



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL *CAMPUS* CERRO LARGO

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

SUSANA WEYH WAMMES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO VA-MSPD - LC-MS PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TECIDOS DE ANUROS**

CERRO LARGO - RS

2019

SUSANA WEYH WAMMES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO VA-MSPD- LC-MS PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TECIDOS DE ANUROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de grau em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Fronteira Sul *Campus* Cerro Largo.

Orientadora: Profa. Dra. Liziara da Costa Cabrera
Co-orientador: Prof. Ms. Ruben Alexandre Boelter

CERRO LARGO - RS

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Wammes, Susana Weyh

Otimização e validação do método VA-MSPD-LC-MS para determinação de agrotóxicos em tecidos de anuros / Susana Weyh Wammes. -- 2019.

50 f.:il.

Orientador: Dr Liziara da Costa Cabrera.

Co-orientador: Ms. Ruben Alexandre Boelter.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS , 2019.

1. Anuros. 2. Contaminantes. 3. Monitoramento. I. Cabrera, Liziara da Costa, orient. II. Boelter, Ruben Alexandre, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

SUSANA WEYH WAMMES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO VA-MSPD- LC-MS PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TECIDOS DE ANUROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de grau em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Fronteira Sul *Campus* Cerro Largo.

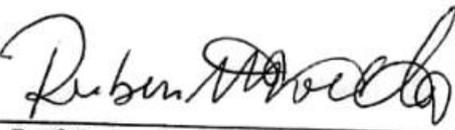
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

05/12/2019

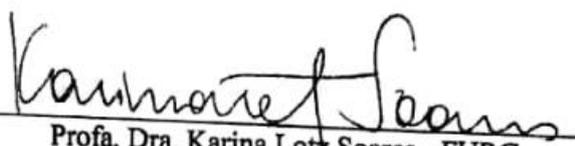
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Liziara da Costa Cabrera – UFFS
Orientadora



Prof. Ruben Alexandre Boelter – UFFS
Co-orientador



Prof. Dra. Karina Lotz Soares - FURG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos professores Liziara da Costa Cabrera e Ruben Alexandre Boelter por aceitarem me orientar neste trabalho.

Especialmente a professora Liziara que me acompanhou durante este um ano, durante muitas horas no laboratório e orientações e teve paciência para me explicar um pouco mais sobre a área da Química Analítica. Agradecer também por ser mais do que minha orientadora, ser uma amiga.

Agradecer ao professor Ruben por ter me ensinado a dissecar rãs e pelas vezes que me auxiliou com orientações para escrita do trabalho.

A Profa. Dra. Karina Lotz Soares por aceitar gentilmente o convite de participação da banca de avaliação do trabalho e pelas contribuições feitas para o aprimoramento do mesmo.

Às colegas e amigas do laboratório 107 do bloco 3, Gabrielle dos Santos Leite, Letícia Gabrielhi Rocha, Rafaela Roberta Morelato, Lize Elena Kaufmann Back, que de uma ou de outra forma me ajudaram muito na parte do laboratório e tornaram meus dias cansativos mais alegres.

Ao químico do laboratório Jonas Dugatto que sempre me auxiliou bastante durante esse período e a todos os técnicos que ajudaram de alguma forma.

A amiga Vírian Brutti Coradine que me auxiliou nas coletas, no laboratório e me apoiou muito durante este período. A amiga Aldine Kieling por auxiliar na coleta e disponibilizar uma das áreas de estudo. As amigas Gênis Hermina Schreiner, Daniele Bremm, Patrícia Borck Garcia, Adriana Spies, que sempre me incentivaram e foram grandes amigas.

Ao meu querido namorado Evandro Werle Spies que me auxiliou nas coletas, mesmo não concordando com a temática do meu trabalho. Agradeço pela paciência durante este período corrido e por tudo que fizestes para me ajudar.

À minha família que sempre me apoiou e compreendeu minha ausência nestes últimos meses. A eles agradeço por não medirem esforços para me ajudar sempre que podiam. Aos meus pais que me ensinaram que para ser feliz não precisamos de riquezas materiais e sim de união e simplicidade. A minha querida irmã que sempre serviu de inspiração e exemplo para mim.

A Universidade Federal da Fronteira Sul *Campus* Cerro Largo que permitiu com que eu tivesse acesso ao ensino superior e de forma gratuita e desenvolvesse o presente trabalho.

RESUMO

Devido à intensificação das atividades humanas, cada vez mais, estão sendo gerados contaminantes para o ambiente que podem trazer consequências para as diferentes formas de vida do planeta. Dentre estes contaminantes, estão os agrotóxicos, que podem apresentar uma ameaça aos animais, como aos anfíbios, mais precisamente os anuros, uma vez que os agrotóxicos mais hidrofóbicos tendem a se bioacumular nos tecidos ricos em lipídios. Os anfíbios são animais suscetíveis e estão em declínio populacional. Levando em consideração o exposto e sabendo que a região de estudo, Noroeste do Rio Grande do Sul, faz uso intenso de agrotóxicos nas lavouras agrícolas, o presente trabalho teve por objetivo otimizar e validar o método VA-MSPD-LC-MS (Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex, Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas) para determinação de sete agrotóxicos em tecidos de rãs: atrazina, tebuconazol, clorpirifós, difenoconazol, trifloxistrobina, pirazosulfuron e fipronil. Para otimização do método foram testadas diferentes condições de fase móvel e materiais usados para VA-MSPD. Os testes se basearam em análises univariadas para determinar tipo de suporte sólido e quantidade de amostra. Uma análise multivariada foi utilizada para determinar tipo e volume de solvente, quantidade de sulfato de sódio e de suporte sólido. Para avaliar as melhores condições foi considerado como resposta a recuperação entre 70-120% para todos os testes e também desvio padrão relativo para as análises univariadas. A melhor condição se deu utilizando 0,5 g de amostra, 1 g de C18, 1 g de Na₂SO₄ e 4 mL de acetonitrila. O método proposto foi validado, seguindo os critérios exigidos pela ANVISA (2017) e INMETRO (2018), com recuperação entre 70 a 120% e RSD < 20%. O LOQm (Limite de Quantificação do método) ficou entre 8 e 80 µg kg⁻¹ para os sete agrotóxicos analisados. O método é seletivo, linear, preciso, exato, econômico e ecológico. Nas amostras de agroecossistemas foram quantificados difenoconazol e trifloxistrobina. Estes dados sugerem que pode estar ocorrendo bioacumulação nos tecidos dos anuros. O presente trabalho foi um passo importante para o monitoramento de agrotóxicos bioacumulativos em tecidos de rãs, no entanto, outros estudos necessitam ser realizados para melhor compreensão desse fenômeno e dos impactos que pode causar.

Palavras-chave: Rãs. Contaminantes. Monitoramento.

ABSTRACT

Due to the intensification of human activities, more and more contaminants that may have consequences for the different life forms of the planet are being generated into the environment. Pesticides, which can pose a threat to animals, such as amphibians, more precisely anurans, since they tend to bioaccumulate in lipid-rich tissues. Amphibians are suckable animals and are in population decline. Taking into account the above and knowing that the study region, Northwest of Rio Grande do Sul, makes heavy use of pesticides in agricultural crops, the present work aimed to optimize and validate the VA-MSPD-LC-MS (Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion, Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry) method to determine seven pesticides in frog tissues: atrazine, tebuconazole, chlorpyrifos, difenoconazole, trifloxystrobin, pirazosulfuron and fipronil. For method optimization, different mobile phase conditions and materials used for VA-MSPD were tested. The tests were based on univariate analysis to determine solid support type and sample quantity. A multivariate analysis was used to determine type and volume of solvent, amount of sodium sulfate and solid support. In order to evaluate the best conditions, the response between 70-120% recovery for all tests and relative standard deviation for univariate analyzes was considered. The best condition was found using 0.5 g of sample, 1 g of C18, 1 g of Na₂SO₄ and 4 ml of acetonitrile. The proposed method was validated according to the criteria required by ANVISA (2017) and INMETRO (2018), with recovery between 70 and 120% and RSD <20%. The LOQm (Limit of Quantification of the method) was between 8 and 80 µg kg⁻¹ for the seven pesticides analyzed. The method is selective, linear, precise, accurate, economic and ecological. In agroecosystem samples, difenoconazole and trifloxystrobin were quantified. These data suggest that bioaccumulation may be occurring in anuran tissues. This work was an important step towards the monitoring of bioaccumulative pesticides in frog tissues, however, other studies need to be performed to better understand this phenomenon and the impacts it may cause.

