma vez que, não necessita de solventes orgânicos, rapidez no processo operacional, utilização de pequenos volumes de amostra, reutilização das fibras em inúmeras análises (desde que obedecidas às recomendações dos fabricantes) e automação das análises (PAWLISZYN, 1999; PAWLISZYN, 2000).

A Tabela 3 apresenta as principais etapas das técnicas de preparo de amostras inicialmente citadas e também das técnicas miniaturizadas,

desenvolvidas com o propósito de simplificar o processo de extração, melhorando a etapa de pré-concentração.

Tabela 3 Principais etapas das técnicas de preparo de amostras: LLE, SPE, SDME, DLLME e SPME

Técnicas	Principais etapas
LLE	Adição de solvente orgânico na amostra; Agitação no funil de separação; Separação das fases aquosa e orgânica; Remoção da fase orgânica; Evaporação/concentração da fase orgânica; Injeção no instrumento analítico.
SPE	Condicionamento dos cartuchos ou membranas; Eluição da amostra; Eluição do solvente para remover interferentes e analitos dessorvidos; Evaporação/concentração da fase orgânica; Injeção no instrumento analítico.
SDME	Exposição da microgota de solvente orgânico à amostra; Injeção no instrumento analítico.
DLLME	Adição da mistura de dois solventes (extrator e dispersor) à amostra; Centrifugação; Injeção no instrumento analítico.
SPME	Exposição da fibra de SPME à amostra; Dessorção dos analitos no instrumento analítico.

Fonte: Queiroz, 2009; Campone et al., 2012; Pawliszyn, 2012.

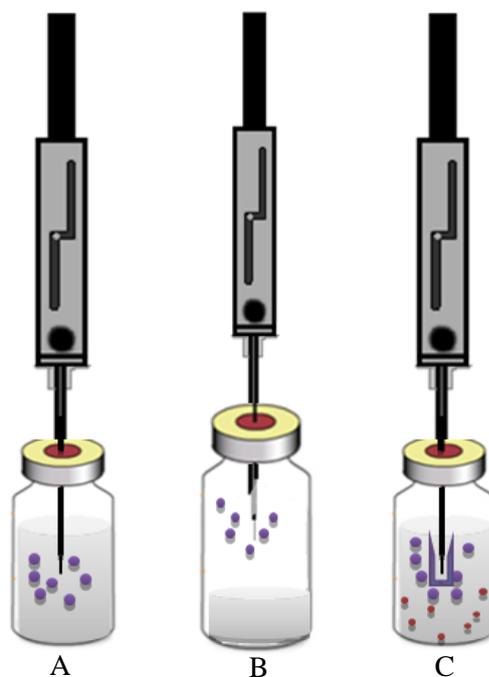
As técnicas miniaturizadas apresentam simplicidade evidente no que se refere ao número de etapas necessárias no processo de extração, conseqüentemente menor tempo de execução, menor consumo de amostra e reagentes, dentre eles, os solventes orgânicos ultrapuros.

3.6.3.1 Modos de extração na SPME

Considerando a especificidade de cada matriz, a seleção do modo de extração é muito importante por garantir a preservação e integridade da fase polimérica e devido a grande diversidade de matrizes que podem ser analisadas utilizando a SPME, três modos de extração podem ser empregados: imersão direta, em *headspace* e extração envolvendo uma membrana protetora (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).

Na amostragem direta, a fibra revestida é imersa diretamente na solução da amostra (Figura 9A) e os analitos são transportados diretamente da matriz para a fase extratora. Nesse modo de extração é necessário agitação da amostra para facilitar o processo de difusão dos analitos. O modo de extração direto é ideal para aplicação em amostras, cujos analitos não apresentam volatilidade, no entanto, deve-se atentar quanto à natureza da amostra, visto que em alguns casos, estas podem naturalmente degradar o material do revestimento das fibras (PAWLISZYN et al., 2012).

Figura 9- Esquema de extração por: A) imersão direta; B) *headspace* e C) protegida por membrana em SPME.



Fonte: Própria autora

No modo de extração por *headspace*, a fibra extratora é mantida no espaço acima do menisco da solução contendo os analitos, ou seja, a fibra é exposta na fase gasosa dentro do vial, conforme mostrado na Figura 9B. Este tipo de extração baseia-se no aquecimento de amostras aquosas ou sólidas contidas em um frasco fechado, provocando a volatilização dos compostos. Recomenda-se que o modo de extração seja empregado para analitos relativamente voláteis, mas também pode ser aplicado a compostos pouco voláteis, desde que, sejam adotados procedimentos que favoreçam a partição dos mesmos para o *headspace*, conseqüentemente a extração pela fibra. Os analitos são adsorvidos/absorvidos e concentrados na fibra até que o equilíbrio entre as três fases seja alcançado (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).

A grande vantagem de se utilizar o modo *headspace* é para amostras que contenham interferentes de elevado peso molecular, como as matrizes biológicas, além disso, este tipo de extração prolonga a vida útil das fibras (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).

No caso de amostras contendo analitos não voláteis, com compostos interferentes de alta massa molecular e que apresentam elevadas concentrações, a aplicação da extração direta ou em *headspace* pode não ser tão conveniente. Nestes tipos de amostras a extração é realizada colocando-se uma membrana protetora seletiva ao redor da fibra (Figura 9C), protegendo-a. Tais membranas são impermeáveis aos componentes que causam danos ao revestimento, porém são permeáveis aos analitos de interesse. O uso de membranas protetoras pode ocasionar em melhor reprodutibilidade e precisão. O processo de extração dos analitos nesse modo é mais lento, uma vez que, os analitos precisam difundir-se na membrana (PAWLISZYN, 1997; PAWLISZYN, 1999).

3.6.3.2 Fatores que influenciam a extração na SPME

A quantidade de compostos de interesse extraídos pelas fibras quando se utiliza a SPME como preparo de amostras pode ser afetada por alguns parâmetros, como:

- **Adição de sal**

O aumento da força iônica das soluções contribui de forma efetiva para o aumento da recuperação no processo de SPME, uma vez que, a presença de eletrólitos em sistemas de adsorção diminui a solubilidade dos compostos hidrofóbicos presentes em fase aquosa, fenômeno este denominado “*salting out*”, onde moléculas de água formam uma esfera de hidratação em torno das moléculas de sal, ocasionando na redução das moléculas de água disponíveis para solubilizar os compostos de interesse

presentes nas amostras, acarretando na maior migração dos analitos para a fase extratora. Entretanto, analitos polares podem acabar interagindo de maneira eletrostática com as moléculas de sal, diminuindo sua difusão para a fase extratora (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000). Em outras palavras, os sais geralmente aumentam o coeficiente de distribuição dos analitos quando na forma não dissociada, aumentando a quantidade de analito extraída. No entanto, se os analitos presentes na solução estiverem na forma dissociada, observa-se uma diminuição na extração devido ao aumento do coeficiente de atividade das espécies iônicas ao se aumentar a força iônica das soluções (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000).

- **Temperatura de extração**

A temperatura exibe grande influência sobre a microextração, contribuindo de duas formas diferentes: no modo de extração direta, ou seja, por imersão da fibra na amostra, os coeficientes de difusão dos analitos aumentam à medida que se eleva a temperatura, ocasionando em um ganho na quantidade de analito extraída (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000). No modo de extração por *headspace*, um incremento na temperatura aumenta a concentração dos analitos presentes no *headspace*, acarretando em uma extração mais rápida, devido ao menor tempo necessário para atingir o equilíbrio. Desta forma, o aumento da temperatura de extração, ocasiona no aumento do coeficiente de difusão do analito, facilitando sua migração para a fibra extratora (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000).

- **Tempo de extração**

Ao se realizar um procedimento de SPME, deve-se otimizar o tempo necessário de extração, considerando o equilíbrio de sorção

(adsorção/absorção), no qual a quantidade de analito extraído se mantém constante. Este talvez seja o parâmetro de maior importância para a aplicação da SPME, pois, caso o tempo não seja determinado corretamente, o sistema não estará em equilíbrio, ocasionando em medições irreprodutíveis, com coeficientes de partição menores do que os reais. (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000).

Segundo Pawliszyn (1997), o tempo de extração é definido como o tempo necessário para que a fase polimérica extraia o equivalente a 95% da massa extraída quando o equilíbrio é atingido. Lembrando que o tempo de extração é dependente de diversos fatores, tais como: processo de agitação, espessura da fase polimérica, dentre outros.

- **Agitação da amostra**

Na SPME, o aumento da velocidade de extração é observado quando o sistema é mantido sob agitação, devido ao fato de facilitar a difusão dos analitos até a superfície da fase extratora. A camada estática é determinada pelas condições de agitação e viscosidade dos fluidos, no qual, o aumento da agitação ocasiona na diminuição da camada estática, resultando em um aumento no processo de difusão, conseqüentemente, na diminuição do tempo necessário para que o equilíbrio de sorção seja atingido. Diversas formas de agitação da amostra ao redor da fibra foram estudadas, no entanto, a agitação com barra magnética é a mais utilizada (PROSEN; ZUPANCIC-KRALJ, 1999; PAWLISZYN, 1999; PAWLISZYN, 2000).

- **Volumes da solução de suporte da amostra e do *headspace***

O volume da amostra é outro parâmetro relevante em SPME, uma vez que, ele está diretamente relacionado com a sensibilidade do método. Quando se realiza um procedimento de SPME, o volume de amostra é muito maior que a razão de distribuição do analito entre a fase polimérica e a

amostra pelo volume da fibra, sendo assim, a quantidade de analito extraída é diretamente proporcional à concentração da amostra e é independente do volume da mesma, conforme pode ser observado na equação 15:

$$n = K_{f\text{aq}} V_f C_0 \quad (15)$$

Onde, $K_{f\text{aq}}$ corresponde à razão de distribuição do analito entre a fibra e a amostra, V_f é o volume da fibra e C_0 é a concentração inicial do analito de interesse. Se o volume do *headspace* também é muito grande, a sensibilidade reduz consideravelmente (PENÁLVER et al., 1999).

- **Solventes orgânicos**

Para compostos apolares, geralmente, a presença de solventes orgânicos na amostra aquosa reduz a quantidade de analito extraído devido à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fase polimérica (PENÁLVER et al., 1999).

- **Tipo de fibra (fase extratora)**

A eficiência da extração depende diretamente da constante de distribuição entre o analito e a fase polimérica, e o fator que determina o tipo de fibra a ser utilizada são as propriedades do analito, como polaridade, massa molecular e volatilidade do composto. A eficiência e o tempo de extração são determinados pela espessura do filme que constitui a fibra e também pela constante de partição, no qual, filmes que apresentam maior espessura apresentam maiores taxas de extração, no entanto, são necessários tempos maiores para que o equilíbrio de partição seja atingido (PAWLISZYN, 1999; PAWLISZYN, 2000).

As fibras utilizadas no processo de SPME podem ser classificadas segundo o processo de extração, por absorção ou adsorção, a semelhança entre esses dois processos é o fato de que, em ambos, as moléculas do composto de interesse migram para a fase polimérica por meio do processo de difusão, no entanto, no processo de absorção os analitos atravessam a superfície do revestimento e se difundem durante a extração. Além disso, este processo não é competitivo, ou seja, a extração não é afetada pela presença de outros compostos presentes na matriz. Já na adsorção, os analitos permanecem adsorvidos na superfície do revestimento, podendo haver competição entre os compostos de interesse e os possíveis interferentes presentes na matriz, ocasionando na diminuição da quantidade de analito extraída. A desvantagem observada no processo de absorção são que alguns analitos podem ficar fortemente retidos nos interstícios da fibra, inutilizando-a (YUAN et al., 2000).

Na Tabela 4 estão descritas algumas fibras comerciais e suas características.

Tabela 4 Fibras de SPME disponíveis comercialmente e suas características

Fases Extratoras	Polaridade	Espessuras de Filme (μm)	Aplicação	Características	Tipo de extração
PDMS (polidimetilsiloxano)	Apolar	7, 30 e 100	Compostos apolares e voláteis	Revestimento líquido de alta viscosidade e estabilidade	Absorção
PA (poliacrilato)	Polar	85	Compostos de média à alta polaridade (álcoois, cetonas e fenóis). Voláteis de média à alta polaridade.	Sólido que pode se liquefazer em temperaturas ambiente	Absorção
CW-DVB (carbowax-divinilbenzeno)	Polar	65	Compostos de média à alta polaridade (álcoois, cetonas e fenóis). Voláteis de média à alta polaridade.	Sólido poroso	Adsorção
PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenzeno)	Mista (Bi-polar)	65	Voláteis e não-voláteis de baixa à alta polaridade	Sólido poroso	Adsorção
Carboxen-DVB (carboxen-divinilbenzeno)	Mista (Bi-polar)	75	Voláteis	Sólido poroso	Adsorção
DVB/Car/PDMS (divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano)	Mista (Tri-polar)	30 e 50	Compostos voláteis e semi voláteis	Sólido poroso	Adsorção

Fonte: YUAN et al., 2000; SUPELCO, 2004.

- **pH da amostra**

A eficiência da extração está diretamente relacionada ao pH da amostra, pois apenas as formas não dissociadas dos compostos são extraídas pelos revestimentos das fases poliméricas. Geralmente o controle do pH é feito utilizando soluções tampão, fazendo com que a maioria dos analitos presentes em formas dissociadas passem a forma não dissociada. Além disso, quando a SPME é realizada em modo direto, valores de pH extremos (menor que 2 e maior que 11) podem danificar o revestimento das fases poliméricas (YUAN et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000).

- **Dessorção**

Após a extração, os compostos de interesse sorvidos na fibra são transferidos para o instrumento analítico, onde ocorrem a dessorção, separação e quantificação. O processo de dessorção é basicamente a difusão dos analitos do filme polimérico para o fluido de arraste, gás de arraste quando GC e fase móvel quando LC. Desta forma, as variáveis tempo e temperatura de dessorção deverão ser otimizados para eliminar possíveis efeitos de memória na fase polimérica (PAWLISZYN, 1997).

As principais limitações inerentes a SPME estão relacionadas ao fato de que compostos de elevada massa molecular podem sorver irreversivelmente na fibra, ocasionando alterações de suas propriedades, inutilizando-a, não seletividade dos analitos extraídos pelas fases poliméricas, a fragilidade das fibras extratoras, além disso, o condicionamento térmico utilizado para limpeza das fibras pode ocasionar no sangramento do revestimento das mesmas (NERIN et al., 2009).

3.7 Quimiometria

O intenso desenvolvimento instrumental de análises influenciou na obtenção de grande quantidade de dados em apenas uma única medida da amostra, tornando praticamente indispensável o uso de procedimentos matemáticos e estatísticos na otimização destes dados. Nesse sentido, os processos estatísticos frequentemente empregados para otimização dos dados são os métodos univariados e multivariados (HOPKE, 2003; SANTOS; SANTOS; FERREIRA, 2003).

Na análise univariada de dados, cada variável é avaliada individualmente, fixando-se condições para as demais, como as interações entre as variáveis não são avaliadas esta técnica torna-se limitada. Atualmente, reconhece-se que grande parte dos sistemas é de natureza múltipla, inviabilizando a utilização de modelos univariados para a obtenção de resultados ideais. Nesta perspectiva, a análise multivariada de dados vem sendo amplamente utilizada por considerar cada variável individualmente e suas interações, simultaneamente, obtendo uma quantidade de informação consideravelmente grande em menor número de ensaios (SANTOS; SANTOS; FERREIRA, 2003).

A crescente necessidade de tratamento dos dados químicos de natureza multivariada e com o recente avanço na tecnologia de computadores, aliados a softwares sofisticados deram origem a uma nova área da química, a quimiometria, que foi introduzida em 1972 pelo Suíço Swede Svante Wolde e pelo Americano Bruce R. Kowalski, definida como ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processos químico, no qual são obtidas informações sobre o estado do sistema por meio da aplicação de métodos estatísticos e matemáticos. A quimiometria é basicamente dividida em planejamento e otimização de experimentos ou delineamento sequencial de experimentos fornecendo o máximo de informações químicas relevantes (MASSART et al., 1998; FERREIRA et al., 2002).

3.7.1 Planejamento experimental na metodologia de preparo de amostras

O planejamento experimental é uma das mais importantes fases no processo de investigação científica e atualmente vem sendo usado em grande escala. Por meio desta técnica, é possível determinar quais variáveis exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como limites inferior e superior de valores destas variáveis e o efeito da interação destas na resposta. Logo, o produto final do planejamento que é o conjunto de dados, poderá ser tratado com base em resultados teóricos, permitindo uma interpretação mais simples com resultados mais confiáveis, em menor tempo tornando-se mais viável economicamente (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

3.7.1.1 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), foi introduzida na década de 50, e desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais, é uma técnica de otimização baseada na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas, permitindo selecionar a combinação de níveis ótimos para a obtenção da melhor resposta em uma dada situação (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

Segundo Myers, Khuri e Carter (1989), a análise experimental pelo método de superfície de resposta gira em torno da suposição de que uma resposta (y) é uma função de fatores controláveis (x_1, x_2, \dots, x_k) e que a função pode ser aproximada por um polinômio, o qual pode fornecer uma boa descrição entre os fatores e a resposta obtida. A ordem deste polinômio é limitada pelo tipo de planejamento usado, podendo ser de primeira ou

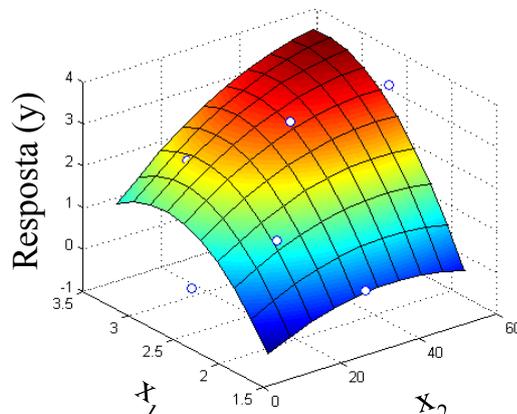
segunda ordem, logo, os planejamentos mais empregados para ajustar o modelo quadrático (segunda ordem) são os planejamentos Compostos Centralizados (CCD) ou DCCR (Planejamento Composto Central Rotacional), matriz de Doehlert e Box-Behnken, responsáveis por incorporar a curvatura à superfície de resposta (ZOUAGH et al., 2000). Na equação 16 tem-se uma equação de segunda ordem.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (16)$$

em que y é a resposta predita; β_0 é o ponto de interseção; b_{ij} é o coeficiente de interação; b_i é o coeficiente linear; b_{ii} é o coeficiente quadrático; k é o número de fatores; x_i e x_j são as variáveis referentes aos fatores e ε é o erro aleatório.

Em um gráfico de superfície, os valores de dois fatores são representados nos eixos x e y , enquanto os valores da resposta são representados no eixo z . Esse gráfico fornece uma visão tridimensional que pode exibir um desenho mais claro da superfície de resposta, pelo ajuste das respostas ao modelo quadrático da equação 14, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10- Gráfico de superfície de resposta em função dos fatores x_1 e x_2 , obtido a partir de um DCCR.



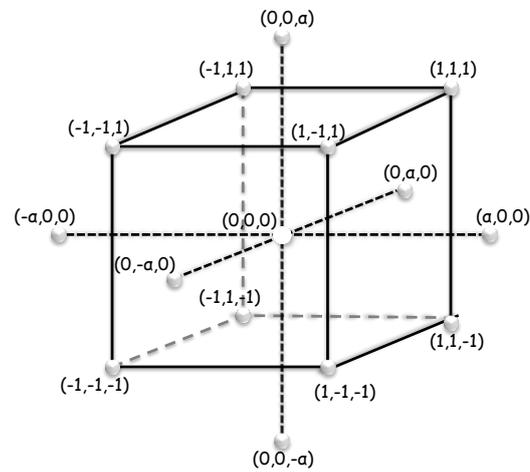
Fonte: Gerado a partir de resultados da própria autora no Software Chemoface 1.4.

3.7.1.2 Planejamento Composto Central (CCD)

O CCD (do inglês *Central Composite Design*), também conhecido como delineamento composto central rotacional (DCCR) foi introduzido por Box e Wilson (1951) e consiste basicamente em um dos planejamentos tipo estrela mais populares empregados para ajustar modelos de superfície de resposta, que compreendem efeitos de primeira ordem (linear), de interação e de segunda ordem (quadrático). O CCD pertence a uma classe de delineamentos eficientes, os quais requerem poucos ensaios para sua realização (MATEUS; BARBI; CONAGIN, 2001).

Na Figura 11 está esquematizado um planejamento DCCR para três variáveis, o qual é basicamente constituído por: 8 pontos fatoriais, que são referentes a parte cúbica com os valores das variáveis compreendidas nos níveis máximos (1) e mínimos (-1); 6 pontos axiais, indicando que as variáveis estão situadas a $\pm \alpha$ da origem, formando a estrela do planejamento e os pontos centrais, que são níveis médios das variáveis (0).

Figura 11- Disposição espacial dos experimentos de um planejamento DCCR 2^3 .



Fonte: Adaptado de Lima; Filho (2010).

O total de análises realizadas é dado pela soma dos pontos fatoriais, axiais e centrais, representado por $N = 2^k + 2k + n_0$, respectivamente, onde k são os fatores estudados e n_0 o número de pontos centrais. Na tabela 5 está representada uma matriz obtida no planejamento DCCR para três variáveis.

Tabela 5 Combinações entre os níveis codificados dos fatores v_1 , v_2 e v_3

v_1	v_2	v_3	
-1	-1	-1	} Planejamento fatorial
1	-1	-1	
-1	1	-1	
1	1	-1	
-1	-1	1	
1	-1	1	
-1	1	1	
1	1	1	
0	0	0	} Ponto central
$-\alpha$	0	0	} Pontos axiais
α	0	0	
0	$-\alpha$	0	
0	α	0	
0	0	$-\alpha$	
0	0	α	

$v_1 =$ fator 1
 $v_2 =$ fator 2
 $v_3 =$ fator 3

Fonte: Teófilo; Ferreira, 2006.

O DCCR é um projeto muito utilizado devido sua flexibilidade e sua utilização em experimentos sequenciais. Os pontos fatoriais e centrais do planejamento servem como fase preliminar, podendo se ajustar um modelo de primeira ordem e verificar a necessidade de incorporar o termo quadrático obtido pelos pontos axiais (α). O valor de α no modelo estatístico é determinado de forma que os efeitos e interações estimados no modelo de segunda ordem sejam ortogonais, para isso α deve estar a uma distância de $\pm\sqrt[4]{2^k}$ do ponto central, no qual k é o número de fatores. Outra particularidade do modelo DCCR é que os erros experimentais são baseados no erro puro que é obtido a partir das repetições do ponto central, além disso, os pontos centrais melhoram a estimativa dos efeitos quadráticos obtidos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Desta forma, para fornecer informações seguras de um processo, o DCCR é comumente utilizado em associação com a análise de superfície de respostas na determinação de condições ótimas operacionais (VAZ, 2009).

3.8 Validação de metodologia analítica

A validação de um método analítico é um procedimento fundamental para verificar, por meio do fornecimento de evidências objetivas, se o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido e para assegurar sua confiabilidade na determinação de compostos. Apesar de possuírem diferenças em suas normas, os órgãos credenciados fornecem diretrizes e recomendações para a execução do procedimento de validação, requisito fundamental para o processo de demonstração de competência técnica (RIBANI et al., 2004).

O termo validação de uma forma geral é definido como a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que tal método está sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. Neste contexto, a validação de uma técnica analítica, bem como os estudos rigorosos da segurança e qualidade são imprescindíveis para o desenvolvimento de protocolos (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

No Brasil, as agências regulamentadoras responsáveis por avaliar a competência destes ensaios garantindo que este conjunto de verificações esteja sendo realizado, são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). De acordo com estes órgãos os parâmetros de validação são: seletividade e/ou especificidade, faixa de trabalho ou linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

3.8.1 Seletividade e/ou especificidade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade define a capacidade do método em produzir resposta para apenas um analito, sendo, portanto, específico para aquele determinado composto, já a definição para seletividade refere-se à capacidade deste método em distinguir um determinado analito presente em uma matriz complexa, sem interferência de outros componentes da mistura. Ambos estão diretamente relacionados com a capacidade de um método em determinar e quantificar corretamente um determinado composto na presença de outras substâncias da matriz, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

A análise da seletividade e/ou especificidade deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica para não comprometer a linearidade, exatidão e precisão do método. Esta análise pode ser avaliada por testes de comparação da matriz isenta do composto de interesse com a matriz enriquecida com o padrão, isento de qualquer interferente. Outra maneira de avaliar a seletividade, quando a matriz possui o composto de interesse, deve ser realizada uma comparação entre as curvas analíticas do padrão e do padrão na matriz a fim de observar possíveis interferentes (RIBANI et al., 2004).

3.8.2 Faixa de trabalho (linearidade)

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Desta forma, o analito poderá ser quantificado a partir de sinais medidos para as massas ou concentrações conhecidas deste, expressa como uma equação da reta, denominada curva analítica. Embora somente dois pontos definam uma reta, recomenda-se que a curva analítica tenha no

mínimo cinco pontos e que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo do composto de interesse a ser determinado na amostra real (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010). A equação 17 relaciona duas variáveis, para que assim seja possível determinar coeficiente angular e linear da reta.

$$y = ax + b \quad (17)$$

onde y é a resposta medida (absorbância, altura, área do pico, etc), x é a concentração, a é a inclinação da curva analítica, que representa o quão sensível é o método e b representa a interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do composto de interesse ou calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Se houver relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos que possam demonstrar uma clara correlação entre as respostas obtidas e a concentração do analito. Para tanto, os estudos de linearidade devem conter a inclinação, coeficiente linear e coeficiente de determinação (r^2) da reta obtida. Os resultados devem ser capazes de demonstrar que não há um desvio significativo da linearidade, ou seja, que os valores de r^2 sejam superiores a 0,99 e 0,9 segundo a ANVISA e INMETRO, respectivamente (ANVISA, 2003; RIBANI, et al., 2004.; INMETRO, 2010).

3.8.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) de um método corresponde à menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. É definido também como a menor

concentração que pode ser distinguida do sinal-ruído com certo grau de confiança. Este parâmetro pode ser basicamente calculado de três formas distintas, pelo método visual, método relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. Dentre estes métodos, o baseado nos dados obtidos da curva pode levar a resultados mais precisos, o qual pode ser calculado pela equação 18.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (18)$$

onde s pode ser estimado pelo desvio padrão do intercepto e S pelo coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

3.8.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) de um método corresponde à menor concentração do analito de interesse que é possível quantificar em uma determinada faixa de trabalho, com exatidão e precisão aceitáveis, sob condições experimentais estabelecidas. O LQ é comumente estimado de três maneiras diferentes, pelo procedimento sinal-ruído, por processos estatísticos e pelo desvio-padrão, se baseando nos parâmetros da curva, o qual pode ser calculado pela equação 19 (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (19)$$

onde s pode ser estimado pelo desvio padrão do intercepto e S pelo coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

3.8.5 Exatidão

A exatidão, também chamada de tendência, descreve a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, ou seja, a distância entre os valores esperado e o obtido. Valores baixos obtidos para o parâmetro exatidão são provenientes de erros sistemáticos que contribuem para os desvios ou tendências nos resultados. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, dentre outros: uso de material de referência certificado (CRM), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

3.8.5.1 Recuperação

Dentre os métodos de exatidão aplicados em uma metodologia de validação analítica, os ensaios de recuperação são os mais frequentemente observados, devido à dificuldade em se obterem os CRM. Nos procedimentos de recuperação é possível inferir sobre a eficiência do método de preparo de amostras, comparando-se as respostas obtidas para o padrão isento de matriz com uma matriz enriquecida com o padrão nas mesmas concentrações e posteriormente submetida ao processo de preparo de amostras (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

O cálculo da exatidão é normalmente expresso em função da porcentagem do erro relativo, na qual, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). A recuperação pode ser calculada pela equação 20:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \quad (20)$$

Em que valor obtido é a concentração/área medida do composto de interesse após fortificação da matriz isenta do analito e o valor esperado é a concentração/área obtida fortificando-se a matriz de referência (por exemplo, a água).

3.8.6 Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados independentes, repetidos de análises individuais efetuadas para uma mesma amostra em condições idênticas de trabalho. Este parâmetro pode ser avaliado pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV) (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010). A equação 21 descreve a estimativa do desvio padrão relativo:

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{M} \times 100 \quad (21)$$

na qual, s é o desvio padrão das recuperações e M é a média das recuperações. Em testes de validação de métodos, a precisão deve ser considerada em três diferentes parâmetros: intradia (repetibilidade), interdia (precisão intermediária) e intralaboratorial (reprodutibilidade) (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

3.8.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de várias análises, de um mesmo método, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Para que seja chamada repetibilidade as medições devem seguir, por exemplo, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo local (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

3.8.6.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos distintos, ou até mesmo uma combinação destes fatores. Este parâmetro dentre os parâmetros apresentados na precisão é o que apresenta maior variabilidade dos resultados dentro de um laboratório, desta forma, é aconselhável que seja adotado, com o objetivo de verificar se no mesmo laboratório, o mesmo método fornecerá resultados similares (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

3.8.6.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade se refere ao uso do mesmo procedimento analítico de uma mesma amostra, realizada sob condições variadas, ou seja, diferentes laboratórios, diferentes analistas, locais e equipamentos como parte de estudos colaborativos, e deve ser considerada como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, como por exemplo, em farmacopeias (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010).

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D. R. de; de PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1775-1783, Sept, 2008.

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, n. 1, p. 1-9, May. 2006.

BIRJANDI, A. P. et al., Speciation of butyl and phenylin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1193, n. 1-2, p. 19-25, Jun. 2008.

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, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, Sept./Oct. 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 Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de legislação**: programas nacionais de saúde animal do Brasil. Brasília, 2009. 440 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em: 17 nov. 2014.

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 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>. Acesso em: 22 out. 2015.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, S.; KEVE, S. **Peixes do pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 184 p.

CAMPONE, L. et al. Ph-controlled dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 754, n. p. 61-66, 2012.

CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

COELHO, S. R. **Produção intensiva de surubins híbridos em gaiolas: estudos de caso**. 2005. 84 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Patagem) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Luiz de Queiroz. Piracicaba.

CREPALDI, D. V. et al. O surubim na aquicultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4. p. 150-158, 2006.

DARIAS, J. L. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 1611-1618, 2010.

DIAS, J. et al. **Implementação de sistemas de qualidade e segurança dos alimentos**. 1st ed. Londrina: Midiograf II, 2010. 160 p.

