UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

DETERMINAÇÃO DE BROMOFENÓIS SIMPLES RELACIONADOS AO *FLAVOR* DE CAMARÕES MARINHOS E DE CATIVEIRO

RAFAEL DOURADO PIMENTA FONTES

Salvador, 2013

RAFAEL DOURADO PIMENTA FONTES

DETERMINAÇÃO DE BROMOFENÓIS SIMPLES RELACIONADOS AO FLAVOR DE CAMARÕES MARINHOS E DE CATIVEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes

Salvador, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Fontes, Rafael Dourado Pimenta.

CDD:639.543

Determinação de bromofenóis simples relacionados ao *flavor* de camarões marinhos e de cativeiro / Rafael Dourado Pimenta Fontes. - 2013.

75 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Camarão. 2. Camarão – Bromofenóis. 3. Camarão – Sabor e aroma. I. Lopes, Wilson Araújo. II.Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. III. Título.

CDU-543.632:639.512

TERMO DE APROVAÇÃO

RAFAEL DOURADO PIMENTA FONTES

Determinação de bromofenóis simples relacionados ao flavor de camarões marinhos e de cativeiro.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes– Orientador _____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Maria das Graças Andrade Korn
_____
Doutorado em Ciências (Química Analítica) pela Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Núbia Moura Ribeiro _____
Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro(UFRJ)
Instituto Federal da Bahia

Salvador, 12 de julho de 2013.

À minha mãe Maria Francisca,

À meu pai José Roberto,

À minha filha Rafaella.

“Podemos acreditar que tudo que a vida nos oferecerá no futuro é repetir o que fizemos ontem e hoje. Mas, se prestarmos atenção, vamos nos dar conta de que nenhum dia é igual a outro. Cada manhã traz uma benção escondida; uma benção que só serve para esse dia e que não se pode guardar nem desaproveitar.

Se não usamos este milagre hoje, ele vai se perder.

Este milagre está nos detalhes do cotidiano; é preciso viver cada minuto porque ali encontramos a saída de nossas confusões, a alegria de nossos bons momentos, a pista correta para a decisão que tomaremos.

Nunca podemos deixar que cada dia pareça igual ao anterior porque todos os dias são diferentes, porque estamos em constante processo de mudança.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Wilson Lopes, pela orientação e tolerância.

Ao Prof. Jailson de Andrade, pelo espaço (LPQ), equipamento de realização das análises e valiosas discussões.

Ao Prof. Pedro Afonso Pereira pelo espaço (LPQ) de análise das amostras.

À Profª Gislaine Vieira, pelos ensinamentos no tratamento das amostras.

Ao professor Rodrigo Johnsson (Instituto de Biologia-UFBA) pela identificação da espécie da amostra e pelos ensinamentos relativos às partes em que o camarão é constituído.

A Gerônimo e Gitonilson Tosta da Bahia Pesca pelas amostras de camarão de cativeiro.

A Joelma Pereira pela parceria no trabalho e valiosas discussões.

A Eliane Sousa pela grande ajuda e apoio na parte experimental das análises.

A Manuela Cardoso pela grande ajuda no trabalho e valiosas conversas e conselhos.

A colega e companheira de laboratório Paula Cordeiro, por tudo.

Ao amigo Rogério Luiz da Silva pelas críticas e sugestões.

Aos colegas do IQ (professores e funcionários).

Aos colegas do LPQ e SOMAR, pela convivência e por direta ou indiretamente terem contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao colegiado de pós-graduação em Química da UFBA.

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade e momentos de descontração.

A Dorisvaldo Paiva pelo suporte técnico.

A todos que de alguma forma contribuíram para motivar a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESB, pelo suporte financeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades físicas dos bromofenóis simples	14
Tabela 2.	Constantes físicas dos bromofenóis simples	48
Tabela 3 -	Tempos de retenção, íon quantificadores e íons qualificadores de cada analito obtidos com a programação do CG encontrada na Literatura	56
Tabela 4 -	Tempos de retenção, íon quantificadores e íons qualificadores de cada analito obtidos com a nova programação do CG	56
Tabela 5 -	Curvas analíticas, limites de detecção e quantificação dos bromofenóis	57
Tabela 6 -	Desvios padrão relativos dos bromofenóis	59
Tabela 7 -	Recuperações dos bromofenóis pelo método desenvolvido	60
Tabela 8 -	Concentrações dos bromofenóis (*n*g g^{-1}) em camarões de cativeiro e pescado no litoral da Bahia obtidos por SDME	61
Tabela 9 -	Concentrações de bromofenóis (*n*g g^{-1}) em camarões de cativeiro e sua ração obtidas por SDME e CG-EM.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Relação entre alimentos de origem marinha e nutrientes	01
Figura 2 -	Produção de pescado (t) nacional da pesca extrativa (marinha e continental) de 1950 a 2010 e aquicultura (marinha e continental) de 1980 a 2010	03
Figura 3 -	Evolução da produção de carcinicultura nacional (t) de 1995 a 2009	03
Figura 4 -	Produção mundial de camarão em 1979 e 2009: cultivo e captura.	04
Figura 5 -	Relação entre concentração de COV e o *flavor* de alimentos de origem marinha	05
Figura 6 -	Inter-relações das percepções sensoriais com o *flavor*	06
Figura 7 -	Bromofenóis relacionados ao *flavor* de organismos marinhos	07
Figura 8 -	Extensão costeira do estado da Bahia	19
Figura 9 -	Camarão de cativeiro *Litopenaeus Vannamei*	22
Figura 10 -	Camarão pescado *Xiphopenaeus Kroyeri*	23
Figura 11-	Técnicas de extração para determinação por CG-EM	25
Figura 12-	Extratores usados na DES: a) original; b) modificada por Schultz, 1977	26
Figura 13-	Aparelhagem de Clévenger modificada para *SDE*	27
Figura 14-	Representação da microextração em fase sólida (*SPME*)	28
Figura 15-	Procedimento de extração por *SDME* e determinação por CG-EM (direto)	29
Figura 16-	Procedimento de extração por *SDME* e determinação por CG-EM (*headspace*)	30
Figura 17-	Vantagens e limitações da técnica de extração *SDME*	31
Figura 18-	Imagem da fazenda experimental Oruabo, Vila de Acupe, Santo Amaro da Purificação, BA	37
Figura 19-	Imagem do viveiro de camarão cultivado da Fazenda Oruabo - Bahia Pesca	37

Figura 20-	Imagem do Mercado Popular (Água de Meninos), em Salvador.	38
Figura 21-	Comprimento médio do camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*).	38
Figura 22-	Comprimento médio do camarão pescado Sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).	39
Figura 23-	Desenho esquemático de camarão (vista lateral).	40
Figura 24-	Tratamento das amostras de camarão.	40
Figura 25-	Cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 utilizado nas análises.	44
Figura 26-	Procedimento esquemático de extração por SDME e determinação por CG-EM.	49
Figura 27-	Procedimento de extração por *SDME*, utilizado no trabalho, e determinação por CG-EM.	49
Figura 28-	Fluxograma do método de extração dos bromofenóis em abdômen de camarão por *SDME.*	50
Figura 29-	Cromatograma de íons totais dos 5 bromofenóis obtido no CG-EM com padrão modo *SCAN.*	51
Figura 30-	Espectros de massas de bromofenóis (1 a 5) obtidos do cromatograma de íons totais (CG-EM/*SCAN*) comparado com aqueles obtidos da biblioteca *NIST*	52
Figura 31-	Cromatograma de íons totais dos 5 bromofenóis obtido no GC-MS com padrão modo *SIM*.	54
Figura 32-	Programação do CG utilizada na literatura para a análise dos bromofenóis.	55
Figura 33-	Nova programação do CG desenvolvida para a análise dos bromofenóis.	55
Figura 34-	Curvas analíticas.	57
Figura 35-	Cromatograma de uma amostra (abdômen) de camarão obtido no CG-EM modo *SIM*.	61
Figura 36-	Concentração dos analitos em camarão capturado.	61
Figura 37-	Concentração dos analitos em ração e camarão de cativeiro.	62
Figura 38-	Concentração dos analitos totais	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
BF	Bromofenol
CG	Cromatografia gasosa
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
COV	Compostos orgânicos voláteis
DBF	Dibromofenol
DES	Destilação-extração simultâneas
DL	Dose letal
EM	Espectrometria de massas
IE	Impacto de elétrons
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
SDME	Microextração com gota única (do inglês, *single drop microextraction*)
SIM	Monitoramento de íons selecionados (do inglês, *selected Ion monitoring*)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês, *solid phase microextraction*)
t	Tonelada
TBF	Tribromofenol
TIC	Cromatograma de íons totais (do inglês, *total ion chromatogram*)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

SUMÁRIO

	SUMÁRIO	xi
	LISTA DE TABELAS	**vii**
	LISTA DE FIGURAS	**viii**
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	**x**
	RESUMO	**xiv**
	ABSTRACT	**xvi**
1.	INTRODUÇÃO	01
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	09
2.1.	Bromofenóis em organismos marinhos	09
2.2.	Ocorrência	10
2.3.	Propriedades físicas	12
2.4.	Toxicologia	15
2.5.	Bromofenóis e o *flavor* de alimentos de origem marinha	15
2.6.	Pesca e aquicultura no estado da Bahia	18
2.7.	Camarões	20
2.7.1.	Espécies estudadas	21
2.7.1.1.	*Litopenaeus Vannamei*	21
2.7.1.2.	*Xiphopenaeus Kroyeri* (Sete barbas)	22
2.8.	Metodologia analítica	23
2.8.1.	Extração	24
2.8.1.1.	Destilação-extração simultâneas (*DES*)	26
2.8.1.2.	Microextração em fase sólida (*SPME*)	28
2.8.1.3.	Microextração com gota única (*SDME*)	29
2.8.1.3.1.	Fatores que influenciam a extração por *SDME*	31
2.8.1.3.1.1.	Solvente extrator	31
2.8.1.3.1.2.	Tempo de contato	32
2.8.1.3.1.3.	Volume da microgota de solvente	32
2.8.1.3.1.4.	Velocidade de agitação	33
2.8.1.3.1.5.	Temperatura	33
2.8.1.3.1.6.	Efeito da adição de sal	33

2.8.1.3.2.	Algumas aplicações da microextração com gota única	34
2.8.2.	Análise	34
3.	OBJETIVOS	36
3.1.	Objetivo geral	36
3.2.	Objetivos específicos	36
4.	PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1.	Obtenção e preparo de amostras	37
4.2.	Reagentes e Solventes	40
4.3.	Equipamentos e materiais	40
4.4.	Soluções de trabalho	41
4.5.	Coluna cromatográfica	41
4.6.	Gases especiais	41
4.7.	Vidrarias	42
4.8.	Outros materiais	42
4.9.	Condições cromatográficas e espectrométricas	43
4.10.	Validação do método	44
4.10.1	Curvas analíticas	44
4.10.2.	Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)	44
4.10.3.	Precisão	45
4.10.4.	Exatidão	46
4.11.	Extração dos bromofenóis	47
4.11.1.	Preparação da amostra	48
4.11.1.1.	Metodologia de extração	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Otimização do procedimento SDME	50
5.2.	Condições cromatográficas e espectrométricas	50
5.3.	Validação do método	56
5.3.1.	Curvas analíticas	56
5.3.2.	Precisão	58
5.3.3.	Exatidão	59
5.4.	Aplicação do método	60
6.	Conclusões	64

7. Perspectiva de trabalhos futuros 65
8. Referências 66
9. Trabalhos divulgados durante o mestrado 75

RESUMO

Na atualidade, o consumo de organismos marinhos (principalmente peixes e camarões) tem aumentado cada vez mais, devido à sua constituição proteica. Nos últimos anos, com a elevada demanda de pescados, intensificou-se também o cultivo (aquicultura), principalmente de camarão, para suprir o mercado consumidor. A aceitação de alimentos de origem marinha pelo consumidor está diretamente relacionada ao odor e sabor que devem ser atrativos e agradáveis. As principais substâncias químicas identificadas com as responsáveis pelo "*flavor*" dos alimentos marinhos são os bromofenóis simples 2-bromofenol (2-BF), 4-bromofenol (4-BF), 2,4-dibromofenol (2,4-DBF), 2,6-dibromofenol (2,6-DBF) e 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBF). A microextração com gota única (*SDME*) é uma técnica que apresenta muitas vantagens, quando comparada com as técnicas clássicas, pois permite o isolamento e pré-concentração dos analitos em um passo único, seguida de introdução da amostra em sistema de análise por CG-EM. Esta técnica vem ganhando destaque por não ser exaustiva, utilizar uma quantidade muito pequena de solvente (estando de acordo com os preceitos da química verde), requer um curto tempo de análise, tem elevada sensibilidade e baixo custo. Nesse trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia analítica baseada em *SDME* e CG-EM para determinação de bromofenóis em abdômen e ração de camarão cultivado (carcinicultura) (*Lithopenaeus vannamei*) e abdômen de camarão pescado (*Xiphopenaeus kroyeri*, camarão sete barbas) em diferentes estações do ano. A otimização da técnica por CG-EM permitiu boa separação dos bromofenóis simples em apenas 15 minutos. Esta nova metodologia foi validada em função da linearidade das curvas analíticas, limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação para cada um dos cinco analitos estudados. A recuperação e precisão variaram, respectivamente, de 50,8 a 103% e de 2,27 a 18,8%. Os limites de detecção e quantificação variaram, respectivamente, de 0,200 a 0,499 ng mL^{-1} e de 0,500 a 1,000 *n*g mL^{-1}. Não foi perceptível uma relação regular ou linear entre a sazonalidade e a concentração dos bromofenóis nos camarões pescados. Tanto na primavera quanto no verão a maior concentração detectada foi do 2,4-DBF, enquanto no outono e inverno foram o 4-BF e o 2-BF respectivamente. Já no abdômen do camarão de cativeiro e na ração deste a maior concentração foi do 4-BF. A menor concentração na ração, no abdômen do

camarão cultivado e na estação verão corresponde ao 2-BF, na primavera e no outono ao 2,6-DBF, enquanto no inverno ao 4-BF. A metodologia desenvolvida, além de apresentar baixos limites de detecção e quantificação, envolve menor tempo de análise, menor consumo de energia e solventes, sendo assim compatível com os preceitos da Química Verde.

Palavras-chave: bromofenóis, camarões, microextração com gota única (*SDME*), CG-EM.

ABSTRACT

At present, the consumption of marine organisms (mainly fish and shrimp) has increased even more, due to its constitution protein. In recent years, with the high demand of fish, also accelerated cultivation (aquaculture), especially shrimp, to supply the consumer market. Acceptance of marine foods by consumers is directly related to odor and flavor that should be attractive and pleasant. The main chemicals identified as responsible for the "flavor" of marine foods are simple bromophenol 2-bromophenol (2-BF), 4-bromophenol (4-BF), 2,4-dibromophenol (2,4-DBF) 2,6-dibromophenol (2,6-DBF) and 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TBF). A single droplet with microextraction (SDME) is a technique that has many advantages compared with conventional techniques, since it allows the isolation and preconcentration of analytes in a single step, followed by introduction of the sample analysis system GC-MS. This technique has been gaining attention for not being exhaustive, use a very small amount of solvent (which is consistent with the principles of green chemistry), requires a short analysis time, has high sensitivity and low cost. In this work we developed a new analytical methodology based SDME and GC-MS to determine bromophenols in abdomen and feed farmed shrimp (*Lithopenaeus vannamei*) shrimp fished and abdomen (*Xiphopenaeus kroyeri*, seven shrimp whiskers) in different seasons year. Optimization of GC-MS technique allowed good separation of bromophenols simple in just 15 minutes. This new methodology was validated on the basis of the calibration curves linearity, limit of detection and quantification accuracy and recovery for each of the five analytes studied. The recovery and precision ranging, respectively, from 50,8 to 103% and from 2,27 to 18,8%. The limits of detection and quantification varied, respectively, from 0,200 to 0,499 ng ml-1 and 0,500 to 1,000 ng ml-1. It was not noticeable or a regular relationship between the linear and the concentration of bromophenol seasonality in shrimp fished. Both in spring and in summer the highest concentration detected was 2,4-DBF, while in autumn and winter were the 4-BF and 2-BF respectively. Already in the abdomen of shrimp feed in captivity and this was the highest concentration of 4-BF. The lowest concentration in the feed, abdomen farmed shrimp and summer season match 2-BF, in spring and autumn to 2,6-DBF, while in winter the 4-BF. The methodology developed, and have low limits of detection and quantification, involves less analysis

time, lower power consumption and solvents and is therefore compatible with the principles of Green Chemistry.

Keywords: bromophenols, prawns, with single drop microextraction (SDME), GC-MS.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem marinha são importantes fontes de nutrientes para a espécie humana. Neles estão contidos lipídeos, proteínas (que contribuem com cerca de 16% do total de proteína animal consumido no mundo), carboidratos, vitaminas lipo e hidrossolúveis, aminoácidos e minerais que são essenciais à vida [COULTATE, 2004]. A despeito desse grande valor nutricional, o consumo brasileiro de pescado ainda é muito pequeno [SILVA *et al*., 2007].

Nas últimas décadas, o consumo de alimentos de origem marinha, principalmente peixes e camarões, têm crescido consideravelmente, em parte devido à conscientização dos efeitos benéficos desses importantes alimentos para a saúde humana. Os peixes e camarões são considerados como alimentos completos, de excelente valor nutricional, ricos em proteínas, vitaminas e importantes fontes de minerais fisiologicamente importantes como Na, Ca, I, P, Se, Fe, entre outros (Figura 1) [OGAWA *et al*., 1999].

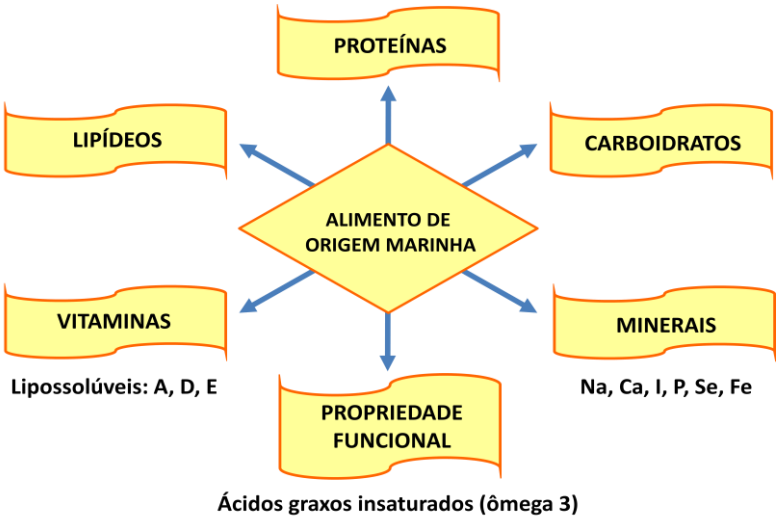


Figura 1. Relação entre alimentos de origem marinha e nutrientes [OGAWA *et al.*, 1999].

Na Bahia, a população, principalmente do Recôncavo Baiano, aprecia frequentemente peixes, camarões e moluscos através de uma diversificada tradição culinária. A Bahia em 2005 foi o estado da região nordeste com a maior produção pesqueira representando aproximadamente 11,92% do país e 0,03% da produção mundial de peixes [BAHIA PESCA, 2005]. Os principais destinos do pescado,

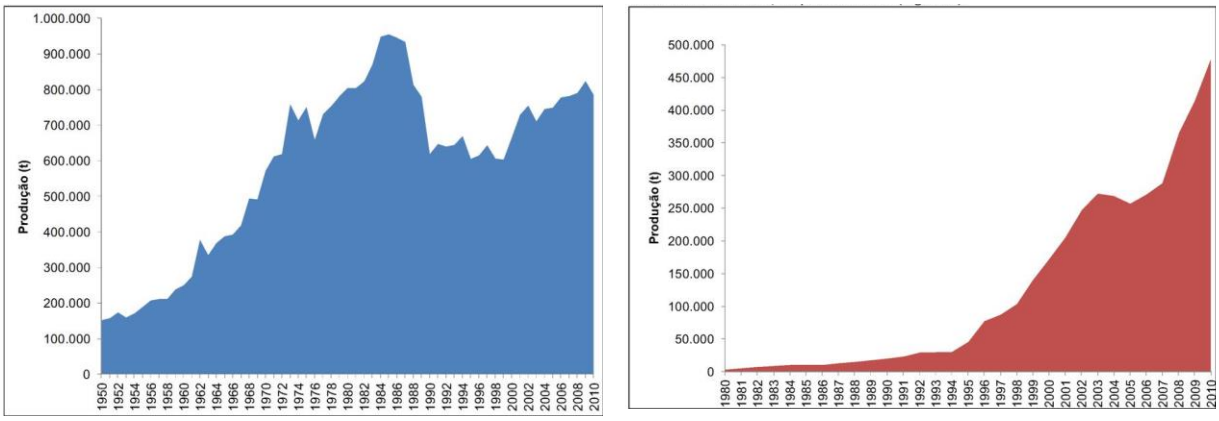
representando aproximadamente 76% da produção mundial, são os mercados de peixes frescos, congelados, enlatados e secos [FAO, 2007].

A produção mundial de pescado (pesca extrativa e aquicultura) atingiu aproximadamente 142 milhões de toneladas em 2008 e 146 milhões de toneladas em 2009, sendo a China o país que mais produziu com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas. O Brasil contribuiu com 1.240.813 toneladas em 2009, correspondendo a 0,86% da produção mundial de pescado. Em 2008, a produção de pescado nacional contribuiu com 0,81% do total produzido no mundo. Com este aumento no percentual da produção mundial de pescado entre 2008 e 2009, o Brasil subiu quatro posições no ranking geral dos maiores produtores de pescado do mundo, atingindo o 18º lugar [MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2012].

Analisando-se a série histórica (1950 - 2010) dos dados de produção pesqueira do Brasil, observa-se um crescimento acentuado de 1950 até 1985, quando foi registrada a maior produção, atingindo 956.684 toneladas. Entre 1986 e 1990 houve um declínio gradativo, quando a produção pesqueira diminuiu de 946.560 toneladas para 619.805 toneladas, evidenciado pelo inicio do processo de sobrepesca de alguns estoques, tais como, o da sardinha-verdadeira, dos camarões e dos peixes demersais da região Sul. Além disso, em meados da década de 1980 houve a desativação dos incentivos fiscais, o que também contribuiu para o declínio da produção pesqueira entre 1985 e 1990. De 1990 até o ano 2000, a produção pesqueira ficou caracterizada por um período de estabilidade. A partir do ano 2000, a produção voltou a crescer, passando de 666.846 toneladas para 825.164 toneladas em 2009. Este aumento deveu-se principalmente pela recuperação, ainda que tímida, de alguns estoques, tais como o da sardinha-verdadeira. Ainda que tenha sido observado um declínio da captura entre 2009 e 2010, quando foi registrada uma produção de 785.366 toneladas, o período entre 2000 e 2010 caracterizou-se por um período de recuperação da produção pesqueira nacional em relação à década precedente (Figura 2a) [MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2012].