Keywords: Frogs. Contaminants. Monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostragem de Cerro Largo - RS.	18
Figura 2 - Amostragem de Candido Godói - RS.	19
Figura 3 - Espécies de rãs utilizadas no estudo.	21
Figura 4 - Trituração das amostras e homogeneização.....	22
Figura 5 - Preparo da amostra através da técnica VA - MSPD	23
Figura 6 - Equipamento de análise das amostras.....	23
Figura 7 - Cromatogramas do tipo TIC em $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos investigados.....	27
Figura 8 - Recuperações obtidas utilizando diferentes massas de amostras.....	28
Figura 9 - Recuperações obtidas utilizando sílica para a dispersão da matriz.	28
Figura 10 - Recuperações obtidas utilizando C18.....	29
Figura 11 - Esquematização do preparo da amostra (VA-MSPD) nas condições definitivas do método.	31
Figura 12 - Recuperações (%) obtidas em fígado e tecido de <i>L. fuscus</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos para extração e quantificação de compostos em diferentes matrizes.	16
Tabela 2- Características dos agrotóxicos investigados.	19
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental.	21
Tabela 4 - Gradiente de eluição empregada no método.	26
Tabela 5 - Comparação entre resultados (recuperação e RSD em %) obtidas para cada agrotóxico utilizando C18 novo e C18 reutilizado.	29
Tabela 6 - Respostas de recuperação e RSD (%) obtidas para cada agrotóxico utilizando diferentes solventes.	30
Tabela 7 - Linearidade do método.	32
Tabela 8 - Exatidão do método em termos de recuperações (%) e repetibilidade obtidas em termos de desvio padrão relativo (RSD %).	33
Tabela 9 - Limite de quantificação dos compostos - LOQ.	34
Tabela 10 - Resultados (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) da determinação de agrotóxicos em <i>L. fuscus</i> de agroecossistemas.	35
Tabela 11 - Resultados da determinação de agrotóxicos (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) em <i>L. fuscus</i> do local “controle”	36

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 - Octadecilsilano

C18_R - C18 reutilizado

DCM - Diclorometano

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

ESI - Ionização por eletrospray

EtOH - Etanol

GAA - *Global Amphibian Assessment*

GC - *Gas chromatography*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

Kow - coeficiente de partição octanol-água

LC - *Liquid Chromatography*

LC-MS - *Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry*

LOQ_m - Limite de Quantificação do método

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

MS - *Mass spectrometry*

RSD - Desvio Padrão Relativo

SPE - *Solid Phase Extraction*

t_R - tempo de retenção

VA- MSPD - *Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion*

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	3
FICHA DE AVALIAÇÃO.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
SUMÁRIO.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 ÁREA DE ESTUDO	18
2.2 PADRÕES DE AGROTÓXICOS	19
2.3 FASE MÓVEL E CONDIÇÕES DO LC	20
2.4 COLETA DE INDIVÍDUOS.....	20
2.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	21
2.6 MÉTODO ANALÍTICO	23
2.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	24
2.7.1 Seletividade.....	24
2.7.2 Linearidade	24
2.7.3 Exatidão	24
2.7.4 Precisão.....	24
2.7.5 Limites de Quantificação (LOQ).....	25
2.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO	25
2.9 ANÁLISE DE ÁGUA	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
3.1 FASE MÓVEL	26
3.2 CONDIÇÕES DO PREPARO DA AMOSTRA	27
3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	32
3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO	34
3.4.1 Amostras de agroecossistemas.....	35
3.4.2 Amostras do local “controle”	36
3.5 ANÁLISE DA ÁGUA.....	37
CONCLUSÃO.....	38

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de cinquenta com implementação da revolução verde, o setor agrícola começou a se desenvolver intensamente com auxílio de tecnologias e uso de agroquímicos, como os agrotóxicos, empregados para combater pragas das culturas e minimizar os prejuízos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003) e aumentar a produtividade tendo em vista a grande demanda. Dependendo da finalidade, os agrotóxicos podem ser classificados como herbicidas, inseticidas, formicidas, inseticidas, entre outros (SILVA; FAY, 2004).

A maioria dos agrotóxicos comercializados atualmente são de origem sintética. Estes foram introduzidos no passado e tiveram bastante uso, como o inseticida diclorodifeniltricloroetano, famoso DDT. A partir disso muitos outros compostos organoclorados foram desenvolvidos, seguidos dos organofosforados que ao contrário dos anteriores, apresentavam menor persistência no ambiente, embora muitos deles sejam altamente tóxicos para mamíferos e consideravelmente tóxicos para aves e outros animais (SILVA; FAY, 2004).

Atualmente o Brasil está entre os países de maior produtividade no setor agrícola, o que é significativo para a economia, no entanto, para tal vem se fazendo o uso de agrotóxicos em larga escala (PIGNATI *et al.*, 2017). Segundo dados de 2017, Mato Grosso, São Paulo e Rio Grande do Sul foram os líderes de comercialização de agrotóxicos, sendo o RS comercializou 70 mil toneladas de ingrediente ativo (IBAMA, 2018).

Em um estudo feito sobre o uso de agrotóxicos no estado do Rio Grande do Sul por área de saúde, a área de Santa Rosa teve destaque com o maior uso de agrotóxicos considerados críticos, correspondendo a 874,85 L/km² por ano. Na sequência de colocações lideram, Frederico Westphalen/Palmeira das Missões, Ijuí, Carazinho, Cruz Alta e Santo Ângelo. A maioria das regiões classificadas como críticas estão localizadas no Norte e Noroeste do estado, o que indica que estes locais estão sob riscos de contaminação ambiental (PEREIRA, 2014).

Embora os agrotóxicos sejam aplicados com o objetivo de agirem fungos, ervas daninhas e insetos na intencionalidade de combater pragas e preservar a qualidade e garantir a rentabilidade das culturas, estes acabam atingindo também o restante do ecossistema, que são seres não-alvos. A contaminação dos animais por agrotóxicos se dá pelo contato com a água,

solo, vento, poeira e alimentação contaminados, podendo atingir locais distantes da origem (MORESCO; MARGARIDO e DE OLIVEIRA, 2014).

Alguns agrotóxicos organoclorados, por exemplo, podem permanecer no ambiente por muitos anos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003), aumentando a probabilidade de uma possível contaminação (PEREIRA, 2014). São considerados tóxicos e biocumulativos e se acumulam nos tecidos de organismos, principalmente em animais que vivem em ambientes aquáticos contaminados (ALCOCK *et al.*, 1998). Estes compostos químicos se acumulam principalmente em tecidos ricos em lipídeos devido sua característica hidrofóbica (WEBER, 1972).

No entanto, não são só os organoclorados que possuem característica hidrofóbica. Outros compostos podem até ser menos hidrofóbicos, mais ainda podem bioacumular. Dentre os agrotóxicos atualmente utilizados destacam-se: o tebuconazol que é um fungicida utilizado para combater doenças em culturas como cereais, legumes, cana-de-açúcar. O cloropirifós é um inseticida organofosforado usado em cultura de cereais, frutas e legumes, é pouco solúvel em água, com persistência moderada no solo e baixa na água. É considerado de alta toxicidade para peixes, aves e invertebrados aquáticos. Difenconazol é um fungicida aplicado a cereais, legumes, milho, canola, pouco solúvel em água, persiste no solo e água e classificado como sendo moderadamente tóxico a grande parte da biota aquática. Trifloxistrobina é um fungicida aplicado em culturas como cereais, legumes e frutas, é pouco solúvel em água, sendo altamente tóxico para peixes e normalmente não é persistente em nenhum meio. Pirazosulfuron é um herbicida utilizado para combater ervas daninhas em culturas de arroz (BRASIL, 2019). Embora pirazosulfuron ser utilizado somente para arroz, esse sido encontrado em água na região de estudo (LEITE *et al.*, 2019). Estudos sobre esse composto são pouco conclusivos, uma vez que não estão disponível muitas propriedades. Fipronil é um herbicida pouco solúvel em água, bastante persistente no solo e relativamente, na água e é tóxico para peixes (IUPAC, 2018).

Ainda sobre a bioacumulação em tecidos ricos em lipídeos, em um estudo realizado com peixe da espécie *Mystus vittatus*, constatou-se a presença de dois agrotóxicos e as concentrações foram maiores nos músculos, depois nas brânquias, sangue, fígado e rins (JOHN; PRAKASH, 2003). Pode ainda ocorrer um fenômeno denominado biomagnificação, onde ocorre uma contaminação através da cadeia alimentar, ocorrendo um aumento da concentração destes agrotóxicos ao longo da cadeia trófica (ZHAO *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos vem relatando a presença de resíduos de agrotóxicos em tecidos de animais, bem como as consequências da exposição de animais a estes compostos observados

em mesocosmos. Estudos como o de Wrubleski (2016) relatam os efeitos dos agrotóxicos em anuros, principalmente relacionado à letalidade e retardo no desenvolvimento de girinos expostos a estes compostos (WRUBLEWSKI, 2016). Ou ainda tratam sobre malformação devido à exposição a algum composto na fase larval (ALMEIDA, 2014; HEREK, 2017).