DIONÍSIO, A. G. G. et al. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

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.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, Jan./Mar. 2005.

FARAJZADEH, M. A. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science**. Weinheim, v. 32, p.3191-3200, 2009.

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.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. **In: Proceedings of the ninth International Symposium in Tilapia in Aquaculture**, 1st ed. Shanghai. 2011. 409 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Food safety and quality. O estado mundial da pesca e aquicultura**. Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em: 20 out. 2015.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e Eugenol como substitutos da benzocáina na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GUÉNETTE, S. A. et al. Phamacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 226, n. 1-4, p.262-265, Jun. 2007.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365-377, 2003.

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.

HUO, X. et al. Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Six Fungicides in Fruit Samples by GC-ECD. **Chromatographia**. v. 73, n. 3-4, p. 313-9, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**, Rio de Janeiro, 2010. 35 p.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 549-566, 2003.

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; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68. n. 13, p.2236-2240, Jul. 1996.

JEANNOT, M. A; CANTWELL, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, n. 2, p. 235-239. Jan. 1997.

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.

JOFRE, V. P. et al. Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 683, n. 1, p. 126-135, Dec. 2010.

KAMATOU, G. P. et al. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013

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.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanusbidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 265-277, Jun. 2004.

KHURI, A. I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **John Wiley e Sons**, v. 2, p. 128-149, Mar./Abr. 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.

KOHLER, I. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 82-89, 2013.

KOKOSA, J. M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends Analytical Chemistry**, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. 1st ed. São Carlos, 2004. 96 p.

LEONG, M. I.; HUANG, S. D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1-2, p. 8-12, 2008.

LEONG, M. I.; HUANG, S. D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, pp. 7645-7650, nov. 2009.

LIMA, C. N.; FILHO, J. S. S. B. Escolha de tratamentos otimizados na construção de fatoriais fracionários. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 1-20, Oct./Dec. 2010.

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

LORENZO, D. et al. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 45, n. 4, p. 519-524, Dec. 2002.

MASHAYEKHI, H. A.; REZAEI, M.; Determination of ecstasy components in human urine by gas chromatography using a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 9, p. 1-6, Sep. 2012.

MASSART, D. L. et al. "Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A". v. 20A, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.

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.

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.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, p. 200-206, 2009.

MELLO, R. A. et al. Avaliação de 2-fenoxietanol e mentol como agentes anestésicos em tilápia. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2012.

MERCK, 2010. Disponível em: (<http://www.merck-chemicals.com.br/solventes-para-cromatografia-analitica-lichrosolv->).

MYERS, R. H.; KHURI, A. I.; CARTER, W. H. Response surface techniques for dual response systems. **Technometrics**, v. 15, p. 301-317, 1989.

NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR Journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 343-360, 2009.

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.

OKAMURA, D. **Influência do amido de milho no metabolismo energético do surubim (*Pseudoplatystoma spp*)**. 2009. 83 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

OLIVEIRA, J. R.; CARMO, J. L.; OLIVEIRA, K. K. C. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, Dec. 2009.

PÁDUA, S. B. de, et al. Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 143-148, Apr. 2010.

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

PAWLISZYN, J. Quantification by SPME before reaching a partition equilibrium. Ed, Applications of solid-phase microextraction. **Royal Society of Chemistry**, Letchworth, Hertfordshire, p. 22-37, 1999

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

PAWLISZYN, J. et al. Automated SPME Systems. **Handbook of Solid Phase Microextraction**, p. 135-165, 2012.

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, E. P.; GAMEIRO, A. H. Análise da tilapicultura brasileira com ênfase no comércio internacional. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, UEL, Londrina, Paraná, 22 a 25 de julho de 2007.

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, Sep. 2014.

PERETTI, A. P. R. ARAÚJO, W. M. C. Abrangência do requisito segurança em certificados de qualidade da cadeia produtiva de alimentos no Brasil. **Gestão e Produção**, São Carlos, v. 17, n. 1, p. 35-49, Feb. 2010.

PRADO, F. D. et al. Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 57-64, 2012.

PROSEN, H. ZUPANCIC-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **Trens and Analytical Chemistry**, v 18, n. 4, p. 272-282, 1999.

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.

QUEIROZ, M. E. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 11-19, 2009.

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.

REZAEI, F. et al. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**. Boston, v. 158, n. 2-3, p. 621-627, Oct. 2008.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos**. 1st ed. Campinas, 2005. 358 p.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd ed, Oxford: Blackwell Science, 2008, p. 236.

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.

SHI, Z. G.; LEE, K. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Dispersive μ -Solid-Phase Extraction for the Fast Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 1540-1545, 2010.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.

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.

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

SUPELCO Inc.; Chromatographic Products (catálogo); Supelco, Bellefonte, PA, 1996; p. 373

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./Apr. 2006.

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

VAS, L.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **J. Mass Spectrom**, v. 39, n. 3, p. 233-254, 2004.

VAZ, L. G. L. Performance do Processo de Coagulação/Floculação no Tratamento do Efluente Líquido Gerado na Galvanoplastia. Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UEOP. Dissertação de Mestrado. 2009.

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.

WHO, World Health Organization. Food Safety, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/>. Acesso em: 16 de jan. 2015.

WOODY C.A.; NELSON J.; RAMSTAD K.; Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.

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, Jun. 2007.

YAMINI, Y.; REZAEI. M.; FARAJI, M.; Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, 1217: 2342-2357, 2010.

YUAN, H. et al. Automated In-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for

the determination of selected benzodiazepines. *J Anal Toxicol.*, v. 24, p. 718, 2000.

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.

ZANG, X. H. et al. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

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

ZGOLA-GRZÉSKOWIAK, A.; KACZOREKB, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, p. 1382-1399, 2011.

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.

A fim de alcançar os objetivos estabelecidos, este trabalho apresenta, na segunda parte, os resultados obtidos por meio de artigos.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1****OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS-SPME/GC-MS USANDO DCCR
PARA DETERMINAÇÃO DE ANESTÉSICO EM PEIXE**

Bianca Mesquita Coelho Botrel^a, Daiane Cássia Pereira Abreu^a, Adelir Aparecida Saczk^{a*}, Matheus Julien Ferreira Bazana^a, Priscila Vieira e Rosa^b

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

Correspondência para o autor. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812
Endereços de e-mail: biamesquitacoelho@yahoo.com.br (B. M. C. Botrel);
daianyinha_cassia@hotmail.com (D. C. P. Abreu); adelir@dqi.ufla.br (A. A.
Saczk); matheus.julien@hotmail.com (M. J. F. Bazana);
priscila@dzo.ufla.br (P. V. Rosa)

Artigo de acordo com as normas da revista

Journal Brazilian Society Chemistry

Resumo

Neste trabalho foi realizada a determinação e quantificação residual do anestésico mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando a microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME) e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). Foram avaliadas cinco concentrações de mentol (5; 7,5; 10; 12,5 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$) em quatro diferentes períodos residuais (0, 12, 24 e 48 h). A quantidade de sal, temperatura e tempo de extração foram otimizados de forma multivariada, empregando o planejamento composto central rotacional (DCCR), para 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 quadrático. Pela análise das superfícies de resposta foi possível prever que a condição ótima de trabalho foi utilizando 3 g de sal, 20 minutos de extração e a temperatura de 50°C. Após determinadas as melhores condições de análise para o mentol, o método proposto foi validado obtendo os limites de detecção e de quantificação de 0,0152 e 0,0462 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, precisão e exatidão dentro do aceitável por órgãos regulamentadores numa faixa linear de 0,47 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, foi realizada a determinação e quantificação residual do mentol em amostras anestesiadas de tilápia, confirmando a necessidade do período residual de 48 horas para total eliminação do mentol dos tecidos dos peixes, de forma a garantir um consumo de filés do pescado isento do produto administrado na produção.

Palavras-chave: mentol, residual, tilápia do Nilo, quimiometria, miniaturização no preparo de amostras

1. Introdução

A piscicultura representa atualmente a atividade agropecuária que mais cresceu nos últimos anos.¹ Esse aumento pela procura e criação de peixes se deve principalmente pela busca da população por alimentos mais saudáveis, uma vez que, o pescado apresenta alto valor nutritivo, sendo rico em micronutrientes minerais, ácidos graxos essenciais e poliinsaturados (ômega 3 e 6), responsáveis por numerosos benefícios no organismo humano, tais como, funções estruturais nas membranas, equilíbrio homeostático e tecidos cerebrais e nervosos, além de proteínas de alto valor biológico.^{2,3}

Dentre as espécies de peixes mais consumidas e cultivadas é possível citar a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que vem se destacando com números expressivos, representando atualmente a segunda espécie mais consumida mundialmente, em decorrência a qualidade e principalmente ao sabor da carne. O cultivo dessa espécie tem substituído a pesca extrativa, tornando-a um peixe substituto para todos os tipos de peixes selvagens capturados, enfatizando seu papel fundamental na aquicultura rural, assim como na maioria dos sistemas de produção de alta tecnologia, sendo vendida em mercados nacionais e internacionais, em virtude da ampla aceitação, sendo considerada uma “galinha aquática”, pelo fato de ser tão aceita comercialmente quanto à carne de frango.⁴

Em contrapartida, em sistemas intensivos de produção, os peixes passam por situações adversas que podem acarretar em prejuízos no seu desenvolvimento, deixando-os mais susceptíveis a doenças levando-os até a morte, uma vez que são extremamente sensíveis aos processos de manejo, viabilizando a utilização de compostos químicos que sejam capazes de reduzir os danos causados aos animais. Nesse sentido, os anestésicos são utilizados de maneira promissora e possivelmente melhoram a qualidade da carne do pescado.⁵⁻⁷

Estudos apontam que os danos causados pela tricáina (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222) o único anestésico aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) são irreversíveis.⁸ Desta forma, a busca por substâncias alternativas capazes de realizar a efetiva sedação dos peixes torna-se indispensável.

O mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol, um componente encontrado no óleo essencial de plantas do gênero *Mentha* (Figura 1), tem sido empregado como alternativa aos compostos sintéticos utilizados no processo de analgesia de peixes, por apresentar características de um anestésico ideal, tais como, eficiência em baixas doses, baixa toxicidade em doses muito superiores às efetivas, disponibilidade, baixo custo, facilidade de utilização, boa margem de segurança para o usuário e o ambiente.^{7, 9,10}

No entanto, é necessário um estudo do período residual deste composto, uma vez que, pode permanecer retido no tecido do peixe por um determinado tempo, viabilizando a busca por métodos eficientes de determinação residual pós-abate. Nesse propósito, a separação, identificação e quantificação de compostos são realizadas empregando as cromatografias em fase líquida (HPLC) e em fase gasosa (GC). No entanto, a identificação de analitos em amostras contendo inúmeros componentes, como é o caso das amostras biológicas, geralmente requerem processos prévios de preparação.^{11, 12}

As técnicas inicialmente propostas para procedimentos de pré-concentração que antecedem a determinação por instrumentos analíticos, são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), no entanto, estas técnicas apresentam alguns inconvenientes, tais como, maior custo e consumo de tempo, a utilização de grande volume de solventes orgânicos que além de apresentarem custo elevado são potencialmente tóxicos.¹³⁻¹⁶

Considerando o preparo de amostras como uma das etapas críticas do processo analítico, o qual tem sido um dos principais obstáculos para a

obtenção de resultados adequados em termos de precisão e detectabilidade, diferentes métodos têm sido propostos, a fim de otimizar e propor alternativas de extração, dentre estes, a microextração em fase sólida (SPME) vem se destacando, no qual o princípio da técnica consiste na extração dos analitos presentes em amostras aquosas ou sólidas para uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente ou absorvente denominado fase extratora.¹⁷⁻²¹

Este trabalho teve como objetivo, o desenvolvimento de uma metodologia para a análise residual do mentol em filés de tilápia do Nilo, empregando a SPME como técnica de preparo de amostra, avaliando o efeito dos parâmetros, quantidade de sal, temperatura e tempo de extração, a fim de, melhorar a eficiência da extração, por meio de análises quimiométricas, utilizando o planejamento composto central rotacional (DCCR) como ferramenta estatística na otimização do processo.

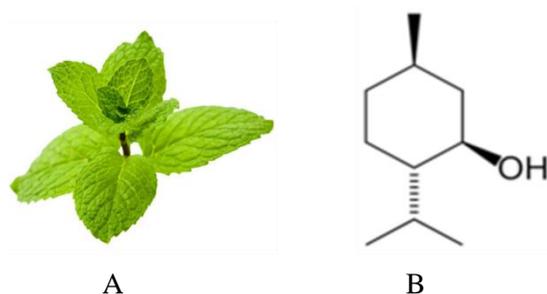


Figura 1 Aspecto geral da folha de *Mentha* (A); Estrutura química do mentol (B)

2. Experimental

2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados (mentol, acetona, sulfato de sódio) nas análises foram de grau analítico e adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). As soluções foram preparadas utilizando água Tipo 1 (ultrapura), processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). A solução

estoque de mentol foi preparada dissolvendo-se 0,01 g de mentol em 10 mL de acetona ($1 \times 10^6 \mu\text{g L}^{-1}$). As soluções utilizadas no preparo das amostras foram posteriormente preparadas por diluições. A solução estoque foi preparada diariamente e armazenada a uma temperatura de 4°C.

2.2 Instrumentação

Para realização do procedimento de microextração foi utilizado um *holder* automático equipado com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm , obtidos da Supelco. Antes das análises as fibras foram condicionadas em temperatura de 250°C por 30 minutos conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados frascos de vidro transparentes (vial) para SPME com capacidade de 20 mL (Agilent) selados com tampa com septo de PTFE ((politetrafluoretileno)/silicone) e tubos de centrífuga cônico de 50 mL com tampa HDPE, plug a prova de vazamento (Ciencor, EUA).

Para o preparo das 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/UFLA). As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas QP2010 (GC-QMS) Plus (Shimadzu - Japão). A coluna analítica utilizada foi a DB-5MS (30 m x 0,25 mm id x 0,25 μm) com composição da fase estacionária de 5% difenil-95-dimetil-polisiloxano (Shimadzu - Japão).

2.3 Preparação das amostras

2.3.1 Amostras de peixes anestesiados com mentol

Para o procedimento de analgesia, os peixes foram anestesiados por imersão em soluções de mentol nas seguintes concentrações 5; 7,5; 10; 12,5

e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, após anestesiados os peixes foram abatidos com tempos de 0, 12, 24 e 48 h. Essas concentrações e tempos de abate foram definidos com base na metodologia de estágios de anestesia e recuperação definidas para o mentol.⁹ Após o abate, os peixes foram congelados (-20°C) até o procedimento de preparo de amostra. As amostras foram fornecidas pelo Departamento de Zootecnia – Setor de Piscicultura da UFLA.

2.3.2 Preparação das amostras para otimização do método

A preparação das amostras foi uma adaptação do trabalho de Klimànková e colaboradores 2008,²¹ no qual as amostras de teste foram preparadas pesando-se 2g de tecido de tilápia isento de mentol, em um tubo de centrífuga cônico de polipropileno com capacidade de 50 mL, as matrizes foram fortificadas com mentol e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente antes da extração. Em seguida adicionou-se 2,5 mL de água às amostras, as quais foram homogeneizadas em vórtex por 5 minutos, posteriormente centrifugadas por 10 minutos a uma velocidade de $15\ 000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi transferido para um vial com capacidade de 20 mL. Este procedimento foi realizado novamente. O vial contendo 5 mL do extrato do peixe foi então submetido ao processo de microextração em fase sólida.

2.4 Otimização do método de extração do mentol por SPME

O DCCR foi empregado na otimização da metodologia de análise do mentol por HS-SPME. Na Tabela 1 estão os parâmetros e seus respectivos níveis avaliados na técnica de microextração.

Tabela 1 Parâmetros e níveis usados no DCCR

Parâmetros	Mínimo (-1)	Ponto Central (0)	Máximo (+1)
Temperatura (°C)	40	45	50
Tempo de extração (min)	20	30	40
Quantidade de sal (g)	2,0	2,5	3,0

O planejamento foi obtido pela soma de 2^k pontos fatoriais com 2k pontos axiais e 3 pontos centrais, sendo k o número de variáveis independentes, obtendo um total de 17 experimentos.^{22,23}

Para as análises 2 g de filés de tilápia isentos de anestésico foram fortificados com solução estoque de mentol na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente antes da extração.

A fim de determinar as condições mais adequadas para a análise do mentol, o sistema de extração por SPME foi otimizado pela aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta, avaliando os ajustes dos dados obtidos aos modelos: linear, interação, quadrático puro e quadrático. Para o delineamento experimental, bem como a obtenção das condições ideais do sistema, por meio da estimativa dos parâmetros estatísticos, foi empregado o programa Chemoface versão 1.4.²⁴

2.5 Procedimento de extração do mentol empregando SPME em modo *headspace*

Visando a volatilização do analito no sistema, antes do processo de extração do mentol pela fibra, as amostras (5 mL do extrato do peixe juntamente com 3 g de sal) foram submetidas a um período de estabilização por 10 minutos, com agitação de 250 rpm e temperatura de 50°C. Após a estabilização, a fibra foi exposta com uma penetração de 40 mm no *headspace* do vial. Após 20 minutos de extração, a fibra foi retraída para dentro da agulha e injetada no cromatógrafo em fase gasosa. A temperatura

do injetor foi mantida a 270°C, a fibra ficou exposta dessolvendo por 2 minutos.

2.6 Condições de análises por GC-MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás, no qual a temperatura inicial do programa foi de 80°C durante 3 min, aumentada para 130°C a uma taxa de 5°C min⁻¹ e a partir dessa temperatura aumentou-se para 250°C a uma taxa de 30°C min⁻¹, totalizando 17 minutos de corrida cromatográfica. O gás de arraste (hélio 99,999%) foi mantido a um fluxo de 1 mL min⁻¹. Foi utilizado um injetor split/splitless no modo splitless, com tempo de Split de 1 minuto. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram mantidas em 270°C, 280°C e 150°C, respectivamente. O detector do espectrômetro de massas operou em monitoramento de íon selecionado (SIM) de 5 a 17 minutos. O detector foi programado para ler as unidades de massa atômica (m/z) de 71 e 81, em uma energia eletrônica de 70 eV. A quantificação do mentol foi então realizada pela integração das áreas dos picos.

2.7 Validação do método analítico

Depois de definidas as melhores condições na metodologia de microextração, o método desenvolvido foi validado em matrizes biológicas de tecidos de peixes, fortificando-se as amostras a partir da solução estoque de mentol, resultando nas concentrações: 0,47; 0,94; 1,87; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 µg L⁻¹. 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 nos protocolos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro)²⁵ e do International Conference on Harmonisation (ICH)²⁶.

2.7.1 Seletividade

Devido à complexidade da matriz, tornou-se necessária a avaliação do efeito da matriz diante do composto estudado, desta forma, foram comparados os resultados obtidos das análises da matriz de peixe isenta de mentol e a matriz fortificada com solução estoque na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, ambas submetidas ao processo de extração por SPME.

2.7.2 Curva de calibração e LD/LQ

A curva analítica foi construída por padronização externa para a quantificação residual de mentol utilizando as condições otimizadas de amostragem por HS-SPME. A linearidade do método foi determinada pela avaliação da regressão da curva (razão da área do pico versus a concentração do composto) expressa pelo coeficiente de determinação (R^2), numa faixa dinâmica compreendida entre $0,47 - 60 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 8$). Os LD e LQ do método para o composto em estudo foram obtidos estimando-se o desvio padrão do intercepto (s) pelo coeficiente angular (S) da curva analítica, conforme equações 1 e 2, respectivamente.

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

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

2.7.3 Precisão e exatidão

A precisão intradia ($n = 3$) foi estimada por meio da realização de três extrações sucessivas, em um único dia, em três diferentes níveis de fortificação ($7,5$; 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$) do padrão de mentol nas amostras de peixe. A precisão interdia ($n = 9$) foi realizada repetindo-se a análise intradia em

três dias consecutivos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.²⁵⁻²⁷ As respostas foram expressas em termos de coeficiente de variação.

O objetivo principal da recuperação é corrigir os resultados dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração e de perdas ocasionadas durante as etapas da marcha analítica, até o momento da análise instrumental, tais como limpeza (*clean up*), diluições, pré-concentrações, derivatizações, dentre outros.²⁸ A recuperação média foi obtida pela fortificação de amostras de tecido de tilápia com solução estoque de mentol, em três níveis de concentração: 7,5; 30 e 60 µg L⁻¹. As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração por SPME e em seguida analisadas por GC-MS em triplicata para cada concentração. Após análise cromatográfica, determinaram-se as concentrações reais médias para cada nível de concentração empregando a equação da regressão linear da curva analítica referente à faixa de trabalho. Em seguida, calculou-se a recuperação (%) em cada nível de concentração (Equação 3).²⁵

$$R(\%) = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \quad (3)$$

Em que valor obtido é a concentração medida do anestésico após fortificação da matriz (filé de peixe isento de mentol) e o valor esperado é a concentração obtida fortificando-se a água deionizada, utilizada como matriz de referência, ambos os valores obtidos a partir das amostras submetidas ao procedimento de microextração e posteriormente analisadas por GC-MS.

2.8 Aplicação do método de SPME em amostras de tecido de tilápia do Nilo

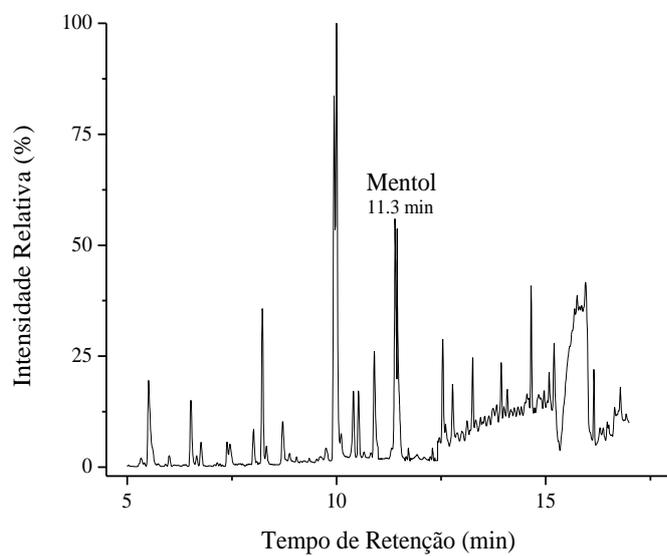
Após a validação do método analisou-se as amostras de tilápia do Nilo anestesiadas, empregando a SPME. Para tal, a extração do mentol foi

realizada em duplicata seguindo o procedimento de microextração otimizado.

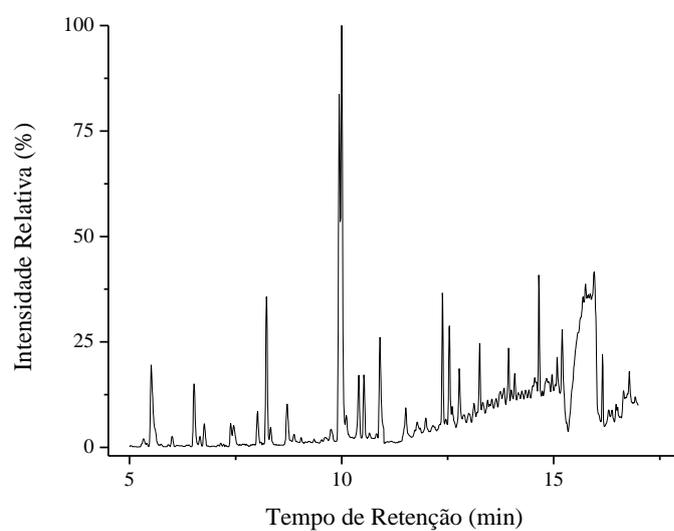
3 Resultados e discussão

3.1 Otimização do método GC-MS

A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos da extração do padrão de mentol por SPME no modo de varredura (SCAN) e modo monitoramento de íon selecionado (SIM), respectivamente.



A



B

Figura 2 Cromatogramas obtidos no modo monitoramento de varredura (SCAN) para o extrato de filé de tilápia: A) fortificado com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução estoque de mentol; B) sem a fortificação, ou seja, na ausência de anestésico.

O método proposto apresentou excelente seletividade, não havendo interferência da matriz no pico referente ao mentol. O que foi confirmado, uma vez que, não houve sobreposição de picos referentes a componentes presentes no tecido do peixe com o pico referente ao mentol, permitindo que o modo SIM fosse utilizado nas análises subsequentes (Figura 2).

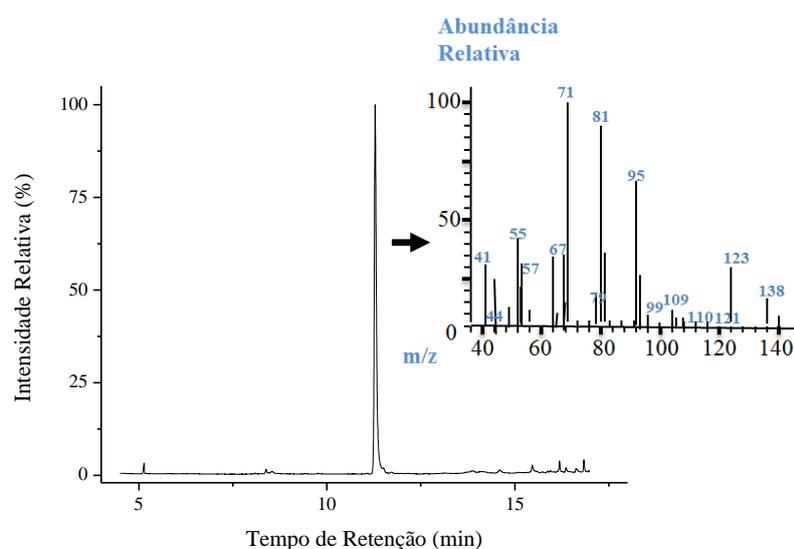


Figura 3 Cromatograma obtido no modo monitoramento de íon selecionado (SIM) para o extrato de filé de tilápia fortificado com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução estoque de mentol.

Desta forma, foram selecionados os íons 71 e 81 m/z , uma vez que, foram os íons que apresentaram maior intensidade, conforme pode ser observado na Figura 4.

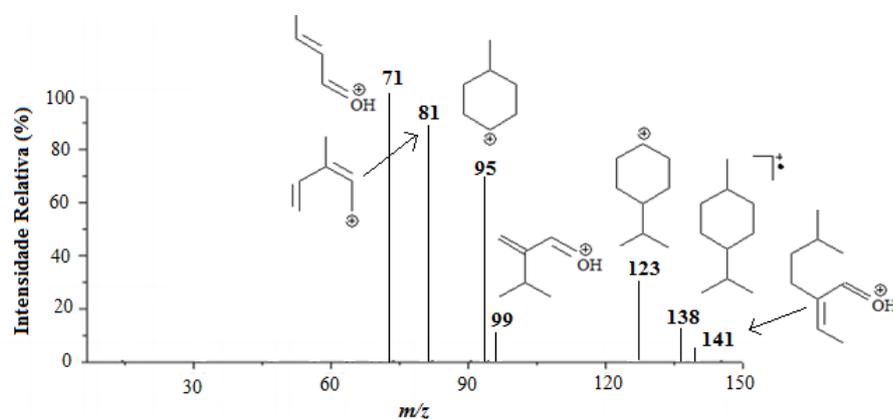


Figura 4 Espectro de massas do mentol com prováveis estruturas geradas a partir das fragmentações de maior estabilidade

Fonte: Própria autora

No caso do mentol, o pico referente ao íon molecular (156 m/z) nem apareceu no espectro por causa da sua instabilidade, o que é característico dos álcoois secundários, moléculas bastante frágeis, que apresentam uma fragmentação rápida, desta forma, ele não foi selecionado como um dos íons precursores.²⁹ Na Figura 5 está representado o mecanismo de fragmentação proposto para o mentol.

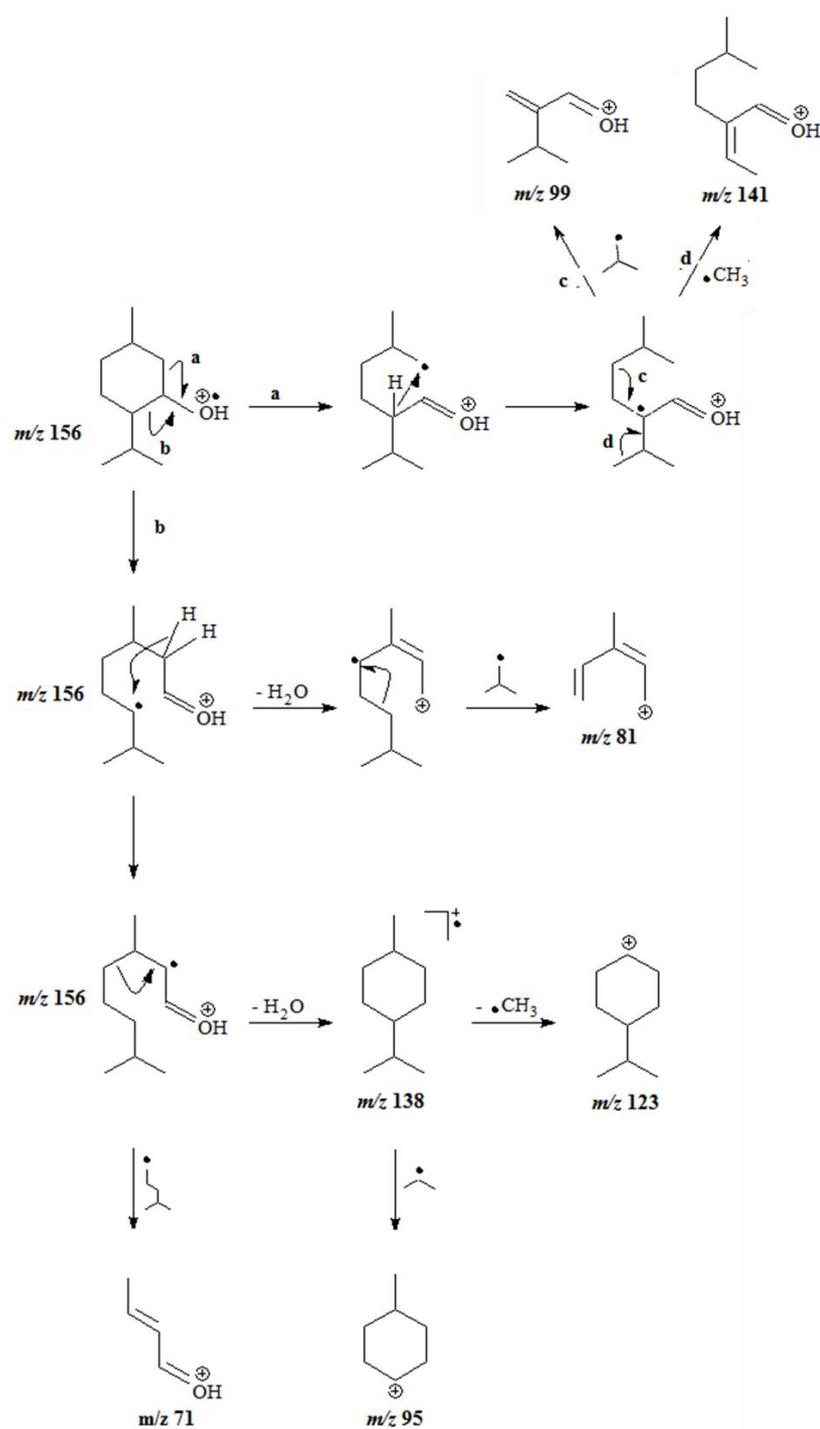


Figura 5 Mecanismo de fragmentação proposto para o mentol
 Fonte: Própria autora

3.2 Seleção do revestimento da fibra

A utilização da fibra mais adequada depende tanto do composto de interesse como da matriz estudada, tornando o revestimento da fase extratora em SPME um dos fatores mais importantes para avaliar a eficiência da extração, devido à forte dependência da natureza química da substância a ser extraída, que é estabelecida por sua polaridade e volatilidade característica.³⁰⁻³³

A seleção do melhor tipo de revestimento de fibra na extração HS-SPME de mentol, tem sido previamente estudada em óleos naturais e sintéticos³⁴, produtos alimentícios e farmacêuticos³⁵, alimentos³⁶, cremes³⁷, no entanto, não existem trabalhos relacionados com sua determinação em peixes. Porém, nos trabalhos reportados, a fibra PDMS apresentou eficiência na extração do composto mentol, portanto, nas análises subsequentes foi empregada esta fibra.