De acordo com a FAO, a produção aquícola brasileira teve início em 1968, quando foram reportadas menos de 0,5 toneladas. Desde então, a aquicultura nacional tem mostrado um crescimento gradual, atingindo o pico de produção em 2003, com 273.268 toneladas. Após uma pequena queda nos anos de 2004 e 2005,

a produção retomou o crescimento, registrando os maiores volumes em 2008, 2009 e 2010, com respectivamente 365.367 toneladas, 415.649 toneladas e 479.398 toneladas (Figura 2b) [MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2012].



a) b)

Figura 2. Produção de pescado (t) nacional: a) da pesca extrativa (marinha e continental) de 1950 a 2010; b) aquicultura (marinha e continental) de 1980 a 2010 [MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2012].

No período de 1995 a 2009 houve um intenso crescimento da produção nacional de camarão cultivado com um pico também em 2003, um declínio nos anos de 2004 e 2005 e estabilização da produção a partir de 2006 (Figura 3).

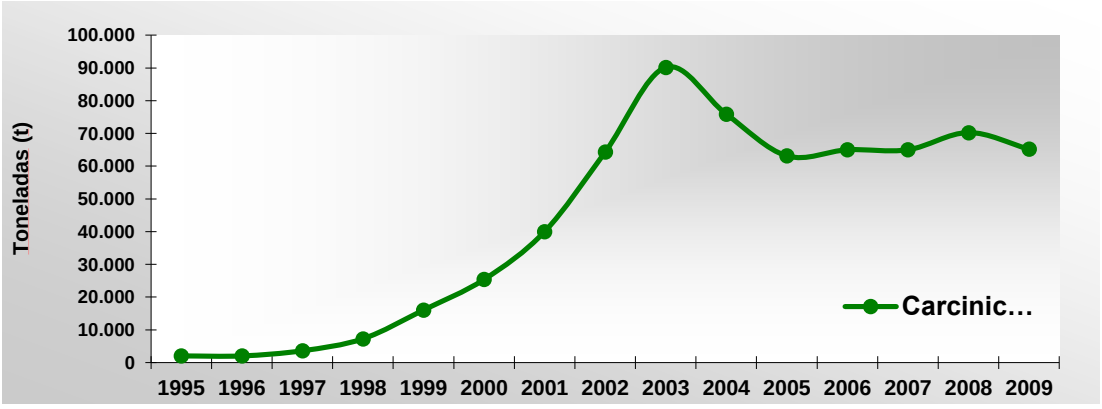


Figura 3. Evolução da produção de carcinicultura nacional (t) de 1995 a 2009 [MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2012].

Entre 1979 e 2009 a produção mundial de camarão cultivado (carcinicultura) superou a produção de camarão capturado, conforme dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), sendo que a produção de cultivo superou a produção extrativa em 38.475 t em 2008 (Figura 4) [ABCC]. Este aumento no cultivo é devido à grande demanda por alimentos de origem marinha (camarão) como conseqüência do elevado crescimento populacional com o passar dos anos. Sendo assim, a aqüicultura surge como alternativa para o suprimento das necessidades alimentícias dos seres humanos. Além do aumento da população, outra justificativa é o custo para se cultivar organismos de cativeiro em relação ao custo para se capturá-los, onde o lucro é maior na aqüicultura.

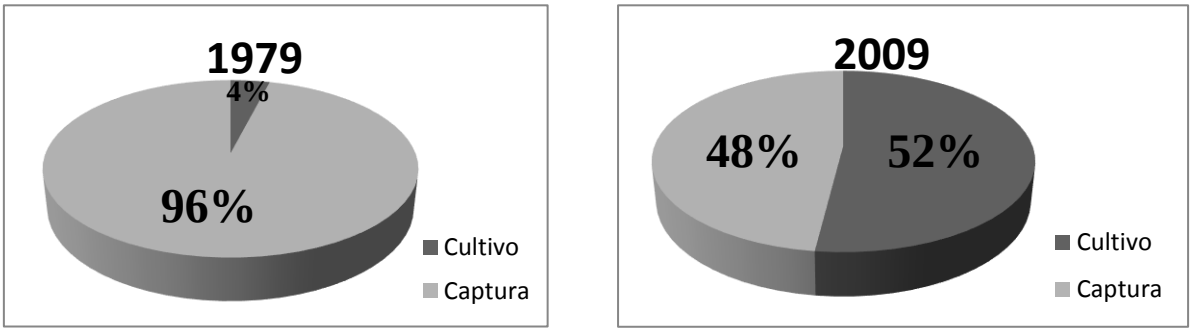


Figura 4. Produção mundial de camarão em 1979 e 2009: cultivo e captura.

A grande utilidade do pescado como fonte alimentar tem sido destaque em diversos trabalhos devido ao que estes oferecem de benefício aos seres humanos como o seu valor nutritivo, digestibilidade fácil, sabores diversificados e possuir uma composição equilibrada.

Numerosos fatores fazem com que o pescado possa obter variação na sua composição e consequentemente no seu valor nutritivo como espécie a qual pertence o organismo marinho, idade do mesmo, meio de sobrevivência, dieta alimentar, época em que é capturado, peso, dentre vários outros [ALMEIDA; FRANCO, 2006; GOKÇE, 2004; LUZIA *et al.*, 2003; OGATA *et al.*, 2004; OKADA; MORRISSEY, 2007; RECKS; SEABORN, 2007; ZLATANOS; LASKARIDIS, 2007].

Pescados em geral possuem composições variadas em umidade (64 a 90%); em proteína (8 a 23%); em gordura (0,5 a 25%); em resíduos minerais (1 a 2%); e em carboidratos (<1%) [HART; FISHER, 1971; STANSBY,1973].

A qualidade dos alimentos de origem marinha é determinada por uma variedade de fatores pré e pós-pesca, incluindo dieta, condições ambientais, processamento, estocagem, transporte e pode estar associada à presença de determinadas substâncias químicas e, muitas destas, pertencem ao grupo dos compostos orgânicos voláteis (COV).

Os Compostos Orgânicos Voláteis (COV) constituem uma ampla variedade de substâncias naturais e sintéticas que têm como principal característica a pressão de vapor maior que 10^{-2} torr [HANSEN *et al*., 1991], que resulta em volatilidade nas condições de temperatura e pressão normais.

Muitos destes COV como, por exemplo, bromofenóis, compostos carbonílicos e ácidos carboxílicos, estão presentes em organismos de origem marinha que são usados na alimentação humana (Figura 5), sendo responsáveis por muitas de suas características e propriedades sensoriais.

Dependendo da concentração, estas substâncias podem contribuir para melhorar ou piorar a qualidade desses alimentos, pois interferem diretamente em suas características sensoriais, tornado o *flavor* mais agradável (*on-flavor*) ou desagradável (*off-flavor*) [OLIVEIRA *et al*., 2009; SILVA *et al*., 2007; WHITFIELD *et al*., 1997; WHITFIELD, 1990; TESE, VELOSO, M. C. C., 2005]. Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) o termo "*flavor*" significa sabor. No entanto, de acordo com a literatura internacional, "*flavor*" se emprega no sentido mais amplo ou da percepção global integrada de todos os sentidos, no momento da degustação e ingestão de um alimento (Figura 5) [SILVA *et al*., 2007; ABNT, 1993].

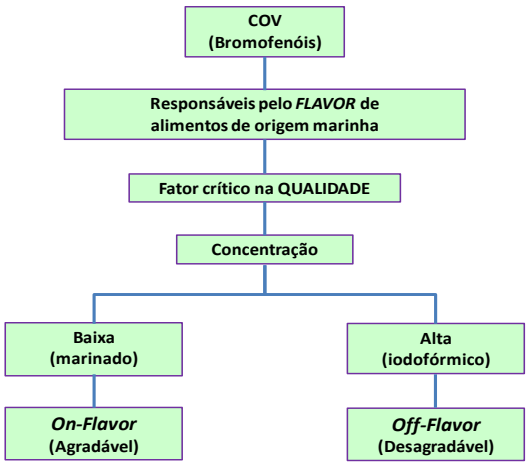


Figura 5. Relação entre concentração de COV e o *flavor* de alimentos de origem marinha.

Os alimentos de origem marinha, por exemplo, camarões e peixes, possuem sabor e odor (*flavor*) característicos bastante variados, e acredita-se que estes têm relação, entre outros fatores, com a dieta natural das espécies e sua composição química [WHITFIELD *et al*., 2002; SILVA *et al*., 2007].

A percepção das sensações, que resultam da interação entre os sentidos do ser humano e os alimentos, é o primeiro e principal fator de discriminação para a avaliação e posterior aceitação, indiferença, rejeição ou preferência de um produto por parte do consumidor. Em particular, as primeiras sensações que influenciam a avaliação sensorial por parte de um consumidor estão relacionadas com o sentido da visão (cor, aspecto, aparência) e tato (consistência). Contudo, são os sentidos da gustação e do olfato que melhor permitem separar alimentos indesejáveis, danosos à saúde, ou mesmo letais, daqueles nutritivos. As interações sensoriais associadas ao *flavor* estão representadas na Figura 6 [SILVA *et al.*, 2001].

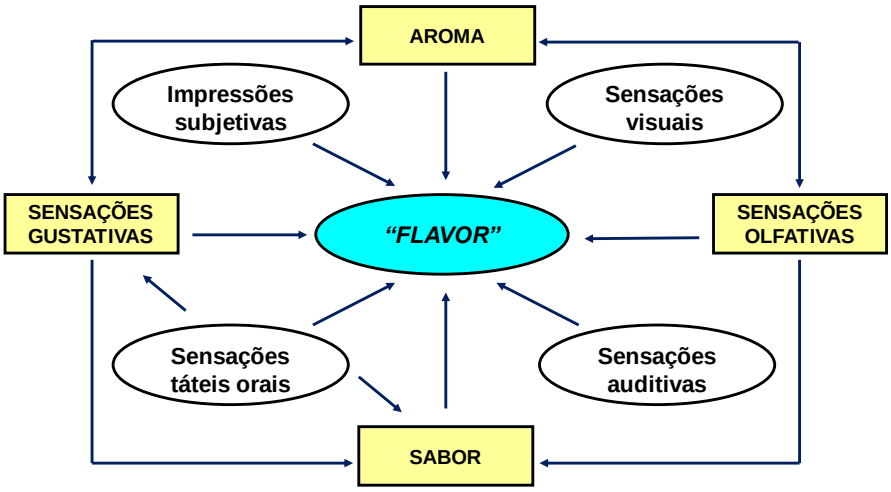


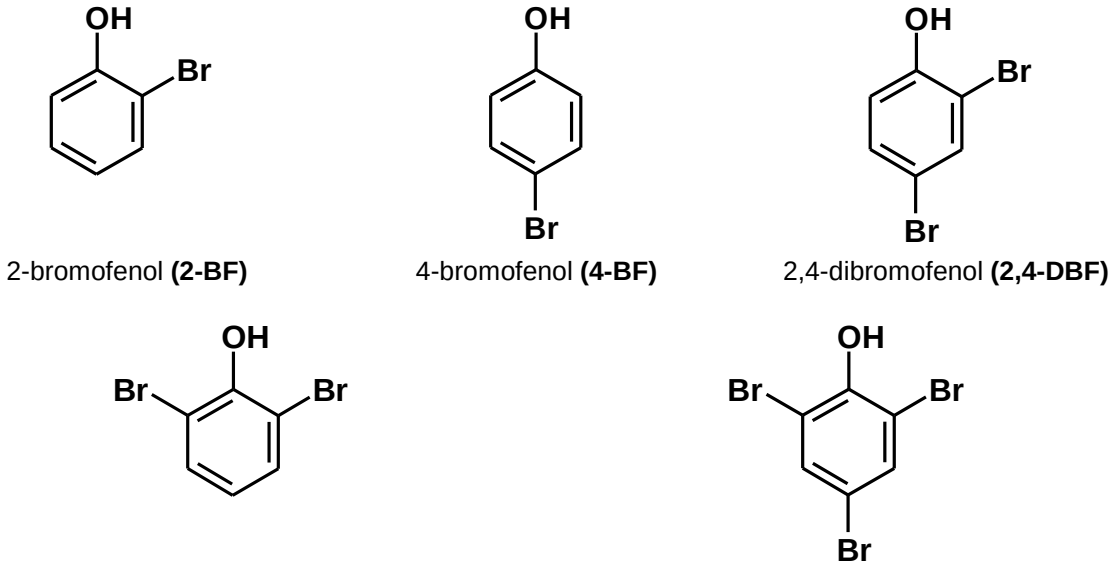
Figura 6. Inter-relações das percepções sensoriais com o *flavor* [VELOSO *et al.*, 2001].

O pressuposto que o aroma desprendido dos alimentos pode estimular o apetite e a preferência alimentar tem suscitado pesquisas em várias áreas da agricultura e da aqüicultura a fim de colocar no mercado produtos de qualidade nutricional e especialmente de *flavor* agradável [LENT, 2001; GUYTON; HALL, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 1987].

Atualmente sabe-se que algumas substâncias isoladamente ou combinadas, em função de suas concentrações, podem produzir ou intensificar o *flavor* agradável

ou desagradável em peixes e camarões, sendo este um campo de estudo ainda em aberto e extremamente promissor [VELOSO *et al.*, 2001].

Dentre as substancias que podem atuar e interferir na qualidade dos alimentos de origem marinha destacam-se os bromofenóis simples, exemplificados pelo 2-bromofenol (2-BF), 4-bromofenol (4-BF), 2,4-dibromofenol (2,4-DBF), 2,6-dibromofenol (2,6-DBF) e 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBF), os quais podem produzir, intensificar ou alterar o *flavor* desses alimentos (Figura 7).



2-bromofenol **(2-BF)** 4-bromofenol **(4-BF)** 2,4-dibromofenol **(2,4-DBF)**

2,6-dibromofenol **(2,6-DBF)** 2,4,6-tribromofenol **(2,4,6-TBF)**

Figura 7. Bromofenóis relacionados ao *flavor* de organismos marinhos.

A determinação de constituintes químicos com baixas concentrações em amostras complexas, como é o caso de bromofenóis em organismos marinhos, exige o uso de métodos analíticos capazes de extrair, concentrar, separar, identificar e quantificar eficientemente com alto grau de precisão e exatidão. Isso hoje é possível pelo uso de técnicas modernas e equipamentos sofisticados, com o auxílio de amplos recursos computacionais. O desenvolvimento de métodos analíticos deve ser realizado de modo que permita uma amostragem adequada e representativa, com boa sensibilidade, alta seletividade, menor tempo de análise possível, menor custo e menor impacto para o ambiente [SILVA *et al.*, 2005].

Diferentes técnicas de amostragem, extração, pré-concentração, separação, identificação e quantificação de constituintes químicos têm sido desenvolvidas para análise de compostos orgânicos em amostras ambientais [LOPES *et al.*, 2008; KOESTER *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2010; ZANJANI *et al.*, 2007] e de alimentos [WARDENCKI *et al.*, 2004; KATAOKA *et al.*, 2000; VICHIA *et al.*, 2008; AMVRAZI *et al.*, 2009].

Análise de alimentos é importante para a avaliação do valor nutritivo e qualidade dos produtos frescos e processados e, também, para monitoramento os aditivos alimentares e a detecção e determinação de contaminantes tóxicos ou nocivos à saúde. A análise de constituintes químicos em alimentos, incluindo os bromofenóis, tem como pontos críticos uma boa técnica de amostragem e um apropriado método de análise [SILVA *et al.*, 2005].

As técnicas de microextração em fase sólida (SPME) e microextração com gota única (SDME) têm sido amplamente utilizadas na análise química de alimentos (camarões, peixes, temperos) como um recurso eficaz para isolar e concentrar analitos, apresentando muitas vantagens em relação às técnicas clássicas de extração [AMVRAZI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005; EICEMAN *et al.*, 2006].

Os métodos cromatográficos, devido à grande versatilidade que permite o seu uso na separação, identificação e quantificação de constituintes químicos, é uma das técnicas mais utilizadas na análise de amostras ambientais e de alimentos. Entre os métodos cromatográficos, destacam-se a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como as mais utilizadas e mais eficientes técnicas de análise de substâncias orgânicas em baixas concentrações [LOPES *et al*. 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2005; EICEMAN *et al.*, 2006; SANTOS; GALCERAN, 2002].

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), pela eficiência, alto poder de resolução, seletividade e sensibilidade é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de constituintes químicos em diversas matrizes como ar, solo, água, sedimento, alimentos etc. [RODRIGUES *et al.*, 2010; RAYNIE, 2006; SANTOS; GALCERAN, 2002].

Nos últimos anos tem sido utilizada uma grande variedade de procedimentos para o isolamento e quantificação de bromofenóis de amostras alimentares,

especialmente de origem marinha. Contudo, pela importância e atualidade do assunto, a continuidade de estudos sobre os bromofenóis é importante para o desenvolvimento de protocolos eficazes de amostragem, técnicas de extração e metodologias para a quantificação desses compostos em baixos níveis de concentração em diferentes tipos de organismos marinhos.

Por outro lado, a partir da década de 1990, surgiu uma nova tendência em como conduzir as análises químicas, com o intuito de reduzir o impacto ambiental das mesmas. Essa nova visão é denominada *Green Chemistry*, ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto-sustentável e deve ser considerada como um fator essencial ou como um imperativo no desenvolvimento de processos e análises químicas [RODRIGUES *et al.*, 2010].

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Bromofenóis em organismos marinhos

O ambiente marinho é considerado a maior fonte natural de compostos orgânicos halogenados. Entretanto, até o início da década de 1960, não havia publicações sobre estes compostos, a exceção dos derivados iodados da tirosina. Durante a década de 1970 o interesse por estes compostos aumentou, sendo que nesta década foram descritas mais de 300 novas substâncias. A partir da década de 1980, ocorreu um aumento significativo no número de trabalhos sobre compostos halogenados de origem marinha sendo que, dez anos depois, o número de compostos descritos já havia ultrapassado 1500. Assim, no final da década de 1990 já havia registro de cerca de 3.000 compostos halogenados oriundos de diversas fontes naturais, sobretudo do ambiente marinho [GRIBBLE, 1992,1998].

Além do constante aumento no interesse pelo ambiente marinho, o número crescente de compostos descritos se deve, em grande parte, ao surgimento, desenvolvimento e aprimoramento de diversas técnicas espectroscópicas e espectrométricas de elucidação estrutural como, por exemplo, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional e a espectrometria de

massas. Aliado ao desenvolvimento das técnicas analíticas tem-se ainda o aumento da sensibilidade dos testes biológicos e a necessidade de encontrar novos medicamentos refletidos pelo grande número de trabalhos que resultaram em avanços na medicina [SILVA *et al*., 2007].

Dentre os halocompostos presentes nos organismos marinhos destacam-se os halofenóis, os quais, embora considerados como poluentes antrópicos, podem também ser produzidos naturalmente por uma variedade de organismos [GRIBBLE, 1992; BOYLE *et al.*,1993].

Embora exista uma grande variedade estrutural de bromofenóis comprovadamente de origem marinha, os bromofenóis simples mais estudados são o 2-bromofenol, 4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol e 2,4,6-tribromofenol. Esses bromofenóis simples têm sido considerados como componentes principais do *flavor* característico de peixes e crustáceos marinhos e são sintetizados a partir do bromo e de fenóis presentes no ambiente ou organismos marinhos [WHITFIELD *et al.*,1988a, 1992b; BOYLE *et al.*,1992b, 1993; KUBITZA, 1999; SILVA *et al*., 2007].

2.2. Ocorrência

Os bromofenóis voláteis estão amplamente distribuídos através da cadeia alimentar nos oceanos. Estes compostos são naturalmente encontrados em organismos marinhos incluindo as algas, briozoários e poliquetas, entre outros. Para a maioria dos organismos marinhos superiores, a aquisição de bromofenóis ocorre a partir da dieta. Assim, este processo é casual, pois depende do tipo de alimento e da quantidade ingerida, bem como da concentração de bromofenóis presentes no alimento. O equilíbrio na concentração de bromofenóis presentes no tecido do organismo reflete o saldo entre a dieta ingerida e a depuração normal. Quando o organismo ingere algum alimento com nível elevado de bromofenóis, ocorre um aumento do *flavor* iodofórmico tornando-o desagradável com tendência a “coisa estragada”, entretanto, a ingestão de pequenas concentrações de bromofenóis contribui para o aroma natural marinho e iodado [BEMELMANS den BRABER, 1983; WITHFIELD *et al.*, 1988; BOYLE *et al.*, 1992b, 1993].

Os bromofenóis são produzidos diretamente por algas, briozoários e poliquetas que são classificados em produtores primários, enquanto na maioria dos organismos marinhos como peixes, moluscos e crustáceos (camarão, caranguejo, siri, lagosta), a incorporação ocorre a partir da dieta, sendo estes classificados como produtores secundários. Em crustáceos marinhos, os bromofenóis são considerados como sendo provenientes da dieta. Essas substâncias foram identificadas em espécies de crustáceos da costa australiana, *Penaeus merguiensis*, *P. monodon*, *P. esculentus*, e de Hong Kong, *P. japonicus*, *Charybdis feriatus,* em concentrações de até 2.410 ng g^{-1}. As concentrações variaram marcadamente entre as espécies e, também, entre as localidades onde foram coletadas [WHITFIELD, 1997, 1992,1988; CHUNG *et al*., 2003; SILVA *et al*., 2007].

Entretanto, a origem dos bromofenóis em espécies marinhas permanece incerta. Existem evidências de que os bromofenóis encontrados em camarões adultos, por exemplo, são provenientes de pequenos animais ingeridos, os quais também acumulam essas substâncias provenientes de outros animais e plantas [WHITFIELD *et al.*, 1988; WHITFIELD, 1990; 1992]. O registro da participação de bromofenóis na cadeia alimentar sugere uma distribuição extensa desses compostos em uma grande variedade de espécies marinhas [BOYLE *et al.*, 1992].

Os crustáceos bentônicos, quando adultos, são carnívoros, e desta forma, sua dieta consiste principalmente de organismos que habitam o fundo dos oceanos (outros crustáceos, poliquetas, moluscos, algas), variando apenas a ordem de preferência [WHITFIELD *et al.,*1997]. Através de análises quantitativas foi demonstrada a predominância dos bromofenóis no cefalotórax dos camarões, tal como uma conseqüência da presença de resíduos alimentares retidos no estômago [WHITFIELD *et al.,*1988b,1997]. Tal fato suporta fortemente a hipótese anteriormente expressa que tais compostos são derivados das dietas naturais destes animais.