Na exposição de anfíbios machos no início do seu desenvolvimento a doses baixas de atrazina, por exemplo, pôde ser observado o hermafroditismo (HAYES *et al.*, 2002). Além disso, a exposição de *Lithobates pipiens* à agrotóxicos DDT, malationa e dieldrina resultou na imunossupressão, ou seja, alteração no sistema imunológico (GILBERTSON, *et al.*, 2003). Este efeito também é relatado quando *L. pipiens* é exposta a atrazina (BRODKIN *et al.*, 2009).

Em um estudo de exposição de girinos de *L. nigromaculata* ao agrotóxico α -cipermetrina durante 14 dias com adição do composto a cada 3 dias, observou-se a bioacumulação deste composto no organismo. Na exposição à α -cipermetrina durante 96 horas, observou-se que mais indivíduos morriam conforme aumentava o tempo de exposição e a concentração de α -cipermetrina. A exposição de girinos a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de α -cipermetrina durante duas semanas, resultou no retardamento do crescimento (XU ; HUANG, 2017). Já a exposição de girinos de *Rhinella arenarum* ao composto clorpirifós durante 96 horas, foi observado a redução de 50% da locomoção na concentração máxima $75 \mu\text{g L}^{-1}$ (QUIROGA *et al.*, 2019).

Neste sentido, percebe-se que inúmeros trabalhos relacionados a contaminantes ambientais, utilizam anuros para pesquisa, pois estes possuem uma morfologia bastante sensível. Os ovos dos anuros não possuem estrutura rígida para proteção fazendo com que fiquem expostos no ambiente, envolvidos apenas por uma espuma, tornam-se alvos fáceis de contaminantes. Quando eclodem na forma larval, os girinos permanecem exclusivamente no ambiente aquático e se alimentam de vegetais onde ambos podem estar contaminados por agrotóxicos. Os anuros possuem pele permeável, o que pode ser uma das portas de entrada para agrotóxicos presentes na água (BLAUSTEIN; BANCROFT, 2007). Devido à sua caracterização fisiológica de permeabilidade da pele e exposição a dois ambientes distintos (terra e água), estes animais são considerados sensíveis a estressores e por isso são bons indicadores biológicos de contaminantes no ambiente (BLAUSTEIN, 1994).

A preocupação com animais como anfíbios se dá principalmente por estes estarem entre os grupos de animais do mundo que estão apontando declínio populacional e perda de espécies (BLAUSTEIN *et al.*, 1994), pois tem-se menos espécies por exemplo, comparado com o século passado (LANNON, 2005). Acredita-se que este fenômeno seja decorrente de

um conjunto de fatores ambientais que atuam sobre a população de determinado grupo (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002), fatores como, perda de habitats, doenças, agroquímicos, radiação UVB, espécies exóticas e alterações climáticas (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; LANNOO, 2005; VERDADE; DIXO e CURSIO, 2010). Algumas desta causadas são intensificadas pela ação antrópica, principalmente a degradação do habitat natural que é modificado em questão de anos (LANNOO, 2005), assim como também a intensificação do uso dos agrotóxicos, principalmente os herbicidas, que são apontados como principal contribuinte no processo de declínio dos anfíbios (GREENWELL *et al.*, 1996).

Em um estudo realizado no Brasil em 2003 pelo *Global Amphibian Assessment - GAA*, dentre as 731 espécies de anfíbios avaliadas, seis foram consideradas Criticamente em Perigo (CR), seis Em Perigo (EN), 12 Vulneráveis (VU), uma Extinta (EX), 21 Quase Ameaçada (NT) e 205 Deficientes em Dados (DD) (SILVANO; SEGALLA, 2005). De acordo com o relatório do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) entre 2010 e 2014 foram avaliados 973 espécies de anfíbios e destes 41 espécies foram inseridas na lista de espécie ameaçada e uma espécie foi classificada como extinta.

Os anfíbios tem um papel fundamental no equilíbrio ecológico dos ecossistemas atuando principalmente para o controle de insetos (SILVA, 2015). Além disso, possuem destaque econômico por possuírem componentes fundamentais para fabricação de medicamentos (TEMPONE *et al.*, 2007).

Tendo conhecimento de que determinados agrotóxicos se acumulam principalmente nos tecidos lipofílicos de animais e em seres que tem contato frequente com o ambiente aquático, e levando em conta o uso intensivo destes produtos químicos aqui na região noroeste e missões do estado do Rio Grande do Sul, concomitante com a contínua legalização de agrotóxicos que vem ocorrendo no país, considera-se de grande relevância investigar se a bioacumulação de agrotóxicos está ocorrendo em tecido de anuros.

Além do que já foi exposto, nota-se a necessidade do estudo tendo em vista a precariedade de trabalhos na área, principalmente no Brasil. Como referência para este tema segunda a revisão feita, temos somente trabalhos internacionais como de Nerin *et al.* (2002) realizado na Espanha, Fellers *et al.* (2004) e Smalling *et al.* (2015) e (2013a) nos Estados Unidos. É mais frequente a investigação e determinação de compostos contaminantes em outros seres, como animais bentônicos (PÉREZ-RUZAFÁ *et al.*, 2000), peixes (JOHN; PRAKASH, 2003; ERNST *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2019), golfinhos (ALONSO *et al.*, 2012) caranguejos (SMALLING *et al.*, 2010), suínos (CHENG *et al.*, 2009), entre outros. Acredita-se que a falta de estudos de determinação de agrotóxicos em anuros seja decorrente da pouca

demanda de consumo da carne de rãs no país, pois a maioria dos trabalhos estão preocupados em monitorar os agrotóxicos em alimentos de maior demanda, como carnes, sementes e frutas, por exemplo, buscando investigar se os valores encontrados obedecem ao valor máximo permitido para o consumo humano.

No entanto, para a realização deste estudo foi necessário primeiramente a otimização e validação de uma técnica de preparo de amostras, tendo em vista que não foi encontrado na literatura métodos que sejam rápidos, precisos e ambientalmente corretos para essa matriz. Assim, o presente trabalho foi baseado nos poucos estudos que existem com anfíbios (SMALLING *et al.* 2013a) e também em estudos que utilizam outras matrizes biológicas, principalmente peixes (Tabela 1). Desta forma, foi otimizada uma técnica recentemente denominada de Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex – VA-MSPD (do inglês *Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion*) que vem se destacando pela sua capacidade de extração de compostos em uma variedade de matrizes, com precisão e exatidão aceitáveis (SOARES, 2019). Como pode ser visto na tabela a seguir, se trata de uma técnica empregada recentemente (Tabela 1).

Tabela 1 - Métodos para extração e quantificação de compostos em diferentes matrizes.

Técnica de extração	Técnica de análise	Amostra	Analitos	Suporte sólido	Solvente de extração	Referência
MSPD GPC	GC- μ ECD GC-MS	Caranguejo	Agrotóxicos		DCM	Smalling <i>et al.</i> (2010)
MSPD GPC	GC-MS	Rã	Agrotóxicos	Florisil	DCM	Smalling <i>et al.</i> (2013a)
MSPD GPC	GC-MS	Peixe e caranguejo	Agrotóxicos	Florisil	DCM	Smalling <i>et al.</i> (2013b)
VA- MSPD	GC-MS	Peixe	Agrotóxicos	C ₁₈	MeCN	Caldas <i>et al.</i> (2013)
MSPD	GC- MS/MS	Peixe	Fármaco	Sílica gel	Florisil	Chen; Tsai; Ding (2014)
MSPD GPC	GC-MS	Rã	Agrotóxicos	Florisil	DCM	Smalling <i>et al.</i> (2015)
VA- MSPD	LC-ESI-MS/MS	Peixe	Fármacos	Terra diatomáceas	MeOH	Hertzog <i>et al.</i> (2015)
QuEChERS	LC-MS/MS	Peixe	Agrotóxicos		MeCN (1% ácid. acét.)	Rocha <i>et al.</i> (2015)
VA-MSPD	LC-MS/MS	Sedimento	Biocidas	C18 reutilizado	EtOH	Andrade (2017)

Técnica de extração	Técnica de análise	Amostra	Analitos	Suporte sólido	Solvente de extração	Referência
VA-MSPD	HPLC-UV	Leite materno	Fármaco	β -CD, sílica PSA e Terra diatomáceas	MeOH	León-González; Rosales-Conrado, (2017)
VA- MSPD	LC-MS/MS	Peixes	Biocidas	Concha de mexilhão	EtOH	Vieira <i>et al.</i> (2018a)
VA - MSPD	GC- ECD	Peixe	Biocidas anti-incrustantes	C18 _R	Formiato de etila Ácido acético	Vieira <i>et al.</i> (2018b)
VA - MSPD	LC-ESI-MS/MS	Lodo de esgoto	Fármacos e PCPs	Argamassa de vidro	MeOH	Cerqueira <i>et al.</i> (2018)
VA - MSPD	HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS	Peixe	Fármacos, filtros UV e biocidas	Sílica	MeOH	Soares (2019)

Fonte: Autora, 2019. GPC - Comatografia de Permeação em Gel; GC - Cromatografia Gasosa; μ ECD - Micro Detector de Captura de Elétrons; GC-MS e GC-MS/MS - Cromatografia gasosa com detector de massas e massas em série. LC-ESI-MS- Cromatografia Líquida com Ionização por Eletro Spray acoplado à Espectrometria de Massas; HPLC--UV Cromatografia de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta; VA - MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex; QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; QqLIT - *Quadrupole linear ion trap*; DCM - diclorometano; MeCN - acetonitrila; MeOH - metanol.