Optou-se por trabalhar com extração por *headspace*, garantindo a durabilidade da fibra, uma vez que, as análises foram realizadas em matriz biológica e em modo de imersão direta os constituintes do tecido dos peixes poderiam danificar a fibra, ao ficarem adsorvidos irreversivelmente na superfície do revestimento da mesma.

3.3 Dessorção da fibra

O tempo e a temperatura de dessorção da fibra no injetor são os parâmetros de fundamental importância na análise por SPME, pelo fato de que, com o aumentar da temperatura, a afinidade do composto pela fibra diminui ocorrendo a dessorção, que é o processo inverso. Desta forma, torna-se necessário um tempo menor de exposição da fibra no injetor, conseqüentemente o efeito memória entre as corridas é minimizado, aumentando a exatidão do método.³⁸

Considerando a teoria de que a temperatura do injetor deve ser aproximadamente 50°C acima da temperatura de ebulição do composto (mentol 212°C), a temperatura do injetor foi fixada em 270°C durante as análises cromatográficas (temperatura dentro do recomendado pelo fabricante da fibra). O tempo de dessorção adotado foi 2 minutos, visto que, neste tempo, não foi observado efeito de memória entre corridas.

3.4 Análise multivariada dos fatores que afetam a SPME

A fibra de PDMS foi utilizada para avaliar o efeito dos parâmetros que afetam a eficiência da técnica de SPME (quantidade de sal, temperatura e tempo de extração) a fim de maximizar o rendimento da extração de mentol em filés de tilápia. Os experimentos foram conduzidos empregando o DCCR, com o intuito de avaliar não só o efeito destes parâmetros na análise residual de mentol em filés de tilápia, como também, a interação entre eles. Foram realizadas três repetições do ponto central, com o objetivo de estimar o erro experimental. Na Tabela 2 estão os resultados obtidos em área para os 17 ensaios do planejamento estatístico.

Tabela 2 Condições experimentais e resultados obtidos (áreas) a partir do planejamento DCCR para a análise do mentol em filés de tilápia

Ensaio	Temperatura de extração (°C) (X1)	Tempo de extração (min) (X2)	Sal (g) (X3)	Área (u.a.) (Y)
1	40	20	2,0	28018293
2	40	20	3,0	31539019
3	40	40	2,0	29406824
4	40	40	3,0	45238473
5	50	20	2,0	31002740
6	50	20	3,0	55270163
7	50	40	2,0	30892215
8	50	40	3,0	50925935
9	36,6	30	2,5	36499642
10	53,4	30	2,5	49284809
11	45	13,15	2,5	36982443
12	45	46,49	1,66	39995641
13	45	30	3,34	23472471
14	45	30	2,5	24685702
15	45	30	2,5	29162014
16	45	30	2,5	28766639
17	45	30	2,5	28932569

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, foi possível averiguar a influência de cada parâmetro estudado. O diagrama de Pareto (Figura 6) foi utilizado para demonstrar a contribuição de cada um desses parâmetros na eficiência da extração do mentol. No gráfico é possível visualizar uma barra para cada fator de combinações avaliadas bem como as suas interações, que são ordenadas da mais para a menos significativa.

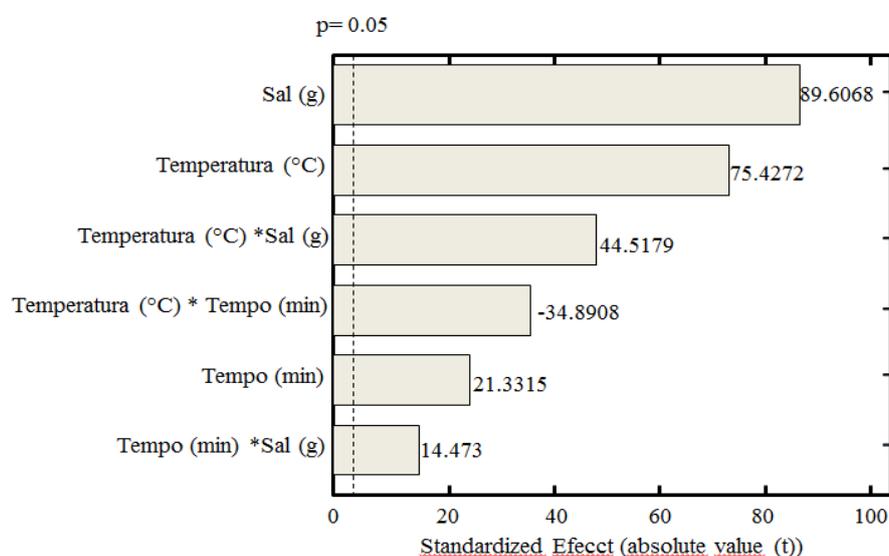


Figura 6 Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto

Analisando o gráfico 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 efeitos, pode-se salientar que valores positivos de efeitos estimados correspondem a um aumento no sinal analítico quando a variável segue para seu nível máximo. Enquanto valores negativos indicam que os maiores sinais analíticos são obtidos quando as variáveis são empregadas nos seus níveis inferiores. Em relação às interações, os valores positivos indicam que ocorre aumento no sinal analítico quando ambas as variáveis forem na mesma direção, já os valores negativos indicam que o sinal analítico aumenta quando os níveis das variáveis seguem em direções contrárias.

Analisando-se os parâmetros individualmente, a quantidade de sal aparece como o fator que exibe maior influência sobre a extração do mentol, melhorando a sensibilidade do método analítico. O aumento na quantidade de sal melhora a eficiência da extração e a sensibilidade de métodos

analíticos, uma vez que, o sal modifica a solubilidade do analito, que geralmente diminui com o aumento da força iônica, facilitando sua difusão para o *headspace*. Desta forma, a constante de distribuição dos analitos entre a fase extratora e a amostra tende a aumentar, devido ao aumento da concentração do analito no *headspace* da amostra, o que pode ser atribuído ao aumento da constante de Henry para o analito, que relaciona a pressão de vapor de equilíbrio de uma substância com sua concentração na fase condensada.^{39 - 42}

O parâmetro, temperatura, exibe considerável influência na análise do mentol pela técnica de SPME. De acordo com trabalhos reportados na literatura, a temperatura de extração é um parâmetro importante em qualquer procedimento de extração, por afetar a velocidade de transferência de massa dos analitos. O aumento da temperatura de extração ocasiona no aumento da difusão dos analitos em direção a fibra, diminuindo o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio de partição entre a amostra e a fase extratora.^{39, 40} Este efeito pode ser explicado, pelo aumento na volatilidade do mentol, que tende a migrar para a fibra extratora, por apresentar maior afinidade pela composição do revestimento da mesma.³⁷ Além disso, a temperatura de extração pode melhorar de maneira significativa a eficiência da extração por HS-SPME, devido à sua forte influência sobre a pressão de vapor de compostos voláteis no *headspace* da amostra.^{43 - 47}

O tempo de extração também apresentou efeito positivo na estimativa dada pelo gráfico de Pareto, no entanto, exibiu uma das menores influências no processo de extração do composto avaliado. A análise das interações entre os parâmetros também mostrou significância positiva, indicando que em ambas as variáveis os níveis máximos favorecem a extração do mentol, exceto a interação entre a temperatura e o tempo de extração que apresentou efeito negativo. Trabalhos na literatura reportam que o aumento da temperatura de extração diminui o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio de partição entre os analitos e a fase extratora.^{47 - 50}

3.4.1 Análise por Superfície de Resposta

A fim de determinar as condições mais adequadas para a análise do mentol em matriz de peixe, o sistema de extração por SPME foi otimizado pela aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta. No qual, a qualidade do ajuste da resposta foi avaliada pela análise de variância (Tabela 3), apresentando regressões significativas para o modelo quadrático, com coeficiente de determinação (R^2) maior que 80% e probabilidade de significância (p) menor que 5%, indicando aplicabilidade do modelo na microextração do mentol.^{51,52}

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

	SQ	GL	QM	F cal	p-valor
Regressão	1,2344x10 ¹⁵	9	1,3715x10 ¹⁴	3,9515	0,0418
Residual	2,4296x10 ¹⁴	7	3,4709x10 ¹³		
Falta de Ajuste	2,4289x10 ¹⁴	5	4,8577x10 ¹³	1,2324x10 ³	8,1096x10 ⁻⁴
Erro Puro	7,8833x10 ¹⁰	2	3,9417x10 ¹⁰		
Total	1,4773x10 ¹⁵	16			
R^2	0,8355				

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio;
 F_{cal} = Teste de Fisher; p-valor = probabilidade de significância.

Portanto, o modelo quadrático pode ser descrito matematicamente pela equação de segunda ordem (4), no qual, os coeficientes do modelo e a respectiva significância de cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4. Todos os parâmetros, suas interações e os termos ao quadrado apresentaram significância com 95% de confiança.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

Em que y é a resposta predita; β_0 , é o ponto de interseção; b_{ij} , o coeficiente de interação, b_i , o coeficiente linear, b_{ii} , o coeficiente quadrático, k , é o número de fatores, x_i e x_j são as variáveis referentes aos fatores e ϵ , o erro associado com o modelo.

Tabela 4 Coeficientes e testes de significância das variáveis obtidas para a microextração do mentol

Termo	Coefficiente	Erro	T	p-valor
b_0	$4,9845 \times 10^8$	$6,7496 \times 10^6$	73,8489	$1,8331 \times 10^{-4}$
X_1	$-2,0385 \times 10^7$	$2,2832 \times 10^5$	-89,2816	$1,2543 \times 10^{-4}$
X_2	$-5,1174 \times 10^5$	$8,0686 \times 10^4$	-6,3424	0,0240
X_3	$-2,8240 \times 10^7$	$1,7843 \times 10^6$	-15,8266	0,0040
$X_1 * X_2$	$-4,8982 \times 10^4$	$1,4039 \times 10^3$	-34,8908	$8,2043 \times 10^{-4}$
$X_1 * X_3$	$1,2499 \times 10^6$	$2,8077 \times 10^4$	44,5179	$5,0420 \times 10^{-4}$
$X_2 * X_3$	$2,0318 \times 10^5$	$1,4039 \times 10^4$	14,4730	0,0047
X_1^2	$2,1711 \times 10^5$	$2,3652 \times 10^3$	91,7922	$1,1866 \times 10^{-4}$
X_2^1	$3,8710 \times 10^4$	591,3048	65,4646	$2,3326 \times 10^{-4}$
X_3^2	$-4,8949 \times 10^6$	$2,3652 \times 10^5$	-20,6955	0,0023

X_1 = Temperatura; X_2 = Tempo de extração; X_3 = Quantidade de sal

Na Figura 7 estão representadas as superfícies de resposta das interações entre as variáveis estudadas. Na qual estão apresentados três gráficos em terceira dimensão, sendo as respostas obtidas para as áreas representadas pelo eixo z e os efeitos das variáveis analisadas nos eixos x e y.

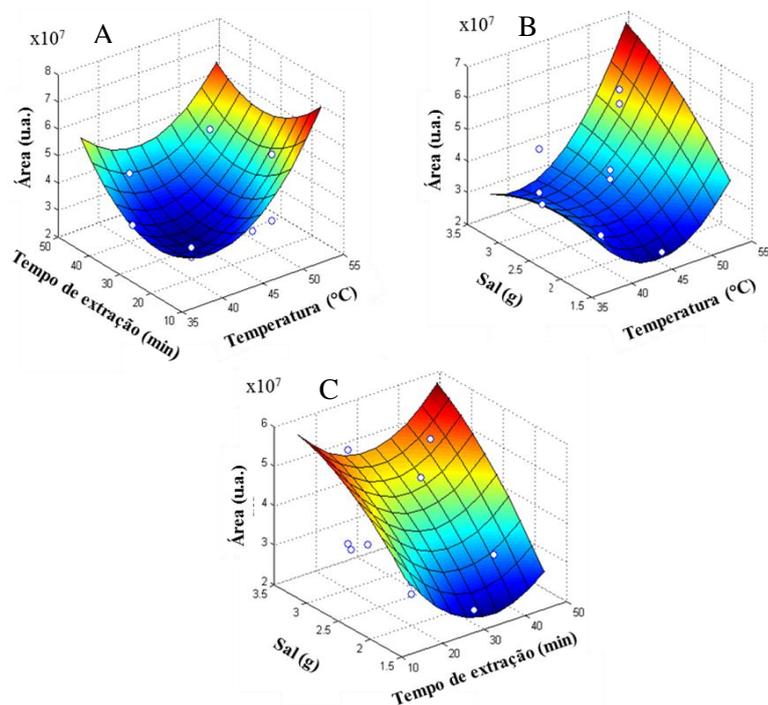


Figura 7 Gráficos das superfícies de respostas da área *versus* o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se 3,0 g de sal; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de 20 minutos; C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 50°C

É possível observar que as respostas maximizadas para a extração do mentol foram com tempo de extração de 20 minutos, temperatura de extração mais elevada, 50°C e uma quantidade superior de sal, 3 g, confirmando o que observado no gráfico de Pareto. Frente ao exposto, estas foram definidas como as condições otimizadas para a extração e análise de mentol em filés de peixes para as análises subsequentes.

3.5 Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica é uma etapa muito importante por assegurar a utilização ótima dos recursos analíticos.^{53, 54} No presente trabalho, as figuras de mérito foram avaliadas em termos de seletividade,

linearidade, exatidão (recuperação relativa), precisões intra e interdia, LD e LQ,²⁵⁻²⁸ utilizando os parâmetros de HS-SPME otimizados.

O método proposto apresentou boa seletividade, uma vez que, não foram observados picos coincidentes entre a matriz (filé de tilápia) isenta de mentol e a matriz fortificada com solução estoque do anestésico, comprovando que as respostas do analito não sofrem interferência de outros componentes da matriz.

Para o estudo de linearidade da metodologia desenvolvida para determinação residual de mentol em filés de tilápia empregou-se o método de padronização externa. O intervalo linear de trabalho obtido foi de 0,47 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir do qual foi construída a curva analítica (Figura 8).

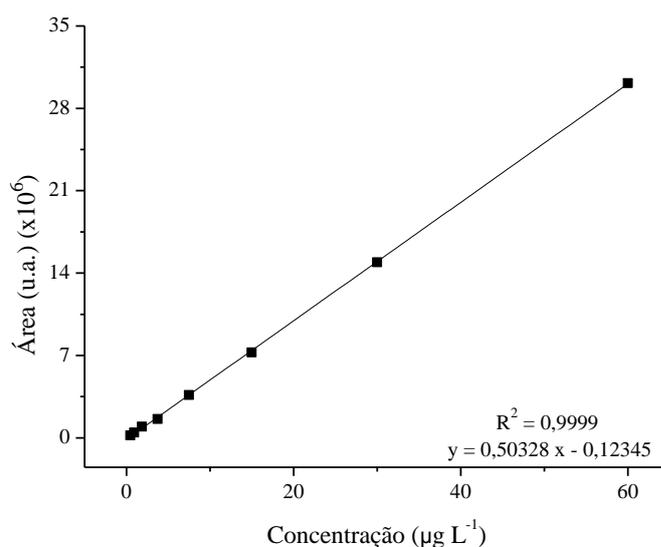


Figura 8 Curva analítica obtida para o mentol em tecido de tilápia por extraído SPME

O coeficiente de determinação encontrado foi de 0,9999, indicando forte correlação linear entre as concentrações e as áreas. Os LD e LQ encontrados foram de 0,0152 e 0,0462 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Quando comparado a outro estudo de anestésico em peixes o valor de LD encontrado

mostra-se menor. Abreu (2015)⁵⁵, usando SPME e GC-MS, obteve LD para 2-fenoxietanol de $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os valores de coeficiente de variação (CV) encontrados para a precisão intradia, nos três níveis de concentração analisados (7,5; 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$), foram 2,6%, 0,73% e 0,77%, respectivamente. Os resultados obtidos para a precisão interdia (7,5; 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$), foram 3,33%, 2,00% e 1,55%, respectivamente.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, nos mesmos três níveis de concentração avaliados para a precisão (7,5; 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$) e os valores encontrados foram respectivamente, 91,44%, 103,67% e 86,84% e seus respectivos coeficientes de variação foram 4,46%, 3,27%, 1,92%.

3.6 Aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de mentol em filés de tilápia

As análises das amostras reais de filés de tilápia foram conduzidas de modo a verificar o tempo residual do mentol no tecido do pescado, para cada concentração e tempo de abate, foram avaliados dois peixes. A Figura 9 representa os resultados das médias obtidas nas análises das amostras dos peixes nos diferentes períodos residuais avaliados.

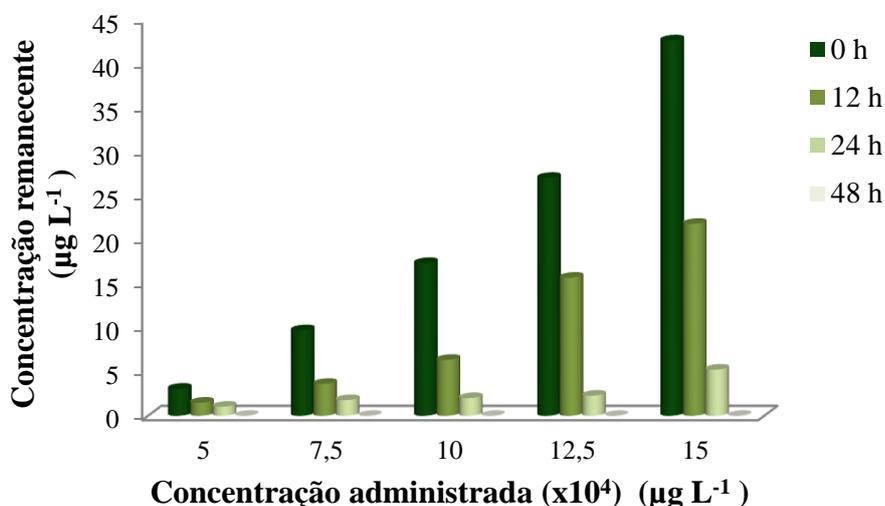


Figura 9 Concentrações residuais de mentol determinadas em filés de tilápia em diferentes tempos de depuração

Com base na Figura 8, observa-se que no período de 24 h foram detectadas concentrações remanescentes de mentol para todas as amostras de peixes analisados, ou seja, não houve total eliminação do composto pelo organismo dos animais no período de 24 h pós-anestesia. Enfatizando que, para um consumo pós-manejo seguro é necessário que os peixes sejam submetidos a um período residual de no mínimo 48 h.

4 Conclusão

Este trabalho descreve o desenvolvimento, validação e otimização de uma metodologia de HS-SPME/GC-MS para a determinação residual de mentol em filés de tilápia do Nilo. A utilização da quimiometria na otimização dos parâmetros de extração contribuiu para a redução do tempo de análise e também ajudou na determinação das condições ótimas, possibilitando o desenvolvimento de um método simples e rápido, permitindo a detecção do mentol de forma maximizada quando se trabalhou nas condições, tempo de extração de 20 minutos, temperatura de 50°C e 3 g

de sal. A metodologia de SPME combinada com GC-MS permitiu a quantificação residual do mentol em filés de tilápia, proporcionando boa repetibilidade do método, além de alta taxa de recuperação no processo de extração. Pelo método proposto, no período de 48 h não foram encontradas quantidades detectáveis de mentol, garantindo consumo pós-manejo seguro do pescado nesse período.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Ao Centro de Análises e Prospecção Químicas (CAPQ) pela realização das análises cromatográficas, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Departamento de Zootecnia da UFLA pelo fornecimento das amostras de peixe e a Rede Mineira de Química (RMQ).

Referências

[1] ZIMMERMANN, S. Estado atual e tendências da moderna aquicultura. In: *Fundamentos da Moderna Aquicultura*. MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMERMANN, S. Canoas: ULBRA, **2001**, p.191.

[2] LIRA, G. M.; MANCINI FILHO, J.; SANT'ANA, L. S.; TORRES, R. P.; OLIVEIRA, A. C.; OMENA, C. M. B.; SILVA NETA, M. L. *Rev. Bras. Cien. Farmac.* **2004**, *40*, 529.

- [3] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil*. Brasília, **2009**. 440 p.
- [4] LIPING, L.; FITZSIMMONS, K; Better science, better fish, better life proceedings of the ninth International symposium on Tilapia in aquaculture. Shanghai Ocean University, Shanghai, China **2011**, 409 p.
- [5] ROSS, LG; ROSS, B. *Anesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, **1999**, p. 176.
- [6] BURKA, JF; HAMMELL, KL; HORSBERG, TE; JOHNSON, GR; RAINNIE, DJ; SPEARE, DJJ; *J. Vet. Pharm. Therap.* **1997**, *20*, 333.
- [7] MGBENKA, BO; EJIOFOR, EN; *Journal of Applied Aquaculture*. **1998**, *8*, 73.
- [8] DAVIS, MW; STEPHENSON, J; NOGA, EJ; CAROLINA, N; STREET, H; *Journal of Aquatic Animal*. **2008**, *20*, 86.
- [9] ROSS, LG; ROSS, B. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed, Oxford: Blackwell Science, **2008**, p. 236.
- [10] ROUBACH, R; GOMES, LC; FONSECA, FAL; VAL, AL; *Aquaculture Research*. **2005**, *36*, 1056.
- [11] FAÇANHA, MF; GOMES, LC; *Acta Amazônica*. **2005**, *35*, 71.
- [12] GILAR, M; BOUVIER, ESP; COMPTON, BJ; *J. Chrom. A*. **2001**, *909*, 111.
- [13] QUEIROZ, SCN; COLLINS, CH; JARDIM, ICSF; *Química Nova*, **2001**, *24*, 68.
- [14] PSILLAKIS, E; KALOGERARAKIS, N. *J. Chrom. A*. **2001**, *938*, 113.
- [15] CHISVERT, A; ROMÁN, IP; VIDAL, L; CANALS, A. *J. Chrom. A*. **2009**, *1216*, 1290.
- [16] WU, HF; KAILASA, SK; YAN, JY; KU, HY; *J. Ind. Eng. Chem.* **2014**, *20*, 2071.
- [17] PINHEIRO AS; ANDRADE, JB; *Talanta*, **2009**, *79*, 1354.
- [18] VUCKOVIC, D; ZHANG, X; CUDJOE, E; PAWLISZYN, J; *J. Chrom. A*. **2010**, *1217*, 4041.

- [19] RAMOS, MA; PÉREZ, LMR; CURBELO, MAG.; BORGES, JH; *J. Chrom. A.* **2011**, 1218, 7415.
- [20] SANTANDER, R; CREIXELL, W; SÁNCHEZ, E; TOMIC, G; SILVA, JR; ACEVEDO, CA; *Food Bioprocess Technol.* **2013**, 6, 3345.
- [21] KLIMÁNKOVÁ, E. et al. *Talanta*, **2008**, 75, 1082.
- [22] STALIKAS, C; FIAMEGOS, Y; SAKKAS, V; ALBANIS, T. *J. Chrom. A.* **2009**, 1216, 175.
- [23] STOYANOV, KS; WALMSLEY, AD; Response surface modelling and experimental designs. In P. Gemperline (Ed.), *Practical guide to chemometrics* (2nd ed. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis. **2006**.
- [24] NUNES, CA; FREITAS, MP; PINHEIRO, ACM; BASTOS, SC; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 2003.
- [25] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008*. Rio de Janeiro, **2010**. 35 p.
- [26] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). *Validation of Analytical Text and Methodology, Q2(R1)*, **2005**, 17 p.
- [27] EURACHEM WORKING GROUP. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, **2014**. Ed. 2nd
- [28] MINISTÉRIO AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Guia de validação e controle de qualidade analítica. Fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários*. **2011**. Ed. 1st
- [29] SILVERSTAIN, RM; WEBSTER, FX; KIEMLE, DJ; *Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos*, **2010**, 7th ed.
- [30] MENDES, B; GONÇALVES, J; CÂMARA, J; *Talanta*. **2012**, 88, 79.
- [31] OLIVEIRA, JM; FARIA, M; SÁ, F; BARROS, F; ARAÚJO, IM; *Analytica Chimica Acta.* **2006**, 563, 300.
- [32] PERESTRELO, R; CALDEIRA, M; RODRIGUES, F; *J. Sep. Sci.* **2008**, 1841.

- [33] FERREIRA, L; PERESTRELO, R; CALDEIRA, M; CAMARA, JS; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1875.
- [34] COLEMAN, WM; LAWSON, SN; *J. Chrom. Sci.* **1998**, *36*, 401.
- [35] LIGOR, M; BUSZEWSKI, B. *J. Chrom. A.* **1999**, *847*, 161.
- [36] LIGOR, M; WÓJCIK, J; BUSZEWSKI, B. *Polish Journal of food and nutrition sciences.* **2004**, *13*, 355.
- [37] FIORI, J; NALDI, M; GOTTI, R. *Chromatographia*, **2010**, *72*, 941.
- [38] PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [39] PEÑALVER, A; POCURULL, E; BORRULL, F; MARCÉ, RM; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 557.
- [40] LORD, H; PAWLISZYN, J; *J. Chrom. A.* **2000**, *902*, 17.
- [41] PIZARRO, C; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N; GONZÁLEZ-SÁIZ, JM; *J. Chrom. A.* **2010**, *1217*, 6013.
- [42] YANG, X; PEPPARD, T; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925.
- [43] CARASEK, E; PAWLISZYN, J; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8688.
- [44] TAT, L; COMUZZO, P; STOLFO, I; BATTISTUTTA, F; *Food Chemistry.* **2005**, *93*, 361.
- [45] SPICHIGER, M; MÜHLBAUER, RC; BRENNEISEN, R; *J. Chrom. B.* **2010**, *799*, 111.
- [46] PELLATI, F; BENVENUTI, S; YOSHIZAKI, F; BERTELLI, D; ROSSI, MC; *J. Chrom. A.* **2005**, *1087*, 265.
- [47] ZHANG, C; QI, M; SHAO, Q; ZHOU, S; FU, R; *J. Pharm. Biom. Anal.* **2007**, *44*, 464.
- [48] JIA, M; ZHANG, H; MIN, D; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2744.
- [49] BUDZIAK, D; MARTENDAL, E; CARASEK, E; *J. Chrom. A.* **2007**, *1164*, 18.

- [50] CHATTERJEE, S; KUMAR, A; BASU, S; DUTTA, S; *Chem. Engin. J.* **2012**, *181*, 289.
- [51] TEÓFILO, RF; FERREIRA, MMC; *Química Nova*, **2006**, *29*, 338.
- [52] MATEUS, NB; BARBIN, D; CONAGIN, A; *Acta Scientiarum.* **2001**, *23*, 1537.
- [53] CHAN, CC; *Quality Assurance Journal.* **2011**, *14*, 61.
- [54] CHAN, CC. Analytical method validation: Principles and practices. In S. C. Gad (Ed.), **2008**, *Pharmaceutical manufacturing handbook: Regulations and quality* (pp. 727–742). Hoboken, NJ: John Wiley.
- [55] ABREU, D. C. P. Determinação residual de 2-fenoxietanol em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) por técnicas de microextração acopladas ao GC-MS. 2015. 127 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

ARTIGO 2**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO RESIDUAL DO ANESTÉSICO MENTOL
EM FILÉS DE TILÁPIA POR SDME/GC-MS**

Bianca Mesquita Coelho Botrel ^a, Daiane Cássia Pereira Abreu ^a, Adelir Aparecida Saczk ^{a*}, Matheus Julien Ferreira Bazana ^a, Sabrina Mesquita Coelho ^a, Priscila Vieira e Rosa ^b, Zuy Maria Magriotis ^a, Rafael Machado Félix de Lima ^a

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

Correspondência para o autor. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812
Endereços de e-mail: biamesquitacoelho@yahoo.com.br (B. M. C. Botrel); daianyinha_cassia@hotmail.com (D. C. P. Abreu); adelir@dqi.ufla.br (A. A. Saczk); matheus.julien@hotmail.com (M. J. F. Bazana); sabrina10mcoelho@yahoo.com.br (S. M. Coelho); priscila@dzo.ufla.br (P. V. Rosa); zuy@dqi.ufla.br (Z. M. Magriotis); rafaelmachadolima@hotmail.com (R. M. F. de Lima)

Artigo submetido à revista **Food Chemistry**

Resumo

O método rápido e simples de microextração com gota única e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (SDME/GC-MS) foi empregado na determinação residual do anestésico mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol em filés de peixes da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). O solvente extrator utilizado foi o octano, com volume de 1,8 μL , sendo a extração realizada pelo *headspace* da amostra. Os parâmetros, temperatura, tempo de extração e quantidade de sal foram otimizados para obtenção da melhor sensibilidade da metodologia de forma multivariada, empregando o delineamento composto central (DCCR) e de acordo com os dados obtidos todas as variáveis e suas interações mostraram-se significativas no processo. A análise de ajuste para as superfícies de resposta indicou que a regressão foi significativa para o modelo quadrático. A análise das superfícies de resposta determinou que a condição ideal de trabalho foi tempo de extração de 15 minutos, temperatura de 30°C e 3 g de sal. A metodologia desenvolvida apresentou recuperação de aproximadamente 94%, seletividade e linearidade adequadas, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9997. Os limites de detecção e quantificação do analito foram de 0,0206 e 0,0625 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Foram analisadas amostras de filés de peixes anestesiados com cinco concentrações de mentol compreendidas entre 5×10^4 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, com tempos de abate de 0, 12, 24 e 48 horas. Confirmou-se a necessidade do período residual de 48 horas, para total metabolização do mentol no organismo dos peixes.