WHITFIELD *et al.* (1997), ao comparar camarões cultivados àqueles naturais, observa que os primeiros apresentam um número menor dos bromofenóis em estudo, bem como em concentrações mais baixas, não sendo possível identificar um composto dominante em quantidade. Além disso, foi notado que o conteúdo total de bromofenol em camarões cultivados foi relativamente consistente quando comparado à grande variação observada nos animais naturais. Este diferente

padrão observado para os conteúdos totais de bromofenol em camarões cultivados e naturais pode, provavelmente, ser explicado por seus diferentes hábitos alimentares.

A uniformidade na composição de bromofenol de animais cultivados quando comparados aos naturais pode ser explicada por suas dietas; a dieta dos cultivados é regimentada, ao passo que a dieta de um camarão natural é produto de uma existência de livre procura. Assim, o *flavor* de camarões cultivados poderia ser seguramente modificado pela adição desses compostos, em quantidades apropriadas, à dieta do animal, despertando assim o interesse do consumidor.

Entretanto, tentativas recentes nesse sentido têm fracassado, pois os bromofenóis perdem-se durante o preparo do alimento, sendo necessário o encapsulamento com um componente natural da dieta (poliqueta ou alga desidratada), para garantir que estes ficariam retidos no alimento final [WHITFIELD *et al.*, 2002].

Portanto, algas, poliquetas, esponjas e briozoários podem ser considerados como as principais fontes de bromofenóis em peixes marinhos. Entretanto, o trabalho de identificação dos organismos que poderiam contribuir para a introdução de bromofenóis em peixes marinhos ainda não está esgotado [WHITFIELD *et al.*, 1995, 1996, 1998].

2.3. **Propriedades físicas**

Os bromofenóis simples têm massa molar elevada devido à contribuição dos átomos do elemento químico bromo. Sendo assim, estes possuem pontos de ebulição elevados, são pouco voláteis, pela relação existente entre a massa e o estado físico das substâncias além da interação interpartícula, propiciando uma maior dificuldade para isolá-lo de alimentos marinhos [BOYLE *et al*., 1993]. Os bromofenóis são relativamente polares, especialmente os isômeros monobromados, sendo dispersos em algum grau em água. Contudo, BOYLE *et al*. (1992b) observou que os monobromofenóis não se dispersam em nenhuma extensão em óleo vegetal. Os coeficientes de partição octanol/água (Tabela 1) determinados para os bromofenóis [BOYLE *et al*., 1992ª] indicam que apenas o 2,4-DBF (Log P=3) e o

2,4,6-TBF (Log P=3,74) poderiam potencialmente ser bioacumulados em animais marinhos. Geralmente, compostos com valores de Log P abaixo de 3 serão solubilizados em fase aquosa e não se bioacumularão em células e tecidos lipídicos [GOBAS *et al.,* 1988; POELS *et al*., 1988].

Tabela 1. Propriedades físicas dos bromofenóis simples.

Propriedade	2-BF	4-BF	2,4-DBF	2,6-DBF	2,4,6-TBF
Fórmula	C_6H_5BrO	C_6H_5BrO	$C_6H_4Br_2O$	$C_6H_4Br_2O$	$C_6H_3Br_3O$
Massa Molar	172	172	252	252	330
Densidade ($g.cm^{-1}$)	$1,4924^{20/4}$ [b]	$1,840^{15}$ [a, b]	-	-	$2,55^{20/20}$ [a, b]
Solubilidade	Água, éter	Álcool, $CHCl_3$, éter, 7 partes de água	Éter, álcool	Éter, álcool	Álcool, $CHCl_3$, 14.000 partes de água.
Estado físico	Líquido oleoso[a]	Cristais piramidais tetragonais ($CHCl_3$, Et_2O)[a]	Cristais em agulhas (éter de petróleo)[b]	Cristais em agulha (água)[b]	Cristais longos[a]; em agulhas (EtOH)[b]; prismas (bz)[b]
Ponto de ebulição (ºC)	194[c]	238[c]	154[c]	162[c]	244[c]
Ponto de fusão (ºC)	5,6[b]	64[a]	40[b]	56-57[b]	94-96[a]
Log P*	1,69[d]	1,94[d]	3,00[d]	2,37[d]	3,74[d]

*P = Constante de partição em octanol/água, expresso em log P

[a]INDEX MERCK, 1983

[b]HANDBOOK, 1974

[c]BUCKINGHAM, 1982; VERSCHUEREN, 1983

[d]VEITH *et al*., 1979; BOYLE *et al*., 1992a

2.4. **Toxicologia**

Sendo os bromofenóis simples substâncias químicas às quais é atribuído o "*flavor*" dos organismos marinhos, sua toxicidade é de extrema importância já que os seres humanos podem ingerir inadequadamente estes e terem sua saúde prejudicada. A preocupação maior quanto a estes compostos é pelo fato de serem halogenados, fato este que confere uma maior toxicidade biológica que seus correlativos não halogenados. Como exemplo característico tem-se os fenóis clorados que são até 500 vezes mais tóxicos que o fenol, tendo a toxicidade maior quanto maior for o número de substituintes clorados [KWASNIEWSKA e KAISER, 1983]. Na maioria das vezes, assim como nos compostos clorados, sendo maior o número de substituintes bromados por comparação a situação anterior resultará em uma maior toxicidade [KWASNIEWSKA e KAISER, 1983]. Porém, há uma diferença entre os compostos fenólicos clorados em relação ao demais substituintes halogenados que é a maior bioatividade deste do que os seus comparáveis correlativos bromofenóis [SWEET, 1987; SAX e LEWIS, 1989]. Em humanos, bromofenóis são descritos como moderadamente tóxicos podendo causar irritação na pele, olhos e mucosas [SAX e LEWIS, 1989]. Na literatura sinalizam quanto as quantidades letais (LD_{50}) para os bromofenóis simples 2-BF, 4-BF, 2,4-DBF, e 2,4,6-TBF submetidos oralmente a camundongos ou ratos sendo constatado as concentrações de $6{,}52x10^5$, $5{,}23x10^5$, $2{,}82x10^5$ e $2x10^6$ ng g^{-1}, respectivamente. Entretanto, os humanos devem ingerir de 8 a 600 milhões de camarões para produzir um efeito letal [BOYLE *et al*., 1993], estando, estes valores, completamente fora da realidade do dia-a-dia.

2.5. **Bromofenóis e o *flavor* de alimentos de origem marinha**

No estudo do conteúdo de bromofenóis em várias espécies de peixes e camarões, obtidos tanto de ambientes salinos quanto de água doce, foi observado que os organismos marinhos continham quantidades variadas de bromofenóis totais, enquanto que aqueles provenientes de água doce não apresentavam quantidades

detectáveis pelos métodos analíticos utilizados, além disso, não conferiam o "*flavor*" característico marinho e salgado [BOYLE *et al.*, 1992a].

A literatura identifica os bromofenóis simples 2-bromofenol (2-BF), 4-bromofenol (4-BF) 2,4-dibromofenol (2,4-DBF), 2,6-dibromofenol (2,6-DBF) e 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBF) como componentes "chave" do *flavor* de diversos alimentos marinhos, tais como lagostins, peixes oceânicos, moluscos, crustáceos e algumas espécies de algas comestíveis [BOYLE *et al.*,1992a; WHITFIELD *et al.*, 1988, 1995, 1997; ANTHONI *et al.*,1990]. Destes compostos, o mais potente é o 2,6-DBF que confere um "*flavor*" iodínico ou iodofórmico à carne de lagostin, enquanto o 2-BF e 2,4,6-TBF produzem um intenso "*flavor*" de camarão [BOYLE *et al.*,1992b; WHITFIELD *et al.*,1995]. Alguns trabalhos têm comprovado que suas diferentes combinações nas espécies marinhas podem resultar em *flavors* agradáveis (*on-flavor*) ou desagradáveis (*off-flavor*), dependendo da respectiva concentração [WHITFIELD *et al.*, 1988a; BOYLE *et al.*, 1992b]. Sozinhos ou em combinação, estes compostos conferem ou intensificam o "*flavor*" ou sabor dos alimentos marinhos.

As substâncias bromadas de origem natural, em ambiente e organismos marinhos, foram temas de alguns artigos de revisão [SIUDA *et al.*, 1973; FAULKNER, 1977; GRIBBLE, 1992, 1998]. A maioria dos trabalhos focaliza o isolamento e a identificação de substâncias com potenciais usos farmacêuticos. Revisões anuais foram publicadas sobre substâncias bromadas complexas de ocorrência natural isoladas de organismos marinhos [FAULKNER 1984a, 1984b, 1986, 1987, 1988, *apud* BOYLE *et al.*, 1993]. Apenas alguns autores têm discutido sobre as propriedades odoríferas e flavorizantes de substâncias bromadas, principalmente os bromofenóis voláteis [ASHWORTH & CORMIER, 1967; HIGA *et al.*, 1980; BOYLE *et al.*, 1992, 1993; WHITFIELD *et al.*, 1988 a, 1995, 2002, SILVA *et al*., 2007].

Os bromofenóis simples têm sido encontrados em concentrações na ordem de ng g^{-1} em peixes marinhos, crustáceos, moluscos, sendo fortemente associados ao *flavor* agradável (marinado) ou desagradável (iodofórmico), em função de suas concentrações [WHITFIELD, 1999, 1997,1988; BOYLE *et al.*, 1993; SILVA *et al*., 2007].

A maioria dos estudos sobre o *flavor* (sabor) de alimentos de origem marinha, tem sido direcionada para peixes. Até a primeira metade do século 20 os estudos sobre *flavor* em peixes eram incipientes, estando restritos apenas a características indesejáveis apresentadas por organismos de água doce. Além disso, existiam alguns obstáculos, tais como, a falta de metodologia adequada para quantificar e descrever precisamente os aromas encontrados, a existência de metodologias rudimentares para estudar e isolar microalgas a partir de águas naturais e a falta de métodos químicos para analisar especificamente compostos orgânicos presentes nos organismos [PERSSON, 1995]. Apesar disso, a elucidação de *off-flavor* levou apenas a um refinamento de técnicas, refletido pela adição de alguns detalhes experimentais nos diferentes estudos relacionados ao tema, realizados ao longo de décadas [SILVA *et al*., 2007].

A partir da década de 1960, a dieta assumiu uma posição importante sobre o efeito no *flavor* dos peixes, quando foi observado que a ingestão de certas espécies de invertebrados pelo salmão ou pelo bacalhau produzia um *off-flavor* detectável no peixe processado [WHITFIELD *et al.*, 1996]. Contudo, embora a literatura científica dos últimos anos aponte para a certeza de que o *flavor* natural dos animais marinhos decorram da dieta, poucos estudos tem sido realizados para tentar demonstrar esta relação [WHITFIELD *et al.*, 1988b; 1995; 1996].

Durante muito tempo não foram realizados estudos químicos relacionando ou indicando a presença de substâncias específicas, as quais poderiam atuar possivelmente como fontes responsáveis pelo *flavor* ou *off-flavor* em alimentos de origem marinha. Atualmente, considera-se que alguns fatores, independentes ou combinados, podem gerar substâncias responsáveis pelos paladares / odores / aromas indesejáveis (*off-flavor*). Dentre estes fatores, são descritos a degradação microbiana ou auto-oxidativa da carne fresca devido ao manuseio incorreto e/ou durante a estocagem [WHITFIELD *et al.*, 1996]; a adsorção de compostos químicos a partir de ambientes poluídos industrialmente [PERSSON, 1984; WHITFIELD, 1988a]; a presença de algas e bactérias na água de cultivo ou em alguns tipos de ingredientes usados nas rações [KUBITZA, 1999] e a bioacumulação de componentes químicos presentes na dieta ou no meio [WHITFIELD, 1988a; WHITFIELD *et al.*, 1996]. Dependendo do caso, estas substâncias, mesmo presentes em pequenas concentrações, devido aos seus baixos índices limiares,

levam à perda das propriedades sensoriais tornando o pescado inadequado ou inaceitável para o consumo humano [WHITFIELD *et al.*, 1988].

2.6. Pesca e aquicultura no estado da Bahia

Atualmente o mundo está passando por um processo de explosão populacional e dois aspectos têm sido motivo de preocupação: i) a necessidade de ampliação constante na produção de alimentos e ii) os problemas ambientais decorrentes da produção destes. Assim, a aquicultura apresenta-se como uma solução viável tanto para atender à crescente demanda por alimentos aquáticos, quanto para reduzir o problema da contaminação ambiental causada pelo descarte de sub-produtos residuais (cabeça, vísceras, pele, nadadeiras e espinhas). Esses resíduos, nos processos de industrialização, podem ser incorporados a rações, constituindo-se um ciclo de produção ecologicamente correta [SILVA *et al*., 2007; WHITFIELD *et al.*, 1996].

No entanto, o êxito da aquicultura está na percepção da qualidade e consequentemente na aceitação dos alimentos por parte dos consumidores. Assim, para que estes possam ser consumidos torna-se necessário assegurar as suas boas condições higiênico-sanitárias, características nutricionais, e principalmente a boa qualidade sensorial, já que esta geralmente é levada mais em conta do que as propriedades nutricionais na hora da escolha de um alimento [CARVALHO FILHO, 2005].

Atualmente já é bem estabelecida a importância da incorporação de bromofenóis simples em rações para aquicultura, que conferem um *flavor* agradável aos pescados cultivados [CARVALHO FILHO, 2005].

O Brasil e, particularmente o Estado da Bahia, possui uma grande extensão marítima, com áreas propícias ao cultivo de camarões e outros organismos marinhos de interesse alimentar (Figura 8).

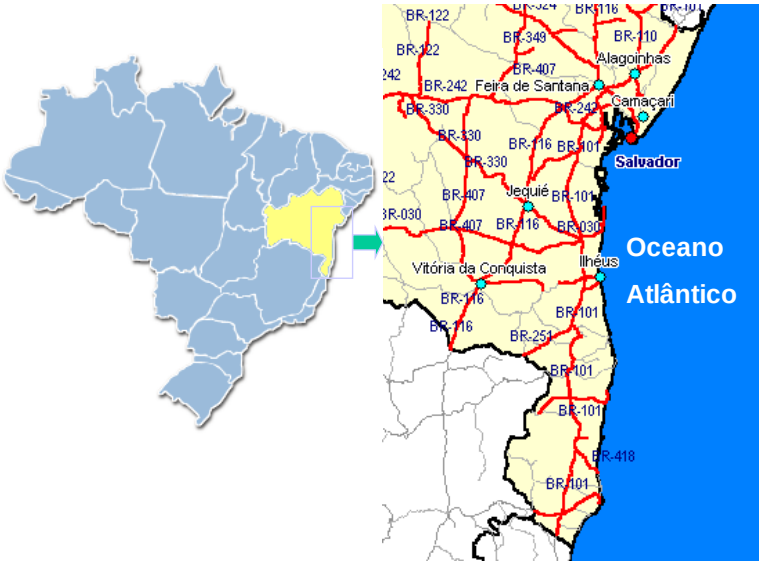


Figura 8. Extensão costeira do estado da Bahia.

O litoral baiano apresenta grande quantidade e variedade de organismos marinhos cuja constituição química é pouco conhecida. O pescado (peixes, crustáceos e outros organismos marinhos) é um dos principais alimentos da população costeira na Bahia. Entretanto, pouco se conhece sobre a qualidade dos produtos comercializados, provenientes de fazendas de cultivos ou não. Também, o incremento na produção de pescado através da aquicultura, especialmente a maricultura, depende, entre outros aspectos, do conhecimento das espécies químicas envolvidas nos processos de absorção/depuração de compostos orgânicos voláteis [SILVA *et al*., 2007].

Entre os camarões de ocorrência no litoral da Bahia, são importantes as espécies: *Lithopenaeus schimitti* [Burkenroad, 1936] (camarão branco), *Xiphopenaeus kroyeri* [HELLER, 1862] (camarão sete barbas), enquanto na maricultura a principal espécie é o *Lithopenaeus vannamei*.

Apesar da importância econômica das espécies marinhas como produto artesanal e também de cultivo, poucos são os estudos sobre o perfil dos COV e bromofenóis simples, componentes chave do *flavor/sabor* nesses organismos marinhos. Este trabalho visa contribuir para os conhecimentos sobre estes compostos orgânicos em espécies marinhas do litoral da Bahia.

Estudos recentes do grupo de pesquisa LPQ-IQ-UFBA [VELOSO, M. C. C. TESE DE DOUTORADO, 2005; SILVA, V. M. TESE DE DOUTORADO, 2006;

SANTOS SOBRINHO, J. P. DOS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2012] tratam do desenvolvimento de métodos para extração, separação e quantificação de bromofenóis simples em amostras de organismos de origem marinha, utilizando as técnica de CLAE-UV e CG-EM.

2.7. Camarões

Os artrópodes em geral são cobertos por uma estrutura calcificada denominada exoesqueleto que é constituído por quitina, proteínas e carbonato de cálcio. O corpo dos camarões é dividido em duas regiões distintas compostas pelo cefalotórax e pelo abdômen [BARBIERI JR; OSTRENSKY NETO, 2001].

O cefalotórax, localizado na porção anterior do corpo do camarão, é uma estrutura formada pela fusão entre cabeça e tórax na qual se encontram as seguintes estruturas de grande importância funcional para o animal: (i) a carapaça cuja função é recobrir e proteger as brânquias e órgãos vitais; (ii) os olhos pedunculados, responsáveis pela visão; e (iii) o rostro, estrutura pontiaguda com função de proteger o animal contra os predadores. Também no cefalotórax encontram-se vísceras importantes tais como o cérebro, coração, hepatopâncreas, estômago e as gônadas.

O abdômen, localizado na parte posterior do corpo do animal, contém a maior parte da musculatura dos peneídeos, bem como o ânus e um cordão do sistema nervoso [ANDREATTA; BELTRAME, 2004].

Os apêndices são estruturas com diversas funções tais como alimentação, locomoção, escavação, limpeza e captação de estímulos externos. As antenas e antênulas, localizadas na cabeça, possuem basicamente funções sensoriais. As maxilas, maxílulas e mandíbulas, também localizadas na cabeça, estão relacionadas a funções alimentares tais como corte, manipulação e trituração de alimentos. No tórax estão localizadas estruturas como os maxilípedes que têm tanto funções sensoriais (tato e paladar) quanto alimentares (manipulação dos alimentos). Ainda no tórax, encontram-se os cinco pares de patas ambulacrais ou pereiódopos que desempenham a função de locomoção sobre superfícies, sendo que o primeiro par de pereiódopos possui forma de pinça e denomina-se quelípodo.

2.7.1. Espécies estudadas

2.7.1.1. *Litopenaeus Vannamei*

A espécie *Litopenaeus vannamei* pertence ao Reino Animalia e é taxonomicamente classificada segundo esquema a seguir:

Filo Arthropoda

Sub-filo Crustacea **Pennant, 1777**

Classe Malacostraca **Latreille, 1806**

Subclasse Eumalacostraca **Grobben, 1892**

Superordem Eucarida **Calman, 1904**

Ordem Decapoda **Latreille, 1803**

Subordem Dendrobranchiata **Bate, 1888**

Superfamília Penaeoidea **Rafinesque, 1815**

Família Penaeidae **Rafinesque, 1815**

Gênero *Litopenaeus* **Pérez Farfante e Kensley, 1997**

Espécie *Litopenaeus vannamei* **Boone, 1931**

O Camarão Cinza do Ocidente (*Litopenaeus vannamei*), espécie nativa da costa sul-americana do Pacífico, onde se estende do Peru ao México, mostra acentuada presença na faixa costeira do Equador. Atualmente é cultivada em todos os países produtores do Ocidente. Em geral, apresenta taxa uniforme de crescimento, fácil adaptabilidade a diferentes condições de meio ambiente; é considerada uma variedade de tamanho médio e tem excelente aceitação nos mercados americano e europeu. A carcinicultura brasileira explora exclusivamente esta espécie que, confirmando suas características, adaptou-se bem aos

ecossistemas costeiros do país. O L. vannamei participa com 16% da produção mundial de camarão cultivado [SEBRAE, 2008].

Figura 9. Camarão de cativeiro *Litopenaeus vannamei*

2.7.1.2. *Xiphopenaeus kroyeri* (Sete barbas) [HELLER, 1862]

O camarão-sete-barbas apresenta ampla distribuição geográfica no Atlântico ocidental [HOLTHUIS, 1980, PEREZ-FARFANTE, 1970], vive em fundos de areia e/ou lama e raramente ultrapassa a isobata dos 30 metros, concentrando-se preferencialmente na faixa dos 15 metros. Não apresenta estratificação populacional e não possui dependência de regiões estuarinas para completar o seu ciclo de vida, como acontece com as espécies do gênero Farfantepenaeus e Litopenaeus [VIEIRA, 1947; GUNTER, 1950; NEIVA e WISE, 1963; IWAI, 1973]. O camarão sete-barbas vive pouco mais de um ano e a reprodução ocorre durante todo o ano, com dois picos: um no verão e outro no outono [VIEIRA, 1947]. Segundo NEIVA e WISE (1963) o recrutamento ocorre no inverno e primavera e a taxa de mortalidade mensal é de cerca de 55% para machos e fêmeas, respectivamente do 4º ao 6º mês de vida. BRANCO *et al.* (1999) relatam que a presença de juvenis é comum durante todo o ano e que as maiores concentrações ocorrem no outono.

Os camarões peneideos são um dos recursos naturais mais rentáveis do mundo, sendo que as espécies da família Penaeidae destacam-se pela importância econômica uma vez que são intensamente exploradas na maior partes das regiões tropicais e subtropicais do mundo [VASQUES, 2005].

A pesca de camarões no Brasil sustenta-se em espécies do gênero Farfantepenaeus, Litopenaeus e Xiphopenaeus sendo que o “camarão-sete-barbas” constitui-se um dos mais importantes recursos pesqueiros [SILVA *et al.*, 2005]. Esse camarão apresenta certa facilidade de exploração advinda da baixa profundidade em que ocorre e a relativa abundância dos cardumes pescáveis. Tais características propiciaram nos últimos anos um grande incremento no número de embarcações que atuam sobre o recurso. A proximidade da costa e a concentração da população ribeirinha nestas localidades, faz com que, a captura, seja realizada quando for atribuído, aos organismos, um valor comercial, em caso contrário, as espécies são classificadas como rejeitado.

Figura 10. Camarão pescado *Xiphopenaeus kroyeri*

Apesar da importância econômica das espécies marinhas como produto artesanal e também de cultivo, poucos são os estudos sobre o perfil dos COV e bromofenóis simples, componentes chave do *flavor/sabor* nesses organismos marinhos. Este trabalho visa contribuir para os conhecimentos sobre estes compostos orgânicos em espécies marinhas do litoral da Bahia.