Na técnica original da MSPD desenvolvida por Barker *et al.* (1989), foram sugeridas modificações por Sebastião *et al.* (2010) e mais tarde estas alterações foram adaptadas por Caldas *et al.* (2013), dando origem a VA-MSPD. Esta técnica consiste basicamente na mistura e maceração da amostra com suporte sólido, adição de solvente (BARKER, 2000), agitação por vórtex, centrifugação e remoção do sobrenadante para injeção.

A mesma, vem sendo empregada recentemente para diferentes matrizes e compostos, pois de acordo com Vieira *et al.*, (2018b) para determinação de biocidas em peixes a técnica é eficiente por apresentar uma recuperação boa (acima de 60% e RSD abaixo de 18%), a extração ser rápida e consumir pouco solvente orgânico, tornando o método ecológico (VIEIRA *et al.*, 2018b). Assim como para determinação de ibuprofeno em leite materno a técnica VA - MSPD é sensível, seletiva, precisa, confiável, com baixo consumo de amostra, suporte sólido e solvente, além disso, é simples, barata, eficaz e reproduzível em baixos níveis de concentração (LEÓN-GONZÁLEZ; ROSALES-CONRADO, 2017).

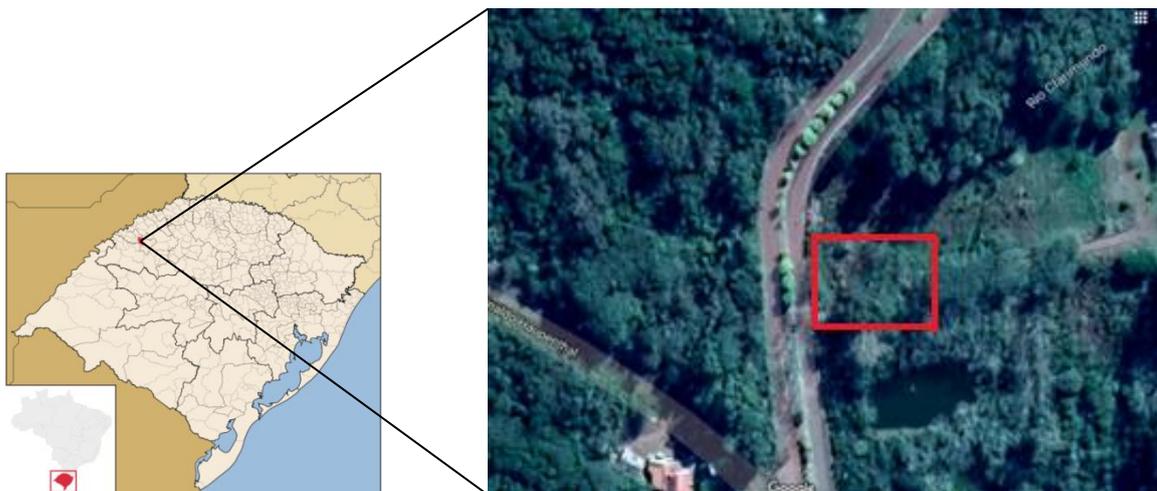
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A coleta de amostras de rãs se deu em dois pontos distintos, um no município de Cerro Largo (transição entre zona urbana e rural) e outro na Linha Acre (zona rural) do município de Candido Godói, com localizações de 28°07'42.8"S 54°45'01.5"W e 27°58'30.9"S 54°42'20.5"W respectivamente. Os municípios estão localizados na região das Missões (Cerro Largo) e Noroeste (Candido Godói) do Rio Grande do Sul. Os dois pontos amostrais são de área aberta. A primeira área (Figura 1) consiste em uma poça temporária rodeada por fragmentos de Mata Atlântica isolada de lavouras agrícolas, com risco reduzido de contaminação por agrotóxicos. Já a outra área (Figura 2) consiste em borda de lavoura à agricultura (soja e trigo) com risco de presença de agrotóxicos aumentando.

De acordo com dados preliminares de 2017 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a utilização das terras do município de Cerro Largo corresponde a 180,767 hectares de uso permanente e 6.908,977 hectares de uso temporário. Possui uma produção anual de grãos de soja de 14.987,478 t, 8.662,404 t de trigo, 14.814,710 t de grãos de milho e 29.149,650 t de milho forrageiro. Referente ao município de Candido Godói, 219,301 hectares são de uso permanente e 12.723,842 hectares de uso temporário. Com produção anual de 26. 813,054 t de soja, 14.966,910 t de trigo, 11.517,488 t de milho em grão e 121.035,335 t de milho forrageiro (IBGE, 2017).

Figura 1 - Amostragem de Cerro Largo - RS.



Fonte: Google Mapas, 2019.

Figura 2 - Amostragem de Candido Godói - RS.

Fonte: Fonte: Google Mapas, 2019.

2.2 PADRÕES DE AGROTÓXICOS

Para o presente estudo foram investigados nos tecidos de rãs, um total de sete agrotóxicos (Tabela 2): atrazina, clorpirifós, difenoconazol, fipronil, tebuconazol, trifloxistrobina, pirazosulfuron (todos padrões Sigma Aldrich, acima de 98% de pureza). Para a escolha dos mesmos, levou-se em consideração os que são amplamente usados na região de estudo, e a capacidade de bioacumulação (K_{ow} próximo ou superior a três) exceto para atrazina, a qual foi somente pelo seu amplo uso. Além da disponibilidade de padrões no laboratório e a compatibilidade com a técnica de detecção e coluna disponível.

Tabela 2- Características dos agrotóxicos investigados.

Agrotóxico	Classe Agronômica	Log K_{ow}	m/z MI*	t_R (min)	Massa Molar ($g \cdot mol^{-1}$)
Atrazina	Herbicida	2,70	216+	6,03	215,68
Tebuconazol	Fungicida	3,70	308+	7,67	307,82
Clorpirifós	Inseticida	4,70	352+	8,79	350,59
Difenoconazol	Fungicida	4,36	406+	8,04	406,26
Trifloxistrobina	Fungicida	4,50	409+	8,57	408,37
Pirazosulfuron	Herbicida	3,16	413-	6,91	414,29
Fipronil	Inseticida	3,75	435-	7,43	437,15

Fonte: Autora, 2019. Log K_{ow} – Logaritmo da constante de equilíbrio octanol-água; m/z – razão massa carga e MI - Modo de ionização na ESI + ou -; t_R – tempo de retenção.

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de 1000 mg L^{-1} essas foram diluída a 100 mg L^{-1} e 1 mg L^{-1} (soluções trabalho individual) todas elas diluídas em metanol. As soluções individuais trabalho foram injetadas no sistema cromatográfico para verificar a resposta individual de cada analito. Logo após foi preparada uma mistura dos padrões numa concentração de 2 mg L^{-1} (M7 ou mistura padrão trabalho), a qual foi diluída a 1 mg L^{-1} e injetada no equipamento LC-MS para otimizar a separação dos compostos.

2.3 FASE MÓVEL E CONDIÇÕES DO LC

A fase móvel utilizada para cromatografia foi composta de metanol grau HPLC e água ultrapura (ambos acidificados a 0,1% com ácido fórmico graus HPLC e com 5mM de formiato de amônio). Para separação foram testados diferentes gradientes variando a proporção de metanol no início de 5% a 50%.