Palavras-chave: análise residual, aquicultura, quimiometria, segurança dos alimentos

1.Introdução

Dentre as espécies de peixes mais produzidas e consumidas mundialmente, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca, em decorrência de sua excelente adaptação em diferentes sistemas intensivos de cultivo, associado a sua alta aceitação pelo mercado consumidor. Com a intensa atividade do cultivo de pescado, os peixes são expostos a diversos fatores estressantes durante o processo de manejo, ocasionando em maior susceptibilidade a doenças patogênicas e infecciosas (Yukihiro, Saita & Gonçalves, 2008).

Neste contexto, a utilização de anestésicos auxilia na redução destes efeitos. Uma das hipóteses do mecanismo de ação dos anestésicos está relacionada com a atividade neurológica, por interagir com neurotransmissores inibidores do sistema nervoso central, causando anestesia, reduzindo os movimentos respiratórios e os batimentos cardíacos (Yang et al., 2003; Ross & Ross, 2008).

A tricafina (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222) é o único anestésico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) usado na piscicultura (Façanha & Gomes, 2005; Simões & Gomes, 2009). No entanto, este anestésico, se administrado em altas dosagens e em pH alcalino, pode ocasionar lesões nas córneas dos peixes, podendo levar a formação de câncer, além do alto custo deste reagente (Davis, Stephenson, Noga, Carolina & Street, 2008).

O mentol é um dos constituintes do óleo essencial extraído de plantas do gênero *Mentha* e apresenta potencial como anestésico, por possuir propriedades anestésicas e anti-inflamatórias, além de fácil utilização, ampla disponibilidade em farmácias de manipulação, baixo custo e boa margem de segurança, tornando-o uma alternativa interessante na sedação de peixes (Davis, Stephenson, Noga, Carolina & Street, 2008; Façanha & Gomes, 2005; Lorenzo, Paz, Dellacassa, Davies, Vila & Canigüeral, 2002). Entretanto, não existem protocolos para a sua utilização, pelo fato da

concentração, tempo de indução e recuperação anestésica, ainda não terem sido determinados (Façanha & Gomes, 2005).

Durante o processo de produção, os anestésicos podem se acumular no organismo dos peixes persistindo por um determinado tempo, sendo este denominado período residual. A determinação errada do período residual ou o desrespeito desse período para o abate do animal são os principais responsáveis pela contaminação dos alimentos. Desta forma, a análise residual destes compostos torna-se uma ferramenta importante para a definição de regulamentos que envolvam desde os parâmetros de aplicação até o abate e o processamento do pescado, definindo margens seguras para o consumo pós-manejo (Melo, Costa, Nóbrega & Ferreira, 2005).

Para a determinação e quantificação de anestésicos na carne do pescado, usualmente são empregadas as técnicas cromatográficas, no entanto, a identificação de compostos presentes em matrizes complexas como o tecido do peixe requer processos prévios de preparação (extração e pré-concentração). Neste sentido, novas técnicas foram desenvolvidas tomando como princípio à miniaturização da extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), técnicas tradicionalmente utilizadas em procedimentos de pré-concentração prévios às determinações por instrumentos analíticos, mas que, apresentam algumas desvantagens, como a utilização de grande volume de solventes orgânicos que além de apresentarem custo elevado são potencialmente tóxicos (Pinheiro & Andrade, 2009; Chisvert, Román, Vidal & Canals, 2009; Wu, Kailasa, Yan, Chin & Ku, 2014).

Dentre as técnicas miniaturizadas de extração e pré-concentração, destaca-se a microextração com gota única (SDME), por reduzir significativamente o consumo de solventes orgânicos, apresentar simplicidade de operação e boa relação custo-eficácia. Na SDME, a fase extratora consiste em uma microgota de solvente orgânico, suspensa por uma microsseringa, na qual, a extração e pré-concentração ocorre pela difusão

dos analitos da amostra para a fase extratora (Allothman, Dawod, Kim & Chung, 2012; Jeannot, Przyjazny & Kokosa, 2010).

Desta forma, o intuito deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica empregando a SDME/GC-MS na determinação residual de mentol em filés de tilápia do Nilo, utilizando o Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) como ferramenta estatística na otimização do processo.

2. Experimental

2.1 Reagentes e soluções

O mentol (99,0%), acetato de etila (99,7%), octano (99,9%), tolueno (99,9%), hexano (95,0%) e sulfato de sódio (99,0%) utilizados nas análises foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

A solução estoque de mentol foi preparada dissolvendo-se 0,01 g de mentol em 10 mL de acetato de etila ($1 \times 10^6 \mu\text{g L}^{-1}$). Para as soluções utilizadas no preparo das amostras foram realizadas diluições da solução estoque em água, resultando em concentrações na faixa de 1,56 – 120 $\mu\text{g L}^{-1}$. A solução estoque foi armazenada a uma temperatura de 4°C, sendo preparada uma nova solução a cada dia.

2.2 Materiais e Instrumentação

Para o procedimento de microextração foi utilizada uma microseringa com capacidade de 10 μL com agulha tipo 2, modelo 701 N adquirida da Hamilton (Bonaduz-Suíça). Foram utilizados frascos de vidro transparentes (vials) com capacidade de 10 mL selados com tampa com septo de PTFE (politetrafluoretileno/silicone), adquiridos da Agilent (EUA).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás QP2010 GC Plus (Shimadzu - Japão) acoplado com um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (GC-QMS) do Centro de Prospecção e Análise Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras. A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna analítica DB-5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme), composição da fase estacionária 5% difenil-95-dimetilpolisiloxano (Shimadzu - Japão).

2.3 Preparação das amostras

2.3.1 Amostras de peixes anestesiados com mentol

Para a quantificação residual do anestésico nos filés de tilápia foram utilizados peixes submetidos ao processo de anestesia por imersão em soluções nas concentrações de mentol de: 5; 7,5; 12,5 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, e período residual para o abate de 0, 12, 24 e 48 h após a anestesia. Essas concentrações foram definidas com base na metodologia de estágios de anestesia e recuperação definidas para o mentol (Ross & Ross, 2008). Após o abate, os peixes foram congelados (-20°C) até o procedimento de preparo de amostra.

2.3.2 Preparo de amostras de filés de tilápia

A metodologia de extração do mentol foi uma adaptação do trabalho de Klimànková & colaboradores (2008): 2g de tecido de tilápia isento de anestésico foram macerados e transferidos para um tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL. As matrizes foram fortificadas com padrão de mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e deixadas em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente antes da extração. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de água ultrapura às amostras, as quais foram homogeneizadas em vórtex

por 5 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a uma velocidade de 15 000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um vial com capacidade de 10 mL. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. O vial contendo 5 mL do extrato do peixe foi submetido ao processo de SDME.

2.4 Otimização multivariada da técnica de SDME na extração de mentol

Para verificar o efeito dos parâmetros, quantidade de sal, temperatura e tempo de extração na análise do mentol em filés de tilápia, os experimentos foram avaliados de forma multivariada em cinco níveis (+1, 0, -1, + α e - α). Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros e os respectivos níveis avaliados na técnica de microextração.

Tabela 1 Parâmetros e níveis usados no planejamento DCCR

Parâmetros	Mínimo (-1)	Ponto Central (0)	Máximo (+1)
Temperatura (°C)	25	30	35
Tempo de extração (min)	5	15	25
Quantidade de sal (g)	2,0	2,5	3,0

O planejamento foi obtido pela soma de 2^k pontos fatoriais com 2k pontos axiais e 3 pontos centrais, em que k é o número de variáveis independentes, obtendo um total de 17 experimentos. Estes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Matriz do DCCR (valores reais) para as variáveis em estudo na SDME para a análise de mentol em filés de tilápia

Ensaio	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Sal (g)
1	25	5	2,0
2	25	5	3,0
3	25	25	2,0
4	25	25	3,0
5	35	5	2,0
6	35	5	3,0
7	35	25	2,0
8	35	25	3,0
9	20	15	2,5
10	40	15	2,5
11	30	1	2,5
12	30	35	2,5
13	30	15	1,5
14	30	15	3,5
15	30	15	2,5
16	30	15	2,5
17	30	15	2,5

Para as análises, 2 g de filés de tilápia isentos de mentol foram fortificados com solução estoque do anestésico na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, o tecido foi submetido à obtenção do extrato e posteriormente analisado.

A fim de determinar as condições mais adequadas para a análise do mentol, o sistema de extração por SDME foi otimizado pela aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta, avaliando os ajustes dos dados obtidos aos modelos: linear, quadrático, quadrático puro e de interação.

2.5 Procedimento de extração do mentol empregando SDME em modo *headspace*

Antes do processo de extração do mentol, as amostras passaram por um período de estabilização do sistema, no qual o vial contendo 5 mL do extrato de peixe, juntamente com 3 g de sulfato de sódio foi submetido a agitação magnética (com barra agitadora de dimensões 4 mm de largura por 1,05 mm de diâmetro) por um tempo de 10 minutos, na temperatura de 30°C. Em seguida, utilizou-se a microsseringa para exposição da microgota do solvente orgânico, no qual, 1,8 µL do solvente foi exposto no *headspace* da solução sob agitação (a distância entre a microgota e a solução foi fixada em 1,5 cm). Após o período de 15 minutos de extração, a microgota foi retraída para a microsseringa e injetada no sistema cromatográfico. Antes de cada extração, lavou-se a microsseringa 10 vezes com o solvente de extração, a fim de eliminar as bolhas no cilindro e na agulha, eliminando também possível efeito memória.

2.6 Procedimento de determinação do mentol por GC-MS

A temperatura inicial do programa do GC-MS foi 80°C durante 3 minutos, seguida de aquecimento a uma taxa de 5°C min⁻¹ até 130°C e a partir dessa temperatura aumentou-se para 250°C a uma taxa de 30°C min⁻¹, totalizando 17 minutos de corrida cromatográfica. O gás de arraste (hélio 99,999%) foi mantido a um fluxo de 1 mL min⁻¹, no modo splitless, com tempo de splitless de 1 minuto. O volume de injeção foi de 0,5 µL a uma temperatura de 270°C. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram mantidas em 280°C e 150°C, respectivamente. O modo de aquisição por monitoramento de íon selecionado (SIM) foi aplicado, de 5 a 17 minutos. Para isto, o detector foi programado para ler as unidades de massa atômica (*m/z*) de 71 e 81, o efluente da coluna foi direcionado para a fonte de íons

onde as moléculas foram ionizadas por impacto de elétrons (energia 70 eV). A quantificação do mentol foi realizada pela integração das áreas dos picos.

2.7 Validação da metodologia analítica

A validação do método foi realizada por procedimentos intralaboratoriais, avaliando-se os principais parâmetros, como, seletividade, linearidade, precisão (intradia e interdia), exatidão (fator de recuperação), limites de detecção e quantificação, propostos pelos protocolos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro, 2010) e International Conference on Harmonisation (ICH, 2005).

2.7.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos das amostras de tilápia isenta de anestésico (amostra branco) com os extratos das amostras de tilápia fortificada com solução estoque de mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ submetidas ao processo de extração por SDME. A partir da comparação dos cromatogramas foi possível observar se havia presença de picos interferentes no tempo de retenção do mentol.

2.7.2 Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi verificada numa faixa dinâmica compreendida entre $1,56 - 120 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 8$), sendo expressa pela curva analítica, considerando-se como ajuste ideal o valor do coeficiente de determinação superior a 0,9900 (Anvisa, 2003). As soluções para a confecção da curva analítica foram preparadas em triplicatas nas concentrações por fortificação da matriz: 1,56; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 90; $120 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.7.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ do método para o composto em estudo foram obtidos estimando-se o desvio padrão do intercepto (s) pelo coeficiente angular (S) da curva analítica, conforme equações 1 e 2, respectivamente.

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

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

2.7.4 Precisão

A avaliação da precisão do método foi realizada utilizando-se ensaios de precisão intradia e interdia. As amostras de tecido de tilápia fortificadas com solução estoque de mentol nas concentrações de 7,5; 30 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram analisadas em triplicata para ambas as técnicas. A precisão interdia foi realizada repetindo-se a análise intradia em três dias distintos. Ambas as respostas foram expressas em termos de coeficiente de variação (CV%).

2.7.5 Fator de recuperação (Exatidão)

De acordo com as diretrizes estabelecidas pelo (INMETRO, 2010), existem três possibilidades para estabelecer a exatidão do método, por meio de materiais de referência, experimentos de recuperação, utilizando amostras fortificadas e comparação dos resultados com os obtidos com outros métodos. Neste estudo a exatidão foi avaliada por meio de um ensaio de recuperação. Para tal, amostras de tecido de tilápia foram fortificadas com solução estoque de mentol, em três níveis de concentração: 7,5; 30 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. O procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração. As amostras fortificadas foram submetidas à SDME e GC-

MS. Após análise cromatográfica, determinaram-se as concentrações reais médias para cada nível de concentração empregando a equação da regressão linear da curva analítica referente à faixa de trabalho. Em seguida, calculou-se a recuperação (%) em cada nível de concentração (Equação 3).

$$R(\%) = \frac{\text{Valor}_{\text{obtido}}}{\text{Valor}_{\text{esperado}}} \times 100 \quad (3)$$

Em que valor obtido é a concentração medida do anestésico após fortificação da matriz (filé de peixe isento de mentol) e o valor esperado é a concentração obtida fortificando-se a água deionizada, utilizada como matriz de referência, ambos os valores obtidos a partir das amostras submetidas ao procedimento de microextração e posteriormente analisadas por GC-MS.

2.8 Aplicação do método de SDME em amostras de tecido de tilápia do Nilo

Após a validação do método analisou-se as amostras de peixes da espécie tilápia do Nilo. A extração do mentol foi realizada em duplicata para maior confiabilidade dos resultados, seguindo o procedimento da microextração descrito no tópico 2.5. As áreas obtidas por GC-MS foram utilizadas para cálculo da concentração utilizando a equação da reta. Todos os extratos foram analisados no mesmo dia do procedimento de preparo de amostras, descrito no tópico 2.3.2.

3 Resultados e discussão

3.1 Condições SDME

Alguns parâmetros considerados de suma importância na técnica de SDME, como solvente extrator e volume da gota, foram avaliados

individualmente, devido a algumas limitações de equipamentos específicos e instabilidade do sistema de extração, mantendo-se as condições centrais do planejamento multivariado.

A escolha do solvente extrator é um dos passos fundamentais para garantir um bom desempenho da SDME, além de ser a primeira etapa realizada nos trabalhos que visam a otimização da técnica. Três solventes extratores foram testados (Tabela 3) em modo *headspace*, apresentando pré-concentração significativa do mentol.

Os solventes extratores hexano e tolueno apresentaram alta taxa de perda da gota, enquanto que para o octano a perda foi desprezível. Por observações, as microgotas que não apresentavam forma esférica, ao serem expostas no *headspace*, eram mais susceptíveis a 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 a volatilidade do solvente (Jeannot, Przyjazny & Kokosa, 2010).

Sendo assim, solventes mais viscosos formam gotas mais esféricas, com menor área superficial, conseqüentemente, diminuindo a evaporação. O solvente escolhido deve ao mesmo tempo, garantir a eficiência da transferência de massa dos analitos para a fase orgânica e preservar a integridade da microgota durante a extração. Portanto, o solvente extrator selecionado para as análises do mentol foi o octano.

Tabela 3 Propriedades dos solventes utilizados no processo de extração do mentol

Solventes	Hexano	Tolueno	Octano
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 da força iônica aumentou-se a estabilidade da gota. Quando se trabalhou com maiores quantidades de sal, a perda do solvente orgânico por volatilização diminuiu. O que pode ser atribuído ao fato de maiores quantidades de sal levarem ao aumento da viscosidade do solvente orgânico, quando em imersão direta (Jeannot, Przyjazny & Kokosa, 2010). No entanto, nenhum trabalho relata a influência do efeito do sal no solvente quando em modo *headspace*. Provavelmente, o sal pode estar relacionado à diminuição do vapor de água no espaço vazio, acarretando em maior tensão superficial da gota orgânica.

Logo, por influenciar diretamente a estabilidade da gota, aumentando assim a precisão da técnica, a quantidade de sal foi um dos parâmetros selecionados para ser avaliado de forma multivariada na extração do mentol.

Outro parâmetro de importância considerável no processo de microextração é o volume da gota do solvente extrator, que está intimamente relacionado com a eficiência do método de SDME. De acordo com Jeannot, Przyjazny & Kokosa (2010), quanto maior o volume da gota de solvente extrator, maior é a quantidade extraída de analito. No entanto, observou-se experimentalmente que, em volumes menores de gota extratora, a extração de mentol foi mais eficiente, conforme ilustrado na Figura 1.

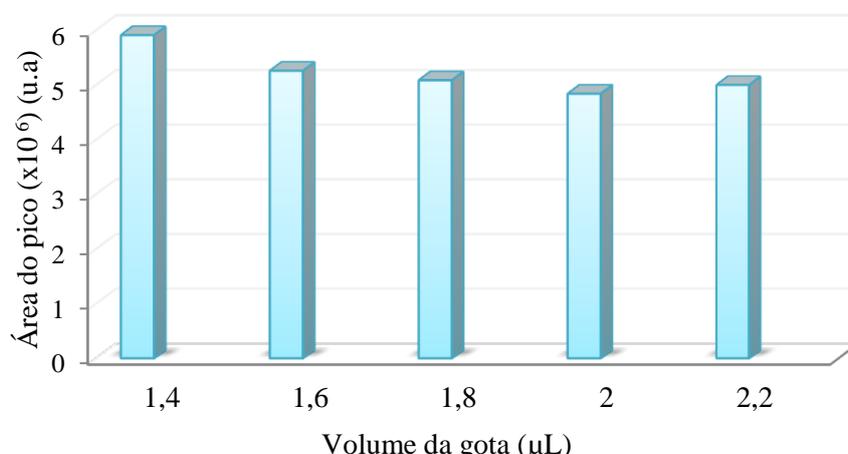


Figura 1 Efeito do volume da gota de solvente extrator (octano) na microextração do mentol. Condições experimentais: concentração de fortificação: $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução estoque de mentol, 15 minutos de extração, 2,5 g de sal, temperatura de 30°C e volume de amostra de 5 mL

O fato observado pode ser atribuído à necessidade de tempos de extração superiores, para que o equilíbrio do sistema seja alcançado, quando utilizadas gotas de solvente extrator maiores, devido ao processo de difusão do analito (Theis, Waldack, Hansen & Jeannot, 2001). As gotas de menores volumes apresentaram os melhores resultados, porém foram instáveis, não permitindo reprodutibilidade dos resultados. Desta forma, foi adotado o volume de $1,8 \mu\text{L}$ nas análises subsequentes.

As condições de análise fixadas para a SDME foram: octano como solvente extrator, empregando o volume de $1,8 \mu\text{L}$, com 5 mL de amostra sob constante agitação.

3.2 Otimização do método por SDME

3.2.1 Gráfico de Pareto para análise do efeito das variáveis

Os parâmetros selecionados por apresentarem maior influência na eficiência da SDME para extração do mentol foram: quantidade de sal, temperatura e tempo de extração. Estes foram analisados de forma

multivariada, empregando o DCCR. Neste planejamento estima-se os erros de efeitos supondo que as interações de altas ordens para $k \geq 3$ não são significativos e, portanto, são erros experimentais nos valores dos efeitos (Teófilo & Ferreira, 2006). Desta forma, 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 de tratamento.

Na tabela 4 estão os resultados obtidos em área para os 17 ensaios da otimização de metodologia analítica.

Tabela 4 Resultados obtidos a partir do planejamento DCCR para a análise de mentol em filés de tilápia fortificados com concentração de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$

Ensaio	Área do composto mentol (u.a)
1	8.072.634
2	11.072.841
3	5.341.090
4	18.686.571
5	36.192.748
6	40.956.105
7	14.201.169
8	46.565.105
9	4.298.345
10	44.814.199
11	5.526.278
12	46.714.153
13	42.899.716
14	50.758.176
15	51.168.750
16	51.370.711
17	51.269.730

Os resultados obtidos em área para análise do efeito das variáveis e de suas interações na extração do mentol permitiram construir um diagrama de Pareto, o qual está representado na Figura 2.

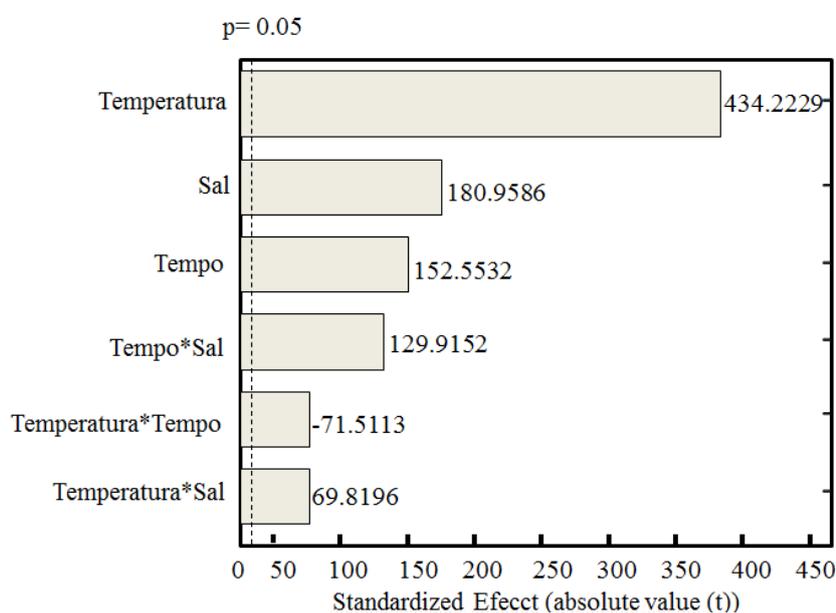


Figura 2 Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto

Conforme observado na Figura 2, todos os parâmetros analisados, bem com suas interações apresentaram efeitos significativos em um teste estatístico conduzido com 95% de confiança. O parâmetro, temperatura exibiu maior efeito positivo na extração do mentol pela técnica de SDME, apresentando efeito positivo. Este fenômeno pode estar atribuído ao aumento da energia cinética das moléculas de mentol ocasionada pelo aumento da temperatura, acarretando em maior migração do mentol para a fase extratora (Lord & Pawliszyn, 2000; Peñalver, Pocurull, Borrull & Marcé, 1999).

O aumento da força iônica da solução, influenciou de forma positiva no sinal analítico, provavelmente devido ao aumento da característica hidrofóbica do mentol, diminuindo sua solubilidade na matriz, favorecendo sua migração para o *headspace*, conseqüentemente, para a fase extratora. Este fenômeno é conhecido como “*salting out*”, onde moléculas de água formam uma esfera de hidratação em torno dos íons do sal, reduzindo sua

disponibilidade para solubilizar os analitos na amostra (Lord & Pawliszyn, 2000; Peñalver, Pocurull, Borrull & Marcé, 1999).

A SDME é uma técnica de equilíbrio, sendo esperado, portanto, que o aumento do tempo de extração proporcione aumento na massa de analito transferida da fase aquosa para a fase orgânica, atingindo seu máximo no momento em que o sistema alcançar o equilíbrio. Neste trabalho, o parâmetro, tempo de extração e a sua interação com a quantidade de sal apresentaram efeito positivo no sinal analítico, no entanto, sua interação com a temperatura de extração apresentou efeito negativo. Este fato pode ser explicado, devido ao aumento da difusão do analito ao redor da gota orgânica, diminuindo o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio (Lord & Pawliszyn, 2000; Peñalver, Pocurull, Borrull & Marcé, 1999).

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 mentol.

4.2.2 Análise por Superfície de Resposta

Para determinação das condições adequadas para a quantificação residual do mentol, foi empregada a análise por metodologia de superfície de resposta, que se baseia na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares, quadráticos, quadráticos puro ou de interações para descrever o sistema estudado, dando condições para otimizá-lo (Chatterjee, Kumar, Basu & Dutta, 2012).

Para o delineamento experimental, assim como na obtenção das condições ideais para a otimização do sistema por meio da estimativa dos parâmetros estatísticos foi empregado o programa Chemoface versão 1.4 (Nunes, Freitas, Pinheiro & Bastos, 2012).

Os resultados dos cálculos estatísticos encontram-se na Tabela 4. 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. Desta forma, as respostas obtidas para a área total do composto analisado foram correlacionadas usando este modelo (quadrático), conforme descrito pela equação 4 (Breitkreitz, Souza & Poppi, 2014).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

Em que y é a resposta predita; β_0 , é o ponto de interseção; β_{ij} , o coeficiente de interação, β_i , o coeficiente linear, β_{ii} , o coeficiente quadrático, k , é o número de fatores, x_i e x_j são as variáveis referentes aos fatores e ε , o erro associado com o modelo.

Este modelo é dado como adequado na microextração do mentol em matriz de peixe, o que foi evidenciado pelos valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,8353 e probabilidade de significância (p-valor) correspondente a 0,0420 com 95% de confiança.

Tabela 5 Resultados estatísticos da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos dados ao modelo quadrático

	SQ	GL	QM	F cal.	p-valor
Regressão	4,9401x10 ¹⁵	9	5,4890x10 ¹⁴	3,9453	0,0420
Residual	9,7388x10 ¹⁴	7	1,3913x10 ¹⁴		
Falta de ajuste	9,7386x10 ¹⁴	5	1,9477x10 ¹⁴	1,9101x10 ⁴	5,2352x10 ⁻⁵
Erro puro	2,0394x10 ¹⁰	2	1,0197x10 ¹⁰		
Total	5,9140x10 ¹⁵	16			
R^2	0,8353				

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F_{cal} = Teste de Fisher; p-valor = probabilidade de significância.

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

Na Figura 3 estão representados três gráficos em 3D (A, B e C), nos quais são mostrados o efeito do tempo de extração (eixo x) em função da

temperatura (eixo y) pela área obtida (eixo z) no processo de extração do mentol. A quantidade de sal foi fixada em 2; 2,5 e 3 g, respectivamente. Analisando os resultados é possível salientar que em maiores quantidades de sal, o processo de extração é favorecido. Considerando, portanto, que o melhor resultado foi obtido quando se trabalhou com 3 g de sal.

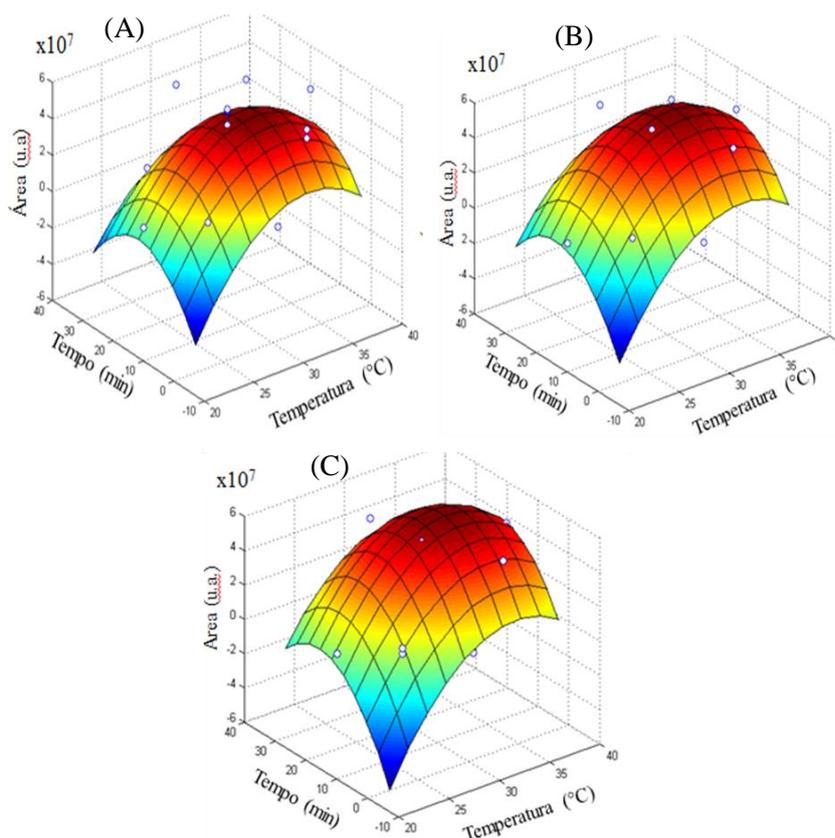


Figura 3 Gráficos das superfícies de resposta da área *versus* o efeito da interação entre o tempo de extração (min) e a temperatura (°C), considerando fixos respectivamente: A) 2; B) 2,5 e C) 3 g de sal

Na Figura 4 os gráficos de superfícies de resposta mostram o efeito da quantidade de sal (eixo x) em função da temperatura (eixo y) pela área obtida (eixo z) no processo de microextração do mentol, fixando os tempos de extração em 5, 15 e 25 minutos, respectivamente.

É possível perceber que as superfícies de resposta obtidas para os tempos de 15 e 30 minutos apresentam perfis semelhantes, sendo que o

período de 15 minutos é o tempo suficiente para que o equilíbrio seja alcançado no processo de extração do mentol, desta forma o tempo de extração de 15 minutos foi escolhido como adequado para as análises subsequentes por se observar o maior sinal analítico, além de favorecer a integridade da gota de solvente orgânico por ser um tempo de extração relativamente curto, quando comparado a alguns trabalhos relatados na literatura empregando a técnica de SDME na determinação de compostos variados (Abreu, 2015; Aguilera-Herrador, Lucena, Cárdenas & Valcárcel, 2010).