2.8. Metodologia analítica empregada na determinação de bromofenóis

Entre os principais métodos para análise de substâncias orgânicas em amostras complexas, destacam-se as técnicas de extração combinadas com a separação e análise cromatográfica. O pré-tratamento da amostra para o isolamento e enriquecimento de compostos orgânicos a partir de matrizes de alimentos é um

dos principais desafios no desenvolvimento de um método analítico, devido as problemáticas de seletividade e utilização de uma grande quantidade de solvente [BULDINI *et al.*, 2002; CHAICHI *et al.*, 2013].

O processo analítico está compreendido de vários etapas: amostragem, manuseio da amostra, preparação da amostra no laboratório, separação, identificação e quantificação dos analitos e, por último, avaliação estatística. Cada uma destas etapas é importante para obtenção de resultados corretos, mas a preparação da amostra pode ser considerada como um componente chave do método analítico [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1. Técnicas de extração mais usadas

As técnicas de extração representam uma importante etapa dos procedimentos de laboratório, especialmente na química analítica. A extração corresponde, de fato, a uma “preparação da amostra” e serve para isolar os analitos de possíveis interferentes, tornando a amostra adequada para a análise [RAYNIE, 2006].

As técnicas clássicas de extração mais utilizadas no isolamento de substâncias orgânicas são a extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction – LLE*) e extração em fase sólida (*Solid-phase extraction – SPE*).

A extração líquido-líquido (*LLE*) é um dos mais antigos procedimentos de pré-tratamento de amostras e é comumente usado por causa de sua simplicidade e baixo custo. Contudo, essa técnica requer volumes relativamente grandes de solvente orgânico, gerando muitos resíduos, consome muito tempo e exige o manuseio de substâncias perigosas para a saúde e meio ambiente [ABADI *et al.*, 2012; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; VALLECILLOS *et al.,* 2012; ZGOŁA-GRZES´KOWIAK; GRZES´KOWIAK, 2011; JAIN; VERMA, 2011; XU *et al.*, 2007].

A extração em fase sólida (*SPE*) que utiliza um aparelho de Soxhlet, além de demandar um grande volume de solvente orgânico, apresenta os problemas de longo tempo de análise e alto custo dos cartuchos de filtração.

Nos últimos anos, contudo, outras técnicas têm sido utilizadas com objetivo de isolar, pré-concentrar, separar e quantificar constituintes químicos, destacando-se especialmente aquelas que se articulam pelos preceitos da química verde com economia de reagentes, solventes, tempo de análise e redução de rejeitos. Entre estas técnicas estão a microextração em fase sólida (*Solid phase microextraction – SPME*) e a microextração com gota única (*Single drop microextraction - SDME*) que normalmente são combinadas com métodos cromatográficos de análise como a CGAR e a CLAE [ABADI *et al.*, 2012; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; VALLECILLOS *et al.,* 2012; ZGOŁA-GRZES´KOWIAK; GRZES´KOWIAK, 2011; JAIN; VERMA, 2011; XU *et al.*, 2007] (Figura 11).

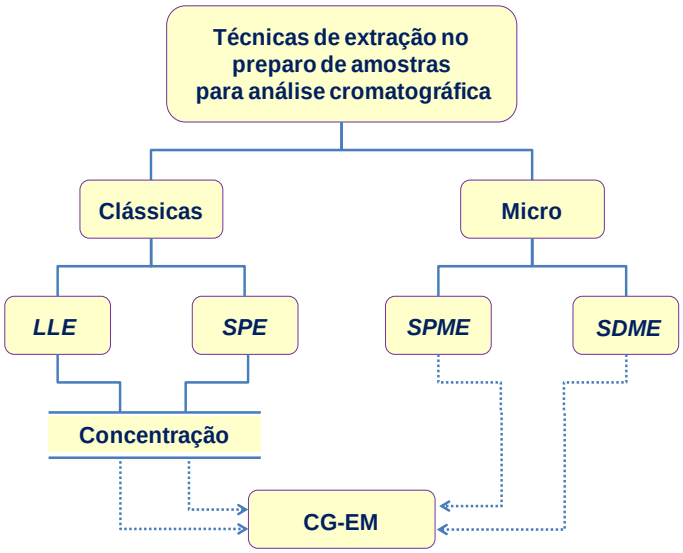


Figura 11. Técnicas de extração para determinação de compostos orgânicos por CG-EM.

Os bromofenóis geralmente são isolados das amostras por destilação-extração simultâneas (DES), procedimento que combina simultaneamente duas técnicas clássicas, a destilação por arraste a vapor e a extração líquido-líquido [WHITFIELD *et al*., 1988]. Após o isolamento, os bromofenóis são geralmente quantificados por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que se destacam entre as técnicas mais utilizadas e mais eficientes na análise de substâncias orgânicas em baixas concentrações [LOPES *et al*. 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2005; EICEMAN *et al.*, 2006; SANTOS; GALCERAN, 2002].

2.8.1.1. Destilação-extração simultâneas (DES)

A DES é muito empregada na extração de bromofenóis voláteis de organismos marinhos através do extrator de Likens-Nickerson (Figura 12) [SCHULTZ *et al*., 1977]. Silva *et al.* (2005) utilizaram uma aparelhagem de Clévenger modificada, adaptada para DES (Figura 13), para extração dos bromofenóis, seguida pela determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

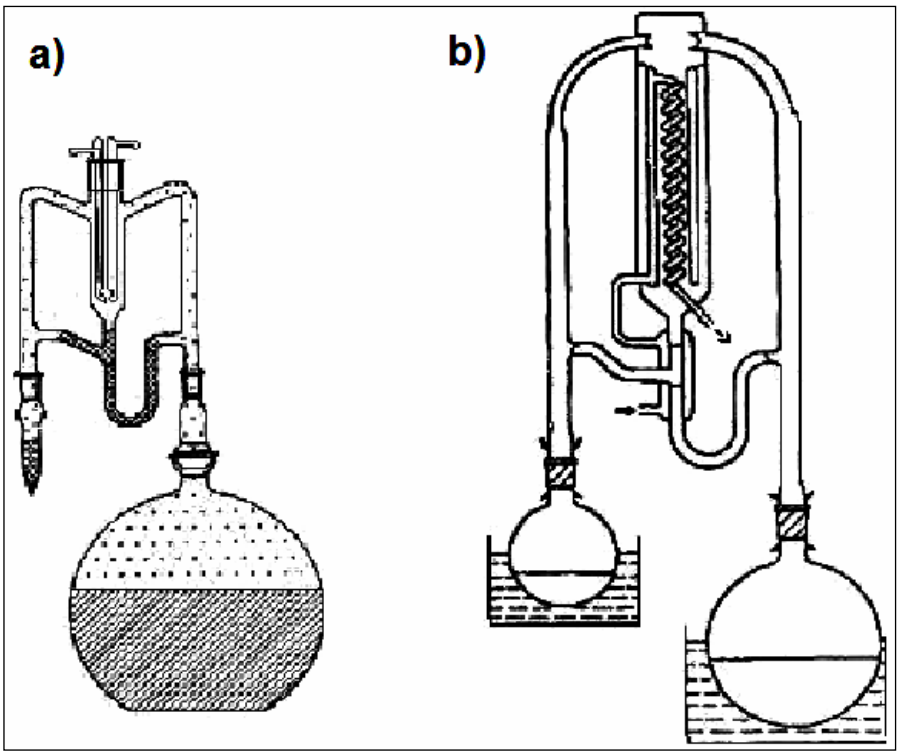


Figura 12. Extratores usados na DES: a) original; b) modificada por Schultz, 1977.

Nesse sistema o material é colocado em um balão de fundo redondo com água desionizada e acidificada a pH = 1. Esse material fica em repouso por aproximadamente 12 horas. Após isso, o material é aquecido e a água é vaporizada arrastando os compostos voláteis presentes nos organismos marinhos. A extração utilizando a mistura de solventes pentano-éter etílico ocorre em um intervalo de tempo de 2 a 4 horas, dependendo da otimização do método. Após a extração, o pH do resíduo é medido para garantir que a acidez foi mantida durante todo o processo.

O extrato coletado é seco com sulfato de sódio, concentrado com nitrogênio e estocado a -15°C até a análise [WHITFIELD *et al*., 1998, 1999c; CHUNG *et al*., 2003; da SILVA *et al*., 2005].

Apesar da alta sensibilidade do CG-EM, a injeção de uma alíquota do extrato do solvente orgânico concentrado diretamente na coluna causa significativa perda de sensibilidade porque o alto nível de óleos voláteis nesses extratos rapidamente é acumulado na porção inicial da coluna cromatográfica [WHITFIELD *et al*., 2002]. Como consequência, frequente limpeza da coluna é necessária para manter o desempenho analítico. Dessa forma, a aplicabilidade deste método para análises de rotina é reduzida [FULLER *et al*., 2008]. Portanto, para se obter melhores resultados de análises cromatográficas, é preciso determinar a melhor técnica de extração dos compostos da amostra aumentando a sensibilidade e diminuindo o tempo de extração e consequentemente análise dessas matrizes.

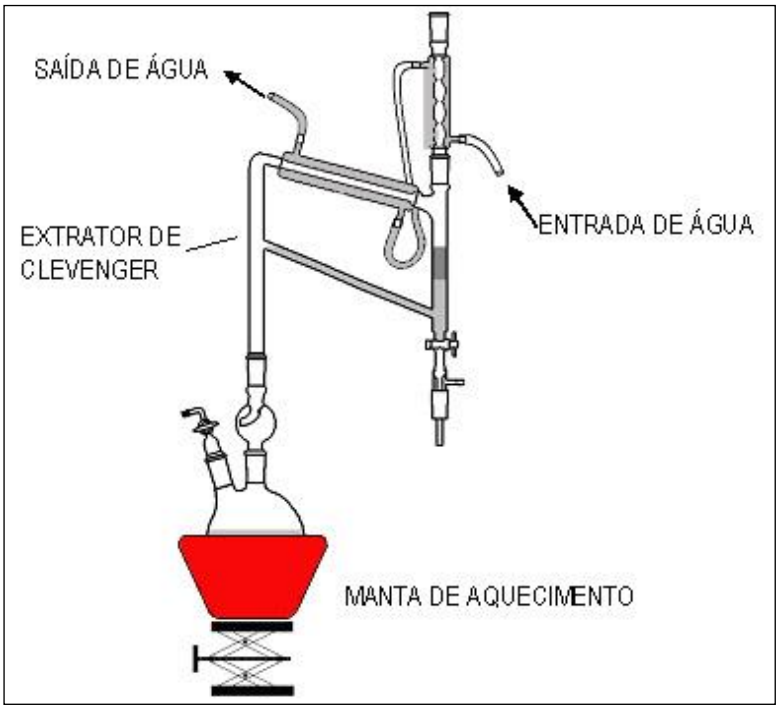


Figura 13. Aparelhagem de Clévenger modificada para DES [SILVA, V. M., TESE DE DOUTORADO].

2.8.1.2. Microextração em fase sólida (*SPME*)

A microextração em fase sólida (*Solid phase microextraction* – SPME) é uma técnica sensível e muito utilizada no isolamento de constituintes químicos de alimentos e amostras ambientais. É uma técnica miniaturizada, em que os processos de extração e concentração de analitos ocorrem em dimensões diferentes da extração em fase sólida - SPE [VALENTE; AUGUSTO, 2000]. O princípio da técnica é a distribuição do analito entre a amostra e um micro componente extrator, que consiste de um material sorvente que recobre uma fibra óptica de sílica fundida. O dispositivo básico utilizado na SPME (Supelco Inc., Bellefont) consiste de um bastão de fibra óptica, de sílica fundida, com 10 mm, recoberto com um filme de um polímero (polidimetilsiloxano, ou carbowax etc.) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado = carboxen). No processo, a fibra de sílica fundida coberta com um filme polimérico seletivo líquido, ou uma fase sólida ou mesmo ambas, é colocada em contato com a amostra, tendo como resultado a partição ou adsorção do analito entre a matriz e a fase estacionária. Em seguida, a fibra é transferida para um instrumento analítico onde os analitos serão dessorvidos, separados e quantificados [LOPES; VALENTE, 2002; SUPELCO, 1995] (Figura 14).

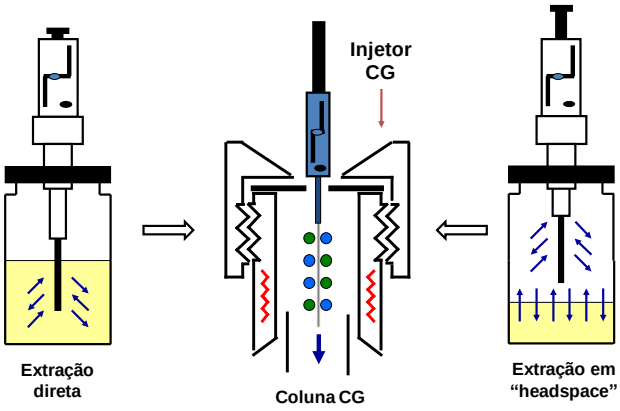


Figura 14. Representação da microextração em fase sólida (*SPME*).

Entretanto, sua aplicação tem sido limitada pelo elevado custo e fragilidade da camada de recobrimento das fibras que tendem a degradar com o uso e a perda

parcial da fase estacionária conduzindo a picos que podem co-eluir com os analitos, afetando a precisão [CORTADA *et al*., 2009].

2.8.1.3. Microextração com gota única (*SDME*)

A microextração com uma simples gota (*Single Drop Microextraction* - *SDME*), desenvolvida por JEANNOT e CANTWEL (1996), é uma técnica moderna que integra amostragem, extração, concentração e permite a introdução da amostra no sistema de análise em um único passo [ZANG *et al.*, 2008].

Nessa técnica, uma microgota (volume na ordem de 1 - 2 µL) de um solvente orgânico imiscível em água é mantida suspensa na ponta da agulha de uma microsseringa convencional de 10 µL e os analitos são particionados entre a microgota orgânica e a solução da amostra [TOR, 2006]. A SDME é uma técnica bastante simples que pode ser executada no modo direto ou indireto (*headspace*).

No modo direto, uma microsseringa de 10 µL com agulha de aço contendo solvente orgânico é introduzida no frasco, a ponta da agulha é submersa na amostra aquosa e o êmbolo lentamente empurrado, expondo a microgota na solução. A microgota é então mantida em contato com a amostra, sob agitação, por um período de tempo que geralmente varia 10 a 30 minutos (Figura 15).

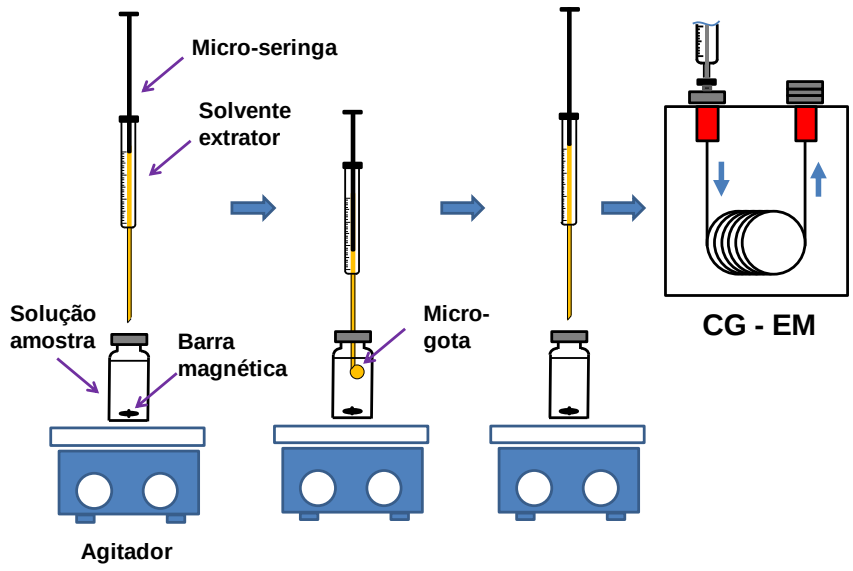


Figura 15. Procedimento de extração por *SDME* e determinação por CG-EM (direto).

No modo indireto (*headspace* ou espaço confinado), a microgota é mantida suspensa no espaço superior, acima da amostra (Figura 16), permitindo a partição dos analitos entre a fase vapor e a fase líquida (microgota). Na imersão indireta (*headspace*) a técnica apresenta a grande vantagem de eliminar o efeito de matriz, tornando o método mais seletivo [TOR, 2006].

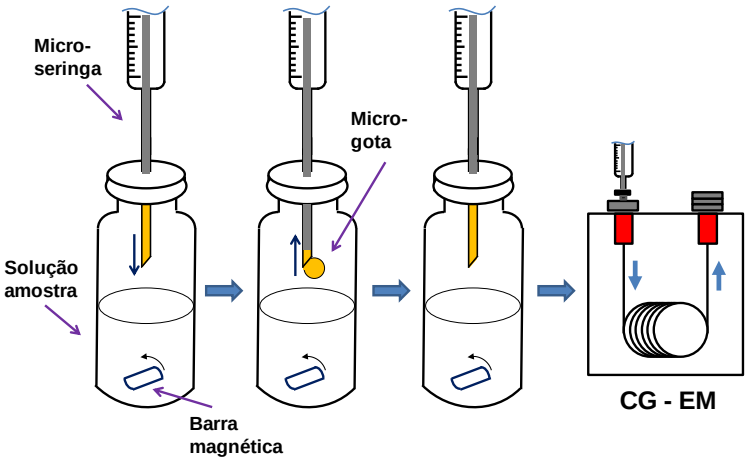


Figura 16. Procedimento de extração por *SDME* e determinação por CG-EM (*headspace*).

A técnica de *SDME* apresenta muitas vantagens (Figura 17) em comparação com outras técnicas de extração/pré-concentração como: não é exaustiva, utiliza uma quantidade de solvente desprezível (o que minimiza o contato do analista com substâncias potencialmente tóxicas), oferece a liberdade de selecionar o solvente mais adequado para os analitos de interesse, requer um curto tempo de análise, tem elevada sensibilidade e baixo custo, quando comparado com *SPME* e *SPE* e utiliza um equipamento simples [PINHEIRO; ANDRADE, 2009].

Por outro lado à técnica de *SDME* apresenta algumas limitações (figura 17) incluindo variação do volume da gota durante o processo de extração, o que afeta diretamente parâmetros tais como: precisão, estabilidade da gota, dissolução do solvente da gota quando usado condições extremas de extração tais como velocidade de agitação alta, longo tempo de extração e elevada temperatura. Além disso, a experiência do operador pode afetar a linearidade e precisão da extração por SDME [PINHEIRO; de ANDRADE, 2009; PINHEIRO *et al*., 2011].

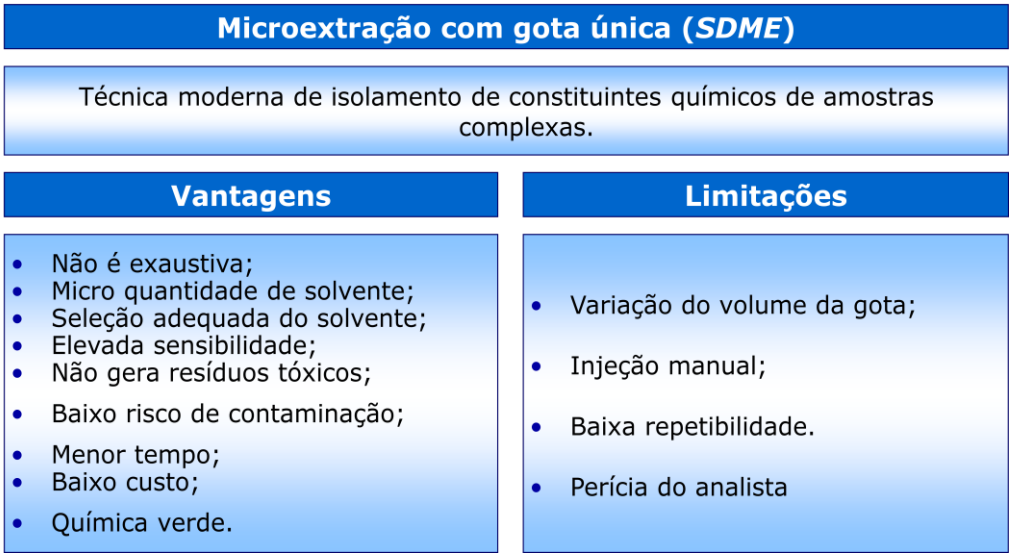


Figura 17. Vantagens e limitações da técnica de extração *SDME*.

Fonte: adaptado de [PINHEIRO; de ANDRADE, 2009; PINHEIRO *et al*., 2011].

2.8.1.3.1. Fatores que influenciam a extração por *SDME*

A eficiência da extração por *SDME* é influenciada por muitos fatores tais como tempo de extração, propriedades químicas e físicas do solvente, tamanho da gota, razão de agitação, temperatura e força iônica da solução [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1.3.1.1. Solvente extrator

A seleção do solvente de extração está baseada no princípio de que "semelhante dissolve semelhante" [SARKHOSH *et al.*, 2011]. O critério de seleção do solvente é similar àquele para extração líquido-líquido (LLE), isto é, os analitos devem ser mais solúveis no solvente de extração do que na amostra. Em geral, para *SDME*, a escolha de um solvente orgânico deve se basear na comparação de seletividade, eficiência da extração, incidência de perda da gota, grau de dissolução da gota, bem como grau de toxicidade [WARDENCKI *et al.*, 2007]. Além disso, o solvente precisa ter uma temperatura de ebulição elevada o suficiente para não

evaporar facilmente, mas também apropriada para o sistema cromatográfico [PATEL *et al.*, 2010; PINHEIRO; de ANDRADE, 2009].

2.8.1.3.1.2. Tempo de contato

O processo de *SDME* depende do equilíbrio em vez de depender de uma extração exaustiva (ou contínua) como, por exemplo, na destilação e extração simultânea (*DES*). Na maioria das aplicações em que a *SDME* é utilizada, a eficiência da extração é maior com o aumento do tempo de extração [SARKHOSH *et al.*, 2011]. Um tempo de extração adequado é necessário para que o equilíbrio dos analitos entre a fase aquosa e a gota orgânica seja alcançado. Porém um tempo de extração muito longo para alcançar o equilíbrio completo pode resultar em dissolução ou perda da gota [ZANG *et al.*, 2008].