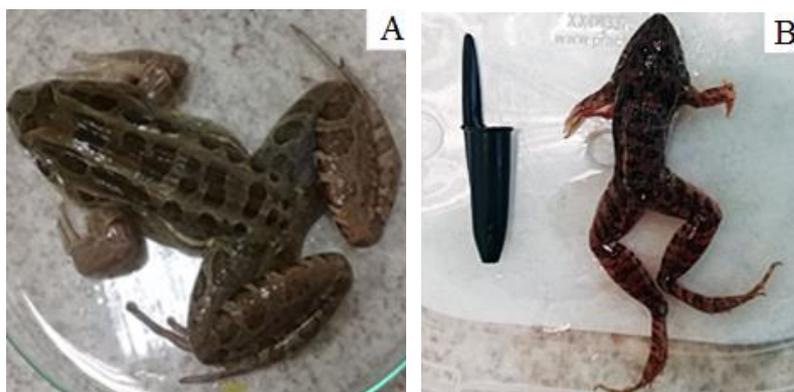
As condições do LC para as análises foram as seguintes: temperatura do forno 50°C , vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna analítica Athena C18-WP, 100Å (50 mm x 2,1 mm d.i x 3,0 μm), marca CNW Technologies® (Duesseldorf, Alemanha).

2.4 COLETA DE INDIVÍDUOS

Para otimização, validação e aplicação do método foram coletados dois indivíduos adultos de rãs da espécie *Leptodactylus latrans* (Figura 3A). A escolha desta espécie se deu pela massa corpórea que possui maior quantidade comparada a outras espécies da região, fazendo com que poucos indivíduos fossem eutanasiados. Já para aplicação do método foram coletados 15 indivíduos de rãs da espécie *Leptodactylus fuscus* (Figura 3B) independente do sexo, idade e peso para o estudo em si.

Esta última espécie foi selecionada pelo fato de estar presente em abundância em dois habitats distintos, permitindo uma comparação dos dados. Ambas as espécies foram coletadas em campo por busca ativa durante a noite ou por armadilha de queda *pitfall*. Em laboratório, os indivíduos coletados foram anestesiados com cloridrato de lidocaína e mantidos em refrigeração. A permissão para o uso dos animais no presente trabalho está protocolada sob o CEUA nº 7854080719 (ID 000095).

Figura 3 – Espécies de rãs utilizadas no estudo.



Fonte: Autora, 2019. A- *Leptodactylus latran*. B - *Leptodactylus fuscus*.

2.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Para a extração dos agrotóxicos na matriz tecidual, foi utilizada a técnica de preparo de amostra denominada Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex - VA-MSPD. Em um primeiro momento as amostras foram preparadas no intuito de otimizar o método, assim, inicialmente foram testadas por análise univariada: quantidade de amostra (0,5 e 1,0 g) e tipo de suporte sólido (quitosana, sílica, C18). Depois de definido sorvente e quantidade de amostra, foram testados por análise multivariada, através de um planejamento fatorial outras variáveis como, tipo de solvente (acetoneitrila e metanol) e suas quantidades, quantidade de suporte sólido (sorvente) (0 a 1,5 g) e quantidade de sulfato de magnésio (0 a 1,5 g) (Tabela 3). Para verificar a eficiência de extração dos agrotóxicos na matriz com o método proposto, as amostras foram fortificadas com a mistura padrão (M7) em concentrações conhecidas (nível de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a extração foi realizada.

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental.

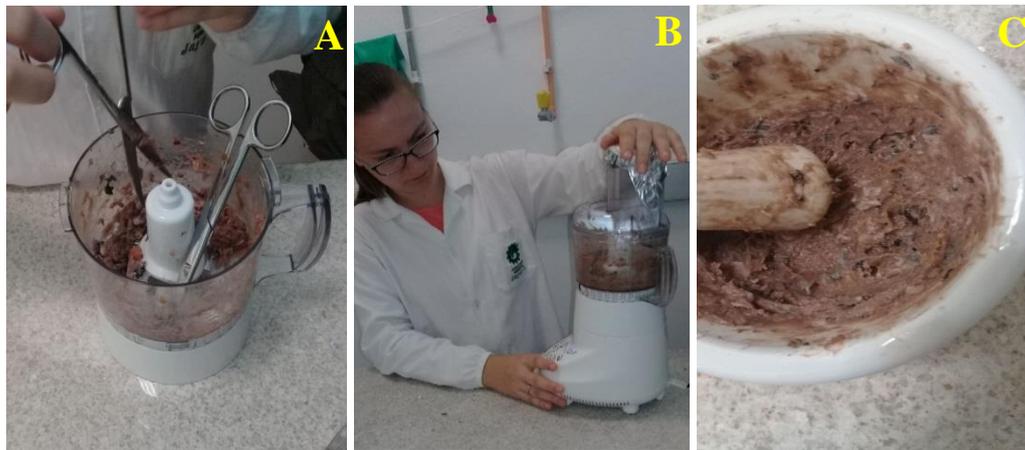
Experimento	C18 (g)	MeCN (mL)	MeOH (mL)	Na ₂ SO ₄ (g)
17	0,0	2,0	2,0	1,0
11	1,5	1,5	2,5	0,5
8	0,5	2,5	2,5	1,5
13	1,5	2,5	1,5	0,5
10	1,5	1,5	1,5	1,5
9	1,5	1,5	1,5	0,5
22	1,0	2,0	3,0	1,0
12	1,5	1,5	2,5	1,5
5	0,5	2,5	1,5	0,5
25 (C)	1,0	2,0	2,0	1,0
24	1,0	2,0	2,0	2,0
15	1,5	2,5	2,5	0,5

Experimento	C18 (g)	MeCN (mL)	MeOH (mL)	Na ₂ SO ₄ (g)
20	1,0	3,0	2,0	1,0
18	2,0	2,0	2,0	1,0
7	0,5	2,5	2,5	0,5
14	1,5	2,5	1,5	1,5
2	0,5	1,5	1,5	1,5
23	1,0	2,0	2,0	0,0
3	0,5	1,5	2,5	0,5
19	1,0	1,0	2,0	1,0
4	0,5	1,5	2,5	1,5
6	0,5	2,5	1,5	1,5
1	0,5	1,5	1,5	0,5
21	1,0	2,0	1,0	1,0
16	1,5	2,5	2,5	1,5
26 (C)	1,0	2,0	2,0	1,0

Fonte: Autora, 2019.

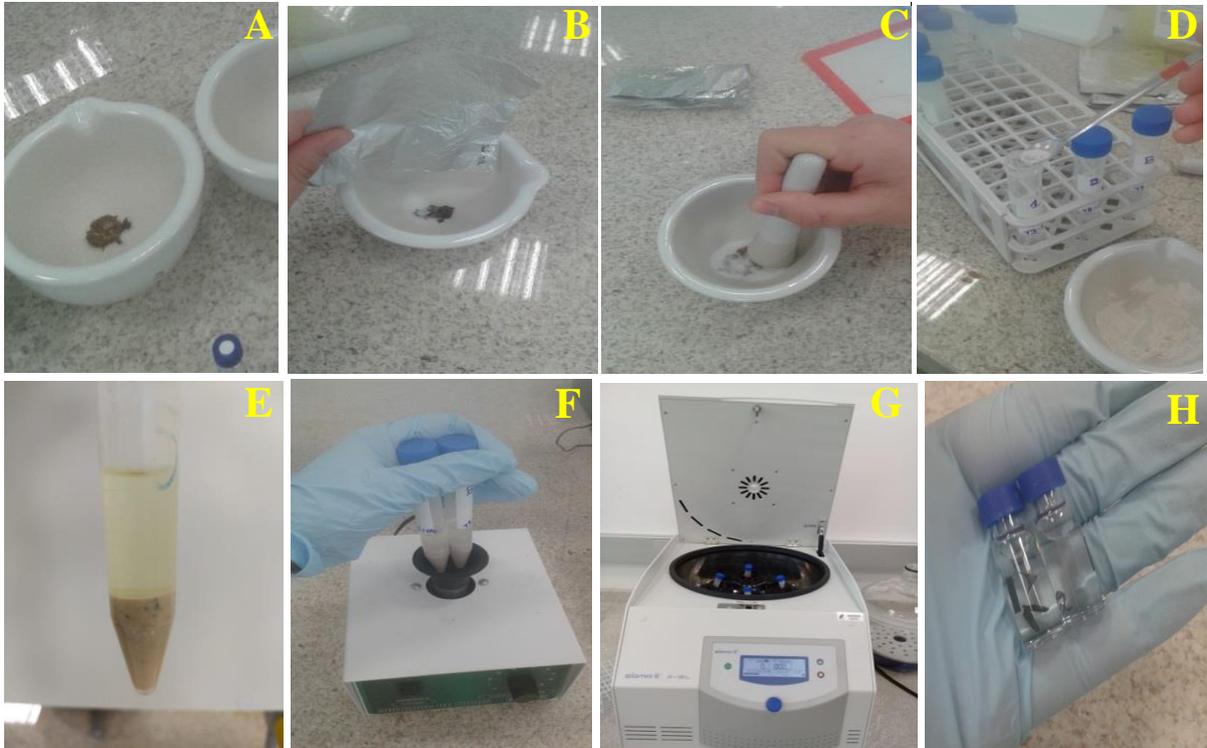
Para os testes, foram utilizados os corpos inteiros das rãs, com exceção do fígado, ovócitos, estômagos. O fígado foi processado separadamente. As amostras foram trituradas em um processador de alimentos (Cuisinart® – SmartPower Duart®) e depois o material foi macerado com pistilo em um gral. Em seguida foi transferido para um tubo do tipo Falcon, pesado e armazenado no freezer para utilização posterior e aplicação da VA-MSPD.