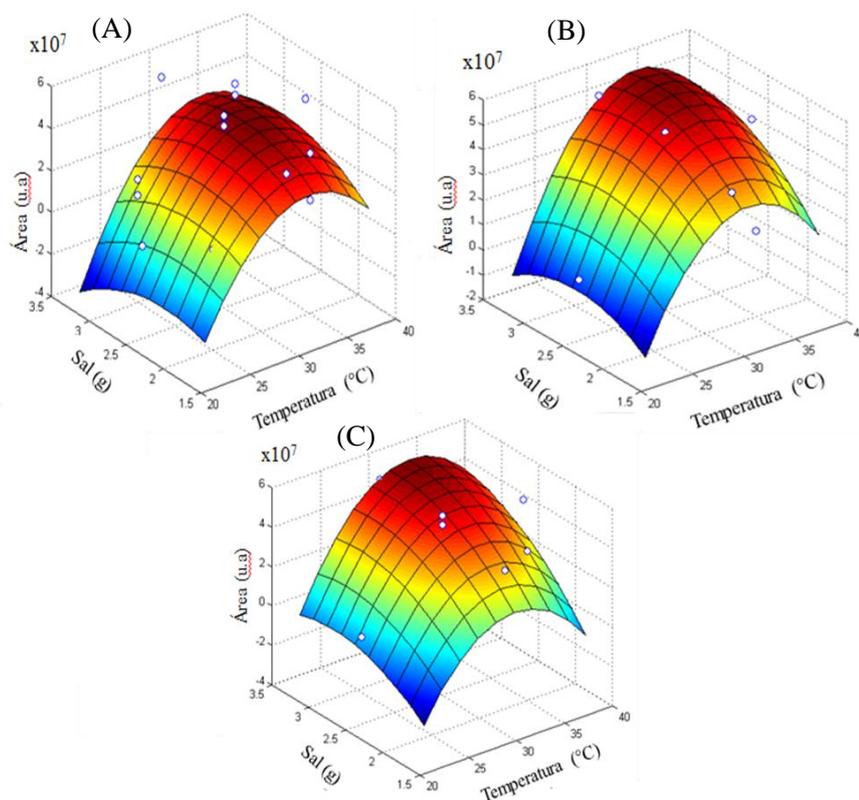


Figura 4 Gráficos das superfícies de resposta da área *versus* o efeito da interação entre a quantidade de sal (g) e a temperatura (°C), considerando fixos respectivamente os tempos: A) 5; B) 15 e C) 25 minutos

Na Figura 5 os gráficos mostram o efeito da quantidade de sal (eixo x) em função do tempo de extração (eixo y) pela área obtida (eixo z), no qual a temperatura foi fixada em 25, 30 e 35°C. Foi possível inferir que a temperatura foi o parâmetro de maior influência no sinal analítico para a extração do mentol em filés de peixes, confirmando a resposta apresentada pelo gráfico de Pareto na Figura 2. Com o aumento da temperatura, aumentou-se a eficiência do processo de extração. No entanto, o aumento da temperatura de 30 para 35°C, não apresentou significância considerável. Desta forma foi adotado 30°C como temperatura de trabalho, uma vez que, temperaturas mais elevadas podem ocasionar na perda parcial do solvente orgânico por volatilização. Desta forma foi adotado 30°C como temperatura de trabalho.

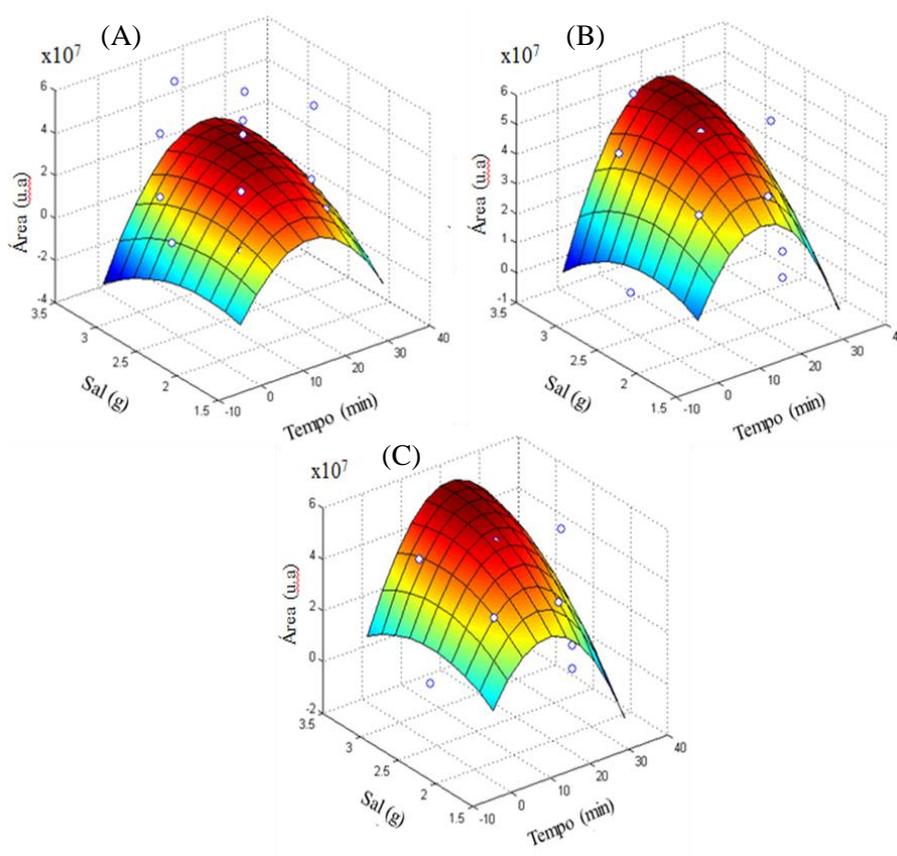


Figura 5 Gráficos das superfícies de resposta da área *versus* o efeito da interação entre a quantidade de sal (g) e o tempo de extração (min), considerando fixas respectivamente as temperaturas: A) 25; B) 30 e C) 35°C

Logo, os pontos experimentais selecionados estão dentro da região ótima obtida pelo estudo de otimização, 15 minutos de extração a 30°C e 3 g de sal.

3.3 Validação da metodologia de quantificação do mentol por SDME

A seletividade foi avaliada comparando-se às análises da matriz isenta e fortificada com solução estoque de mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$. De maneira geral, não foram observados picos de interferentes no mesmo tempo de retenção do mentol, quando realizadas as primeiras

injeções no modo monitoramento de varredura (SCAN), possibilitando que a seleção de íons fosse realizada nas análises subsequentes. O que era esperado, devido à utilização do espectrômetro de massas, que permite um ganho em seletividade na detecção dos compostos (Hoffmann & Stroobant, 2007).

Para a verificação da linearidade da metodologia desenvolvida para determinação residual de mentol em peixes, empregou-se o método de padronização externa. O intervalo linear de trabalho obtido neste estudo foi de 1,56 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 6 apresenta o cromatograma obtido no modo monitoramento de íon selecionado (SIM) em uma amostra de tecido de tilápia e a curva analítica obtida para o mentol por SDME. O tempo de retenção do mentol foi de 11,3 minutos.

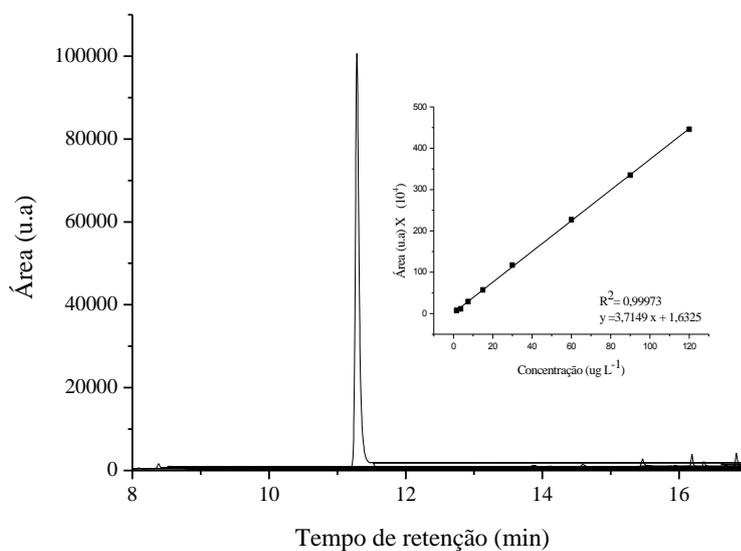


Figura 6 Cromatograma no modo monitoramento de íon selecionado (SIM) para m/z 71 e 81, em uma amostra de tecido de tilápia fortificada com mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e curva analítica obtida para o mentol por SDME/GC-MS

Os dados obtidos da curva analítica evidenciaram linearidade satisfatória no intervalo de concentrações selecionadas, com forte correlação

linear (R) = 0,9997, onde a inclinação da reta (a) foi de 3,7149 e o intercepto da reta (b) foi 1,6325. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,0206 e 0,0625 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Quando comparado a outros estudos de anestésicos em peixes o valor de LD encontrado mostra-se menor. [Abreu \(2015\)](#), usando SDME e GC-MS, obteve LD para 2-fenoxietanol de 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A avaliação da exatidão foi realizada em termos de recuperação média do mentol estudada em três níveis de concentração (7,5; 30 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$), os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 Recuperação média do mentol em tecidos de peixe pelo método de SDME

Concentração de mentol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio Padrão Relativo (RSD - %)
7,5	93,3	3,1
30	93,9	4,9
60	94,1	4,6

*Análise em triplicata para cada concentração

Os valores encontrados para recuperação foram satisfatórios para técnicas de microextração ([Lord & Pawliszyn, 2000](#)), apresentando desvios padrão relativos (RSD) menores que 5%, indicando boa repetibilidade do procedimento de extração ([Queiroz, Silva, Carvalho & Lanças, 2001](#)).

Os resultados obtidos para as precisões intradia e interdia foram satisfatórios, apresentando coeficientes de variação (CV) menores que 5% para os três níveis de concentrações analisadas. Estes resultados foram comparados com os requisitos gerados por órgãos regulamentadores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Inmetro apresentando variação dentro do recomendado por esses guias ([Anvisa, 2003](#); [Inmetro, 2010](#)).

3.4 Aplicação da metodologia na determinação residual de mentol em tecidos de peixes

Após validado, o método desenvolvido foi empregado na determinação residual do mentol em filés de tilápia, as quais foram submetidas a cinco diferentes concentrações de anestésias, duas concentrações inferiores e duas concentrações superiores a concentração recomendada para o referido composto para esta espécie (Ross & Ross, 2008). Para cada concentração e tempo residual, foram avaliados três peixes, nos quais foram realizadas análises em duplicata.

Na Figura 7 podem ser observados os resultados das médias obtidas das concentrações remanescentes de mentol presentes nas amostras de peixes pelo tempo de depuração, na qual foi possível observar que o período residual de 24 horas não foi suficiente para eliminar todo resíduo de mentol no tecido dos peixes, sendo eliminado entre 81 e 90% da substância neste período. Confirmando que nas amostras de peixe analisados o tempo de 48 h foi o período necessário para total eliminação do mentol do tecido dos peixes pelo método de SDME/GC-MS.

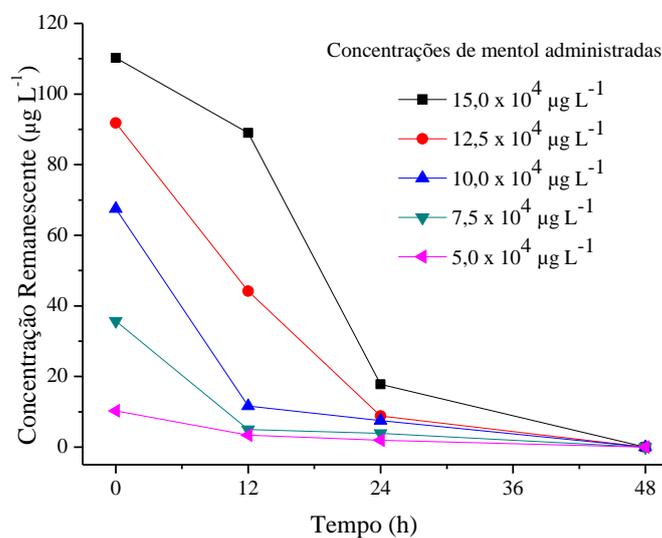


Figura 7 Concentrações residuais de mentol determinadas em filés de tilápia em diferentes tempos de depuração.

Foi possível inferir que nas menores concentrações de mentol administradas aos peixes, nas primeiras 12 h, houve maior eliminação do anestésico pelo organismo dos animais, nas quais os peixe metabolizaram cerca de 67% do mentol, comportamento diferente do observado nas concentração de $15,0 \times 10^4$ e $12,5 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, onde ocorreu uma queda de 19 e 52% nos valores de concentração obtida, respectivamente. A partir de 12 h, houve redução expressiva nas maiores concentrações da substância, enquanto nas menores concentrações, a eliminação apresentou-se constante.

Visando total eliminação do mentol da carne do pescado, é necessário que após o período de anestesia os peixes sejam submetidos a um período residual de no mínimo 48 h, para que não sejam encontrados traços residuais de mentol, garantindo o consumo seguro da carne após o manejo.

4 Conclusões

O método de SDME é uma técnica útil para a quantificação direta de compostos voláteis em diferentes matrizes. Neste trabalho, o método foi aplicado, otimizado e validado para a determinação residual de mentol em amostras de tecidos de peixes. Os parâmetros temperatura, tempo de extração e quantidade de sal foram investigados, obtendo uma metodologia que permitiu a extração do composto em 15 minutos, utilizando apenas 1,8 µL de octano. O método alcançou limites de detecção e quantificação de 0,0206 e 0,0625 µg L⁻¹, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis. Os resultados obtidos durante as análises determinaram que o tempo de depuração necessário para total eliminação do mentol dos tecidos dos peixes deve ser de no mínimo 48 h, garantindo um consumo pós-manejo seguro, sem a presença do composto anestésico usado no processo de produção.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Ao Centro de Análises e Prospecção Químicas (CAPQ) pela realização das análises cromatográficas, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Departamento de Zootecnia da UFLA pelo fornecimento das amostras de peixe e a Rede Mineira de Química (RMQ).

Referências

Abreu, D. C. P. Determinação residual de 2-fenoxietanol em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) por técnicas de microextração acopladas ao GC-MS. 2015. 127 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

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

Alothman, Z. A., Dawod, M., Kim, J. & Chung, D. S. (2012). Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review. *Analytica Chimica Acta*. 739, 14-24.

Aguilera-Herrador, E., Lucena, R., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. (2010). The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 29, 602-616.

Breitkreitz, M. C., Souza, A. M. & Poppi, R. J. (2014). Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com *o*-fenantrolina, um tutorial, parte III. *Química Nova*, 37, 564-573.

Chatterjee, S., Kumar, A., Basu, S. & Dutta, S. (2012). Application of response surface methodology for methylene blue dye removal from aqueous solution using low cost adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, 181-182, 289-299.

Chisvert, A., Román, I. P., Vidal, L. & Canals, A. (2009). 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 sample as model analytical application. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1290-1295.

Davis, M. W., Stephenson, J., Noga, E. J., Carolina, N. & Street, H. (2008). Health The Effect of Tricaine on Use of the Fluorescein Test for Detecting Skin and Corneal Ulcers in Fish. *Journal of Aquatic Animal*, 20, 86-95.

Façanha, M. F. & Gomes, L. C. (2005). A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazônica. Manaus*, 35, 71-75.

Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2007). Mass Spectrometry: Principles and Applications. *John Wiley e Sons*, Chichester, UK. 3rd.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008*. Rio de Janeiro, **2010**. 35 p.

International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of Analytical Text and Methodology*, Q2(R1), **2005**, 17 p.

Jeannot, M. A., Przyjazny, A. & Kokosa, J. M. (2010). Single drop microextraction-Developmet, application and future trends. *Journal Chromatography A*, 1217, 2326-2336.

Klimànková, E., Riddellová, K., Hajšlová, J., Poustka, J., Kolářová, J. & Kocourek, V. (2008). Development of an SPMEGC/MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish. *Talanta*, 75, 1082-1088.

Lord, H. & Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of Drugs. *Journal of Chromatography A*, 902, 17-63.

Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R. & Canigual, S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 1-6.

Melo, M. H. A., Costa, A. C. S., Nóbrega, J. A. & Ferreira, S. L. C. (2005). The use of water soluble tertiary amine reagent for solubilization and metal determination in fish muscle tissue. *Journal Brazilian Chemical Society*, 16, 69-73.

Nunes, C. A., Freitas, M. P., Pinheiro, A. C. M. & Bastos, S. C. (2012). Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. *Journal Brazilian Chemical Society*, 23, 2003-2010.

Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F. & Marcé, R. M. (1999). Trends in solid phase micro extraction for determining organic pollutants in environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 557.

Pinheiro A. S. & Andrade, J. B. (2009). Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*, 79, 1354-1359.

Queiroz, M. E. C., Silva, S. M., Carvalho, D. & Lanças, F. M. (2001). Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal Environmental Science Health*, 36, 517-527.

Ross, L. G. & Ross, B. (2008). *Anesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 236 p.

Simões, L. N. & Gomes, L. C. (2009). Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia do nilo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 613-620.

Teófilo, R. F. & Ferreira, M. M. C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29, 338-350.

Theis, A. L., Waldack, A. J., Hansen, S. M. & Jeannot M. A. (2001). Headspace solvent microextraction. *Analytical Chemistry*, 73, 5651-5654.

Wu, H. F., Kailasa, S. K., Yan, J. Y., Chin, K. & Ku, H. Y. (2014). Comparison of single-drop microextraction with microvolume pipette extraction directly coupled with capillary electrophoresis for extraction and separation of tricyclic antidepressant drugs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, 2071-2076.

Yang, B. H., piao, Z. G., Kim, Y. B., Lee, C. H., Parque, K., Kim, J. S. & Oh, S. B. (2003). Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of Dental Research*, 82, 781-785.

Yukihiro, R. G., Saita, M. V. & Gonçalves, A. C. (2008). Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9, 350-357.

ARTIGO 3

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO RESIDUAL DO
ANESTÉSICO MENTOL EM PEIXE POR GC-MS**

Bianca Mesquita Coelho Botrel ^a, Daiane Cássia Pereira Abreu ^a, Adelir Aparecida Saczk ^{a*}, Matheus Julien Ferreira Bazana ^a, Priscila Vieira e Rosa ^b

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

Correspondência para o autor. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812
Endereços de e-mail: biamesquitacoelho@yahoo.com.br (B. M. C. Botrel);
daianyinha_cassia@hotmail.com (D. C. P. Abreu); adelir@dqi.ufla.br (A. A.
Saczk); matheus.julien@hotmail.com (M. J. F. Bazana);
priscila@dzo.ufla.br (P. V. Rosa)

Artigo de acordo com as normas da revista **Analyst**

Resumo

Métodos de microextração baseados em líquido-líquido por dispersão foram avaliados para a extração de mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol em peixes. A microextração líquido-líquido dispersiva convencional (DLLME) e a baseada em solventes de baixa densidade (LDS-DLLME) são técnicas de pré-concentração miniaturizadas que utilizam sistemas ternários de solventes, em que, os solventes extratores são imiscíveis em água, a diferença entre essas técnicas é que um solvente apresenta densidade maior que a água e o outro menor, respectivamente. O efeito dos diferentes parâmetros experimentais na etapa de extração, incluindo a natureza dos solventes de extração e dispersão, força iônica, volume do solvente extrator e de água (meio de dispersão) foram avaliados. Os parâmetros, natureza dos solventes de extração e dispersão foram analisados de forma univariada, os resultados indicaram que a técnica de LDS-DLLME apresentou extração com maior eficiência para o mentol que a DLLME convencional, utilizando-se o tolueno como extrator e a acetona como dispersor. Após selecionados os solventes de extração e dispersão, os três parâmetros restantes (força iônica, volumes do solvente extrator e de água) foram avaliados em três níveis, empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR) na otimização da microextração. A condição ótima determinada para a extração foi de 100 μL do solvente de extração (tolueno), a quantidade de 0,1 g de sal e o volume de água de 5 mL. O fator de enriquecimento foi de aproximadamente 80 vezes, os limites de detecção e quantificação foram 0,0539 e 0,1190 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, apresentando reprodutibilidade e repetibilidade aceitáveis. A metodologia desenvolvida foi aplicada na determinação residual de mentol em filés de tilápia abatidas nos períodos de 0, 12, 24 e 48 horas após terem sido anestesiadas nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados indicaram que o tempo necessário para que o organismo do peixe elimine totalmente o mentol é superior a 48 h, quando administradas dosagens iguais ou superiores a $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras-chave: DLLME, LDS-DLLME, quimiometria, segurança alimentar

1. Introdução

Com a modernização de equipamentos instrumentais e laboratoriais as técnicas de preparação de amostra tenderam à miniaturização e simplificação das extrações, diminuindo o consumo de solventes orgânicos no processo.^{1,2} Assim, surgiram as novas técnicas de pré-concentração e preparação de amostras baseadas nas tradicionais extrações líquido-líquido (LLE) e em fase sólida (SPE). A microextração em fase líquida (LPME) e a microextração em fase sólida (SPME) deram início a nova classe de técnicas que demandam menor tempo e consumo de solventes, possibilitando o melhoramento do desempenho analítico.³⁻⁵

Um novo modo de LPME, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) tem sido muito empregada, com resultados bem sucedidos por evitar a volatilização e perda do solvente extrator, conseqüentemente, aumentando a reprodutibilidade e sensibilidade do método.^{6,7} A DLLME é baseada em um sistema ternário de solventes (amostra aquosa, solventes dispersor e extrator), no qual o solvente extrator consiste em um solvente orgânico imiscível em água e o dispersor em um solvente que possui a característica de ser tanto miscível na fase aquosa quanto na fase orgânica.^{8,9}

A eficiência da DLLME é independente do tempo de extração devido ao rápido estado de equilíbrio, proporcionado pelo aumento da área superficial do solvente de extração ao ser injetado juntamente com o solvente dispersor na amostra aquosa, no qual a mistura apresenta elevada turbidez. Em seguida, a separação das fases é obtida por centrifugação e a fase orgânica contendo o analito de interesse se sedimenta no fundo do tubo cônico, o qual é recolhido para posterior análise.^{1,10,11}

A DLLME tem sido relatada como uma técnica de separação eficiente e com uma ampla gama de aplicações tanto na extração de compostos orgânicos, como ácido 3-fenoxibenzóico em amostras biológicas complexas,¹² éteres polibromados em tecidos de animais aquáticos,¹³

quinolona em músculo de porco,¹⁴ clenbuterol em tecidos de porcos,¹⁵ bisfenol A, bisfenol S, parabeno e benzofenonas em amostras de urina,¹⁶ drogas de abuso em amostras de urina e sangue,¹⁷ quanto compostos inorgânicos, como, arsênio e antimônio em água¹⁸ e paládio em amostras aquosas,¹⁹ dentre diversas outras aplicações. Esta diversidade no processo de extração deve-se principalmente as vantagens da técnica, como, simplicidade de operação, rapidez, pequeno volume de solventes orgânicos, baixo custo, alta recuperação e alto fator de enriquecimento.²⁰

Como forma de melhorar e adaptar a DLLME algumas modificações foram propostas, como o uso de diferentes solventes extratores. Desta maneira, a técnica passou a ser subdividida em algumas categorias dentre elas: DLLME convencional, que utiliza solventes que possuem densidade maior que a da água, por exemplo, tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, dentre outros e LDS-DLLME, a qual os solventes empregados apresentam densidade menor que a da água, por exemplo, octan-1-ol, hexano, tolueno, ciclohexano, orto-xileno, dentre outros.^{21,22}

Neste presente trabalho, a eficiência das técnicas de microextração dispersivas (DLLME e LDS-DLLME) foram avaliadas analisando-se os parâmetros, solventes extrator e dispersor, força iônica, volumes do solvente extrator e de água (meio de dispersão). Após definido o planejamento experimental as análises foram otimizadas empregando a metodologia de superfície de respostas pelo delineamento composto central rotacional (DCCR). A metodologia desenvolvida foi validada e aplicada na determinação residual do anestésico natural, mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol, em filés de tilápia do Nilo, a espécie de peixe mais consumida e cultivada do Brasil e a segunda espécie mais consumida do mundo, de forma a garantir períodos residuais seguros.

2. Experimental

2.1 Reagentes

Os solventes octano (99,9%), tolueno (99,9%), diclorometano (99,8%), acetonitrila (99,9%), metanol (99,9%) e acetona (99,9%), o padrão de mentol (99,0%) e o sulfato de sódio (99,0%) utilizados nas análises foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA), o tetracloreto de carbono (99,8%) foi adquirido da Merck (EUA) e o clorofórmio (99,8%) foi adquirido da Pro Quimis.

2.2 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas QP2010 (GC-QMS) Plus (Shimadzu - Japão). A coluna analítica utilizada foi a DB-5MS (30 m x 0,25 mm id x 0,25 μ m), com composição da fase estacionária de 5% difenil-95-dimetil-polisiloxano (Shimadzu - Japão). O fluxo de gás hélio foi de 1 mL min⁻¹, foi utilizado um injetor split/splitless com modo de operação splitless, com tempo de 1 minuto. O volume de injeção foi de 1 μ L, a temperatura do injetor foi de 270°C. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram mantidas em 280°C e 150°C, respectivamente. A temperatura inicial do programa foi de 80°C durante 3 minutos, aumentada para 130°C a uma taxa de 5°C min⁻¹ e a partir dessa temperatura aumentou-se para 250°C a uma taxa de 30°C min⁻¹, totalizando 17 minutos de análise cromatográfica. O detector do espectrômetro de massas operou em modo de monitoramento de varredura (SCAN), de 5 a 17 minutos.

2.3 Preparação das soluções e amostras

2.3.1 Soluções

A solução estoque de mentol foi preparada em acetona a uma concentração de 1 g L⁻¹. Para as soluções das análises univariadas dos parâmetros, a solução estoque foi diluída em acetona ou acetonitrila ou

metanol resultando na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, nas análises multivariadas a solução estoque foi diluída em acetona obtendo uma solução com a mesma concentração descrita para as análises univariadas. Para as soluções utilizadas na validação foram realizadas diluições da solução estoque em acetona, resultando em concentrações na faixa de 0,119 a $2,39 \mu\text{g L}^{-1}$. A solução estoque foi armazenada a uma temperatura de 4°C , sendo preparada uma nova solução a cada dia.

2.3.2 Amostras de tilápias submetidas à anestesia com mentol

As tilápias anestesiadas foram fornecidas pelo Departamento de Zootecnia da UFLA. Estas foram submetidas ao processo de anestesia por imersão em soluções anestésicas nas seguintes concentrações: 5; 7,5; 10; 12,5 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, com tempos de abate de 0, 12, 24 e 48 horas após a anestesia. Após o abate, os peixes foram congelados (-20°C) até o procedimento de preparo de amostra.

2.3.3 Pré-tratamento das amostras de filés de tilápia

A metodologia de preparo de amostras foi uma adaptação do trabalho de Liu e colaboradores (2009),²³ em que, para as análises de otimização das condições de microextração e validação foram medidos a massa de 2 g de tecido de filés de tilápia isentos de anestésico macerados e em seguida armazenados em um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL. As matrizes foram fortificadas com o padrão de mentol e deixadas em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram congeladas a -20°C por 6 horas. Para as amostras reais (peixes anestesiados) foi realizado o mesmo procedimento sem a etapa de fortificação (para determinação das concentrações residuais presentes no tecido do peixe após o abate). Posteriormente, no mesmo tubo, foi realizada a liofilização das amostras por 24 horas em um liofilizador (Labconco, 2.5 FreeZone).^{24, 25}

Esta etapa foi realizada com o objetivo de retirar a água e conseqüentemente compactar a gordura, removendo qualquer possibilidade de interferência na técnica de microextração.

2.4 Otimização da técnica de DLLME

2.4.1 Seleção dos solventes extrator e dispersor

Os solventes de extração e dispersão foram avaliados individualmente fixando-se os demais parâmetros da técnica de microextração, no qual, os solventes de extração testados para a DLLME convencional foram o tetracloreto de carbono, clorofórmio e diclorometano, e os solventes com densidade menor que a água usados para a LDS-DLLME foram o tolueno e o octano. Na escolha dos solventes extratores selecionados, foram consideradas as propriedades físicas mais importantes para a DLLME, dentre elas, a densidade, polaridade e solubilidade, conforme representado na Tabela 1.

Tabela 1 Propriedades físicas da água e de diferentes solventes orgânicos extratores empregados na otimização da DLLME

Solvente	Densidade (g mL ⁻¹)	Solubilidade em H ₂ O	Temperatura de ebulição (°C)
H ₂ O	1,00	-	100,0
CCl ₄	1,59	0,8g L ⁻¹ a 25°C	76,72
CHCl ₃	1,47	8 g L ⁻¹ a 20°C	61,2
C ₂ H ₂ Cl ₂	1,33	13 g L ⁻¹ a 20°C	40,0
C ₆ H ₅ CH ₃	0,87	0,47 g L ⁻¹ a 20-25°C	110,6
C ₈ H ₁₈	0,70	0,0007-0,0025 g L ⁻¹ a 20°C	125,6

O solvente dispersor, diferente do extrator, deve ser miscível tanto em água quanto no solvente extrator, de modo a atuar na interface entre

esses dois líquidos. Dessa forma, os solventes dispersores testados foram, acetona, acetonitrila e metanol, suas propriedades físicas estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 Propriedades físicas dos diferentes solventes orgânicos dispersores empregados na otimização da DLLME

Solvente	Densidade (g mL ⁻¹)	Solubilidade em H ₂ O	Temperatura de ebulição (°C)
Acetona	0,79	Solúvel	56,0
Acetonitrila	0,78	Solúvel	82,0
Metanol	0,79	Solúvel	65,0

2.4.2 Análise multivariada

Neste trabalho, três variáveis foram avaliadas em cinco níveis por meio de um delineamento experimental de composto central rotacional (DCCR) na otimização da técnica de DLLME. As variáveis consideradas críticas na extração foram força iônica, por meio da quantidade de sal (X_1), volume de água (dispersado) (X_2) e volume de solvente extrator (X_3). As respostas foram obtidas em área de pico pelas análises cromatográficas. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR), uma técnica multivariada que aplica métodos empíricos para descrever a relação de um conjunto de fatores experimentais e os resultados observados.²⁶ A análise estatística dos dados foi realizada no software Chemoface versão 1.4 com análise de variância.