Em alguns casos, quando o solvente é hidrofílico, um aumento do tempo de exposição causa um aumento do volume da gota pela absorção de água. Além disso, com um longo tempo de amostragem, a gota de solvente pode perder o contato com a agulha devido à força gravitacional [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1.3.1.3. Volume da microgota de solvente

Em *SDME*, o volume da gota é uma importante variável na eficiência da extração. A quantidade de analito extraído aumenta com o aumento do volume da gota. Porém, uma gota maior que 3 µL torna-se instável e pode cair da agulha, especialmente quando utilizada a imersão direta [PATEL *et al.*, 2010]. Gotas de solvente de 1-2 µL são mais estáveis e sua geometria é mais facilmente reproduzida [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1.3.1.4. Velocidade de agitação

A agitação da amostra pode reduzir o tempo necessário para alcançar o equilíbrio termodinâmico, especialmente para analitos com elevado peso molecular. Por isso, a velocidade de agitação é um importante parâmetro que afeta a eficiência da *SDME* [SARKHOSH *et al.*, 2011]. Contudo, uma velocidade de agitação muito alta pode originar bolhas de ar, aumentado a incidência de perda ou deslocamento da gota. Além disso, uma velocidade de agitação elevada pode provocar a redução do volume da gota devido à dissolução na fase aquosa. Assim, é preferível colocar uma velocidade de agitação baixa. Se a extração for eficiente, possivelmente nenhuma agitação é necessária [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1.3.1.5. Temperatura

Resultados experimentais revelaram que o aumento da temperatura aumenta a eficiência da extração. Contudo, elevadas temperaturas podem causar perda da gota de solvente e diminuição da reprodutibilidade do processo de *SDME*. Para simplificar o método, a maioria dos químicos realiza os experimentos à temperatura ambiente [WARDENCKI *et al.*, 2007].

2.8.1.3.1.6. Efeito da adição de sal

Em procedimento convencional, a eficiência da extração líquido-líquido é geralmente aumentada pela adição de sal na solução da amostra devido ao efeito "*salting-out*" [YE *et al.*, 2007]. Na técnica de *SDME*, geralmente há uma inesperada diminuição da eficiência da extração com o aumento da força iônica para a maioria dos analitos, sendo que esse efeito é mais pronunciado para os analitos menos polares [WARDENCKI *et al.*, 2007]. Uma possível explicação é que o NaCl dissolvido em água pode mudar as propriedades físicas do filme de extração e reduzir a difusão dos analitos de interesse em direção à microgota orgânica [SARKHOSH *et al.*, 2011].

2.8.1.3.2. Algumas aplicações da microextração com gota única

ZHANG *et al.* (2008) desenvolveram metodologia para extração de pesticidas organoclorados em vegetais. Eles utilizaram uma gota de 1µL de uma mistura de solventes (p-xileno:acetona 8:2, v/v) imersa em uma solução aquosa de 2 mL e agitada a 400 rpm.

YE *et al.* (2007) desenvolveram um pequeno dispositivo afunilado para extração por SDME, que permite a utilização de uma gota de grande volume, o que melhorou a sensibilidade analítica. A estabilidade da gota foi aumentada por causa do aumento da área de contato e por causa da superfície interior áspera do dispositivo de extração. Foi utilizada uma gota de 20 µL de 1-octanol.

CORTADA *et al.* (2009) utilizaram *SDME* para preconcentrar oito pesticidas organoclorados em amostras de água usando uma gota de 2 µL de tolueno. Pinheiro e de Andrade (2009) utilizaram *SDME* para determinação de multiresíduo de pesticidas em água. Os parâmetros que afetam o desempenho de *SDME* foram estudados e otimizados utilizando um planejamento fatorial. *SDME* foi utilizada também para extração de cocaína e metabólitos da cocaína em urina [JAGER e ANDREWS, 2001].

Até o momento, apenas um trabalho foi publicado em que se utilizou a técnica de SDME na determinação de bromofenóis em amostras oriundas de organismos marinhos [SANTOS SOBRINHO, J. P. DOS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2012].

2.8.2. Métodos de análise de bromofenóis

Os métodos cromatográficos, devido a sua versatilidade, eficiência e sensibilidade, são amplamente utilizados na análise de alimentos e de outras matrizes como, por exemplo, amostras ambientais. Dentre as várias técnicas cromatográficas utilizadas, destacam-se cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A cromatografia gasosa é uma das principais técnicas para a separação, detecção, identificação e quantificação de compostos orgânicos em amostras complexas. A miniaturização e modernização dos instrumentos, com o desenvolvimento de detectores altamente sensíveis e a utilização de técnicas acopladas como cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM) permitiu um considerável aumento da seletividade e eficiência desta poderosa técnica na análise orgânica [SANTOS SOBRINHO, J. P. DOS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2012].

A incorporação de novas tecnologias permitiu a construção de colunas capilares de sílica fundida com fases estacionárias imobilizadas, termicamente estáveis, de alta resolução. Além disso, a utilização de fases estacionárias quirais tornaram a CG um instrumento capaz de resolver separações complexas. Propiciaram, também, a diminuição dos limites de detecção, maior rapidez na análise, maior precisão e exatidão na separação, identificação e quantificação de analitos de misturas variadas [SANTOS SOBRINHO, J. P. DOS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2012].

Um grande número de colunas capilares é disponível comercialmente, de diversos fabricantes, marcas e tipos. As colunas mais utilizadas são de sílica fundida e têm entre 20 e 30 m de comprimento, diâmetro interno entre 0,1 e 0,32 mm e espessura da fase estacionária entre 0,1 e 1,0 µm. A composição da fase estacionária também é bastante variada e a escolha é feita em função da eficiência e poder de resolução para amostras específicas. As fases estacionárias de polaridade baixa são as mais utilizadas na separação de bromofenóis, por exemplo, a fase estacionária ligada do tipo 5%-fenil-95%-metilpolisiloxano (DB-5 MS™) [CHRISTENSEN *et al*., 2005; YANCEY, 1994; SILVA *et al.*, 2007].

A detecção de bromofenóis em amostras de alimentos por CG-EM geralmente é feita em equipamento de baixa resolução com impacto de elétrons (IE). Os bromofenóis simples fornecem íons moleculares intensos com baixos níveis de fragmentação. O sistema geralmente é operado por meio de monitoramento de íons selecionados (modo SIM; do inglês, *selected ion monitoring*) que tem a vantagem de apresentar baixos limites de detecção. A outra vantagem do sistema CG-EM, no modo SIM, é a possibilidade de uso de um íon para quantificação do analito (íon

quantificador) e, simultaneamente, de outro íon (íon qualificador) para confirmação da identidade da substância.

O detector de CG-EM é mais adequado que os detectores convencionais, como, por exemplo, o detector por ionização em chama (CG-DIC), pois além de quantificar permite a confirmação da identidade dos analitos por meio dos espectros de massas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar os bromofenóis simples em abdômen de camarões pescados e cultivados (carcinicultura) com base na microextração com gota única e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.2. Objetivos Específicos

Desenvolver metodologia para determinação de bromofenóis simples [2-bromofenol (2-BF), 4-bromofenol (4-BF), 2,4-bromofenol (2,4-DBF), 2,6-dibromofenol (2,6-DBF) e 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBF)] que têm sido identificados como compostos chave na caracterização do *flavor* de alimentos marinhos, usando as técnicas de microextração com gota única (*SDME*) seguida de análise por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), com ênfase na redução do tempo de análise, melhoria da resolução e minimização do uso de solventes (química verde).

Estudar a composição de bromofenóis simples em camarões pescados artesanalmente e cultivados (carcinicultura) que são geralmente comercializados na cidade de Salvador, Bahia, incluindo as seguintes espécies: *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (camarão sete barbas), e o *Lithopenaeus vannamei* (principal espécie da carcinicultura).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção e preparo de amostras

O desenvolvimento do método (retirar a carapaça e processar a amostra até a consistência de uma “pasta”) de preparação das amostras foi feito numa etapa preliminar utilizando-se camarões frescos, obtidos diretamente da Fazenda Experimental Oruabo (carcinicultura), da Bahia Pesca, do Governo do Estado da Bahia, localizada na Vila de Acupe, no município de Santo Amaro da Purificação (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Imagem da Fazenda Experimental Oruabo, Vila de Acupe, Santo Amaro da Purificação, BA.

Figura 19. Imagem do viveiro de camarão cultivado da Fazenda Oruabo - Bahia Pesca.

Após desenvolvimento, o procedimento foi aplicado às amostras de camarões pescados, oriundos do município de Valença, BA, comercializados na cidade de Salvador, BA, no bairro de Água de Meninos (Mercado de Frutos do Mar), e de cultivo (aquicultura), oriundos da Fazenda Oruabo, cidade de Santo Amaro da purificação, BA.

Figura 20. Imagem do Mercado Popular (Água de Meninos), em Salvador.

Os camarões cultivados (*Lithopenaeus vannamei*), logo após a captura, possuíam peso médio de 12 g, e comprimento padrão médio de 10 cm.

Figura 21. Comprimento médio do camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*).

Os camarões obtidos diretamente por pescadores (*Xiphopenaeus kroyeri*), logo após a captura (recém-pescados), possuíam peso médio de 14 g, e

comprimento padrão médio de 10,5 cm, enquanto que o abdômen (filé) possui comprimento padrão médio de 7,5 cm. As coletas foram realizadas em estações distintas de anos de 2011 e 2012.

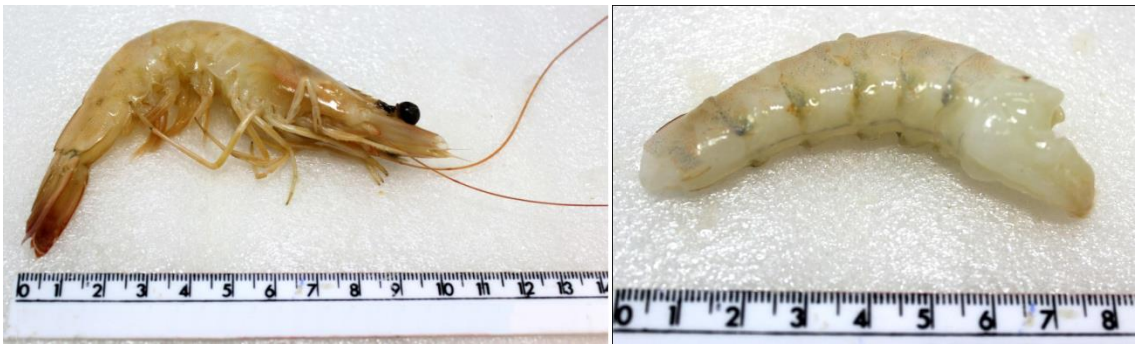


Figura 22. Comprimento médio do camarão pescado Sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

Os camarões no local da coleta foram acondicionados em sacos de polietileno, sendo então transportados para o Laboratório no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, sob refrigeração. No laboratório foram lavados com água destilada, para retirada de impurezas e tiveram suas partes separadas: cefalotórax e abdômen (Figura 23). As diferentes partes foram embaladas em sacos de polietileno (tipo *zip lock*) e mantidas sob refrigeração (-20°C) até o momento da análise.

Para este estudo foi utilizado o abdômen (filé do camarão), triturado em um multiprocessador de alimentos de uso doméstico, até a consistência de uma pasta (Figura 24).

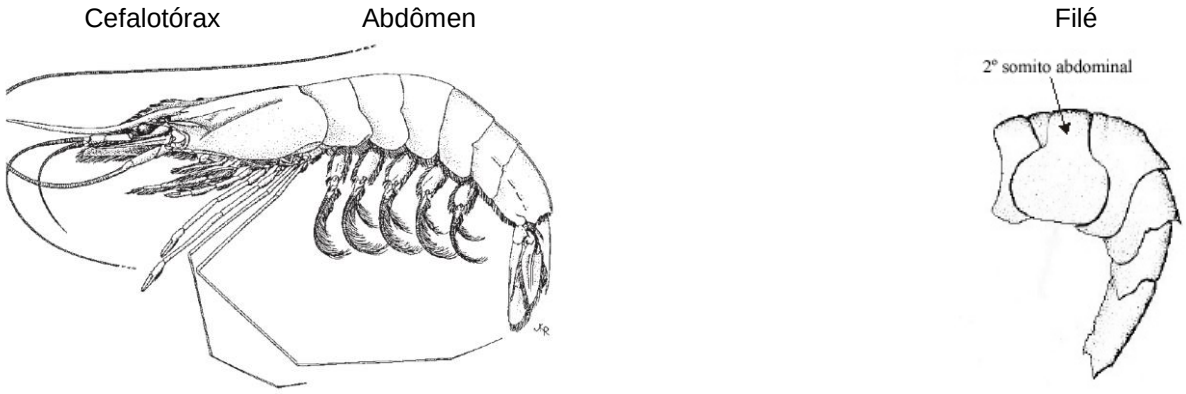


Figura 23. Desenho esquemático de camarão (vista lateral) [PÉREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997].

Figura 24. Tratamento das amostras de camarão.

4.2. Reagentes e Solventes

Os padrões de bromofenóis 2-BF; 4-BF; 2,4-DBF; 2,6-DBF e 2,4,6-TBF utilizados nas análises cromatográficas por CG-EM foram adquiridos da Aldrich com 97-99 % de pureza.

A acetonitrila utilizada no preparo destas soluções padrões foi de grau HPLC da Merck.

O ácido sulfúrico e o tolueno utilizados nos procedimentos de extração foram de grau analítico de procedência da Merck.

A água dezionizada utilizada nos procedimentos de extração foi obtida por destilação e filtração no sistema E-pure da Altech.

4.3. Equipamentos e materiais

Na execução do trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC2010 acoplado a um detector de massas do tipo quadrupolo modelo GCMS-QP2010 (CG-EM), com as seguintes características principais:
  Ionização por impacto de elétrons (IE) com energia de 70 eV;
  Faixa de varredura (*Scan range*): 2 - 1024u;
  Analisador do tipo quadrupolo;

Processador de dados (*software*) Lab Solutions (GCMS Solution e GC Solution);

Banco de dados NIST 147, com aproximadamente 147.000 espectros de massas.

- Centrífuga da Marconi, modelo MA-1810;
- Balança analítica Sartorius, modelo TE214S;
- Banho de ultrassom, marca Arruda modelo SX-10;
- Mutiprocessador de alimentos de uso doméstico, marca Arno;
- Placa de agitação e aquecimento marca IKA, modelo C-MAG HS 7.

4.4. **Soluções de trabalho**

Uma solução estoque de 1000 µg mL^{-1} de cada bromofenol (2-BF; 4-BF; 2,4-DBF; 2,6-DBF e 2,4,6-TBF) em acetonitrila foi preparada e posteriormente armazenada a 4ºC em frasco de vidro âmbar.

Para a construção da curva analítica foram feitas diluições em água da solução estoque no mesmo dia em que a curva foi construída.

4.5. **Coluna cromatográfica**

Foi utilizada uma coluna capilar em sílica fundida para cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), com fase estacionária ligada do tipo 5%-fenil-95%-metil-polisiloxano, DB-5 MS (J & Scientific), 30 m (comprimento) x 0,25 mm (d.i.) x 0,25m (espessura do filme), especificada para análises por espectrometria de massas.

4.6. **Gases especiais**

Foi utilizado o gás especial; hélio ultra-puro (UP), pureza mínima 99,999%, para as análises por cromatrografia gasosa com velocidade linear de 40 $cm.s^{-1}$.

4.7. **Vidraria**

Foi empregada a vidraria de uso comum em laboratório de química analítica, como por exemplo:

- Balão volumétrico de 5, 10, 25 e 100 mL;
- Pipeta volumétrica de 0,5, 1, 2 e 5 mL
- Pipeta graduada de 5 e 10 mL;
- Erlenmeyer de 25 e 50 mL; dentre outros.

As peças de vidro foram lavadas com água e detergente neutro, mantidas em uma solução de Extran Neutro® (Merck), por 30 minutos, sob sonicação, e em seguida, foram seguidamente lavadas com água corrente, água destilada e água ultra-pura (E-pure™ da Altech).

Os balões e pipetas volumétricos foram secos à temperatura ambiente e os demais materiais de vidro foram secos em estufa a 100 °C.

4.8. **Outros materiais**

Foram utilizados também, os seguintes materiais:

- Extran Neutro®, ref. 7553 (Merck);
- Seringa de vidro de 10 mL, para análise por CG, modelo N 80126s, ref. 84852 (Hamilton);
- Frasco de amostra âmbar (*vial*), de 10,0 mL, com tampa sólida de rosca e septo de teflon (PTFE), ref. 27150U (Supelco);
- Suportes, garras etc.

4.9. **Condições cromatográficas e espectrométricas**

As análises por CG-EM foram realizadas em um sistema de CG-EM da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 (Figura 25), equipado com injetor split/splitless, operando no modo splitless. Para separação dos analitos foi empregada uma coluna DB-5 J & Scientific (30 mx 0,25 mm ID x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 40 cm s^{-1}.

Figura 25. Cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 utilizado nas análises.

Os analitos foram inicialmente submetidos à análise por CG-EM utilizando uma programação desenvolvida pelo grupo de pesquisa para a separação dos bromofenóis 2-BF; 4-BF; 2,4-DBF; 2,6-DBF e 2,4,6-TBF [SANTOS SOBRINHO, J. P. DOS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2012].

A identificação dos analitos foi realizada por comparação dos tempos de retenção observados após a injeção da solução padrão de cada bromofenol na nova programação desenvolvida, bem como por comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas relatados na biblioteca eletrônica *NIST*.

4.10. Validação do método

4.10.1. Curvas analíticas

A linearidade está relacionada diretamente com o sistema analítico e, teoricamente é o que determina a região da curva resposta ou de quantificação onde há relação direta entre sinal e concentração. É definida como a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração do composto em questão, dentro de uma faixa analítica especificada (Intervalo Dinâmico ou Faixa Linear Dinâmica). Na prática, a linearidade é avaliada através da construção de curvas analíticas e posterior tratamento estatístico. A variável independente (eixo x) são as várias concentrações do padrão analítico da substância em estudo, e a variável dependente (eixo y), corresponde ao sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. A equação da reta tem a forma: $y = ax + b$, onde a e b são os coeficientes angular (inclinação do gráfico em relação aos eixos) e linear (interseção do gráfico com os eixos) respectivamente; a correlação é calculada geralmente pelo coeficiente de determinação r^2 [RIBANI *et al.*, 2004].

Nesse trabalho, a quantificação dos analitos foi feita pelo método da padronização externa. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, construídas pelo registro da área do pico versus a concentração do analito.

4.10.2. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

Limites de detecção e quantificação conduzem a informações sobre a sensibilidade do método. O LD representa a quantidade mínima ou concentração que pode ser detectada por um dado procedimento analítico, enquanto o LQ representa a quantidade mínima ou concentração que pode ser quantificada por um dado procedimento analítico. A faixa linear dinâmica é a região entre o LQ e o limite superior da curva analítica, ou seja, a faixa real de trabalho [MILLER, 1989].

Para técnicas analíticas em geral, o método mais utilizado para o cálculo desses limites é o da relação sinal-ruído. Entretanto, para as técnicas de separação

como é o caso da cromatografia, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas, pelo tipo e tempo de uso da coluna. A forma mais adequada de calcular o LD e LQ é a utilização do método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais correto. Assim os limites de detecção e quantificação são calculados a partir do quociente entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular das curvas analíticas e este multiplicado por 3 e 10 respectivamente, de acordo com o critério de Miller,1989 ou seja:

LD = 3s/a e LQ = 10s/a

onde **s** é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica, e **a** é o coeficiente angular (inclinação) da mesma.

4.10.3. Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra [LANÇAS, 2004].

A precisão pode ser determinada em condições de repetibilidade e reprodutibilidade. Na repetibilidade os resultados independentes são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo. Na reprodutibilidade, os resultados são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, em diferentes laboratórios, por diferentes operadores e usando diferentes equipamentos [LANÇAS, 2004].

Em validação de métodos, o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (Equação 1) [RIBANI *et al*., 2004].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (1)$$

x é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (Equação 2).

$$\text{RSD (\%) ou CV (\%)} = \frac{s}{\overline{x}} \times 100 \quad (2)$$

4.10.4. Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência [LANÇAS, 2004].

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão [RIBANI *et al*., 2004].

Os materiais de referência certificados são amostras cuja concentração do analito de interesse é conhecida [LANÇAS, 2004]. Os materiais de referência certificados (MRC) são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como *NIST* (“National Institute of Standards and Technology” - USA), *LGC* (“Laboratory of the Government Chemist” - UK), USP, *FAPAS* (“Food Analysis Performance Assessment Scheme” - UK) etc. [RIBANI *et al*., 2004]. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso [BRITO *et al*., 2003].

O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra em concentrações possíveis de serem detectadas e quantificadas, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a equação 3:

$$\text{Re}\, c\% = \frac{\lfloor valor\ \ obtido - valor\ \ real \rfloor}{valor\ \ real} \times 100 \qquad (3)$$

A comparação dos métodos consiste na confrontação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de uma técnica baseada em um princípio diferente [LANÇAS, 2004].

A técnica de adição de analito é método usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. Na técnica de adição de analito, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância. Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz. A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada [BRITO *et al.*, 2003].

4.11. Extração dos bromofenóis

A extração dos bromofenóis foi feita por sonicação, seguida pela pré-concentração através de uma técnica desenvolvida, que utiliza microextração com gota única (*SDME*).

As diferentes propriedades físicas dessas substâncias, tais como pressão de vapor, solubilidade em água e constante de ionização (Tabela 2) podem explicar as dificuldades de extração. O emprego de condições ácidas inibe o processo de ionização dos bromofenóis livres, aumentando a eficiência da extração.

Tabela 2. Constantes físicas dos bromofenóis simples

Bromofenol	Estado físico	MM	pK_a	Pv (mmHg)	Solubilidade em água (g mL^{-1})
2-BF	Líquido	172	8,45	0,0373	$0,223^{25ºC}$
4-BF	Sólido	172	9,17	0,0117	$1,4^{25ºC}$
2,4-DBF	Sólido	252	7,79	0,00134	$0,19^{25ºC}$
2,6-DBF	Sólido	252	6,67	0,00134	$0,0119^{25ºC}$
2,4,6-TBF	Sólido	330	6,80	0,000303	$0,007^{15ºC}$

4.11.1. Preparação da amostra

Aproximadamente 3 g de abdômen de camarão foram colocadas em um tubo de centrífuga. Acrescentou-se 5 mL de água destilada e ácido sulfúrico até pH 1, pois os bromofenóis permanecem na forma molecular, facilitando a extração. O tubo foi fechado e seu conteúdo foi homogeneizado mecanicamente e posteriormente sonicado por 30 minutos. Em seguida centrifugou-se por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e os bromofenóis foram extraídos com uma gota de 1µL de tolueno (Figura 28).