Figura 4 – Trituração das amostras e homogeneização.



Fonte: Autora, 2019. A – Cortes dos pedaços maiores. B – Trituração. C – Homogeneização.

Figura 5 – Preparo da amostra através da técnica VA - MSPD .



Fonte: Autora, 2019. A – Amostra; B - Adição do sal e suporte sólido; C – Maceração por 5min; D – Transferência do material para tubo falcon; E – Adição de solvente; F – Agitação em vórtex; G - Centrifugação; H – Remoção do sobrenadante para injeção no cromatógrafo.

2.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para determinação dos agrotóxicos foi utilizado equipamento de Cromatografia Líquida - LC, como detector de Espectrometria de Massas, LCMS 2020 SHIMADZU® (Figura 6) com fonte de ionização por *Electrospray* (ESI), analisador de massa tipo Quadrupolo e sistema de aquisição de dados LabSolutions®.

Figura 6 - LCMS 2020 SHIMADZU®.



Fonte: Autora, 2019.

2.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método proposto foi realizada respeitando os parâmetros de validação de métodos analíticos impostos pelos órgãos regulamentadores nacionais: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2017) e Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia – INMETRO (2018). Dentre estes parâmetros estão: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, exatidão (em termos de recuperação), repetibilidade e precisão intermediária. Além destes parâmetros, podem ser citados como complementares, robustez e efeito de matriz, os quais não foram abordados nessa validação.

2.7.1 Seletividade

Para atender a este quesito importante que representa o quanto seletivo é o método para selecionar sem erro o analito de interesse mesmo na presença de outros interferentes (LANÇAS, 2004), foram observadas as injeções brancas de solvente, soluções individuais e a mistura de padrões.

2.7.2 Linearidade

Para garantir a linearidade do método, foi construída uma curva de calibração em solvente metanol com pelo menos cinco pontos distintos, onde o eixo x corresponde a diferentes concentrações do padrão e o eixo y representa o sinal resultante de cada concentração em unidades de área. Através das curvas de calibração foram calculados os coeficientes de correlação e de determinação (r e r^2).

2.7.3 Exatidão

Referente à exatidão, foram realizadas fortificações das amostras em 5 níveis de concentração de $8 - 160 \mu\text{g kg}^{-1}$ e empregado o método proposto, e comparando com concentração obtida nos padrões. Os valores obtidos devem estar na faixa de 70 a 120%, para o método ser aceito como exato.

2.7.4 Precisão

A precisão do método foi obtida através da repetibilidade dos experimentos e expresso em Desvio Padrão Relativo - RSD, que corresponde a repetibilidade do experimento no mesmo dia e em diferentes dias.

2.7.5 Limites de Quantificação (LOQ)

Como os agrotóxicos estão presentes a níveis de traços, para verificar quais níveis mínimos de concentração o método foi capaz de quantificar, foram preparadas amostras com fortificações em diferentes concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (8, 16, 32, 80, 160). Foi considerado limite de quantificação quando a relação sinal ruído é maior 10 vezes.

2.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Depois de validado o método para *L. latrans*, o mesmo foi aplicado para outra espécie de rã da mesma família, *L. fuscus*. Para verificar se o método responde da mesma forma para espécies diferentes, foram realizadas fortificações (a nível de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$) e extrações em tecido e fígado, de indivíduos de uma região não agrícola, local “controle”.

Sendo assim, o método foi aplicado com o objetivo de analisar os sete agrotóxicos de estudo no tecido de *L. fuscus* em amostras provenientes de agroecossistemas (Candido Godói - RS). Essas amostras foram separadas em tecido (três indivíduos adultos), fígado (de três indivíduos adultos) e corpo inteiro (de um indivíduo jovem). Já as amostras do local “controle” (Cerro Largo - RS), foram separadas em tecido e fígado adulto.

2.9 ANÁLISE DE ÁGUA

Além da investigação dos sete agrotóxicos em rãs, foi feita uma análise da água para os agrotóxicos, com exceção do pirazosulfuron. A água foi coletada em uma vala da lavoura, no mesmo local e no mesmo período em que foram coletadas as rãs. A técnica empregada para o preparo da amostra foi SPE - *Solid Phase Extraction* e o sistema de análise se deu por LC-MS. O método utilizado foi o método que estava sendo usado como rotina no laboratório para análise de águas. O qual utiliza 250 mL de água acidificada com ácido fosfórico, essa amostra percola cartuchos comerciais de 3 ml, contendo 500 mg de C18. Logo após a amostra é eluída com 2 mL de metanol e injetado no LC-MS. Esse método foi validado em 2018 para 23 agrotóxicos em água.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 FASE MÓVEL

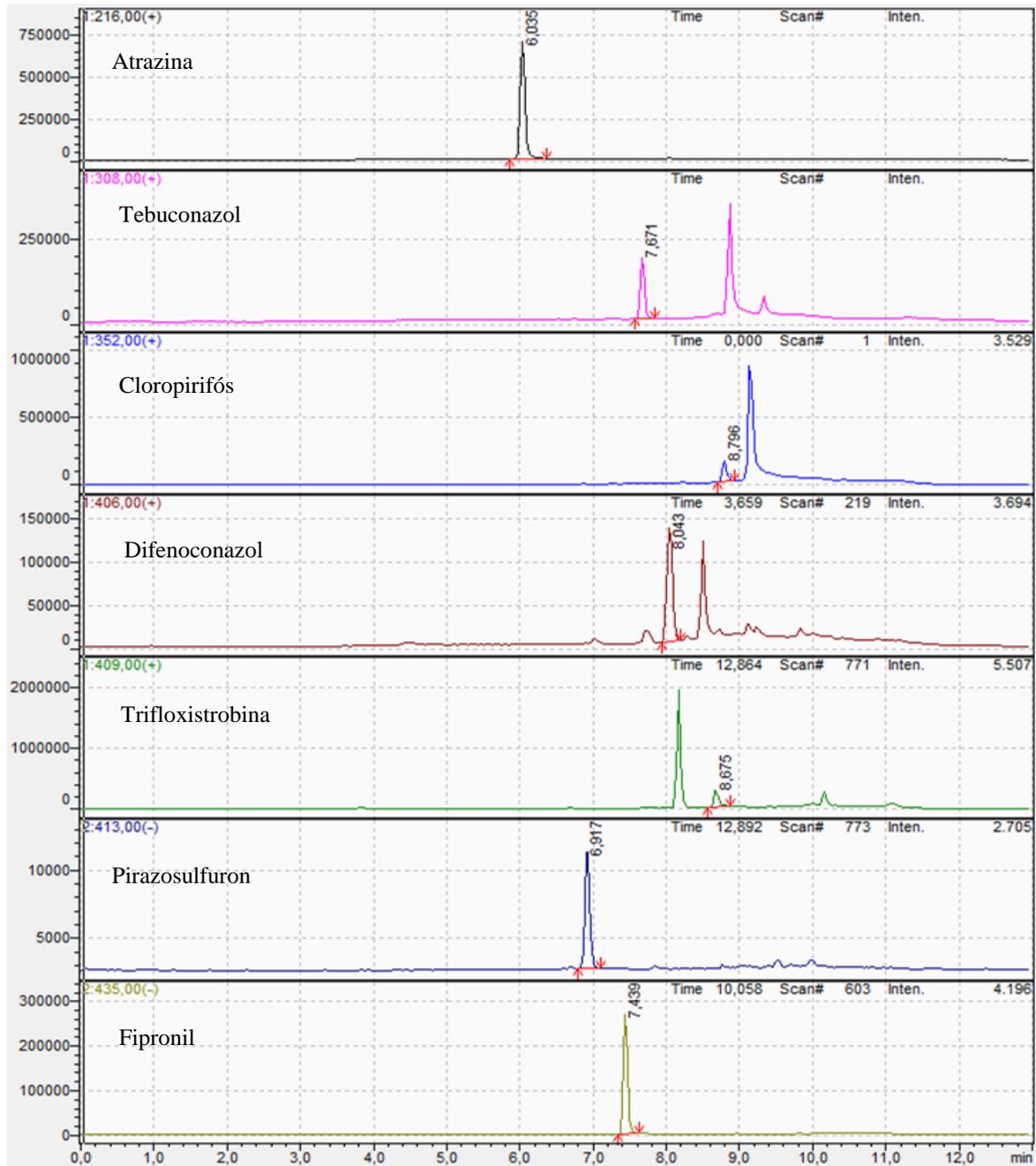
Dentre as fases móveis testadas, quando iniciado com 5% de metanol os compostos saíram todos em torno de 7 e 8 minutos, deixando os picos muito sobrepostos. A fase móvel que apresentou melhores resultados foi a representada abaixo (Tabela 4), onde inicia com 10% de metanol. Esta condição foi a que resultou em cromatogramas com melhores formatos de picos (Figura 7), com tempos variando entre 6 e 8 minutos, portanto foi a selecionada no método.