2.5 Procedimento de extração por DLLME

Em um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL foram adicionados 0,1 g de sal (sulfato de sódio) e 5 mL de água ultrapura (processada por um sistema de purificação Milli-Q modelo Millipore,

Bedford, EUA), este foi agitado em vórtex por 1 minuto para total solubilização do sal. Ao tubo contendo os 2 g de filé liofilizado, foram adicionados 3 mL de acetona, o qual foi agitado em vórtex por 5 minutos e centrifugado a 15 000 x g por 5 minutos, posteriormente, 2 mL do sobrenadante foram coletados.

Em seguida, foram adicionados simultaneamente os solventes dispersor (2 mL de acetona contendo o analito de interesse) e extrator (100 µL de tolueno) ao tubo contendo a solução de água e sal. A mistura foi agitada manualmente por 30 segundos, dando origem uma solução turva, em seguida foi realizada a separação das fases por centrifugação a 12 000 x g por 5 minutos, a fase orgânica (sobrenadante) foi recolhida com uma seringa de 10 µL e imediatamente 1 µL foi injetado no GC-MS.

2.6 Avaliação da metodologia analítica

A validação do método analítico foi realizada de acordo com as recomendações descritas nos protocolos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)²⁷ e International Conference on Harmonisation (ICH)²⁸. Os parâmetros estudados foram, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e recuperação.

A seletividade de um método demonstra a extensão na qual um analito poderá ser determinado em uma amostra complexa, sem sofrer interferências dos componentes da matriz. O objetivo desse experimento foi observar possíveis sobreposições de picos cromatográficos provenientes da matriz e o pico referente ao mentol extraído no tecido de tilápia. Para isto, foram comparados os resultados obtidos das análises da matriz de peixe isenta de mentol e a matriz fortificada com solução estoque na concentração de 10 µg L⁻¹, submetidas ao processo de extração por DLLME.

A verificação da linearidade do método desenvolvido foi realizada numa faixa dinâmica compreendida entre 0,119 – 2,39 µg L⁻¹. A curva de

calibração foi confeccionada a partir de fortificações de mentol em tecidos de tilápia, resultando em concentrações de 0,119; 0,239; 0,476; 1,190; 1,760 e 2,390 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após fortificações das matrizes, as mesmas foram submetidas ao processo de extração utilizando a técnica de DLLME.

A avaliação da precisão foi realizada por meio de experimentos de precisão intradia e interdia. A precisão intradia ($n = 3$) foi avaliada realizando-se extrações consecutivas em tecido de tilápia empregando a DLLME. As análises dos extratos foram determinadas no mesmo dia, em dois diferentes níveis de concentração: 0,239 e 2,390 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão interdia ($n = 9$) foi realizada por um período de três dias consecutivos onde, em cada dia foi repetida a precisão intradia.^{29,30}

O LD do método para o composto em estudo foi obtido estimando-se o desvio padrão do intercepto (s) pelo coeficiente angular (S) da curva analítica, conforme equação 1. O LQ foi o menor ponto da curva analítica.

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

A determinação da exatidão é normalmente realizada por ensaios de recuperação empregando-se materiais de referência certificados e, na ausência destes, por meio de matriz branca fortificada com concentrações conhecidas do analito de interesse.³⁰ Os valores de recuperação foram obtidos com amostras de filés de tilápia fortificadas nas seguintes concentrações: 0,239 e 2,39 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicata para cada concentração. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração otimizado e posteriormente analisadas por GC-MS. Após análise cromatográfica, determinaram-se as concentrações reais médias para cada nível de concentração empregando a equação da regressão linear da curva analítica referente à faixa de trabalho. Em seguida, calculou-se a recuperação (%) em cada nível de concentração fazendo-se a razão da concentração média do anestésico, medida na matriz fortificada pela concentração obtida

fortificando-se a água deionizada, utilizada como matriz de referência, ambos os valores obtidos a partir das amostras submetidas ao procedimento de microextração e posteriormente analisadas por GC-MS.³¹

O fator de enriquecimento (EF) foi definido como a razão entre a concentração do analito na fase orgânica (C_{org}) e a concentração inicial do analito (C_0) na amostra:

$$EF = \frac{C_{org}}{C_0} \quad (2)$$

O C_{org} foi obtido a partir da equação da curva de calibração da solução-padrão de mentol no solvente de extração no intervalo de 0,119 a 2,39 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.7 Aplicação do método de DLLME em amostras de tecido de tilápia do Nilo

Após a validação do método analisou-se as amostras de peixes da espécie tilápia do Nilo. A extração do mentol foi realizada em duplicata, seguindo o procedimento da microextração descrito no tópico 2.5.

3 Resultados e discussão

3.1 Otimização do método por DLLME

Para obter a máxima eficiência na extração do mentol por DLLME, a influência de alguns parâmetros foi avaliada individualmente, como a natureza dos solventes dispersores e extratores. Os parâmetros volume de água, força iônica e volume de extrator foram investigados de forma multivariada.

3.1.1 Influência da natureza dos solventes dispersores e extratores

A escolha dos solventes de extração e dispersão apropriados é crucial na eficiência da extração em DLLME, no qual, o solvente extrator deve ser escolhido com base na sua densidade, baixa solubilidade em água, capacidade de extração dos analitos de interesse e compatibilidade com o sistema cromatográfico. A DLLME pode ser subdividida em várias técnicas de acordo com o processo usado, neste trabalho foram utilizadas a técnica convencional de DLLME e a LDS-DLLME.³² No método convencional o solvente extrator é mais denso que a água, ocorrendo sua sedimentação,⁸ com esse intuito os solventes utilizados foram os clorados: clorofórmio, diclorometano e tetracloreto de carbono. A LDS-DLLME é baseada em solventes com densidades menores que a da água,³³⁻³⁵ neste sentido os solventes extratores empregados foram tolueno e octano, os quais foram recolhidos na superfície da solução.

O solvente dispersor é um solvente orgânico que possui propriedade de parcial miscibilidade no solvente extrator e em água, proporcionando a dispersão do solvente extrator. A eficiência do solvente dispersor na extração do analito está associada a sua capacidade em fazer com que o solvente extrator se particule na solução aquosa, pois quanto menor as gotículas, maior a área superficial para a transferência da substância a ser analisada.³² Nesse intuito os solventes dispersores avaliados foram acetona, acetonitrila e metanol. Na Figura 1 estão apresentados os resultados das análises cromatográficas do mentol obtidas para o teste de influência dos solventes dispersores e extratores na extração.

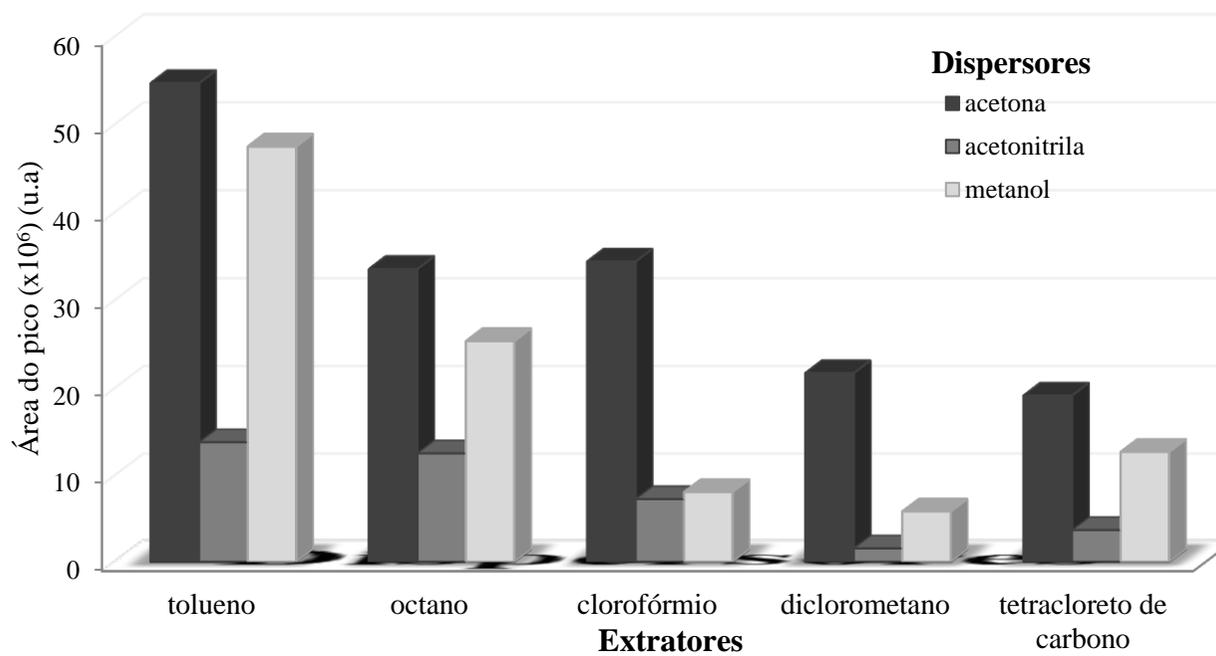


Figura 1 Análise do efeito de diferentes solventes extratores e dispersores na extração de mentol por DLLME. Condições experimentais: concentração de fortificação de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, 2 mL de solvente dispersor, 100 μL do solvente extrator, 4 mL de água e 0,2 g de sal

Como observado na Figura 1 o tolueno foi o solvente de extração que apresentou maior eficiência na extração do mentol, além disso, esse solvente torna-se mais viável quando comparado aos solventes clorados por apresentar menor toxicidade.³⁶ O solvente dispersor que proporcionou maior área dos picos foi a acetona, afetando diretamente o grau de dispersão do extrator na fase aquosa e, por consequência, a eficiência da extração.³⁷ Logo, o tolueno e a acetona foram selecionados como solventes de extração e dispersão, respectivamente, sendo estes empregados nos experimentos subsequentes.

3.1.2 Otimização dos parâmetros de forma multivariada

Esta etapa da otimização consistiu na obtenção da melhor resposta da análise pela investigação da significância das variáveis e de suas interações utilizando-se um modelo de segunda ordem. Com esse intuito, o planejamento DCCR foi empregado na otimização da metodologia de análise do mentol em peixe por DLLME para os parâmetros quantidade de sal (força iônica), volume de água e volume de extrator. Na Tabela 3 estão representados os parâmetros e os respectivos níveis avaliados na técnica de microextração.

Tabela 3 Parâmetros e níveis usados no planejamento DCCR

Parâmetros	Axial (-1,682)	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)	Axial (+1,682)
Quant. de sal (g)	0,032	0,1	0,2	0,3	0,368
Vol. água (mL)	2,32	3	4	5	5,68
Vol. extrator (µL)	31,8	100	200	300	368

Após obtidos os resultados experimentais do planejamento DCCR o efeito das variáveis e de suas interações na extração do mentol foram

estimados estatisticamente, os quais estão elucidados no gráfico de Pareto mostrados na Figura 2.

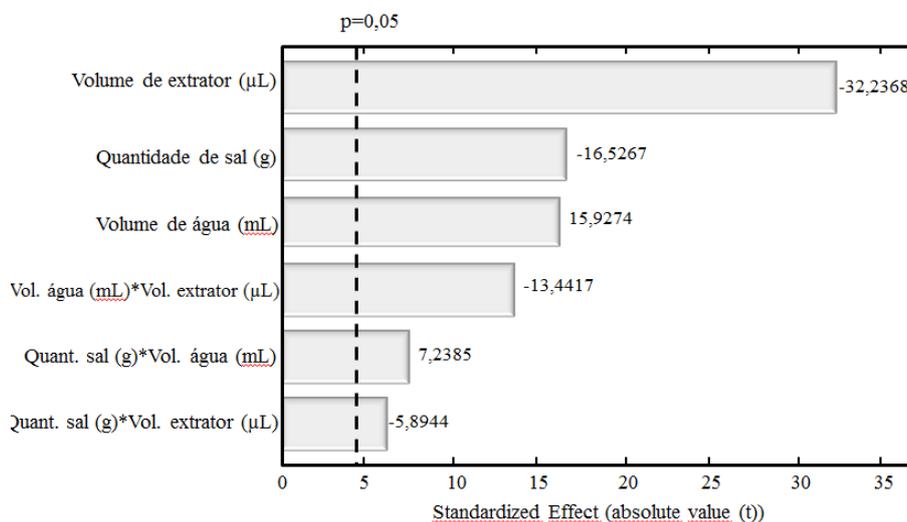


Figura 2 Análise do efeito das variáveis e de suas interações pelo gráfico de Pareto

Na Figura 2 pode ser observada uma linha vertical que indica o limiar para um teste no nível de probabilidade de significância (p) igual a 5%, no qual todos os fatores que possuem valores acima desse limiar são considerados estatisticamente significativos. Logo, todos os parâmetros analisados e suas interações apresentaram efeitos significativos conduzidos com 95% de confiança.^{38,39}

Diferente do que frequentemente ocorre em outras técnicas de microextração, o efeito *salting-out* não favoreceu maior extração do mentol na DLLME. O que pode estar diretamente relacionado com o aumento da força iônica, favorecendo a diminuição da solubilidade do solvente extrator na amostra, provocando o aumento do volume da fase extratora, situado na superfície da solução aquosa, diminuindo o fator de pré-concentração.⁸

Verificou-se que o volume de solvente extrator contribuiu efetivamente para o processo de extração do mentol, influenciando

negativamente de maneira significativa ($p < 0,05$), ou seja, quanto menor o volume de tolueno maior a extração de mentol por DLLME, o que pode ser atribuído ao fato de que, o aumento do volume de solvente extrator, promove o aumento da fase sedimentada, ocasionando na diminuição do fator de enriquecimento, levando a possíveis perdas na detectabilidade dos analitos de interesse.⁸

Determinada a significância dos parâmetros e de suas interações, o método de superfície de resposta foi empregado para a obtenção da região experimental ótima. Para isso, foram realizados testes para a análise de variância para os modelos linear, de interação, quadrático puro e quadrático. Os resultados para a análise de variância mostraram que o modelo quadrático foi significativo ($p \leq 0,05$) para análise do efeito dos parâmetros, os valores para o ajuste de regressão obtiveram probabilidade inferior a 5% (0,0212) indicado que o modelo quadrático foi significativo e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,8244, indicando coerência entre os dados experimentais e o modelo aplicado, logo, o modelo pode ser expresso pela equação 3.

$$\begin{aligned}
 Y = & 6,00 \times 10^7 - 1,00 \times 10^8 X_1 - 1,17 \times 10^7 X_2 + 7,66 \times 10^4 X_3 + \\
 & 2,12 \times 10^7 X_1^* X_2 - 1,72 \times 10^5 X_1^* X_3 - 3,93 \times 10^4 X_2^* X_3 + \\
 & 3,23 \times 10^7 X_1^2 + 2,36 \times 10^6 X_2^2 + 107,28 X_3^2
 \end{aligned} \quad (3)$$

Em que y é a resposta predita (área do pico), X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis, força iônica, volume de água e volume de extrator, respectivamente, dados como termos lineares, de interações e quadráticos juntamente com seus respectivos coeficientes obtidos no teste estatístico. Todos os parâmetros e suas interações apresentaram significância, exceto o quadrado da força iônica, que apresentou p-valor maior que 0,05.

Na Figura 3 estão apresentados os resultados obtidos para a análise da superfície de resposta em gráficos na terceira dimensão.

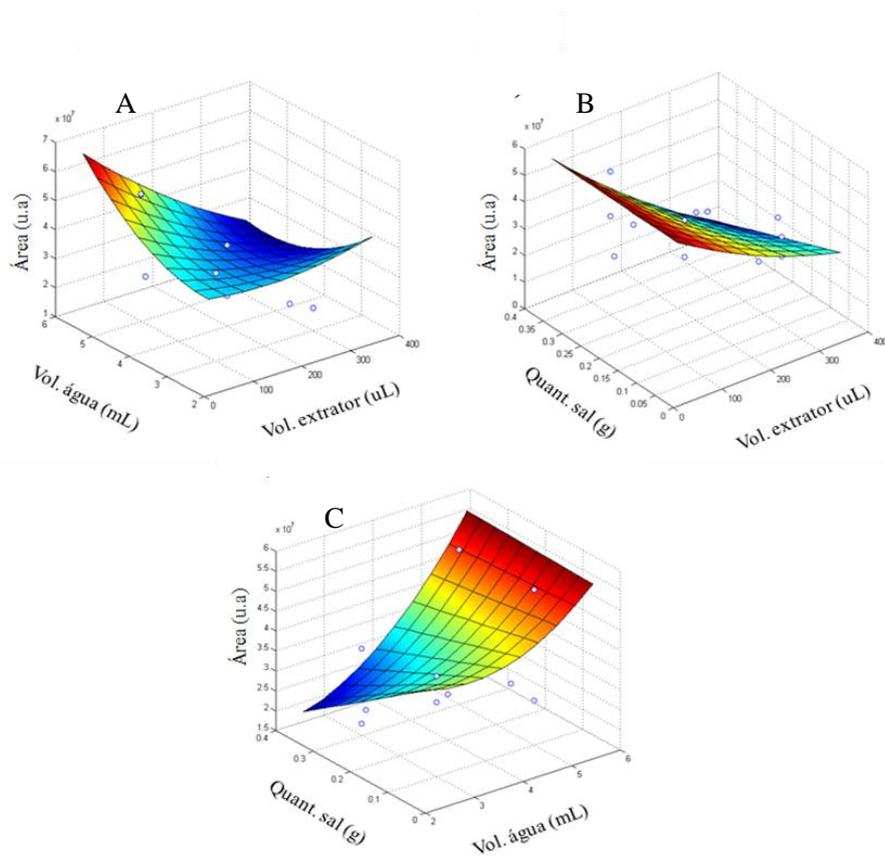


Figura 3 Superfícies de respostas obtidas para a interação das variáveis: A) volume de água com o volume de solvente extrator, fixando 0,1 g de sal, B) quantidade de sal com o volume de solvente extrator, fixando o volume de água em 5 mL e C) quantidade de sal com o volume de água, fixando o volume do solvente extrator em 100 μ L

Analisando-se as superfícies de respostas apresentadas para as interações dos fatores, foram selecionados o volume de 5 mL de água, 100 μ L de solvente extrator e 0,1 g de sal como condições ideais de trabalho para obtenção da melhor resposta analítica.

3.2 Avaliação da metodologia

A validação do método foi realizada pela avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação (LD e LQ), precisões intra e interdia e recuperação.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das respostas cromatográficas obtidas após submeter amostras (filés de tilápia), isentas e fortificadas com o anestésico em estudo, à técnica de DLLME nas condições otimizadas e posterior análise por GC-MS. Foi possível inferir que nenhum interferente foi encontrado no tempo de retenção do mentol (11,3 min). Desta forma, o método mostrou-se seletivo.

Para avaliar a linearidade do método foi construída a curva analítica (Figura 4) a partir de fortificações da matriz, em seis concentrações compreendidas entre 0,119 e 2,39 $\mu\text{g L}^{-1}$, realizadas em triplicata. O coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica foi de 0,9989, indicando boa linearidade de acordo com as diretrizes de validação.^{31, 40-41}

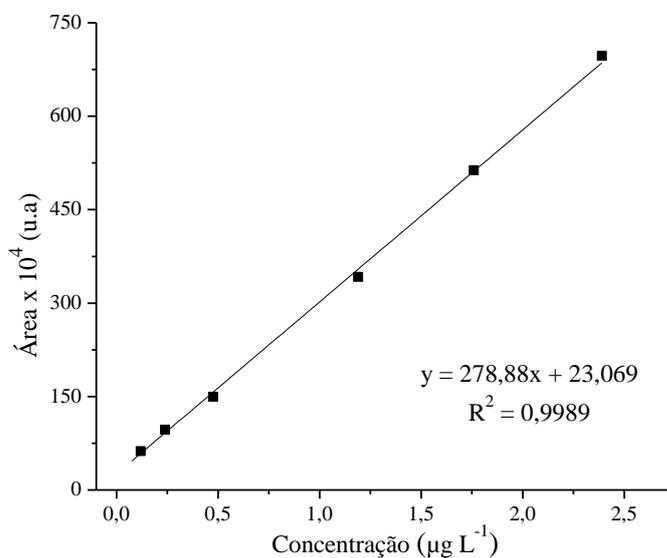


Figura 4 Curva analítica obtida pela técnica de DLLME para o mentol

Os LD e LQ encontrados foram de 0,0539 e 0,1190 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os valores de recuperação e precisão da análise do mentol pela metodologia desenvolvida estão apresentados na Tabela 4, ambas foram realizadas em dois níveis diferentes de concentração e em triplicata. Os valores de recuperação apresentaram-se satisfatórios para os níveis de concentração estudados, indicando eficiência da técnica de preparo de amostras, com desvios padrão relativos (RSD) menores que 5%.^{38, 42} A precisão do método foi avaliada em análises intradia e interdia, os resultados obtidos apresentaram variação dentro do recomendado pelas diretrizes de validação (< 16%), indicando ótima repetibilidade dos resultados.^{43, 44}

Tabela 4 Valores de recuperação e precisões intra e interdia para a validação da metodologia

Níveis de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) e RSD (%)	Precisão intradia (%)	Precisão interdia (%)
0,239	96,0 ($\pm 2,37$)	1,03	3,42
2,39	99,5 ($\pm 4,83$)	2,20	2,90

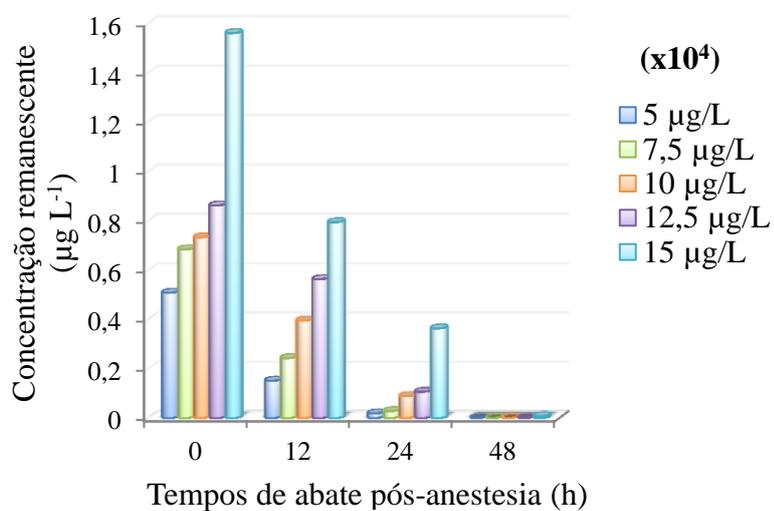
* RSD = Desvios padrão relativos

A avaliação da eficiência da técnica de extração DLLME foi realizada pela análise do EF da amostra no solvente extrator, obtido pela razão da concentração final do mentol na fase orgânica pela concentração de mentol na solução original.⁴⁵ Os resultados apresentaram uma pré-concentração do analito de aproximadamente 80 vezes.

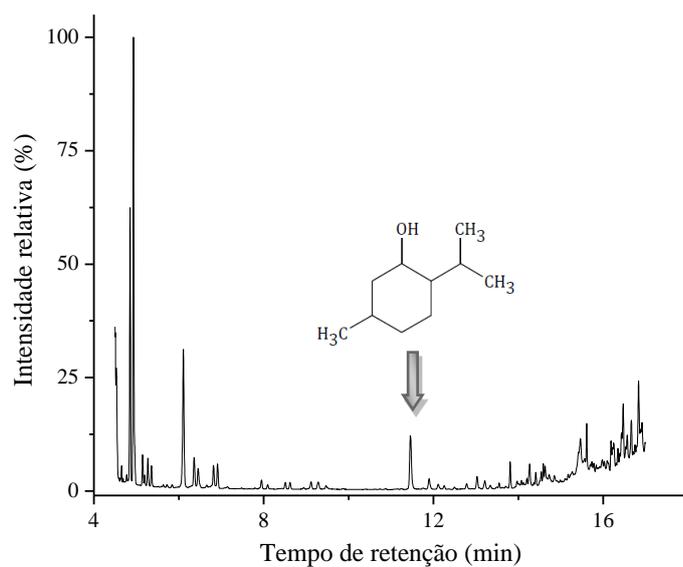
3.3 Análise residual de mentol em tecidos de peixes

Apesar das diversas vantagens observadas pelo uso do mentol como anestésico natural na aquicultura, ele ainda não foi aprovado para administração em peixes destinados ao consumo, por não existirem limites residuais definidos, tornando seu uso ilegal.⁴⁶⁻⁵¹ O único anestésico aceito para administração em peixes e animais de sangue frio pela Food and Drug Administration (FDA) é a tricafina, 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.⁵² Nesse intuito a metodologia proposta desenvolvida neste trabalho foi aplicada na determinação residual de mentol em filés de tilápias anestesiadas, os resultados obtidos em relação as concentrações remanescentes de mentol nos tecidos dos peixes analisados estão representados graficamente na Figura 5A. A Figura 5B mostra o cromatograma típico obtido para a extração usando DLLME/GC-MS.



A



B

Figura 5 A) Gráfico das concentrações remanescentes de mentol em filés de tilápia para as concentrações de sedativo de 5; 7,5; 10; 12,5 e 15x10⁴ µg L⁻¹ e tempos de abate de 0, 12, 24 e 48 h pós-anestesia. B) Cromatograma em modo SCAN, obtido para as condições otimizadas aplicadas na extração de mentol em filé de tilápia anestesiada

Como pode ser observado na Figura 5A, a maior concentração de anestesia ($15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$) obteve as maiores concentrações residuais de mentol em todos os tempos de abate, sendo encontrado um valor inferior ao limite de detecção no tempo de 48 horas, concentração abaixo do valor confiável para a metodologia proposta. Para as demais concentrações administradas não foram encontrados resíduos de mentol 48 horas após a anestesia.

4 Conclusões

A sensível e eficiente técnica de preparo de amostras DLLME juntamente com o sistema GC-MS mostrou-se promissora na determinação de mentol. A otimização da metodologia possibilitou obter uma condição otimizada, com respostas analíticas excelentes em menor número de análises, resultando em menor custo. Além disso a utilização do tolueno como solvente extrator apresentou-se como uma opção ambientalmente favorável quando comparado a outros solventes utilizados na técnica. A metodologia desenvolvida apresentou boa precisão e recuperação numa faixa linear de $0,119$ a $2,39 \mu\text{g L}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de $0,0539$ e $0,1635 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, o fator de enriquecimento obtido pela DLLME foi de 80. O presente trabalho mostra-se importante em segurança alimentar, uma vez que, nenhum alimento deve conter qualquer traço de contaminante utilizado no seu processamento. Constatando que para tilápias submetidas ao processo de anestesia com mentol é necessário um período de eliminação residual superior a 48 horas antes do abate, quando administradas dosagens iguais ou superiores a $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Ao Centro de Análises e Prospecção Químicas (CAPQ) pela realização das análises cromatográficas, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Departamento de Zootecnia da UFLA pelo fornecimento das amostras de peixe e a Rede Mineira de Química (RMQ).

Referências

- [1] M. REZAEI, Y. YAMINI, M. FARAJI, *J. Chrom. A*, 2010, **1217**, 2342-2357.
- [2] C. B. OJEDA, F. S. ROJAS, *Chromatographia*, 2011, **74**, 651-679.
- [3] S. BERIJANI, Y. ASSADI, M. ANBIA, M. R. MILANI HOSSEINI, E. AGHAEI, *J. Chrom. A*, 2006, **1123**, 1-9.
- [4] V. G. MOHAMMADI, A. MOHAMMADI, M. HASHEMI, R. KHAKSAR, P. HARATIAN, *J. Chrom. A*, 2012, **1237**, 30-36.
- [5] A. S. YAZDI, A. AMIRI, *Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 1-14.
- [6] R. R. KOZANI, J. M. NAKHAEI, M. R. JAMALI, *Env. Mon.Asses.*, 2013, **185**, 6531-6537.
- [7] A. V. HERRERA-HERRERA, M. ASENSIO-RAMOS, J. HERNANDEZ-BORGES, M. A. RODRIGUEZ-DELGADO, *Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 728-751.
- [8] M. REZAEI, Y. ASSADI, M. R. MILANI HOSSEINI, E. AGHAEI, F. AHMADI, S. BERIJANI, *J. Chrom. A*, 2006, **1116**, 1-9.
- [9] B. MOKHTARI, N. DALALL, K. POURABDOLLAH, *Arab. J. Sc. Engin.*, 2014, **39**, 53-66.

- [10] A. KRUVE, A. KUNNAPAS, K. HERODES, I. LEITO, *J. Chrom. A*, 2008, **1187**, 58–66.
- [11] P. HASHEMI, F. RAEISI, A. R. GHIASVAND, A. RAHIMI, *Talanta*, 2010, **80**, 1926–1931.
- [12] M. K. R. MUDIAM, A. CHAUHAN, R. JAIN, Y. K. DHURIYA, P. N. SAXENA, V. K. KHANNA, *J. Chrom. B*, 2014, **945**, 23-30.
- [13] X. LIU, J. HU, C. HUANG, H. WANG, X. WANG, *J. Scient. Explor.*, 2009, **32**, 4213-4219.
- [14] W. H. TSAI, H. Y. CHUANG, H. H. CHEN, J. J. HUANG, H. C. CHEN, S. H. CHENG, T. C. HUANG, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **656**, 56-62.
- [15] B. LIU, H. YAN, F. QIAO, Y. GENG, *J. Chrom. B*, 2011, **879**, 90-94.
- [16] F. VELA-SORIA, O. BALLESTEROS, A. ZAFRA-GÓMEZ, A. NAVALÓN, *Talanta*, 2014, **129**, 209-218.
- [17] L. MENG, W. ZHANG, P. MENG, B. ZHU, K. ZHENG, *J. Chrom. B*, 2015, **989**, 46-53.
- [18] R. E. RIVAS, I. LÓPEZ-GARCÍA, M. HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, *Spectrochimica Acta Part B*, 2009, **64**, 329-333.
- [19] R. R. KOZAMI, J. MOFID-NAKHAEL, M. R. JAMALL, *Env. Mon. Asses.*, 2013, **185**, 6531-6537.
- [20] M. ARVAND, E. BOZORGZADEH, S. SHARLATL, M. A. ZANJANCHI, *Env. Mon. Asses.*, 2012, **184**, 7597-7605.
- [21] M. LEONG, M. FUH, S. HUANG, *J. Chrom. A*, 2014, **1335**, 2-14.
- [22] L. GUO, H. LEE, *J. Chrom. A*, 2011, **1218**, 5040- 5046.
- [23] X. LIU, J. HU, C. HUANG, H. WANG, X. WANG, *J. Sep. Sci*, 2009, **32**, 4213-4219.
- [24] FERNANDEZ-TORRES, R.; LOPEZ, M. A. B.; CONSENTINO, M. O.; MOCHON, M. C.; PAYAN, M. R, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, **54**, 1146.