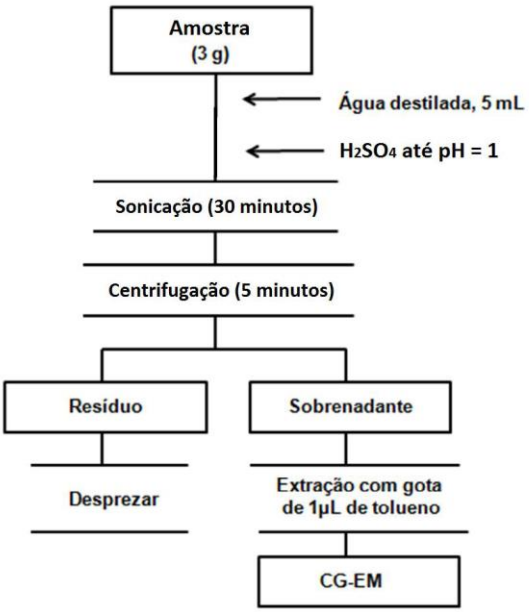


Figura 26. Fluxograma do método de extração dos bromofenóis em abdômen de camarão por *SDME*.

4.11.1.1. Metodologia de extração

A extração foi realizada por uma gota (1µl), de solvente orgânico (tolueno), imersa e suspensa, na solução da amostra, por uma seringa de CG (figuras 26 e 27). O sistema é mantido sob agitação durante todo o procedimento de extração.

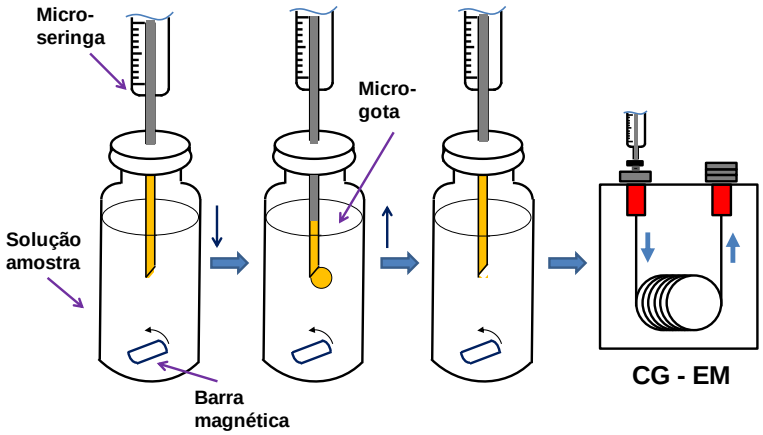


Figura 27. Procedimento esquemático de extração por *SDME* e determinação por CG-EM.

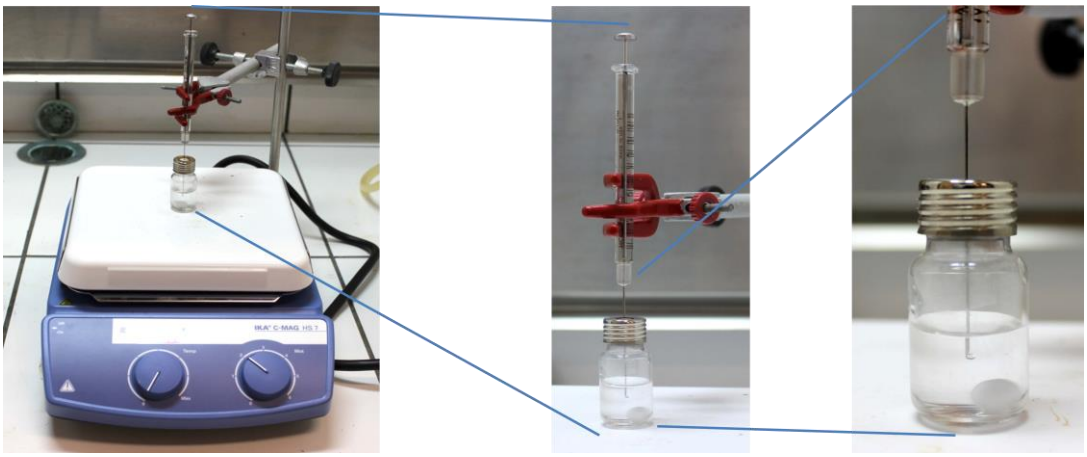


Figura 28. Procedimento de extração por *SDME*, utilizado no trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do procedimento *SDME*

As melhores condições para extração dos bromofenóis, em peixes, com *SDME* foram conseguidas através de um planejamento fatorial Box-Behnken, realizado pelo grupo de pesquisa (LPQ/SOMAR). Foram estudados três fatores: tempo de extração, tipo de solvente e velocidade de agitação. As melhores condições para extração por *SDME* foram: tempo de extração máximo (10 minutos), velocidade de agitação baixa (240 rpm) e tolueno como solvente extrator [DISSERTAÇÃO, SANTOS SOBRINHO, JOELMA PEREIRA DOS, 2012].

5.2. Condições cromatográficas e espectrométricas

A análise por CG-EM, no modo *SCAN* (cromatograma de íons totais), foi realizada com varredura de massas de 100 a 400 u.m.a., por meio da injeção de 1,0 μL de uma solução padrão de 5,0 μg mL^{-1} em ACN. A identificação dos constituintes químicos foi realizada com base na comparação entre os espectros de massas dos bromofenóis contidos na solução padrão com o banco de dados de espectros de massas (*NIST* 147), disponível no sistema CG-EM utilizado.

Depois de estabelecidos os parâmetros para uma boa separação cromatográfica, com a otimização do método no modo *SCAN*, a etapa seguinte foi a identificação de cada um dos 5 bromofenóis e o registro de seus respectivos espectros de massas, servindo de base para construção do método no modo *SIM*.

O cromatograma de íons totais (CG-EM modo *SCAN*) obtido pela injeção de 1 µL de solução padrão de 5,0 µg mL^{-1}, em ACN, é mostrado na Figura 30.

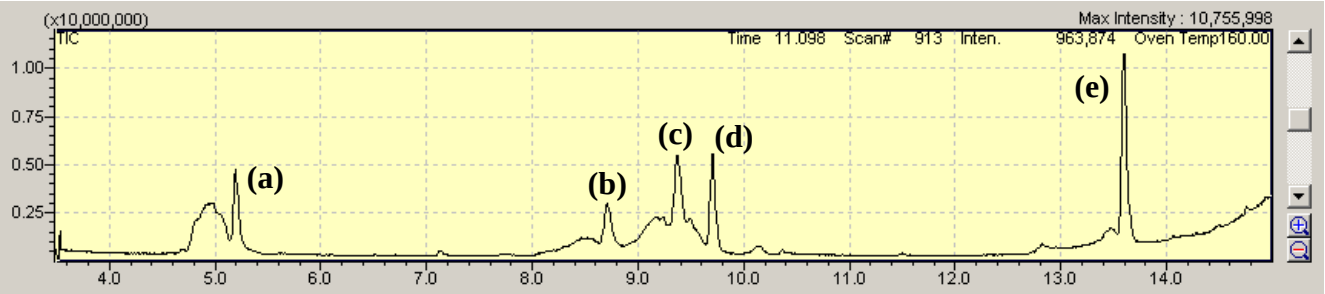
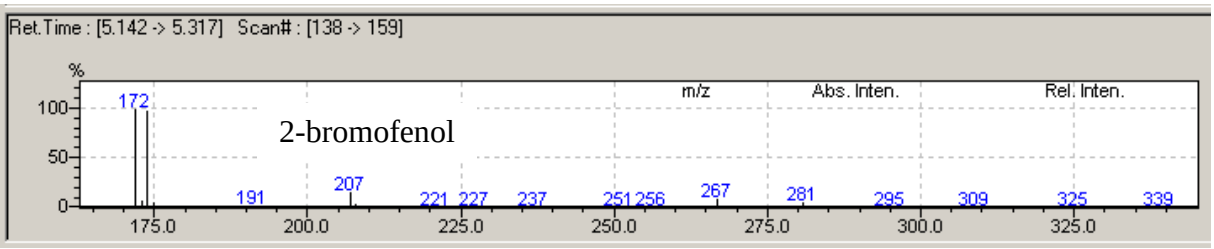
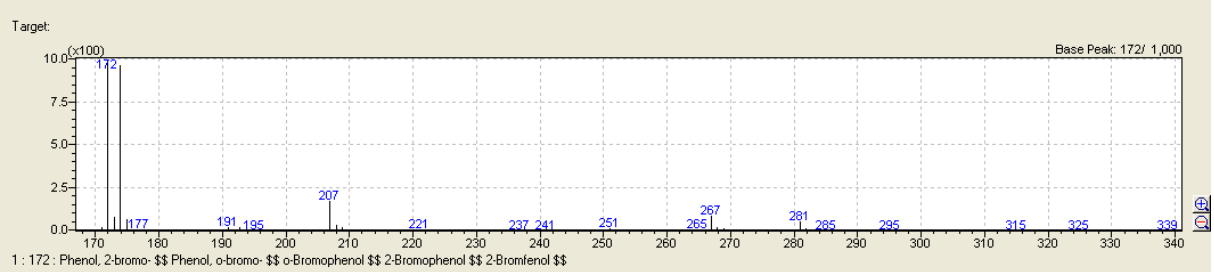


Figura 29. Cromatograma de íons totais dos 5 bromofenóis obtido no CG-EM com padrão modo SCAN:(a) 2-BF; (b) 4-BF; (c) 2,4-DBF; (d) 2,6-DBF; (e) 2,4,6-TBF. Coluna DB-5 J & Scientific (30 mx 0,25 mm ID x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 40 $cm.s^{-1}$.

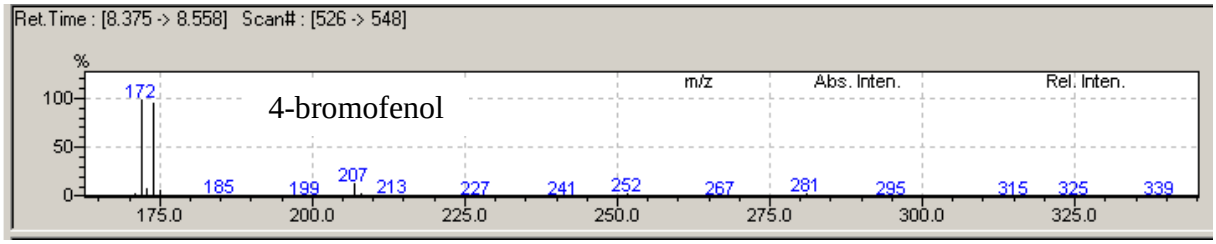
Os espectros de massas obtidos para cada um dos 5 bromofenóis presentes na solução padrão podem ser observados na Figura 30, a seguir.



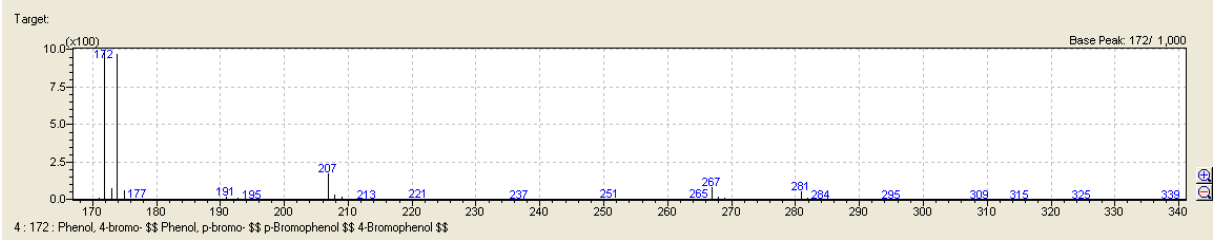
Espectro de massas do 2-bromofenol obtido no Shimadzu GCMS-QP2010.



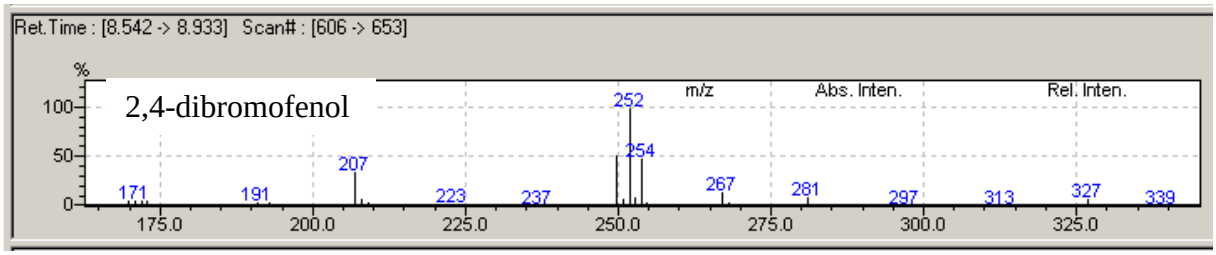
Espectro de massas do 2-bromofenol obtido da *NIST*.



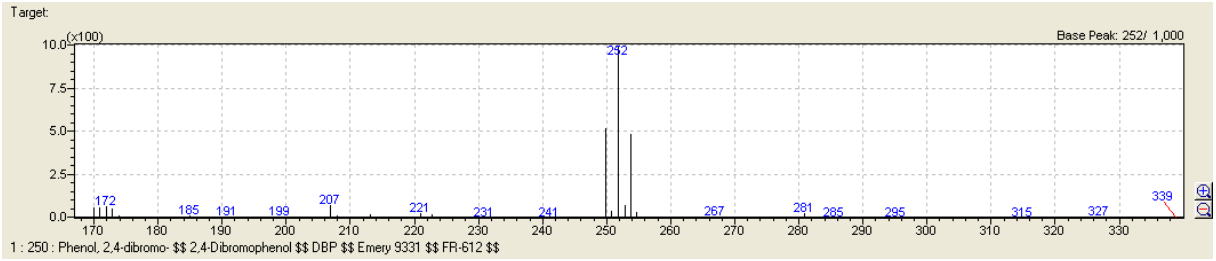
Espectro de massas do 4-bromofenol obtido no Shimadzu GCMS-QP2010.



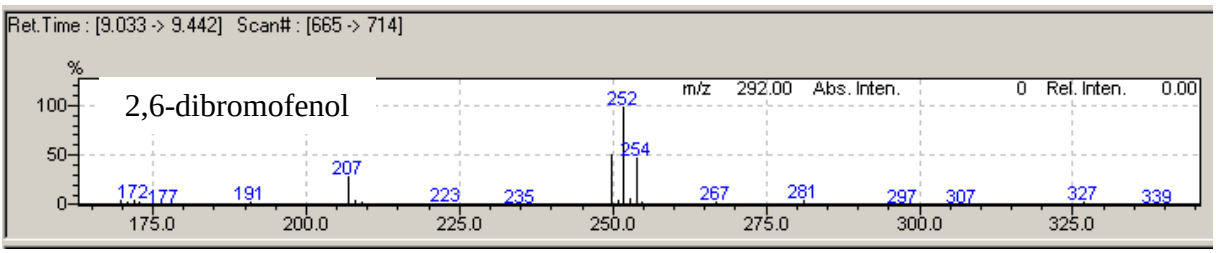
Espectro de massas do 4-bromofenol obtido da *NIST*.



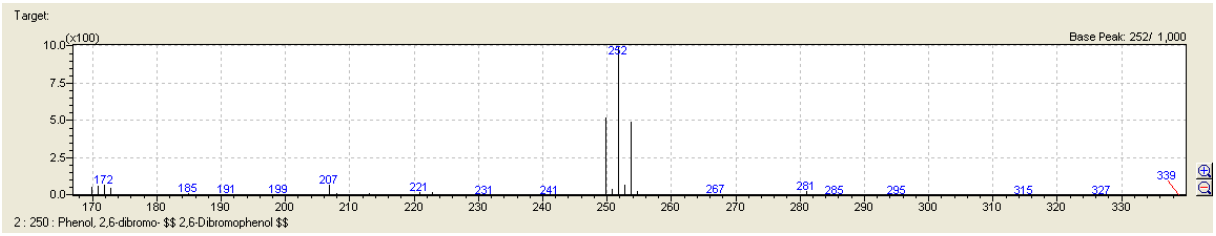
Espectro de massas do 2,4-dibromofenol obtido no Shimadzu GCMS-QP2010.



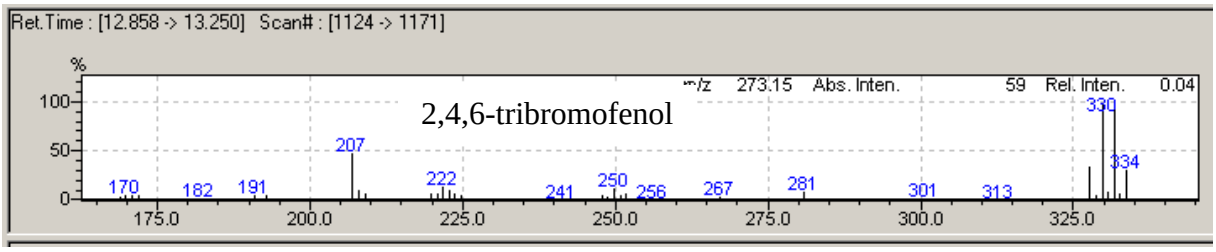
Espectro de massas do 2,4-dibromofenol obtido da *NIST*.



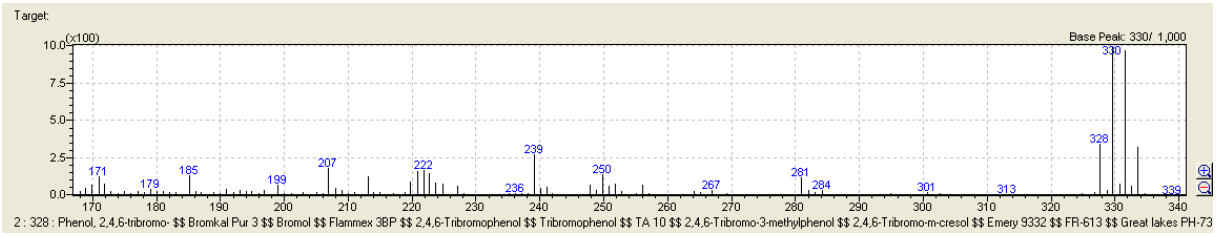
Espectro de massas do 2,6-dibromofenol obtido no Shimadzu GCMS-QP2010.



Espectro de massas do 2,6-dibromofenol obtido da *NIST*.



Espectro de massas do 2,4,6-tribromofenol obtido no Shimadzu GCMS-QP2010.



Espectro de massas do 2,4,6-tribromofenol obtido da *NIST*.

Figura 30. Espectros de massas de bromofenóis (1 a 5) obtidos do cromatograma de íons totais (CG-EM/*SCAN*) comparado com aqueles obtidos da biblioteca *NIST*.

Com base na intensidade relativa dos picos observados nos espectros de massas obtidos, foram selecionados os íons de quantificação e de confirmação de cada analito para serem monitorados no modo *SIM* (*Selected Íon Monitoring*). A Figura 31 mostra o cromatograma obtido no modo *SIM* de uma mistura de padrões dos 5 bromofenóis (2-BF; 4-BF; 2,4-DBF; 2,6-DBF; 2,4,6-TBF). Foram monitorados dois íons para cada substância: o íon que forneceu maior área foi utilizado para a quantificação e o outro íon foi utilizado como qualificador (Tabelas 3 e 4).

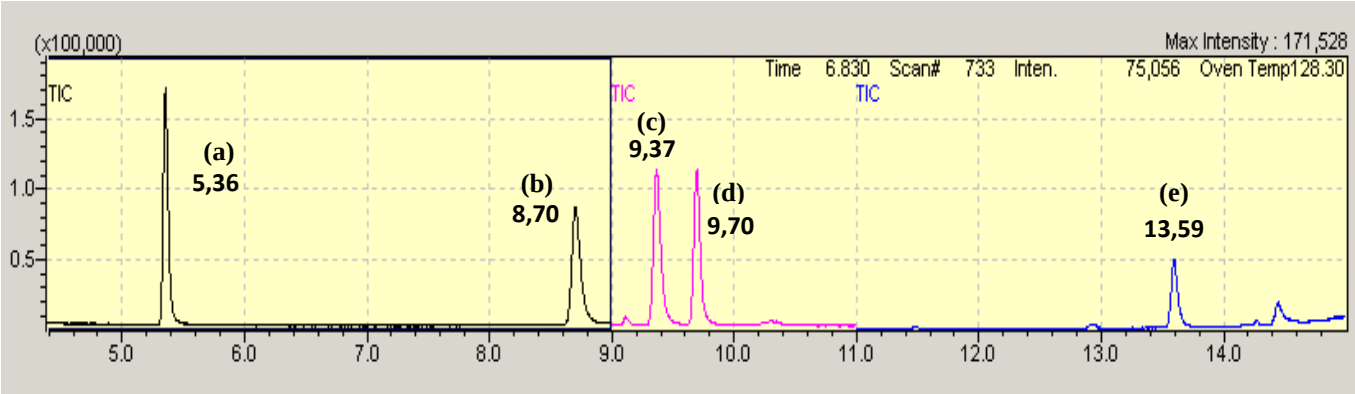


Figura 31. Cromatograma de íons totais dos 5 bromofenóis obtido no GC-MS com padrão modo SIM:(a) 2-BF; (b) 4-BF; (c) 2,4-DBF; (d) 2,6-DBF; (e) 2,4,6-TBF. Coluna DB5 J & Scientific (30 mx 0,25 mm ID x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 40 $cm.s^{-1}$.

A determinação de bromofenóis por CG geralmente utiliza uma programação de temperatura do forno que permite um tempo de análise de aproximadamente 30 minutos (Figura 32), volume de injeção de 1,0 µL, bem como temperatura do injetor e linha de transferência de 260^0C, com o detector operando no modo impacto de elétron (70 e^-v) e a temperatura da fonte de íons em 250^oC.

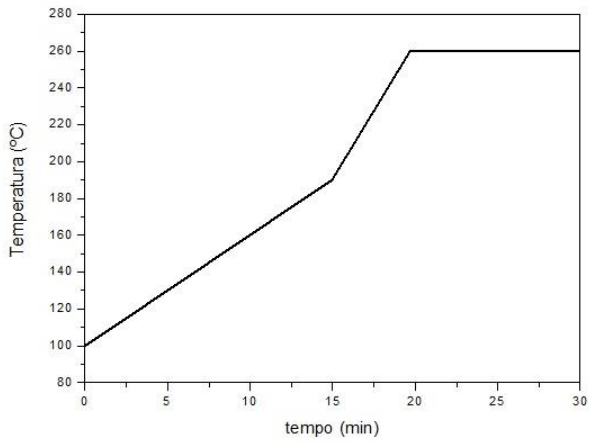


Figura 32. Programação do CG utilizada na literatura para a análise dos bromofenóis.

Apesar da boa resolução dos picos, foi feita uma otimização do método cromatográfico com o objetivo de diminuir o tempo de análise. A nova programação desenvolvida: 60 °C → 160 °C (10 °C/min) → 250 °C (30 °C/min) → 250 °C (2 min) (Figura 32) apresenta tempo de análise de aproximadamente 15 minutos e resultou em boa resolução dos cinco picos referente aos cinco analitos estudados (Tabela 4).