Tabela 4 - Gradiente de eluição empregada no método.

Tempo (min)	Quantidade de solvente mL
0,01	10
0,25	10
2,00	48
8,00	100
9,00	100
11,00	10

Fonte: Autora, 2019.

Figura 7 – Cromatogramas do modo SIM para padrão de concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos investigados.

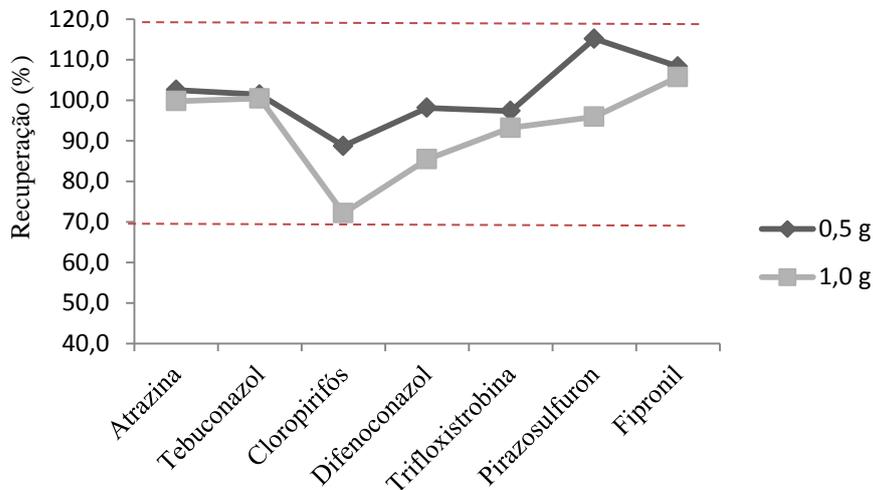


Fonte: Autora, 2019.

3.2 CONDIÇÕES DO PREPARO DA AMOSTRA

A partir dos experimentos utilizando massas de amostra de 0,5 e 1 g (usando 1 g de suporte sólido), foi observado que ambos apresentavam resultados satisfatórios, com recuperações de 70 - 120% (Figura 8), mas como o objetivo era consumir a menor quantidade de massa possível para evitar o sacrifício de um número elevado de indivíduos, foi estabelecido o uso de 0,5 g.

Figura 8 – Recuperações obtidas utilizando diferentes massas de amostras.

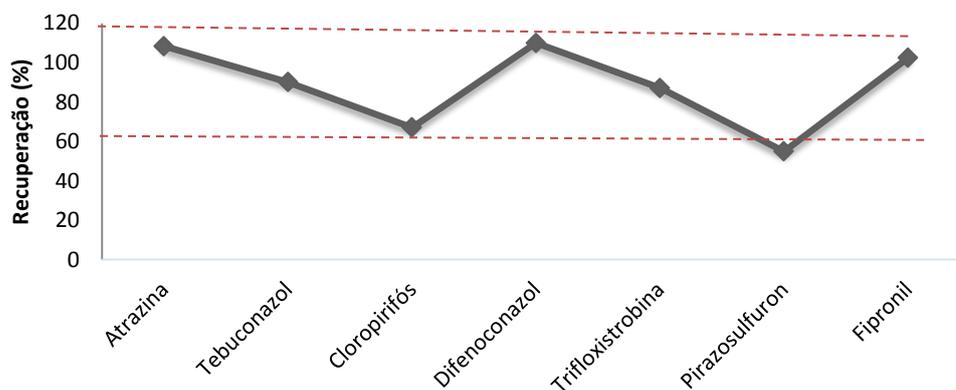


Fonte: Autora, 2019. Demais condições empregadas: 4 mL de MeCN, 1 g sorvente C18, 1 g Na₂SO₄.

Nos testes de diferentes suportes sólidos, como quitosana, sílica e C18, verificou-se que não foram obtidas recuperações satisfatórias empregando a quitosana (dados não apresentados). Resultados similares foram obtidos em um estudo de determinação de agrotóxicos em peixes empregando VA-MSPD e GC nas condições 0,2 g de amostra, 2,0 g de C18_R, 0,2 g de sulfato de sódio e 5 mL de acetato de etila, onde na recuperação não foi possível observar nenhum dos analitos, da mesma forma que no presente trabalho também não apresentou recuperações dentro das estabelecidas (VIEIRA *et al.*, 2018b).

Utilizando a sílica como suporte sólido, os resultados de recuperação ficaram aceitáveis para maioria dos agrotóxicos, exceto para o clorpirifós e para o pirazosulfuron, os quais apresentaram valores de recuperação ficaram abaixo de 70% (Figura 9). Isso fez com que fosse descartado o uso desse suporte sólido no método.

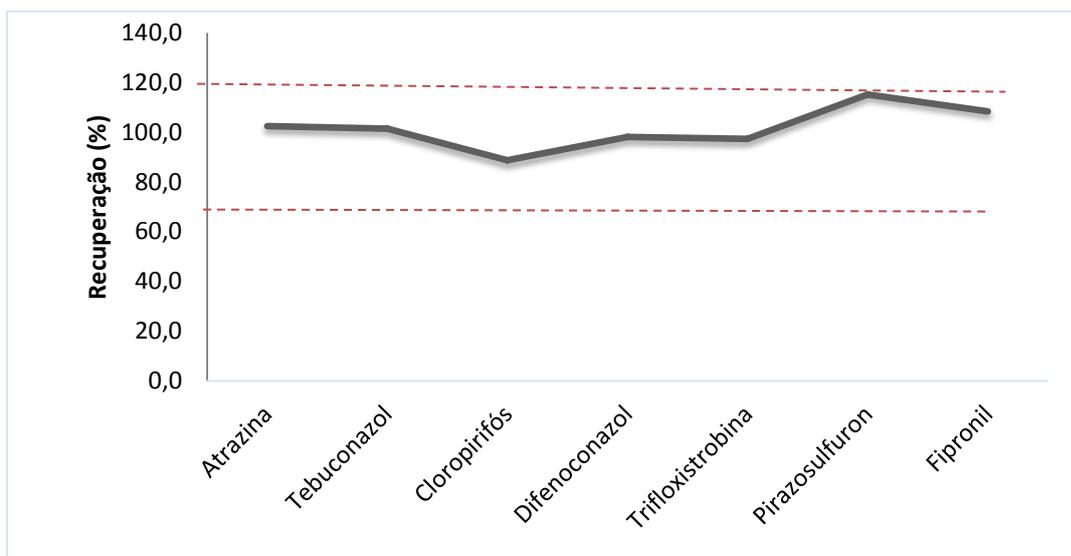
Figura 9 – Recuperações obtidas utilizando sílica para a dispersão da matriz.



Fonte: Autora, 2019. Demais condições empregadas: 4 mL de MeCN, 0,5 g amostra, 1 g sorvente, 1 g Na₂SO₄.

Já quando utilizado o sorvente C18 novo, as recuperações ficaram entre 70 - 120 % para todos os sete agrotóxicos (Figura 10). O C18 por ter característica apolar, retém componentes lipofílicos (BARKER; LONG; SHORT, 1989), o que auxilia na limpeza da amostra.

Figura 10 - Recuperações obtidas utilizando C18.



Fonte: Autora, 2019. Demais condições empregadas: 0,5 g de amostra, 1 g Na₂SO₄, 4 mL de MeCN.

Embora o C18 tenha sido o suporte sólido que apresentou recuperações entre 70 e 120% para todos os agrotóxicos, demonstrando sua eficiência para a matriz de estudo, testou-se C18 reutilizado proveniente de cartuchos de SPE usados. Quanto ao C18-R, obtivemos resultados de recuperação similares ao C18 novo (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre resultados (recuperação e RSD em %) obtidas para cada agrotóxico utilizando C18 novo e C18 reutilizado.