- [25] BERRADA, H.; BORRULL, F.; FONT, G.; MARCÉ, R. M., *J. Chromatogr., A* 2008, **1208**, 83.
- [26] M. A. BEZERRA, R. E. SANTELLI, E. P. OLIVEIRA, L. S. VILLAR, L. A. ESCALEIRA, *Talanta*, 2008, **76**, 965-977.
- [27] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). *Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008*, Rio de Janeiro, 35 p., **2010**.
- [28] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). *Validation of Analytical Text and Methodology, Q2(R1)*, 17 p., **2005**.
- [29] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, **2001**.
- [30] EURACHEM Working Group. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. **2014**.
- [31] AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia para métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE, nº 899 ANVISA*, de 29 de maio de **2003**, Brasília. Série 1.
- [32] X. H. ZANG, Q. H. WU, M. Y. ZHANG, G. H. XI, Z. WANG, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, **37**, 161-168.
- [33] M. I. LEONG, S. D. HUANG, *J. Chrom. A*, 2009, **1216**, 7645-7650.
- [34] X. LI, A. XUE, H. CHEN, S. LI, *J. Chrom. A*, 2013, **1280**, 9-15.
- [35] M. AMOLI-DIVA, Z. TAHERIMASLAK, M. ALLAHYARI, K. POURGHAZI, M. H. MANAFI, *Talanta*, 2015, **134**, 98- 104.
- [36] H. GHAMBARI, M. HADJMOHAMMADI, *J. Chrom. B.*, 2012, **899**, 66-71.
- [37] Y. YAMINI, M. REZAEI, M. FARAJI, *J. Chrom. A.*, 2010, **1217**, 2342-2357.
- [38] A. PEÑALVER, E. POCURULL, F. BORRULL, R. M. MARCÉ, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 557.
- [39] H. LORD, J. PAWLISZYN, *J. Chrom. A*, 2000, **902**, 17-63.

- [40] S. BRAGGIO, R. J. BARNABY, P. GROSSI, M. CUGOLA, *J. Pharm. biom. anal.*, 1996, **14**, 375-388.
- [41] M. RIBANI, C. B. G. BOTTOLI, C. H. COLLINS, I. C. S. F. JARDIM, L. F. C. MELO, *Química Nova*, 2004, **27**, 771-780.
- [42] M. E. C. QUEIROZ, S. M. SILVA, D. CARVALHO, F. M. LANÇAS, *J. Env. Sc. Health*, 2001, **36**, 517-527.
- [43] A. M. CHASIN, M. CHASIN, M. C. SALVADORI, *Revista de Farmácia e Bioquímica*, 1994, **30**, 49-53.
- [44] R. CAUSON, *J. Chrom. B.*, 1997, **689**, 175-180.
- [45] S. KHODADOUST, M. DADJMOHAMMDI, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **699**, 113-119.
- [46] M. F. FAÇANHA, L. C. GOMES, *Acta Amazônica*, 2005, **35**, 71-75.
- [47] A. F. N. GONÇALVES, et al. *Acta Scientiarum*, 2008, **30**, 339-344.
- [48] L. N. SIMÕES, L. C. GOMES, *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 2009, **61**, 613-620.
- [49] R. A. MELLO, et al, *Boletim do Instituto de Pesca*, 2012, **38**, 53-59.
- [50] S. B. de PÁDUA, et al, *Boletim do Instituto de Pesca*, 2010, **36**, 143-148.
- [51] M. I. LEONG, S. D. HUANG, S. D. *J. Chrom. A*, 2008, **1211**, p. 8-12.
- [52] P. SCHERPENISSE, A. A. BERGWERFF, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **586**, 407-410.

ARTIGO 4**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO COM
GOTA ÚNICA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA
DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE MENTOL EM SURUBIM**

Bianca Mesquita Coelho Botrel^a, Daiane Cássia Pereira Abreu^a, Adelir Aparecida Saczk^a, Matheus Julien Ferreira Bazana^a, Priscila Vieira e Rosa^b

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras - MG, Brasil

Correspondência para o autor. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812
Endereços de e-mail: biamesquitacoelho@yahoo.com.br (B. M. C. Botrel);
daianyinha_cassia@hotmail.com (D. C. P. Abreu); adelir@dqi.ufla.br (A. A.
Saczk); matheus.julien@hotmail.com (M. J. F. Bazana);
priscila@dzo.ufla.br (P. V. Rosa)

Artigo de acordo com as normas do periódico **Boletim do Instituto da
Pesca**

Resumo

A piscicultura é uma atividade que representa grande importância econômica para o Brasil, a fim de maximizar a produção uma diversidade de agentes químicos são administrados aos peixes, como os anestésicos, por facilitar o manejo, diminuir o estresse e conseqüentemente reduzir a mortalidade dos animais. No entanto, esses compostos podem se acumular no organismo dos animais por um determinado período, comprometendo a segurança alimentar do consumidor. Desta forma, torna-se necessária a determinação dos níveis residuais destes compostos na carne do pescado e o desenvolvimento de protocolos analíticos que possibilitem a detecção rápida, prática e precisa. Com esse intuito, neste trabalho foi realizada a determinação e quantificação residual do anestésico mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol em filés de surubim (*Pseudoplatystoma sp*), nas concentrações de anestesia entre 3 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$ e períodos residuais de 0, 3 e 6 horas. Na etapa de preparo de amostras foram avaliadas duas técnicas de microextração, a SPME e a SDME, ambas em modo *headspace*, empregando a cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) como método instrumental de análise. No planejamento das análises foi empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR), que possibilitou analisar as variáveis (temperatura, tempo de extração e força iônica) e também suas interações. As metodologias desenvolvidas foram validadas e aplicadas para a quantificação residual de mentol em filés de surubim, apresentando boa precisão e exatidão nas faixas lineares estudadas, com limites de detecção e quantificação de 0,0056 e $0,0169 \mu\text{g L}^{-1}$ e de $0,0074$ e $0,0226 \mu\text{g L}^{-1}$ para as técnicas de SDME e SPME, respectivamente. Para as amostras analisadas no período residual de 6 horas após a anestesia para a menor concentração administrada ($3 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$) ainda foram encontrados $13,18$ e $57,44 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando as técnicas SPME e SDME, respectivamente. Esses valores enfatizam a necessidade de estudos para a determinação do tempo residual necessário para total eliminação do mentol no peixe em estudo.

Palavras-chave: SDME, SPME, surubim, preparo de amostras

1.Introdução

Uma das atividades que mais cresce no Brasil é a piscicultura, o que se deve a boa lucratividade, com rápido retorno do capital investido. Dentre as espécies de peixes produzidas e cultivadas, o surubim (*Pseudoplatystoma sp*) é considerado uma espécie prioritária em decorrência a boa qualidade do filé, que apresenta baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares, Esta espécie vem sendo amplamente produzida em cativeiros, em virtude da diminuição dos estoques naturais e por apresentar grande importância econômica e alto valor comercial [1].

Considerando a demanda cada vez maior, tanto para o consumo quanto para a produção de peixes, um dos procedimentos mais importantes na piscicultura é a anestesia, utilizada para facilitar o manejo, evitar 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 [2,3].

Nesse sentido, o uso do mentol (1R, 2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol torna-se viável para a finalidade de anestesia, pelo fato de possuir margens seguras de administração e proporcionar a diminuição da mortalidade dos peixes. O mentol é um dos constituintes encontrados em óleo essenciais de plantas, e vem se destacando como um anestésico natural empregado como alternativa a utilização de compostos sintéticos, que além de apresentarem custos elevados, podem trazer malefícios não só para a saúde do animal, como também dos operadores que manuseiam estes produtos nas estações de piscicultura [4].

Entretanto, existe 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 [5]. Enfatizando a importância do desenvolvimento de estudos que possibilitem a determinação do período residual necessário para que o mesmo seja eliminado do organismo dos animais, uma vez que, não existem leis que regulamentem a utilização de mentol como anestésico em peixes e nenhum alimento comercializado deve apresentar contaminação de qualquer substância utilizada durante sua produção.

A SDME e a SPME são métodos de extração alternativos que vêm se destacando no campo de preparo de amostras, cujo objetivo é a posterior determinação analítica livre de interferentes. O princípio de ambas as técnicas consiste no particionamento dos analitos de interesse analítico entre a fase extratora e a amostra [6-13].

Na SDME, a fase extratora consiste em uma microgota de solvente orgânico suspensa ou imersa na solução da amostra em um sistema fechado onde ocorre a migração dos analitos [6-10]. O mesmo processo de extração ocorre na SPME, porém, nesse método a fase extratora baseia-se em uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou um sólido adsorvente [11-13]. Essas técnicas podem ser aplicadas para a extração de analitos apolares, de média polaridade e para aqueles cuja polaridade possa ser alterada previamente à extração [6-13].

A eficiência das técnicas SDME e SPME está interligada a diversos fatores que podem influenciar de forma positiva ou negativa na extração, como o efeito da força iônica na solução, tempo e temperatura de extração, agitação da amostra, pH da solução, volume do *headspace*, dentre outros [6-13]. Desta forma, tornam-se indispensáveis modelos estatísticos que possibilitem a análise de diversos parâmetros e suas interações em um volume reduzido de ensaios, com resultados de alta confiabilidade [14].

Desta forma, o intuito deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação residual do mentol em filés de surubim, empregando as técnicas SPME e SDME, utilizando a quimiometria como ferramenta estatística na otimização do processo.

2. Experimental

2.1 Materiais e reagentes

O mentol (99,0%), octano (99,9%), acetona (99,7%) e sulfato de sódio (99,0%) utilizados nas análises foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Todas as soluções foram preparadas utilizando água Tipo 1 (ultrapura), processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). A solução estoque de mentol foi preparada dissolvendo-se 0,01 g de mentol em 10 mL de acetona. Para as soluções utilizadas no preparo das amostras foram realizadas diluições da solução estoque em água, resultando em concentrações na faixa de 1,56 a 480 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SDME e de 0,47 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SPME.

Para o procedimento de SDME foi utilizada uma microsseringa com capacidade de 10 μL com agulha tipo 2, modelo 701 N adquirida da Hamilton (Bonaduz-Suíça). Foram utilizados frascos de vidro transparentes (vials) com capacidade de 10 mL selados com tampa com septo de PTFE (politetrafluoretileno/silicone), adquiridos da Agilent (EUA).

Para realização do procedimento de SPME foi utilizado um *holder* automático equipado com uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm , obtido da Supelco. Antes das análises as fibras foram condicionadas em temperatura de 250°C por 30 minutos conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados frascos de vidro transparentes (vial) com capacidade de 20 mL (Agilent) selados com tampa com septo de PTFE (politetrafluoretileno/silicone).

As amostras de peixes foram armazenadas e preparadas para o processo de extração em tubos de centrífuga cônico de 50 mL com tampa HDPE, plug a 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 (GC-QMS) Plus da Shimadzu (Shimadzu, Japão). A coluna analítica utilizada foi a DB-5MS Shimadzu (30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm), composição da fase estacionária 5% difenil-95-dimetil-polisiloxano. Para o preparo de amostras por SPME foi empregado um amostrador automático, AOC-5000 Shimadzu (Shimadzu, Japão).

2.3 Análise de mentol em filés de surubim

A quantificação residual do mentol em filés de surubim foi realizada nos tempos de abate de 0, 3 e 6 horas após a anestesia, nas concentrações: 3, 6, 9, 12 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, as concentrações e tempos de abate foram definidos com base na metodologia de estágios de anestesia e recuperação definidas para o mentol no surubim [15]. 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 UFLA.

2.3.1 Preparo de amostras de filés de surubim

As amostras foram preparadas a partir de uma adaptação do trabalho de Klimànková e colaboradores (2008) [16]: 2 g de filés de surubim foram macerados e transferidos juntamente com 2,5 mL de água ultrapura para um tubo de centrífuga cônico de 50 mL. As amostras foram agitadas por 5 minutos utilizando-se um vórtex e após, centrifugadas a $15000 \times g$ (4°C) por 10 minutos. O extrato foi transferido para o vial com capacidade de 20 mL (SPME) e 10 mL (SDME). O tecido foi novamente submetido ao processo de extração e o extrato obtido foi adicionado à primeira fração recolhida,

obtendo um volume de 5 mL. Em seguida, as amostras foram submetidas aos processos de microextração.

2.4 Otimização do método de extração por SPME e SDME

Foram realizados dois DCCRs para otimização das metodologias de análise do mentol em filés de surubim por SPME e SDME com auxílio do software Chemoface versão 1.4. Dentre os parâmetros que tem influência na eficiência das técnicas estudadas, três deles (temperatura, tempo de extração e quantidade de sal) foram avaliados de forma multivariada em três níveis (+1, 0, -1), obtendo um total de 17 experimentos. Sendo 8 pontos fatoriais obtidos de acordo com um planejamento fatorial completo de dois níveis, 6 pontos axiais (α), a uma distância de $\pm\sqrt[4]{2^k}$ do ponto central, onde k é o número de variáveis e foram realizadas análises em triplicatas do ponto central (nível 0) para obter a estimativa do erro puro [17,18]. Os níveis empregados para os respectivos parâmetros do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros e níveis usados nos planejamentos DCCR para as técnicas SPME e SDME em surubins anestesiados com mentol

Parâmetros	Mínimo (-)		Ponto Central (0)		Máximo (+)	
	SPME	SDME	SPME	SDME	SPME	SDME
T (°C)*	40	25	45	30	50	35
t (min)**	20	5	30	15	40	25
sal (g)***	2,0	2,0	2,5	2,5	3,0	3,0

DCCR = Delineamento composto central rotacional

*temperatura de extração

**tempo de extração

***quantidade de sal

2.5 Análise por *headspace* em SDME e SPME

Antes dos processos de extração do mentol, as amostras foram submetidas a um período de estabilização do sistema por 10 minutos, com

agitação de 250 rpm e temperaturas de 50°C (SPME) e/ou 30°C (SDME). Após a estabilização, a fibra (PDMS) foi exposta com uma penetração de 40 mm no *headspace* por 20 minutos para extração do analito empregando a SPME. Já na SDME a microgota de solvente orgânico (octano) com volume de 1,8 µL foi exposta a uma distância de 1,5 cm da amostra por um período de 15 minutos. Após o período de extração a microgota e a fibra foram retraídas para seus respectivos dispositivos e injetadas isoladamente diretamente no injetor do cromatógrafo em fase gasosa.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa com fluxo ajustado para 1 mL min⁻¹, no modo splitless utilizando-se um injetor split-splitless. A temperatura inicial do programa foi de 80°C durante 3 minutos, aumentada para 130°C a uma taxa de 5°C min⁻¹, a partir dessa temperatura aumentou-se para 250°C a uma taxa de 30°C min⁻¹, totalizando 17 minutos de corrida. A temperatura do injetor foi mantida a 270°C, na qual a fibra ficou exposta dessorvendo por 2 minutos para o processo de SPME e o volume de injeção da fase extratora para SDME foi de 0,5 µL, as temperaturas de interface e da fonte de íons foram de 280°C e 150°C, respectivamente. O detector do espectrômetro de massas operou em modo íon selecionado (SIM), de 5 a 17 minutos. O detector foi programado para ler as *m/z* de 71 e 81 em uma energia eletrônica de 70 eV. A quantificação do mentol foi realizada pela integração das áreas dos picos.

2.6 Validação do método analítico de quantificação de mentol

A metodologia desenvolvida para determinação do mentol foi validada de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [19] e do International Conference on Harmonization (ICH) [20]. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, linearidade, precisão (intradia e interdia), fator de recuperação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

A validação do método de quantificação do mentol foi realizada em filés de peixe isentos de anestésico pelo método de padronização externa, fortificando-se as amostras a partir da solução estoque de mentol, resultando nas concentrações: 1,56; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 90; 120; 240 e 480 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SDME e 0,47; 0,94; 1,87; 3,75; 7,5; 15; 30; 60 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SPME. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, as análises foram realizadas em triplicatas empregando-se as técnicas de microextração.

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos das amostras de tecido de peixe isento de anestésico (amostra branco) com os extratos das amostras de tecido de peixe fortificadas com solução padrão de mentol nas concentrações de 7,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, para as técnicas de SDME e SPME, respectivamente. Mediante a comparação dos cromatogramas é possível observar se há presença de picos interferentes na região do tempo de retenção do analito de interesse.

A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica, confeccionada a partir de amostras de tecido de peixe fortificadas com solução estoque de mentol, numa faixa dinâmica compreendida entre 1,56 - 480 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SDME e entre 0,47 - 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SPME.

Os LD e LQ do método para o composto em estudo foram obtidos estimando-se o desvio padrão do intercepto (s) pelo coeficiente angular (S) da curva analítica, conforme equações 1 e 2, respectivamente.

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

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

A avaliação da precisão do método foi realizada utilizando-se ensaios de precisão intradia e interdia. As amostras de tecido de peixe fortificadas com solução estoque de mentol nas concentrações de 7,5; 30 e

60 µg L⁻¹ foram analisadas em triplicata para ambas as técnicas. A precisão interdia foi realizada repetindo-se a análise intradia em três dias distintos. Ambas as respostas foram expressas em termos de coeficiente de variação (CV%).

Neste estudo a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação. Para isso, amostras de peixes foram fortificadas com solução estoque de mentol resultando em três níveis de concentração: 7,5; 30 e 60 µg L⁻¹. Subsequentemente, as amostras fortificadas foram submetidas aos processos de extração empregando as técnicas miniaturizadas, SDME e SPME e, posteriormente submetidas à análise por GC-MS. Em seguida, as concentrações médias reais foram determinadas para cada nível de concentração, empregando a equação obtida a partir da curva analítica. A recuperação foi calculada por meio da Equação 3.

$$R(\%) = \frac{\text{Valor}_{\text{obtido}}}{\text{Valor}_{\text{esperado}}} \times 100 \quad (3)$$

Em que valor obtido é a concentração/área medida do anestésico após fortificação da matriz (filé de peixe isento de mentol) e o valor esperado é a concentração/área obtida fortificando-se a água deionizada, utilizada como matriz de referência, ambos os valores obtidos a partir das amostras submetidas ao procedimento de microextração e posteriormente analisadas por GC-MS.

2.7 Aplicação da SDME e da SPME em amostras de tecido de surubim

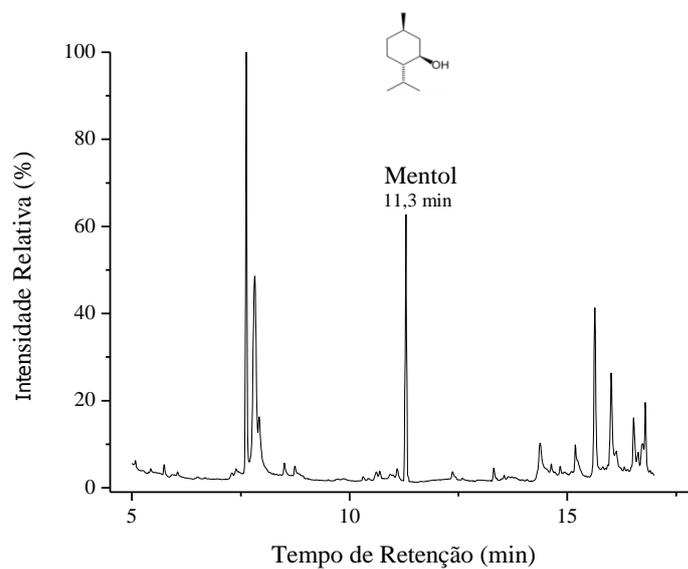
Após a validação do método realizada em amostras de peixes da espécie tilápia do Nilo. Utilizou-se o critério adotado por Mercer (2005) [21], considerando a dificuldade de aplicar os padrões nos próprios extratos em diferentes matrizes. De acordo com o trabalho mencionado, é possível selecionar amostras de referência baseado em sua composição, desta forma,

as amostras de tilápia representaram as amostras de surubim durante o procedimento de otimização e validação. Após, analisou-se as amostras de peixes da espécie surubim empregando a SDME e a SPME. A extração do mentol foi realizada em duplicata para maior confiabilidade dos resultados, seguindo o procedimento da microextração descrito no tópico 2.5. Todos os extratos foram analisados no mesmo dia do procedimento de preparo de amostras, descrito no tópico 2.3.1.

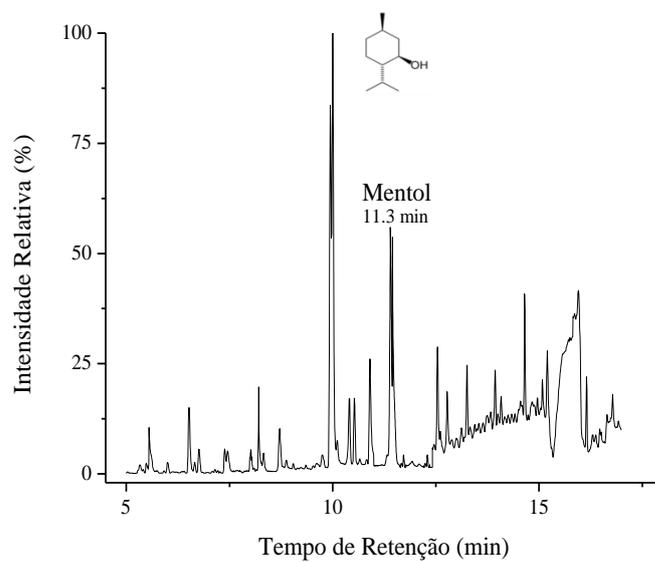
3 Resultados e discussão

3.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram otimizadas levando em consideração o tipo de fibra extratora utilizada na SPME e a natureza do solvente orgânico na SDME. A Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos para matrizes de surubim fortificadas com o padrão de mentol no modo SCAN aplicando as técnicas de SDME e SPME, respectivamente.



A



B

Figura 1 Cromatogramas no modo SCAN da extração do padrão de mentol no tecido de surubim por: A) SDME e B) SPME

Pelos cromatogramas da Figura 1 pode-se perceber que o processo de extração por ambas as técnicas possibilitou uma boa seletividade do

método proposto na determinação de mentol, observada pela separação dos picos. Pode-se inferir pela observação dos cromatogramas que a técnica SDME obteve uma melhor seletividade quando comparada a SPME, no qual a matriz apresentou maior afinidade pela composição da fase polimérica usada na SPME do que pelo octano utilizado como solvente extrator na SDME. Visando facilitar a identificação do mentol optou-se por trabalhar com análises em modo SIM por ser mais sensível e seletivo. Desta forma, analisou-se o espectro de massas do mentol e os íons precursores 71 e 81 m/z foram selecionados, uma vez que apresentaram maior intensidade. O íon molecular nem mesmo apareceu no espectro, possivelmente por se tratar de um álcool secundário, desta forma, não foi selecionado como íon precursor para as análises subsequentes.

3.2 Condições SDME e SPME

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. No qual, o volume e a agitação foram fixados de forma a garantir um espaço seguro para que a gota não tivesse contato com a solução.

Alguns trabalhos reportam a utilização da fibra PDMS em diferentes matrizes para a determinação de mentol, óleos naturais e sintéticos [22], produtos alimentícios e farmacêuticos [23], alimentos [24], cremes [25]. Além da fibra PDMS, os autores também testaram a PDMS/DVB (65 μm), PA (85 μm), CAR/PDMS (75 μm) e DVB/CAR/PDMS (50/30 μm), no qual, todas as fibras apresentaram eficiência na extração.

Neste trabalho, a fibra empregada nas extrações do mentol foi a PDMS (100 μm), a qual apresentou resultados satisfatórios, o que pode ser explicado pela espessura do revestimento da fibra, que com o aumento da espessura aumenta-se a eficiência de extração, permitindo analisar uma maior gama de concentrações [26].

Devido a complexidade da matriz (biológica) optou-se por trabalhar com extração por *headspace*, uma vez que, em modo direto os constituintes da matriz poderiam danificar a fibra, ficando retidos irreversivelmente, inutilizando-a.

3.3 Análise por delineamento composto central

Os parâmetros selecionados para análise de forma multivariada para ambas as técnicas foram: temperatura, tempo de extração e quantidade de sal. Estes foram selecionados por apresentarem maior influência na eficiência da extração do mentol. Com o intuito de avaliar o efeito das três variáveis na análise residual, os experimentos foram conduzidos empregando o planejamento DCCR, obtendo um total de 17 experimentos para cada técnica de microextração, sendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Matriz do DCCR para as variáveis em estudo na análise de mentol em filés de peixe

Ensaio	Temperatura (°C)		Tempo de extração (min)		Sal (g)	
	SDME	SPME	SDME	SPME	SDME	SPME
1	25	40	5	20	2,0	2,0
2	25	40	5	20	3,0	3,0
3	25	40	25	40	2,0	2,0
4	25	40	25	40	3,0	3,0
5	35	50	5	20	2,0	2,0
6	35	50	5	20	3,0	3,0
7	35	50	25	40	2,0	2,0
8	35	50	25	40	3,0	3,0
9	20	36,6	15	30	2,5	2,5
10	40	53,4	15	30	2,5	2,5
11	30	45	1	13,15	2,5	2,5
12	30	45	35	46,49	2,5	1,66
13	30	45	15	30	1,5	3,34
14	30	45	15	30	3,5	2,5
15	30	45	15	30	2,5	2,5
16	30	45	15	30	2,5	2,5
17	30	45	15	30	2,5	2,5

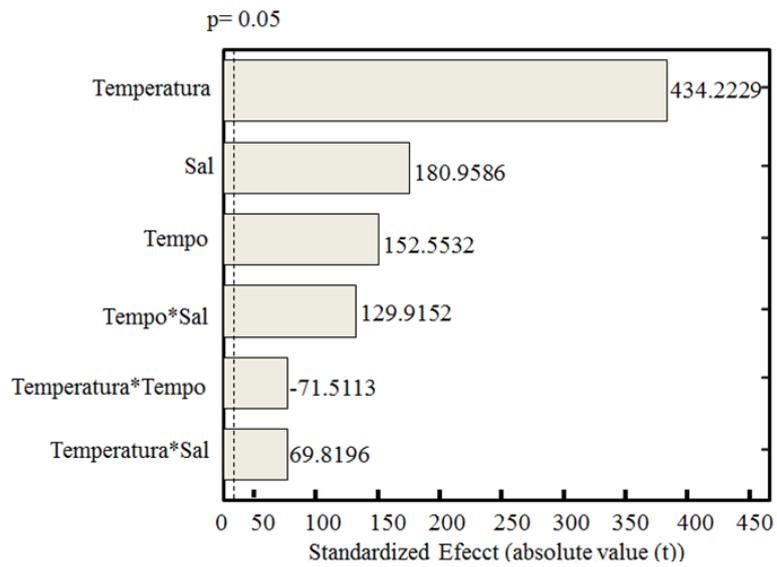
Nas análises pelo DCCR não foram realizadas repetições dos pontos fatoriais e axiais, pois, nesse planejamento estima-se os erros de efeitos supondo que interações de altas ordens para $k \geq 3$ não são significativos e, portanto, são erros experimentais nos valores dos efeitos [17,18]. Assim, substitui-se 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.

Na tabela 3 estão os resultados obtidos em área para os 17 ensaios da otimização das metodologias analíticas (SDME e SPME).

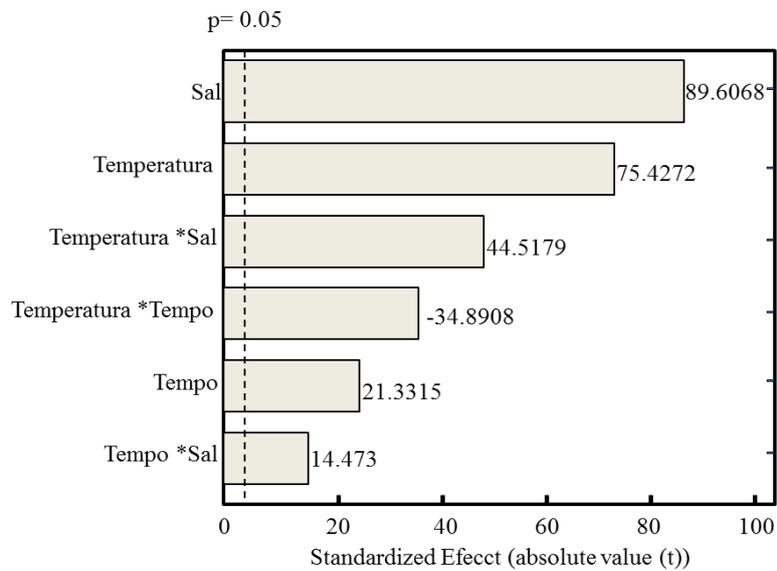
Tabela 3 Resultados obtidos a partir dos planejamentos DCCRs para a análise de mentol em filés de tilápia pelas técnicas de SDME e SPME

Ensaio	Área do composto mentol (u.a)	
	SDME	SPME
1	8.072.634	28.018.293
2	11.072.841	31.539.019
3	5.341.090	29.406.824
4	18.686.571	45.238.473
5	36.192.748	31.002.740
6	40.956.105	55.270.163
7	14.201.169	30.892.215
8	46.565.105	50.925.935
9	4.298.345	36.499.642
10	44.814.199	49.284.809
11	5.526.278	36.982.443
12	46.714.153	39.995.641
13	42.899.716	23.472.471
14	50.758.176	24.685.702
15	51.168.750	29.162.014
16	51.370.711	28.7666.39
17	51.269.730	28.932.569

A partir das respostas em área obtidas nas análises de acordo com a matriz proposta nos planejamentos foram construídos os diagramas de Pareto (Figura 2), representando os efeitos de cada variável estudada e suas interações.