As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram respectivamente de 270^{0}C e 260^{0}C. O detector foi operado no modo impacto de elétron (70 e$^-$v) com a temperatura da fonte de íons de 250^{o}C.

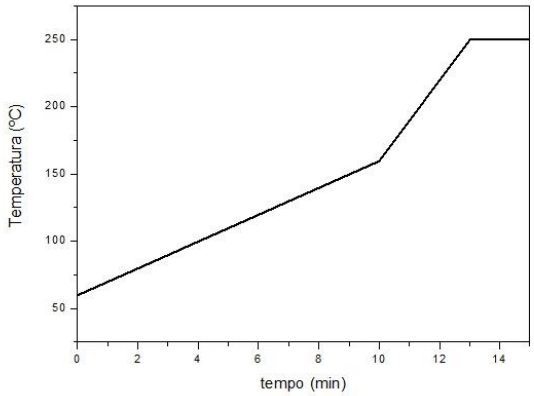


Figura 33. Nova programação do CG desenvolvida para a análise dos bromofenóis.

A Tabela 3 mostra os tempos de retenção obtidos na literatura enquanto que a Tabela 4 com a programação desenvolvida, os íons de quantificação utilizados na construção da curva analítica e íons qualificadores empregados.

Tabela 3. Tempos de retenção (t_R), íons quantificadores e íons qualificadores dos analitos com a programação do CG-EM encontrada na Literatura

Analitos	t_R (min.)	Íon quantificador	Íons qualificadores
2-BF	8,36	172	174
4-BF	13,28	172	174
2,4-DBF	15,09	252	250+254
2,6-DBF	15,82	252	250+254
2,4,6-TBF	20,76	330	330

Tabela 4. Tempos de retenção (t_R), íons quantificadores e íons qualificadores dos analitos com a nova programação do CG-EM

Analitos	t_R (min.)	Íon quantificador	Íons qualificadores
2-BF	5,36	172	174
4-BF	8,70	172	174
2,4-DBF	9,37	252	250+254
2,6-DBF	9,70	252	250+254
2,4,6-TBF	13,59	330	330

5.3. Validação do método

5.3.1. Curvas analíticas

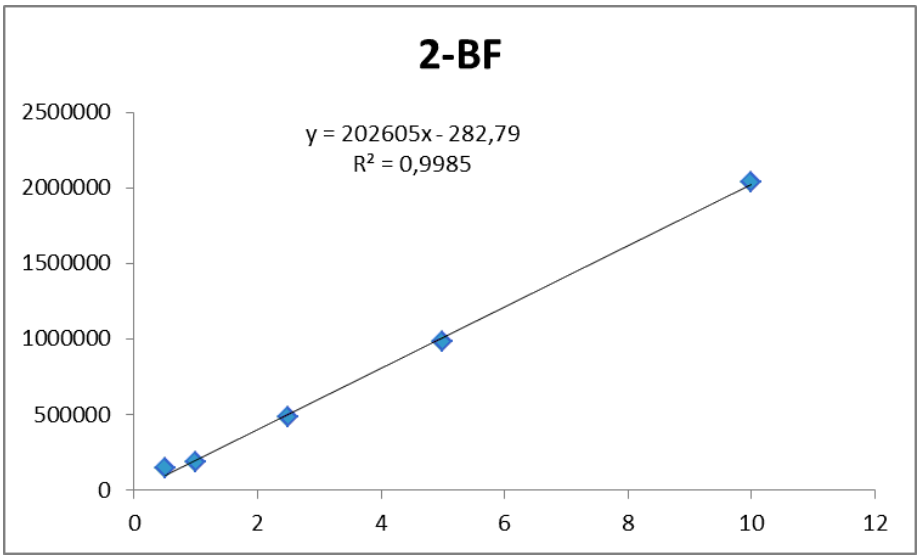
A quantificação dos bromofenóis foi feita por padronização externa. As curvas analíticas dos padrões dos bromofenóis foram obtidas por regressão linear, para concentrações 0,5 a 10,0 *n*g ml^{-1}. As faixas lineares obtidas foram determinadas pelos coeficientes de determinação das curvas geradas a partir de 5 a 6 níveis de concentração. Os coeficientes de determinação encontrados para todas as curvas analíticas foram maiores que 0,9986, confirmando a linearidade do método cromatográfico (Tabela 5).

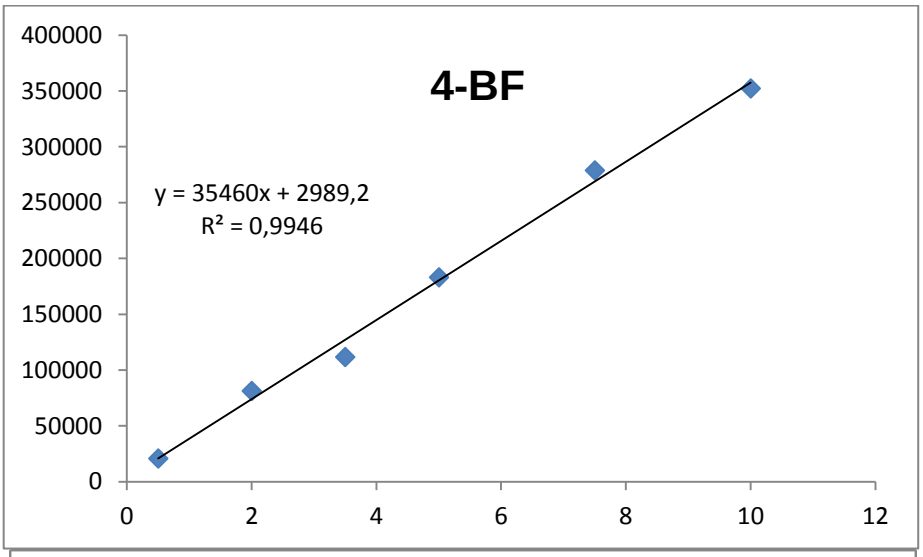
Tabela 5. Curvas analíticas, limites de detecção e quantificação dos bromofenóis.

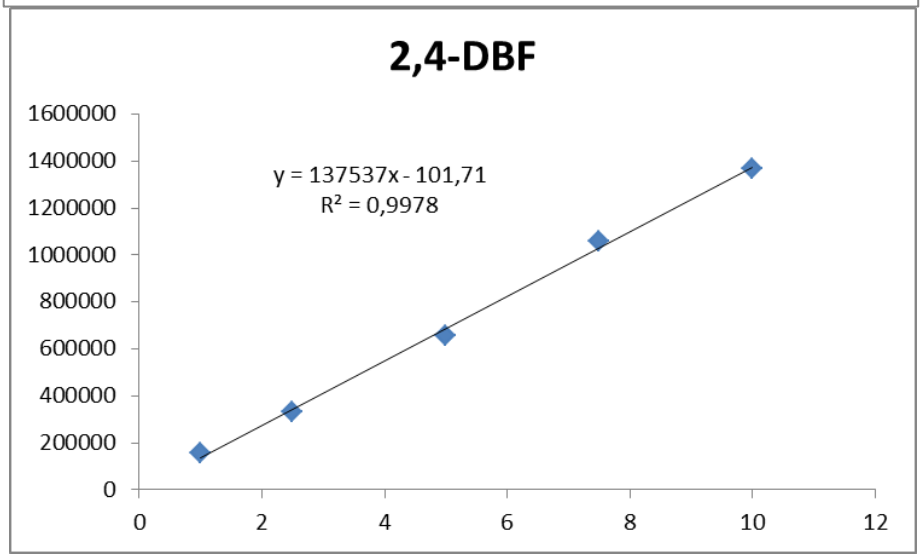
Bromofenol	Curva analítica	R^2	LD (*n*g mL^{-1})	LQ (*n*g mL^{-1})	Faixa linear (*n*g mL^{-1})
2-BF	y = 202605x - 282,79	0,9985	0,341	0,500	0,500-10,000
4-BF	y = 35460x + 2989,2	0,9946	0,300	0,500	0,500-10,000
2,4-DBF	y = 137537x - 101,71	0,9978	0,499	1,000	1,000-10,000
2,6-DBF	y = 230151x + 581,51	0,9985	0,329	1,000	1,000-10,000
2,4,6-TBF	y = 31655x + 7292,5	0,9945	0,200	0,500	0,500-10,000

Y= altura do pico
X= concentração (ng mL^{-1})
r^2= coeficiente de determinação

Graficamente, as curvas analíticas estão representadas na Figura 34, a seguir:







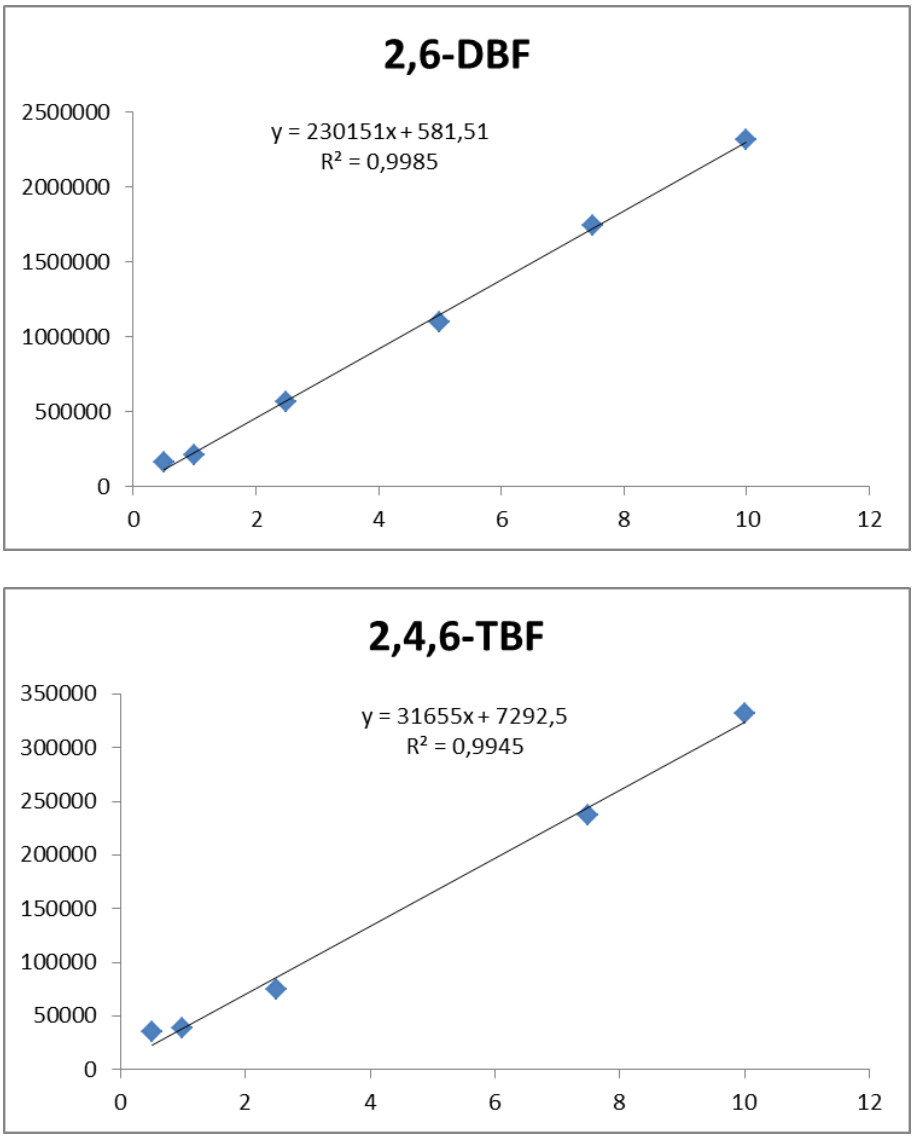


Figura 34. Curvas analíticas do 2-BF (a); 4-BF (b); 2,4-DBF(c); 2,6-DBF (d) e 2,4,6-TBF (e).

5.3.2. Precisão

A precisão foi estudada em solução padrão contendo os cinco bromofenóis, pela repetibilidade das áreas dos picos. A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (*RDS*) de cinco extrações seguidas feitas no mesmo dia, para uma concentração de 5,0 *n*g mL^{-1}, que equivale à concentração média da faixa de calibração. A Tabela 6 apresenta os valores de *RSD* encontrados para as áreas dos bromofenóis.

Tabela 6. Desvios padrão relativos dos bromofenóis.

Bromofenol	**Desvio padrão relativos (*RSD*) (%)**
2-BF	10,8
4-BF	18,9
2,4-DBF	2,27
2,6-DBF	11,3
2,4,6-TBF	11,6

Os valores de desvios padrão relativos para os dois métodos estão abaixo de 20%, sendo aceitáveis para análise de traços [RIBANI *et al*., 2004].

5.3.3. Exatidão

As recuperações foram avaliadas em três níveis de fortificação (1,0; 5,0 e 10 μg kg^{-1}), onde o menor nível de fortificação (1,0 μg kg^{-1}) corresponde aos LQs do 2,4-dibromofenol e do 2,6-dibromofenol. Neste nível, as recuperações apresentaram variação de 51,8% a 103% com desvio-padrão relativo variando entre 3,61% e 17,4%. No nível intermediário (5,0 μg kg^{-1}) as recuperações apresentaram variação de 50,8% a 81,2% com desvio-padrão relativo variando entre 4,63% e 18,9%. No maior nível (10 μg kg^{-1}) as recuperações variaram entre 65,5 % e 98,0% com desvio-padrão relativo variando entre 3,00% e 18,7%. A Tabela 7 mostra os resultados das recuperações relativas obtidas em diferentes concentrações para comprovação da não influência do efeito de matriz.

Tabela 7. Recuperações dos bromofenóis pelo método desenvolvido.

Bromofenol	Recuperação (%)					
	Nível de fortificação (*n*g mL^{-1}) (n=3)					
	1,0	**CV (%)**	**5,0**	**CV (%)**	**10**	**CV (%)**
2-BF	51,8	3,86	50,8	4,63	98,0	10,5
4-BF	63,6	3,61	81,2	4,91	65,5	16,5
2,4-DBF	73,4	6,88	76,8	5,33	76,6	3,00
2,6-DBF	93,5	6,65	71,0	18,7	84,8	10,8
2,4,6-TBF	103	17,4	68,6	18,9	80,6	18,7

5.4. Aplicação do método

Para testar a aplicabilidade do método proposto na análise de amostras reais, o método desenvolvido foi utilizado para determinar a concentração de bromofenóis em camarões de duas fontes distintas: i) cativeiro (carcinicultura), oriundos da Fazenda Oruabo, da Bahia Pesca, distrito de Acupe, Santo Amaro, Bahia; e ii) capturado, oriundos de Valença, Bahia. Estes últimos foram coletados em diferentes estações do ano (sazonal): primavera de 2011, verão de 2012, outono de 2012 e inverno de 2012. As amostras foram analisadas em triplicata. As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos. Na Figura 35, está ilustrado um cromatograma, de uma amostra (abdômen), obtido nas condições otimizadas, o que possibilitou uma excelente separação de todos os cinco bromofenóis em um tempo de análise de 15 minutos.

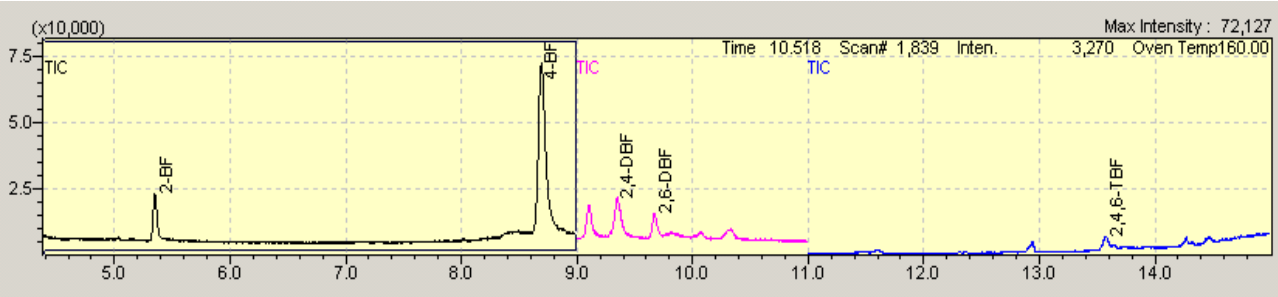


Figura 35. Cromatograma de uma amostra (abdômen) de camarão obtido no CG-EM modo SIM. Coluna DB5 J & Scientific (30 mx 0,25 mm ID x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 40 cm s^{-1}.

Tabela 8. Concentrações de bromofenóis (*n*g g^{-1}) em camarões capturados (*Xiphopenaeus kroyeri*) no litoral da Bahia obtidas por SDME e CG-EM.

Camarão/analito	2-BF	4-BF	2,4-DBF	2,6-DBF	2,4,6-TBF	Total
Primavera/2011	0,301 (10,5)	0,790 (15,1)	3,97 (2,25)	0,0400 (11,5)	3,56 (11,8)	8,66
Verão/2012	0,0430 (9,83)	0,878 (16,3)	1,16 (5,57)	0,0880 (11,1)	0,0700 (10,6)	2,24
Outono/2012	0,275 (1,52)	1,59 (4,37)	0,427 (3,52)	0,166 (1,18)	0,387 (3,66)	2,85
Inverno/2012	4,38 (4,85)	0,612 (1,12)	1,86 (3,57)	0,872 (9,82)	0,740 (11,5)	8,46

Para efeito de comparação, as concentrações dos cinco bromofenóis em ração, camarão de cativeiro e camarão pescado são mostradas em gráficos nas Figuras 36, 37 e 38.

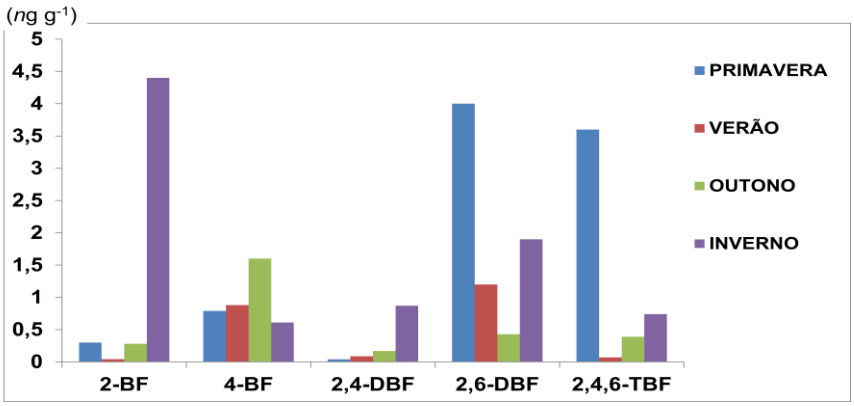


Figura 36. Concentração dos analitos 2-BF, 4-BF, 2,4-DBF, 2,6-DBF e 2,4,6-TBF em camarão capturado em diferentes estações do ano (sazonal): primavera, verão, outono e inverno.

Tabela 9. Concentrações de bromofenóis (*n*g g^{-1}) em camarões de cativeiro (*Lithopenaeus vannamei*) e sua ração obtidas por SDME e CG-EM.

Camarão/analito	2-BF	4-BF	2,4-DBF	2,6-DBF	2,4,6-TBF	Total
Ração/2011	0,188 (10,5)	2,09 (8,92)	0,535 (7,63)	0,221 (2,24)	0,359 (4,88)	3,39
Cativeiro/2011	0,0470 (3,48)	1,24 (1,35)	0,368 (11,4)	0,130 (6,18)	1,15 (16,5)	2,94

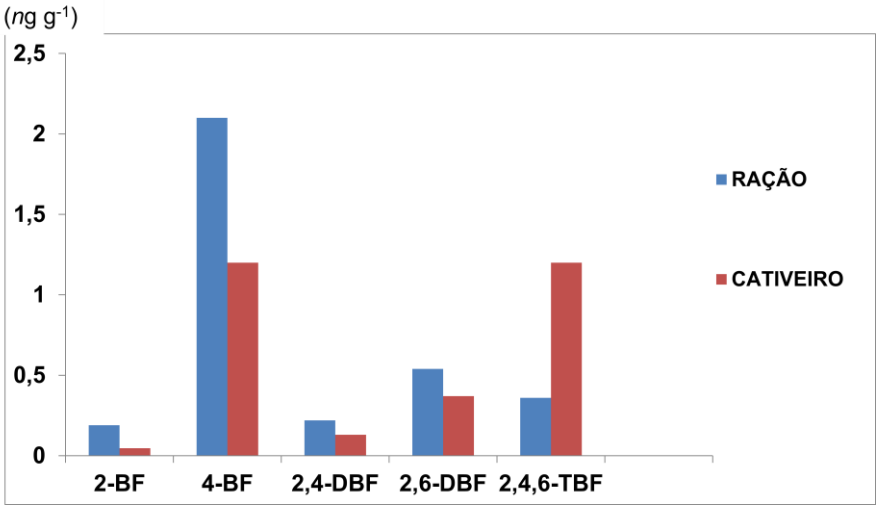


Figura 37. Concentração dos analitos 2-BF, 4-BF, 2,4-DBF, 2,6-DBF e 2,4,6-TBF em ração e camarão de cativeiro.

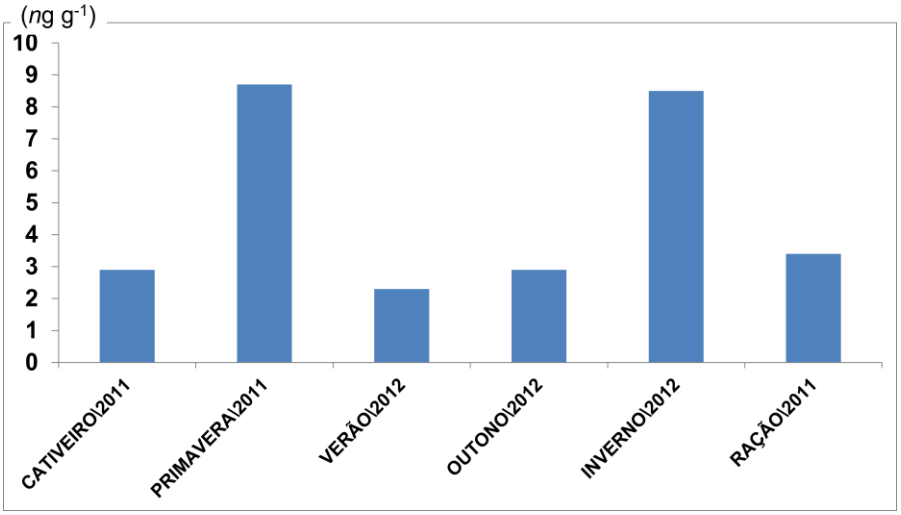


Figura 38. Concentração dos analitos totais em ração, camarão de cativeiro e camarão capturado em diferentes estações do ano: primavera, verão, outono e inverno.