A



B

Figura 2 Diagramas de Pareto para o efeito das variáveis sobre a área total:
A) SDME e B) SPME

Analisando os diagramas de Pareto, foi possível inferir que para ambas as técnicas de extração, todos os parâmetros analisados assim como suas interações apresentaram significância com 95% de confiança em um teste estatístico [17,18]. Foi possível observar (Figura 2A) que o parâmetro temperatura exibiu maior influência para a análise de mentol pela técnica de SDME, indicando que o aumento da temperatura de 25 para 35°C favorece a extração do composto. Na SPME (Figura 2B) foi o segundo parâmetro de maior influência. Esta influência da temperatura na extração pode estar relacionada ao aumento da volatilidade do composto, o que acarreta no 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 [27, 28].

A avaliação do parâmetro tempo de extração para ambos métodos de microextração indica que, tempos maiores de extração favorecem o aumento do sinal analítico. Além disso, o controle do tempo de extração deve ser rigoroso, uma vez que, este parâmetro esta diretamente relacionada à repetibilidade do método [27, 28].

Analisando-se o parâmetro, quantidade de sal, individualmente, este aponta grande influência na resposta analítica principalmente na SPME. Este fato pode estar associado à diminuição da solubilidade do mentol na solução pelo aumento da força iônica, tornando-o mais hidrofóbico, além disso, o aumento da força iônica contribuiu significativamente para a estabilidade da gota [27-29].

As interações dos parâmetros também mostraram efeito positivo na estimativa dada pelo diagrama de Pareto, indicando que suas interações apresentam influência na extração do mentol.

3.3.1 Análise de Superfície de Resposta

Para determinação das condições adequadas para a quantificação residual de mentol, foi empregada a análise por metodologia de superfície de

resposta. Esta se baseia na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares, quadráticos, quadráticos puro ou de interações para descrever o sistema estudado dando condições para otimizá-lo [30].

Os cálculos estatísticos foram realizados usando-se o programa Chemoface, os resultados encontram-se na Tabela 3. As análises da qualidade do ajuste para as superfícies de resposta avaliadas por análise de variância para a SDME e SPME indicaram que a regressão para ambas as técnicas foi significativa para o modelo quadrático (Equação 1).

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

em que y é a resposta predita (área); β_0 , é o ponto de interseção; β_{ij} , o coeficiente de interação, β_i , o coeficiente linear, β_{ii} , o coeficiente quadrático, k , é o número de fatores, x_i e x_j são as variáveis referentes aos fatores e ε , o erro associado com o modelo.

Os coeficientes do modelo e a respectiva significância de cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4. Todos os parâmetros, suas interações e os termos ao quadrado apresentaram significância com 95% de confiança.

Tabela 4 Coeficientes e testes de significância das variáveis obtidas para a microextração do mentol por SDME e SPME

Termo	Coeficiente		P	
	SDME	SPME	SDME	SPME
b_0	$-4,5206 \times 10^8$	$4,9845 \times 10^8$	$1,7239 \times 10^{-5}$	$1,8331 \times 10^{-4}$
X_1	$2,6573 \times 10^7$	$-2,0385 \times 10^7$	$9,3880 \times 10^{-6}$	$1,2543 \times 10^{-4}$
X_2	$5,4782 \times 10^6$	$-5,1174 \times 10^5$	$2,8869 \times 10^{-5}$	0,0240
X_3	$1,5871 \times 10^7$	$-2,8240 \times 10^7$	0,0022	0,0040
$X_1 * X_2$	$-1,5051 \times 10^5$	$-4,8982 \times 10^4$	$2,2508 \times 10^{-5}$	$8,2043 \times 10^{-4}$
$X_1 * X_3$	$1,6990 \times 10^6$	$1,2499 \times 10^6$	$7,0643 \times 10^{-5}$	$5,0420 \times 10^{-4}$
$X_2 * X_3$	$1,1045 \times 10^6$	$2,0318 \times 10^5$	$4,1790 \times 10^{-5}$	0,0047
X_1^2	$-4,4049 \times 10^5$	$2,1711 \times 10^5$	$7,4587 \times 10^{-6}$	$1,1866 \times 10^{-4}$
X_2^2	$-1,0459 \times 10^5$	$3,8710 \times 10^4$	$8,2681 \times 10^{-6}$	$2,3326 \times 10^{-4}$
X_3^2	$-1,5424 \times 10^7$	$-4,8949 \times 10^6$	$6,0825 \times 10^{-5}$	0,0023

X_1 = Temperatura; X_2 = Tempo de extração; X_3 = Quantidade de sal

Este modelo é dado como adequado para as análises de mentol em filés de peixe, uma vez que, os valores de coeficiente de determinação (R^2) foram maiores que 80% e os valores de probabilidade de significância (p) menores que 5% para os métodos avaliados, conforme observado na Tabela 5 [17, 18].

Tabela 5 Resultados estatísticos da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos dados ao modelo quadrático

SDME					
	SQ	GL	QM	F	P
Regressão	$4,940^{1 \times 10^{15}}$	9	$5,4890 \times 10^{14}$	3,9453	0,0420
Residual	$9,7388 \times 10^{14}$	7	$1,3913 \times 10^{14}$		
Falta de ajuste	$9,7386 \times 10^{14}$	5	$1,9477 \times 10^{14}$	$1,9101 \times 10^4$	$5,2352 \times 10^{-5}$
Erro puro	$2,0394 \times 10^{10}$	2	$1,0197 \times 10^{10}$		
Total	$5,9140 \times 10^{15}$	16			
R ²	0,8353				
SPME					
	SQ	GL	QM	F	P
Regressão	$1,2344 \times 10^{15}$	9	$1,3715 \times 10^{14}$	3,9515	0,0418
Residual	$2,4296 \times 10^{14}$	7	$3,4709 \times 10^{13}$		
Falta de ajuste	$2,4289 \times 10^{14}$	5	$4,8577 \times 10^{13}$	$1,2324 \times 10^3$	$8,1096 \times 10^{-4}$
Erro puro	$7,8833 \times 10^{10}$	2	$3,9417 \times 10^{10}$		
Total	$1,4773 \times 10^{15}$	16			
R ²	0,8355				

A partir da escolha do modelo apropriado para analisar os dados, foram obtidas as superfícies de resposta das interações entre as variáveis estudadas, ilustradas nas Figuras 3 e 4.

SDME

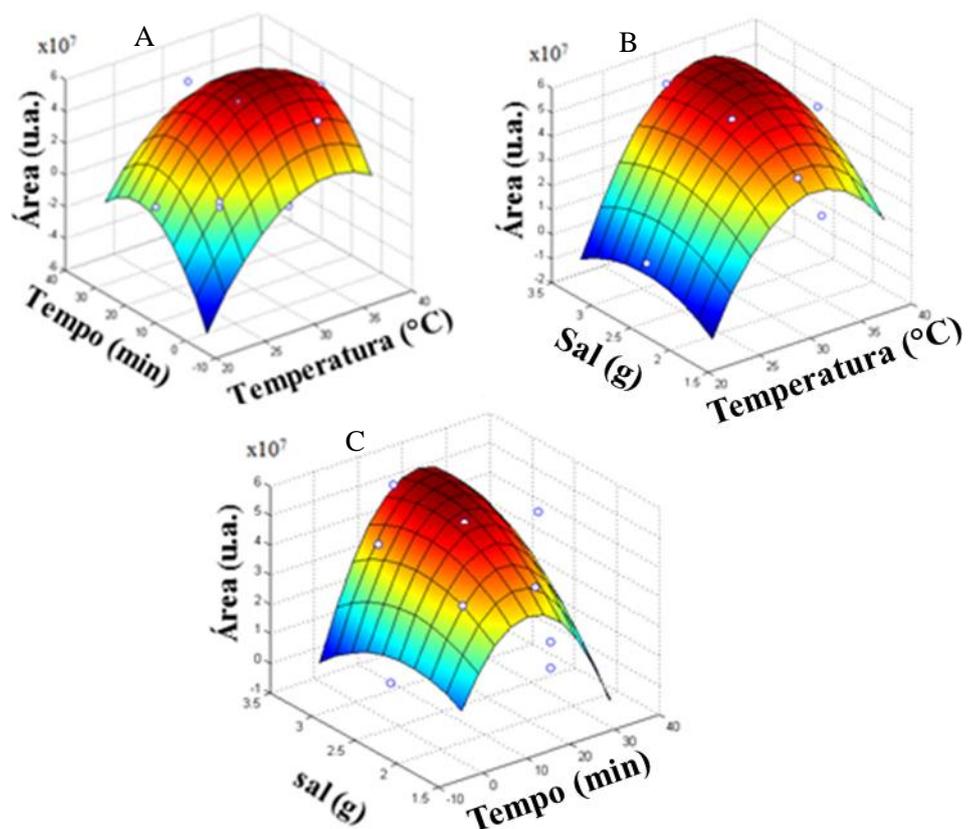


Figura 3 Gráficos das superfícies de respostas da área *versus* o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se a quantidade de sal em 3 g; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de extração de 15 minutos e C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 30°C, respectivamente para a técnica de SDME

SPME

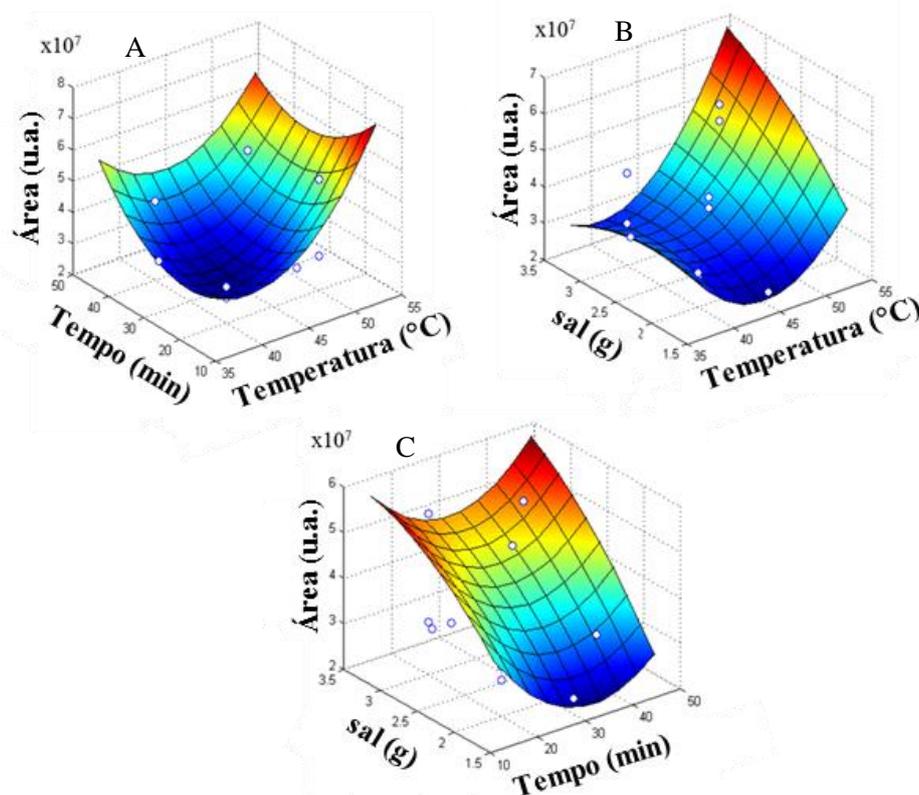


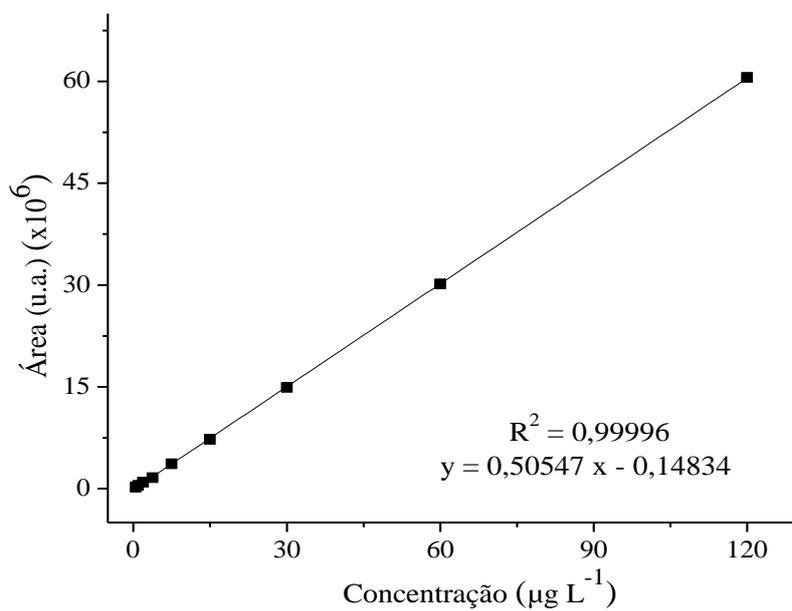
Figura 4 Gráficos das superfícies de respostas da área *versus* o efeito da interação entre: A) temperatura e tempo de extração, fixando-se a quantidade de sal em 3 g; B) quantidade de sal e temperatura de extração, fixando-se o tempo de extração de 20 minutos e C) quantidade de sal e tempo de extração, fixando-se a temperatura de 50°C, respectivamente para a técnica de SPME

Considerando-se a análise dos gráficos de superfícies de respostas representados na Figura 3 envolvendo a interação entre os fatores, adotou-se como condições de trabalho para a SDME, a temperatura correspondente a 30°C, tempo de extração de 15 minutos, empregando 3 g de sal para as extrações de mentol. Para a SPME, com base na Figura 4, as condições otimizadas foram, a temperatura de 50°C, tempo de extração de 20 minutos, empregando 3 g de sal, para a análise de mentol em filés de peixe.

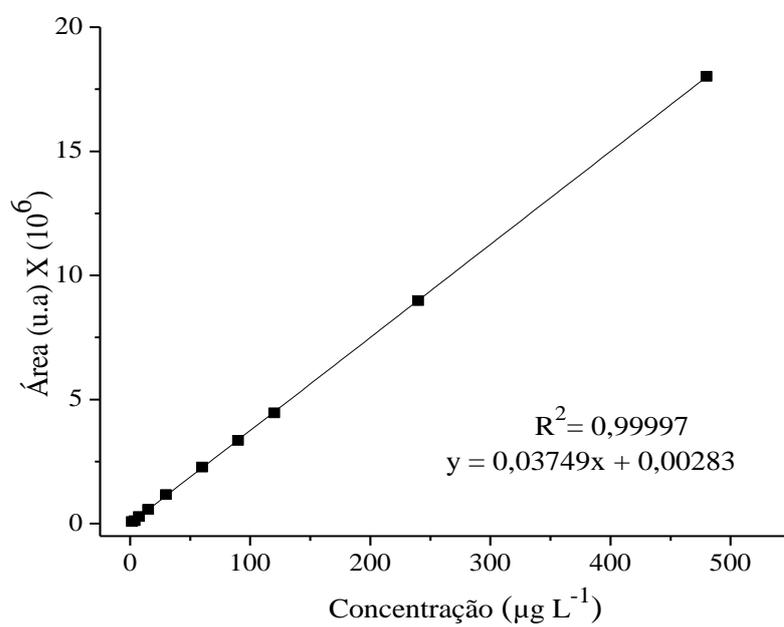
3.4 Validação das metodologias desenvolvidas

A seletividade dos métodos analíticos foi avaliada comparando-se cromatogramas da matriz isenta de mentol (extrato em branco), com cromatogramas dos extratos da matriz fortificada com solução estoque de mentol na concentração de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para as técnicas de SDME e SPME, respectivamente. De maneira geral, pôde-se observar que a matriz de peixe apresenta picos característicos, que correspondem a sua composição, no entanto, não foram observados picos de interferentes no mesmo tempo de retenção do mentol. Desta forma, a seletividade dos métodos foi atendida.

Os intervalos lineares de trabalho empregados para verificação da linearidade das metodologias desenvolvida para determinação residual de mentol em peixes pelas técnicas de SPME e SDME foram de 0,47 a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ e 1,56 a $480 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A partir destes intervalos de concentração, foram construídas as curvas analíticas apresentadas na Figura 5.



A



B

Figura 5 Curvas analíticas obtidas para a extração de mentol por: A) SPME e B) SDME

As equações obtidas para o mentol pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica foram $y = 0,50547x - 0,14834$ e $y = 0,03749x + 0,00283$, para as técnicas de SPME e SDME, respectivamente, calculadas pela regressão linear medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração. Analisando ambas as equações obtidas pode-se inferir que a técnica de SPME apresentou maior sensibilidade que a técnica SDME, uma vez que, a inclinação da reta da curva analítica da SPME foi maior, indicando maior capacidade da técnica em diferenciar dois valores de concentrações próximas. Os coeficientes de determinação encontrados foram 0,9999 para a SPME e 0,9999 para a SDME, mostrando forte correlação linear entre as concentrações e as áreas em ambas as técnicas.

Os LD e LQ encontrados foram de 0,0056 e 0,0169 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SDME e de 0,0074 e 0,0226 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SPME, respectivamente. Os resultados obtidos para a precisão intradia e interdia nas concentrações de 7,5; 30 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, expressos pelo coeficiente de variação (CV%) estão apresentados na Tabela 5 para ambas as técnicas de preparo de amostra. Os resultados obtidos revelaram que os métodos propostos apresentaram precisão aceitável.

Similar à precisão, a avaliação da recuperação também foi realizada em três níveis para a SPME e SDME (Tabela 6). Esses resultados indicaram que as metodologias desenvolvidas apresentaram exatidão confiável. Sendo que, a faixa de recuperação recomendada por Ribani e colaboradores (2004) [31] está compreendida entre 70 e 110% para análise residual.

Tabela 6 Resultados obtidos para as precisões intradia, interdía e recuperação avaliadas para a SPME e SDME

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SPME			SDME		
	(CV%) *	(CV%) **	(%) ***	(CV%) *	(CV%) **	(%) ***
7,5	2,602	3,328	91,4 $\pm 4,5$	1,200	3,325	93,3 $\pm 3,1$
30	0,735	1,996	103,7 $\pm 3,3$	2,447	4,363	93,9 $\pm 4,9$
60	0,772	1,558	86,9 $\pm 2,0$	1,331	4,116	94,1 $\pm 4,6$

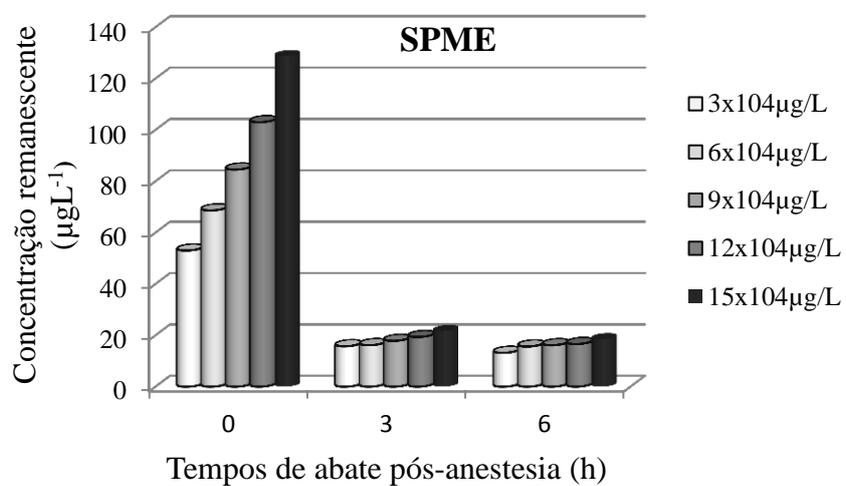
*Precisão intradia

**Precisão interdía

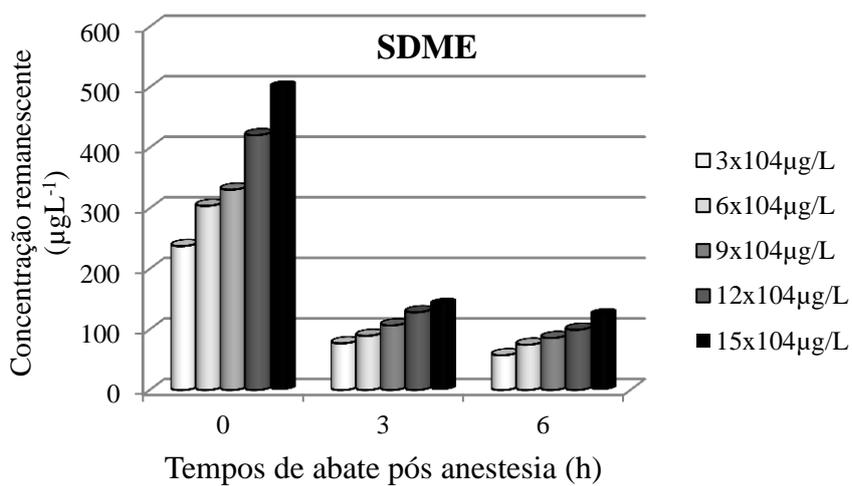
***Recuperação

3.5 Determinação de mentol em filés de surubim

O método validado foi aplicado na determinação residual em filés de surubim anestesiados com mentol nas concentrações de 3, 6, 9, 12 e $15 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$, nos tempos de abate pós-anestesia de 0, 3, e 6 horas. Estes estágios de anestesia foram seguidos conforme recomendações para essa espécie [15], porém como pode ser observado nas Figuras 6A e 6B o tempo de depuração de 6 horas não foi suficiente para a total eliminação residual de mentol para as concentrações administradas no processo de sedação. Apesar do mentol ser um produto de origem natural, ainda é necessário mais estudos que possibilitem determinar o tempo de persistência deste fármaco no organismo desses animais.



A



B

Figura 6 Concentrações residuais de mentol em filés de surubim anestesiados nas concentrações de 3, 6, 9, 12 e 15x10⁴ µg L⁻¹, com tempos residuais de 0, 3, e 6 horas após a anestesia, utilizando técnicas de preparo de amostras: A) SPME e B) SDME

Ambas as técnicas utilizadas no preparo das amostras (SPME e SDME) de peixes possibilitaram a determinação residual de mentol, conforme pode ser observado na Figura 6. Analisando a figura é possível inferir que, quando empregada a SDME as concentrações detectáveis de mentol nos tecidos dos surubins foram maiores. No período residual de 6 horas, na menor concentração administrada ($3 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$), foram detectados 13,18 e 57,44 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando as técnicas SPME e SDME, respectivamente. Inferindo que, para total eliminação do mentol do tecido dos peixes (surubim) é necessário um período residual superior a 6 horas.

Conclusões

Em decorrência da complexidade da amostra estudada, as técnicas de SPME e SDME mostraram-se viáveis, por possibilitarem a análise do mentol em modo *headspace*, eliminando possíveis interferentes a baixo custo e com um consumo menor de solventes. As metodologias analíticas de preparo de amostra propostas mostraram-se sensíveis e eficazes na extração do composto em estudo, apresentando limites de detecção e quantificação de 0,0056 e 0,0169 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SDME e de 0,0074 e 0,0226 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SPME, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis nas faixas lineares estudadas. De acordo com a OMS nenhum alimento deve conter qualquer traço residual de compostos usados no processamento, com isso, para se garantir que o produto a ser consumido esteja isento de mentol ainda são necessários estudos acerca do período de depuração do anestésico. Uma vez que, no tempo de abate de 6 horas após a anestesia para a menor concentração administrada ($3 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$), foram detectadas concentrações consideráveis de mentol.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Ao Centro de Análises e Prospecção Químicas (CAPQ) pela realização das análises cromatográficas, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Departamento de Zootecnia da UFLA pelo fornecimento das amostras de peixe e a Rede Mineira de Química (RMQ).

Referências

- [1] D. V. CREPALDI, P. M. C. FARIA, E. A. TEIXEIRA, O surubim na aquacultura do Brasil, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 30 (2006) 150-158.
- [2] R. G. YUKIHIRO, M. V. SAITA, A. F. N. GONÇALVES, L. S. TAKAHASHI, Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), *Rev. Bras. de Saúde e Prod. Anim.* 9 (2008) 350-357.
- [3] B. H. YANG, Z. G. PIAO, Y. B. KIM, C. H. LEE, J. K. LEE, K. PARK, J. S. KIM, S. B. OH, Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol, *J. of Dent. Res.* 82 (2003) 781-785.
- [4] M. F. FAÇANHA, L. C. A. GOMES, Eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae), *Acta Amazônica.* 35 (2005) 71-75.
- [5] L. N. SIMÕES, P. PAIVA, L. C. GOMES, Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápia-do-nilo, *Pesq. Agropec. Bras.* 45, (2010) 12.
- [6] A. TOR, Determination of chlorobenzenes in Water by drop-based liquid phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection, *J. Chrom. A*, 1125 (2006) 129-132.

- [7] L. XU, C. BASHEER, H. K. LEE, Developments in single-drop microextraction. *J. Chrom. A*, 1152 (2007) 184-192.
- [8] H. ZHANG, J. HUANG, C. WEI, B. YU, X. YANG, X. CHEN, Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables, *Talanta*, 74 (2008) 599-604.
- [9] M. SARKHOSH, A. MEHDINIA, A. JABBARIL, Y. YAMINI, Single drop microextraction of biphenyl and biphenyl oxide in aqueous samples by gás chromatography-flame ionization detection, *J. Anal. Chem.* 2 (2011) 689-696.
- [10] A. JAIN, K. K. VERMA, Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review, *Anal. Chim. Acta*, 706, (2011) 37-65.
- [11] A. L. P. VALENTE, F. AUGUSTO, Microextração por fase sólida, *Química Nova*. 23 (2000) 523-530.
- [12] M. E. QUEIROZ, Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. *Scientia Chromatographica*, 1, (2009) 11-19.
- [13] J. PAWLISZYN, D. VUCKVIC, F. MIRNAGHI, S. RISTICEVIC, Automated SPME Systems, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, (2012) 135-165.
- [14] W. N. L. do SANTOS, C. M. C. SANTOS, S. L. C. FERREIRA, 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, *J. Microchem.* 75, (2003) 211-221.
- [15] L. G. ROSS, B. ROSS, *Anesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, 3^o ed. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 2008, p. 240.
- [16] E. KLIMÁNKOVÁ, K. RIDDELLOVA, J. HAJŠLOVA, J. POUŠTKA, J. KOLAROV, V. KOCOUREK, Development of an SPME GC/MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish, *Talanta*. 75 (2008) 1082-1088.

- [17] R. F. TEÓFILO, M. M. C. FERREIRA, Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, *Química Nova*, 29, (2006) 338-350.
- [18] N. B. MATEUS, D. BARBIN, A. CONAGIN, Viabilidade de uso do delineamento composto central. *Acta Scientiarum*. 23, (2001) 1537-1546.
- [19] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**, Rio de Janeiro, 2010. 35 p.
- [20] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Text and Methodology**, Q2(R1), 2005, 17 p.
- [21] G. E. MERCER, Determination of 112 halogenated pesticides using gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring. *J. AOAC Int.* 5 (2005) 1452-1462.
- [22] F. PENA-PEREIRA, I. LAVILLA, C. BENDICHO, Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in fish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry, *Food Chemistry*. 119 (2010) 402-407.
- [23] A. PEÑALVER, E. POCURULL, R. M. MARCÉ, Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, *Tren. Anal. Chem.* 18 (1999) 557-568.
- [24] A. L. P. VALENTE, F. AUGUSTO, Microextração por fase sólida, *Química Nova*. 23 (2000) 523-530.
- [25] G. A. RIVERA, M. VILA, M. LORES, C. G. JARES, M. LLOMPART, Development of a multi-preservative method based on solid-phase microextraction-gas chromatography- tandem mass spectrometry for cosmetic analysis, *J. Chrom. A*. 1339 (2014) 13-25.
- [26] E. ZHAO, L. HAN, S. JIANG, Q. WANG, Z. ZHOU, Application of a single-drop microextraction for the analysis old organophosphorus pesticides in juice, *J. Chrom. A* 1114 (2006) 269-273.
- [27] M. A. JEANNOT, A. PRZYJAZNY, J. M. KOKOSA, Single drop

microextraction: development, applications and future trends, *J. Chrom. A.* 1217 (2010) 2326-2336.

[28] W. M. COLEMAN, S. N. LAWSON, Solid-Phase Microextraction—Gas Chromatographic—Mass Selective Detection Analysis of Selected Sources of Menthol. *J. Chrom. Sci.* 36 (1998) 401-405.

[29] M. LIGOR, B. BUSZEWSKI, Determination of menthol and menthone in food and pharmaceutical products by solid-phase microextraction – gas chromatography, *J. Chrom. A.* 847 (1999) 161-169.

[30] M. LIGOR, J. WÓJCIK, B. BUSZEWSKI, Application of the solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography (GC, GC/MS) in food analysis. *Pol. j. food nutrit. sci.* 13/54 (2004) 355-362.

[31] M. RIBANI, C. B. G. BOTTOLI, C. H. COLLINS, I. C. S. F. JARDIM, L. F. C. MELO, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, (2004) 771-780.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise residual de compostos anestésicos em peixes, principalmente em tilápia e surubim, peixes de maior produtividade e potencial na piscicultura, é uma ferramenta importante para a definição de protocolos que envolvam desde os parâmetros de aplicação de anestésicos em peixes até o período de depuração antes do abate e processamento do pescado, melhorando a qualidade do produto final.

O presente trabalho teve como foco principal o desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo que pudessem ser empregados na determinação de mentol em matriz biológica. Na qual, a complexidade da matriz dificulta a obtenção de extrações quantitativas de compostos residuais oriundos de processos de manejo, neste sentido, a utilização de métodos de extração e pré-concentração que possibilitem a limpeza da amostra removendo os interferentes presentes na matriz é de suma importância.

Desta forma, três artigos foram destinados ao desenvolvimento de métodos empregando as técnicas miniaturizadas de extração com gota única, em fase sólida e líquido-líquido dispersiva, aplicadas na determinação de quantidades remanescentes do anestésico em filés de tilápia do Nilo. No quarto artigo, as duas primeiras técnicas citadas foram aplicadas também em filés de surubim. Os métodos desenvolvidos mostraram-se rápidos, sensíveis e com grande potencial para a análise do composto presente em filés de peixes.

Dentre as técnicas analisadas a DLLME foi a que apresentou maior sensibilidade, no entanto, as demais técnicas apresentam vantagens essenciais, a SDME demanda utilização de pequenos volumes de solventes orgânicos, a SPME apesar de apresentar custo um pouco mais elevado, devido a necessidade da utilização de fibras extratoras, que apresentam ainda um custo relativamente alto, possibilita a realização das análises de forma

automatizada, devido a disponibilidade do auto-amostrador, o que não acontece com a SDME e a DLLME, onde tudo é realizado manualmente.