Devido ao metabolismo dos camarões de mar aberto (pescados), pode-se perceber que estes organismos tiveram os seus cincos bromofenóis simples em quantidades variadas a depender da estação do ano em que o mesmo foi pescado. Alguns fatores sazonais como temperatura da água, diferença na salinidade e quantidade de alimento disponível podem ter interferido tanto na ingestão (dieta) de organismos produtores primários quanto na excreção desses analitos, favorecendo a bioacumulação.

Os camarões cultivados, por sua vez, adquirem os bromofenóis simples através da ração. Sendo assim, faz-se uma comparação entre as quantidades dos 5 analitos existentes em ambas as matrizes para saber em qual destas cada um é mais concentrado. Após esta constatação, o analito que se encontrar em menor concentração no abdômen do camarão em relação a ração, conclui-se que a bioacumulação deste é baixa enquanto que o analito mais concentrado no abdômen em relação a ração, pode-se afirmar que a bioacumulação deste é elevada.

As estações do ano com maior concentração de bromofenóis totais foram inverno e primavera, enquanto que o verão e o outono possuíram as menores concentrações dos analitos totais. Verifica-se que as concentrações maiores do 2-BF e 2,6-DBF se apresentaram no inverno enquanto que o 2,4-DBF e 2,4,6-TBF na primavera e o 4-BF no outono. Com exceção do 4-BF e do 2,4,6-TBF, os camarões de cativeiro tiveram as concentrações dos bromofenóis muito baixas fruto das suas dietas alimentares que, como se pode verificar na ração, estas substâncias se encontram em pequenas concentrações, caracterizando um *flavor* iodofórmico e fraco “*flavor*” fenólico, sendo que o 2,4,6-TBF possui maior bioacumulação nesses organismos, já que este analito se encontra em maior quantidade. Este fato pode causar uma não preferência dos consumidores por esses camarões, já que os mesmos são atraídos pelo seu cheiro. Sendo assim, uma incorporação na dieta alimentar desses organismos marinhos se faz necessária para uma melhor aprovação do camarão de cativeiro proveniente do projeto Bahia Pesca. Esses dados podem ser visualizados na Figura 36.

6. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida, além de apresentar baixos limites de detecção e quantificação, sensibilidade elevada, envolve menor tempo de análise, menor consumo de energia e solventes, quando comparada a outras técnicas, sendo assim compatível com os princípios da Química Verde.

Os resultados mostram que o método desenvolvido por microextração com gota única (SDME) e análise por GC-MS pode ser aplicado em análises qualitativas e quantitativas dos bromofenóis em abdômen de camarão.

No abdômen do camarão de cativeiro e na ração deste crustáceo a maior concentração foi do 4-BF. A menor concentração na ração, no abdômen do camarão cultivado e na estação verão corresponde ao 2-BF, na primavera e no outono ao 2,6-DBF e no inverno ao 4-BF.

O analito que possui maior bioacumulação no abdômen dos camarões de cativeiro é o 2,4,6-TBF, devido a sua maior concentração em relação a sua alimentação (ração) que se apresenta em menor quantidade.

Tanto na primavera quanto no verão a maior concentração detectada foi do 2,4-DBF, enquanto que no outono e inverno foram respectivamente o 4-BF e o 2-BF.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTUROS

Analisar e comparar as concentrações de bromofenóis em outras espécies de camarão de mar aberto do litoral da Bahia, por exemplo, o camarão branco (*Lithopenaeus schimitti*).

Verificar a relação entre a profundidade em que os organismos marinhos se encontram e a dieta (concentração de bromofenóis).

Determinar a concentração dos bromofenóis simples no cefalotórax do camarão e comparar com o abdômen.

Adaptar metodologia desenvolvida para extração dos bromofenóis em abdômen e cefalotórax de camarões por microextração com gota única (*SDME*) para separação e quantificação através de Cromatografia líquida ultra rápida (*UFLC*).

Comparar a técnica de *SDME* com outras técnicas de extração emergentes como por exemplo a microextração em fase líquida com base em solidificação da gota orgânica flutuante (*LPME*).

8. REFERÊNCIAS

ABADI M. D. M., ASHRAF N., CHAMSAZ M., SHEMIRANI F.; An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v.99, p. 1, 2012.

ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão, http://www.abccam.com.br/estatisticas, acessado em fevereiro de 2013.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas; Análise Sensorial dos Alimentos e Bebidas, NBR 12806, Rio de Janeiro, 1993.

AMVRAZI, E. G.; TSIROPOULOS, N. G. Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry, **J. Chromatogr. A**, v.1216, p.7630, 2009.

ALMEIDA, N. M.; FRANCO, M. R. B. Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.7, 2006.

ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C.R., *et al.* **Aqüicultura: experiências brasileira**. Florianópolis: Multitarefa, p.199, 2004.

ASENSIO-RAMOS M., RAVELO-PÉREZ L. M., GONZÁLEZ-CURBELO M. A., HERNÁNDEZ-BORGES J.; Liquid phase microextraction applications in food analysis. **J. Chromatogr. A**, v.1218, p.7415, 2011.

BAHIA PESCA. Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina. Estado da Bahia: [s.n.], 2005.

BARBIERI JR., R.C.; OSTRENSKY NETO, A. Camarões marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura. Viçosa: Aprenda fácil, v. 1, 2001.

BOYLE, J. L.; LINDSAY, R. C.; STUIBER, D. A. Occurrence and properties of flavor-related bromophenols found in the marine environment: A review. **J. Aquatic Food Product Technol.**, v.2, n.2, p.75, 1993.

BOYLE, J. L.; LINDSAY, R. C.; STUIBER, D. A. Contributions of bromophenols to marine-associated flavors of fish and seafood. **J. Aquatic Food Product Technol.**, v.1, p.43, 1992b.

BOYLE, J. L.; LINDSAY, R. C.; Stuiber, D. A. Bromophenol distribution in salmon and selected seafoods of fresh- and saltwater origin. **J. Food Sci.**, v.57, p.918, 1992a.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. Pesticidas: R. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba**, v.13, p.129, 2003.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora Unicamp: Campinas, 2007.

BULDINI P. L.; RICCI L.; SHARMA J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, **J. Chromatogr. A,** v.975, p.47, 2002.

CHAICHI, M.; MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M. Optimization and application of headspace liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for determination of furanic compounds in coffee using response surface methodology, **Microchem. J.**, v.108, p.46, 2013.

CHUNG, H. Y.; MA, W. C. J.; ANG, JR., P. O. A.; KIM, J-S.; CHEN, F. Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens, Sargassum siliquastrium,* and *Lobophora variegata)* collected in Hong Kong. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.2619, 2003.

CHUNG, H. Y.; MA, W. C. J.; KIM, J-S. Seasonal distribution of bromophenols selected Hong Kong seafood. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.6752, 2003.

CORTADA, C.; VIDAL, L.; TEJADA, S.; ROMO, A.; CANALS, A. Determination of organochlorine pesticides in complex matrices by single-drop microextraction coupled to gás chromatography-mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v.638, p.29, 2009.

COULTATE, T. P. Alimentos: a química de seus componentes. 3 ed. São Paulo: Artmed Editora, 2004.

CHRISTENSEN, J. H.; MORTENSEN, J.; HANSEN, A. B.; ANDERSEN, O. Chromatographic preprocessing of GC–MS data for analysis of complex chemical mixtures. **J. Chromatogr. A**, v.1062, p.113, 2005.

da SILVA, A. A. O.; CARNEIRO, M. H.; MENDONÇA, J. T.;SERVO, G. J. M.; BASTOS, G. C.; OKUBO DA SILVA, S.; BATISTA, P. A. Produção pesqueira marinha do estado de São Paulo no ano de 2004. Série Relatórios Técnicos, Instituto de Pesca, p.1, 2005.

de JAGER, L. S.; ANDREWS, A. R. J. Development of a rapid screening technique for organochlorine pesticides using solvent microextraction (SME) and fast gas chromatography (GC). **Analyst**, v.125, n.11, p.1943, 2000.

de SOUZA PINHEIRO, A.; de ANDRADE, J. B. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Talanta**, v.79, n.5, p.1354, 2009.

EICEMAN, G. A.; GARDEA-TORRESDEY, J.; DORMAN, F.; OVERTON, E.; BHUSHAN, A.; DHARMASENA, H. P. Gas chromatography. **Anal. Chem.**, v.78, p.3985, 2006.

FILHO, J. C. Panorama da Aqüicultura. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/85/editorial85.asp>, consultado em: 12/01/12.

FULLER, S. C.; FRANK, D. C.; FITZHENRY, M. J.; SMYTH, H. E.; POOLE, S. E. Improved approach for analyzing bromophenols in seafood using stable isotope dilution analysis in combination with SPME **J. Agric. Food Chem**., v.56, p.8248, 2008.

GOKÇE, M. A. *et al*. Seazonal variation in proximate and fatty acid compositions of female common sole (*Solea solea*). **Food Chem.**, v.88, p.419, 2004.

GRIBBLE, G. W. Naturally occurring organohalogen compounds – A survey. **J. Nat. Prod.**, v.55, p.1353, 1992.

GUNTER, G. Seasonal population changes and distribution as related to salinity of certain invertebrates of the Texas Coast, including the commercial shrimp. **Publ. Inst. Mar. Sci**., 1 (2), p.7, 1950.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan AS, 9.ed., unid X, cap 53, 1997.

HANSEN, L. D.; EATOUGH, D., (Ed.) Organic Chemistry of the Atmosphere. Boca Raton: CRC Press, 1991.

HART, F. L.; FISHER, H. J. Análisis moderno de los alimentos. Zaragoza: Acribia, cap.10, p.249, 1971.

HOLTHUIS, L. B. Shrimps and prawns of the world. Na annoted catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish. Synop., v.125 (1), p.1, 1980.

IWAI, M. Pesca exploratória e estudo biológico sobre o camarão na costa Centro/Sul do Brasil, com o navio Oceanográfico Prof. W. Besnard, 1969/1971. SUDELPA/IOUSP: 1973.

JAGER, L. S.; ANDREWS, R. J. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.911, p.97, 2001.

JAIN A.**;** VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. **Anal. Chim. Acta**, v.706, p.37, 2011.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Anal. Chem.**, v.68, p.2236, 1996.

KAJIWARA, T.; KODAMA, K.; HATANAKA, A;, MATSUI, K.; Em *Bioctive Volatile Compounds from Plants*; Teranishi, R.; Buttery, R.G.; Sugisawa, H., eds.; ASC Symposium Series: Washington, v.525, cap.9, 1993.

KATAOKA H.; LORDB H. L.; PAWLISZYNB J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis, **J. Chromatogr. A**, v.880, p.35, 2000.

KOESTER, C. J.; SIMONICH, S. L.; ESSER, B. K. Environmental analysis. **Anal. Chem.,** v.75, p.2813, 2003.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. 1ed., RiMa Editora: São Carlos, 2004.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios-Conceitos fundamentais de neurociência. Editoria Atheneu, São Paulo, 2001.

LOPES, W. A.; ROCHA, G. O. da; PEREIRA, P. A. de P.; OLIVEIRA, F.; CARVALHO, L. S.; BAHIA, N. de C.; CONCEIÇÃO, L. S.; ANDRADE, J. B. de.; Multivariate optimization a GC-MS method for determination os sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons en envioronmental samples. **J. Sep. Sci.**, v.31, p.1787, 2008.

LOPES, A. L.; VALENTE, A. L. P. Microextração em fase sólida. **Analytica**, v.2, p.25, 2002.

LUZIA, L. A. *et al*. The influence of season on the lipid profile of five commercially important species of Brazilian fish. **Food Chem.**, v.83, p.93, 2003.

Ministério da Pesca e Aquicultura http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf, acessado em janeiro de 2013.

NEIVA, G.S.; WISE, J.P. The biology and fishery of the sea-bob-shrimp of Santos Bay, Brazil. **Proc. Gulf. Caribb. Fish. Inst**., v.16, p.131, 1963.

OGATA, H. Y. *et al.* Fatty acid composition of five candidate aquaculture species in Central Philippines. **Aquaculture**, v.236, p.361, 2004.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. Manual de pesca, ciência e tecnologia do pescado. Livraria Varela Ltda., v.1, 1999.

OKADA, T.; MORRISSEY, M. T. Seazonal changes in intrinsic characteristics of Pacific sardine (*Sardinocs sagax*). **J. Aquatic Food Product Technol.**, v.16, n.1, p.51, 2007.

OLIVEIRA, A. S.; SILVA, V. M. ; VELOSO, M. C. C.; SANTOS, G. V. ; ANDRADE, J. B. . Bromophenol concentrations in fish from Salvador, BA, Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Impresso), v.81, p.165, 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2006. Rome: FAO, p.3 e 41, 2007.

PATEL, K.; MEHTA, P.; SAHOO, U.; SEN, A.; DAHANY, B. A single drop Micro extraction and future trends. **Int. J. Chem. Tech. Res.**, v.2, p.1638, 2010.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, v.175, 1997.

PEREZ-FARFANTE, I. Diagnostic characters of juveniles of the shrimps Penaeus aztecus aztecus, P. duorarum duorarum e P. brasiliensis (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Spec. Sci. Rep. Fish**., v.599, p.1, 1970.

PINHEIRO, A. S.; de Andrade, J. B. Development, validation and application of a SDME\GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Talanta**, v.79, p.1354, 2009.

RAYNIE, D. E. Modern extraction techniques. **Anal. Chem.**, v.78, p.3997, 2006.

RECKS, M. A.; SEABORN, G. T. Variation in fatty acid composition among nine forage species from a southeastern US estuarine and nearshore coastal ecosystem. **Fish Physiology Biochemical**, v.34, n.3, p.275, 2007.

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química dos alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. Ed. Edgard Blücher: São Paulo, 2004.

RODRIGUES, G. D.; SILVA L. H. M. da; SILVA M. do C. H. da; Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água, **Quim. Nova***,* v.33, n.6, p.1370, 2010.

SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trac-trend.* **Anal. Chem.**, v.21, p.672, 2002.

SANTOS, M. do C. F.; COELHO, P. A.; PORTO, M. R. Sinopse das informações sobre a biologia e pesca do camarão-sete-barbas, *xiphopenaeus kroyeri* (heller, 1862) (decapoda, penaeidae), no nordeste do brasil. **Bol. Téc. Cient. CEPENE,** v.14, n.1, p.141, 2006.

SANTOS SOBRINHO, Joelma Pereira dos. Determinação de bromofenóis simples em peixes por microextração com gota única e CG-EM*.* Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

SARKHOSH, M.; MEHDINIA, A.; JABBARI, A.; YAMINI, Y. Single drop microextraction of biphenyl and biphenyl oxide in aqueous samples by gás chromatography-flame ionization detection. **Am J. Anal. Chem.**, v.2, p.689, 2011.

SCHULTZ, T. H.; FLATH, R. A.; MON, R.; EGGLING, S. B.; TERANISHI, R. Isolation of volatile components from a model system. **J. Agric. Food Chem.**, v.25, p.446, 1977.

Sebrae – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresashttp://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/E9CD4D3A1C1D2AE4832574DC00462420/$File/NT0003906E.pdf, acessado em janeiro de 2013.

SILVA, V. M. da; LOPES, W. A.; de ANDRADE, J. B.; VELOSO, M. C. da C.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, G. V. Bromofenóis simples relacionados ao flavor de organismos marinhos. **Quim. Nova**, v.30, p.629, 2007.

SILVA, V. M. Determinação de compostos orgânicos voláteis em algas e peixes marinhos. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2006.

SILVA, V. M. da; VELOSO, M. C. da C., SOUSA, E. T., SANTOS, G. V., ACCIOLY, M., de ANDRADE, J. B., Determination of eleven Low-Molecular-Weight Carbonyl Compounds in Marine Algae by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, v.44, p.233, 2006.

SILVA, V. M. da; VELOSO, M. C. da C.; OLIVEIRA, A. S. de; SANTOS, G. V.; PEREIRA, P. A. de P.; de ANDRADE, J. B.; Determination of simple bromophenols in marine fishes by reverse – phase high performance liquid chromatography (RP.HPLC). **Talanta**, v.68, p.323, 2005.

SILVA, S. A. da; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M. da; ALENCAR, A. L. S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J. M. O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Quím. Nova**, v.24, p.460, 2001.

STANSBY, M. E. Polynsaturates and fat in fish flesh. **J. Am Dietetic Assoc**, v.63, p.625,1973.

STANSBY, M. E. Speculations on Fishy Odors and Flavors. **Food Technol.,** v.16, p.28, 1962.

STEPHAN, A.; BUCKING, M; STEINHART, H. Novel analytical tools for flavours. **Food Reseach International**, v.33, p.199, 2000.

SUPELCO, Sigma-Aldrich Co. Solid phase microextraction: solventless sample preparation for monitoring flavor and fragrance compounds by capillary gás chromatograpy. Bulletin, n.869, 1995.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1987.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím. Nova**, v.23, p.523, 2000.

VALLECILLOS L., POCURULL E., BORRULL F.; Fully automated ionic liquid-based headspace single drop microextraction coupled to GC–MS/MS to determine musk fragrances in environmental water samples. **Talanta**, v.99, p.824, 2012.

VASQUES, R. O'R. Dinâmica populacional do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis (PEREZ-FARFANTE, 1967) (Crustacea, Decapoda) e caracterização da pesca camaroneira na zona norte de Ilhéus, Ba. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós Graduação em Zoologia, UESC-BA, 2005.

VELOSO, M. C. C. Compostos Orgânicos Voláteis e Ácidos Graxos em Peixes Marinhos*.* Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2005.

VELOSO, M. C. da C.; SILVA, V. M. da; SANTOS, G. V.; de ANDRADE, J. B.. Determination of Aldehydes in Fish by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, v.39, p.173, 2001.

VICHIA S.; ROMEROB A.; TOUSB J.; TAMAMESA E. L.; BUXADERAS S.. Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance, **J. Chromatogr. A**, v.1211, p.1, 2008.

VIEIRA, B.B. Observações sobre a maturação de Xiphopenaeus kroyeri no litoral de São Paulo. **Bol. Mus. Nac.**, v.74, p.1, 1947.

WARDENCKI, W.; CURYLO, J.; NAMIESNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **J. Biochem. Bioph. Methods**, v.70, p.275, 2007.

WARDENCKI W.; MICHULEC M.; CURYLO J.. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis, **Int J. Food Sci Technol.**, v.39, p.703, 2004.

WHITFIELD, F. B.; HELIDONIOTIS, F.; SMITH, D. Role of feed ingredients in the bromophenol content of cultured praws. **Food Chem.**, n.1, 2002.

WHITFIELD, F. B.; HELIDONIOTIS, F.; SHAW, K. J.; SVORONOS, D. Distribution of bromophenols in species of ocean fish from Eastern Australia. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.3750, 1998.

WHITFIELD, F. B.; HELIDONIOTIS, F.; SHAW, K. J.; SVORONOS, D. Distribution of bromophenols in australian wild-harvested and cultivate prawns (Shrimp). **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.4398, 1997.

WHITFIELD, F. B.; HELIDONIOTIS, F.; DREW, M. The role of diet and environment in the natural flavours of seafoods. *In Flavour Science: recents developments.* TAYLOR, A. J.; MOTRAM, D. S., EDS; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U. K., p.3, 1996.

WHITFIELD, F. B.; HELIDONIOTIS, F.; SVORONOS, D.; SHAW, K. J.; FORD, G. L. The source of bromophenols in some species of Australian Ocean fish. **Water Sci. Technol.**, v.31, p.113, 1995.

WHITFIELD, F. B., SHAW, K. J., WALKER, D. I. The source of 2,6- Dibromophenol: cause of an iodoform taint in Australian prawns. **Water Sci. Technol.**, v.25, p.131, 1992.
WHITFIELD, F. B. Flavour of prawns and lobsters. **Food Reviews International**, v.6, p.505, 1990.

WHITFIELD, F. B.; LAST, J. H.; SHAW, K. J.; TINDALE, C. R. 2,6-Dibromophenol: The cause of an iodoform-like off-flavour in some Australian crustacea. **J. Sci Food Agric.**, v.46, p.29, 1988.

WHITFIELD, F. B. Chemistry of off-flavours in marine organisms. **Water Sci. Technol.**, v.20, p.63, 1988a.

WOOD D. C.; MILLER J. M.; CHRIST I. Headspace Liquid Microextraction. **Sample Preparation Perspectives,** v.11, p.573, 2004.

XIAO, Q., *et al*. Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. **Talanta**, v.69, n.4, p.848, 2006.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K.. Developments in single-drop microextraction. **J. Chromatogr. A**, v.1152, p.184, 2007.

XU, N.; FAN, X.; YAN, X.; LI, X.; NIU, R.; TSENG, C. K.; **Phytochemistry**, v.62, p.1221, 2003.

YANCEY, J. A. Review of liquid phases in gas chromatography, Part I: Intermolecular forces. **J. Chromatogr. Sci.**, v.32, p.349, 1994.

YE, C.; ZHOU, Q.; WANG, X. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. **J. Chromatogr. A**, v.1139, p.7, 2007.

ZANJANI M. R. K.; YAMINI Y.; SHARIATI S.; JONSSON J. A° ke. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, **Anal. Chim. Acta**, v.585, p.286, 2007.

ZGOŁA-GRZES´KOWIAK A., GRZES´KOWIAK T.; Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends Anal. Chem.**, v.30, p.9, 2011.

ZHANG, M.; HUANG, J.; WEI, C.; YU, B.; YANG, X.; CHEN, X. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, v.74, p.599, 2008.

ZHAO, L.; LEE, H. K. Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water. **J. Chromatogr. A**, v.919, n.2, p.381, 2001.

ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K. Seazonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish – sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulius encrasicholus*) and picarel (*Spicara smaris*). **Food Chem.**, v.103, p.725, 2007.

9. TRABALHOS DIVULGADOS DURANTE O MESTRADO

FONTES, Rafael Dourado Pimenta; SANTOS SOBRINHO, Joelma Pereira dos; SOUSA, E. T.; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson B. de. Determinação de Bromofenóis em Organismos Marinhos Usando Microextração com Gota Única (SDME) e GC-MS. In: 35A. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2012, Águas de Lindóia, SP. 2012.

FONTES, Rafael Dourado Pimenta; SANTOS SOBRINHO, Joelma Pereira dos; SOUSA, E. T.; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson B. de. Determinação de Bromofenóis em Organismos Marinhos Usando Microextração com Gota Única (SDME) e GC-MS. In: 5º CONGRESSO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA ANALÍTICA E 2º CONGRESSO URUGUAYO DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2012, Montevideo – Uruguay. 2012.