Agrotóxico	C18 novo		C18 reutilizado	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Atrazina	94,1	3,9	92,5	5,4
Tebuconazol	79,7	7,3	94,5	1,0
Clorpirifós	72,0	2,2	76,6	1,2
Difenconazol	85,1	5,6	90,8	1,5
Trifloxistrobina	77,3	1,1	90,1	1,3
Pirazosulfuron	108,8	13,1	115,2	1,6
Fipronil	105,2	9,7	114,2	3,6

Fonte: Autora, 2019.

O C18 reutilizado foi empregado pela primeira vez por Rodrigues *et al.* (2012) e se mostrou eficiente para determinação de dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol em cebola (RODRIGUES *et al.*, 2012). Assim como para de Caldas *et al.* (2013) na determinação de dimetoato, atrazina, clomazona, fenitrotião, malatião, fipronil e tebuconazol em hepatopâncreas de caranguejo (CALDAS *et al.*, 2013). Neste sentido, o C18 reutilizado acaba sendo uma alternativa eficiente, econômica e ecologicamente correta, uma vez que demonstra a possível seletividade do material para ser utilizado.

Diante dos experimentos multivariados usados para determinação da quantidade dos materiais a serem usados (suporte sólido e sal), as condições que apresentaram melhores resultados foram os que utilizaram ambas 1g de C18 e Na₂SO₄. A quantidade de C18 definida (1 g) é considerada uma quantidade relativamente alta, por isso é interessante o uso de materiais alternativos, como o C18 reutilizado.

No que se refere ao solvente utilizado para extração dos analitos, foram testados na matriz multivariada a mistura dos dois solventes (acetonitrila e metanol). Os melhores resultados foram com a mistura de 2 mL de cada no ponto central. Portanto foi realizado um outro experimento univariado, testando ambos separadamente (Tabela 6). Assim foi possível concluir que com metanol, as recuperações ficam fora da faixa ideal (70 - 120%) para dois compostos. Ao contrário do que mostrou os resultados do uso da acetonitrila individualmente, onde foram obtidas recuperações dentro da faixa esperada, para quase todos os agrotóxicos, exceto para atrazina, nesse experimento. Desta forma a acetonitrila foi selecionada como solvente de extração para os agrotóxicos em estudo.

Tabela 6 – Respostas de recuperação e RSD (%) obtidas para cada agrotóxico utilizando diferentes solventes.

Agrotóxico	4 mL de MeOH		4 mL de MECN	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Atrazina	69,7	3,02	58,9	15,51
Tebuconazol	77,2	3,82	71,6	12,61
Cloropirifós	48,0	5,38	97,9	13,68
Difenoconazol	93,8	2,75	84,6	13,10
Trifloxistrobina	66,8	3,15	73,5	13,27
Pirazosulfuron	156,3	16,07	93,2	13,76
Fipronil	107,5	3,05	97,2	12,62

Fonte: Autora, 2019.

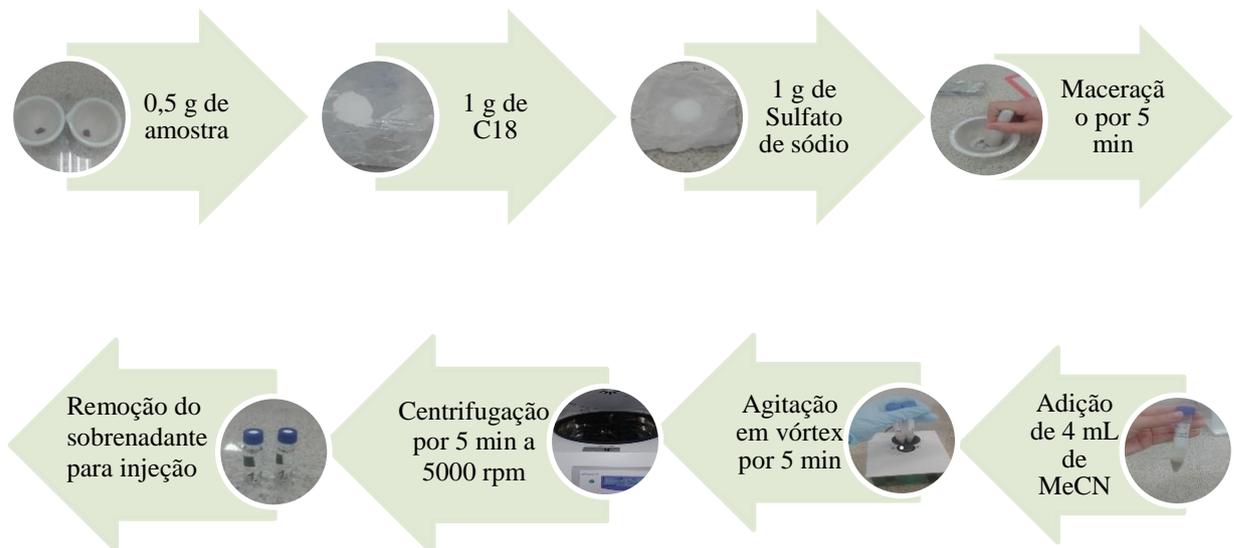
Embora alguns trabalhos como o de determinação de hormônios em matriz de solo (ALBERO *et al.*, 2013) tenham obtido recuperações boas a partir da mistura entre os solventes acetonitrila e metanol, o presente estudo não apresentou o mesmo resultado,

provavelmente porque as características do analito e da matriz de estudo são diferentes. No entanto, em um outro estudo que determinou agrotóxicos (incluindo dois mesmos desse estudo) em tecido de peixe, que por sua vez tem maior similaridade de composição tecidual com a matriz (rã), a melhor recuperação foi alcançada usando acetonitrila como solvente (CALDAS *et al.*, 2013), corroborando com os resultados do nosso trabalho. Este solvente é considerado adequado porque devido a sua polaridade, diminui a capacidade de extração de interferentes como lipídeos (SOUZA *et al.*, 2013) garantindo maior seletividade.

A quantidade fixada de acetonitrila ficou em 4 mL por amostra, pois foi a menor quantidade possível de ser usada para obtenção de uma alíquota considerável para injeção. Aqui também se priorizou pelo uso da menor quantidade possível de solvente, o que torna o método ainda mais ambientalmente seguro.

Em síntese, a condição de materiais e quantidades que apresentou melhores recuperações para o preparo da amostra, é representada na esquematização abaixo (Figura 11). Salientando que os tempos de fortificação, maceração, centrifugação e velocidade de centrifugação foram baseados no utilizados por Soares (2019) e Vieira e colaboradores (2018).

Figura 11 – Esquematização do preparo da amostra (VA-MSPD) nas condições definitivas do método.



Fonte: Autora, 2019.

3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O presente método foi seletivo, pois apesar de interferentes presentes, no tempo de retenção dos analitos não houve nenhum outro sinal. Através das curvas de calibração observou-se que o método é linear com coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2) acima de 0,99 para todos compostos, estando dentro do que é recomendado pelo INMETRO (2018) (Tabela 7) (Anexo A).

Tabela 7 – Linearidade do método.

Agrotóxico	Equação da curva de calibração	r^2	r
Atrazina	$Y = 145.332X + 413.155$	0,998	0,999
Tebuconazol	$Y = 37.468,9X - 90.973,4$	0,999	0,999
Clorpirifós	$Y = 18.249,8X + 145.326$	0,999	0,999
Difenoconazol	$Y = 38512,1X - 60.149,7$	0,996	0,998
Trifloxistrobina	$Y = 314.136X + 44.607,8$	0,999	0,999
Pirazosulfuron	$Y = 1.998,51X - 2.808,34$	0,996	0,998
Fipronil	$Y = 33.696,5X + 69.901,6$	0,999	0,999

Fonte: Autora, 2019. r^2 - Coeficiente de determinação; r - Coeficiente de correlação.

Quanto à exatidão e precisão os resultados também estão dentro do estabelecido pelas normativas onde este trabalho foi baseado (ANVISA e INMETRO). As recuperações foram de 67 - 128%, consideradas aceitáveis, pois os resultados obtidos para amostras fortificadas e padrão são relativos e apresentaram recuperações entre 70 e 120 %. Da mesma forma que, o parâmetro da precisão do método também é atingido, em termos de repetibilidade, tendo de 0,4 a 21%.

Referente aos limites de quantificação do método (LOQm), em relação as concentrações testadas, baseadas no limite instrumental, no nível de $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ (correspondendo a $1 \mu\text{g L}^{-1}$) somente a trifloxistrobina recuperou entre 70 e 120 %, com RSD menor que 20 (Tabela 8), sendo considerado o LOQm para esse composto (Tabela 9). Por outro lado, o clorpirifós recuperou no primeiro dia a partir de $80 \mu\text{g kg}^{-1}$, e no segundo dia não recuperou em nenhum nível. No entanto, no terceiro dia recuperou em todos níveis. Assim, foi considerado para clorpirifós $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ como LOQm. Atrazina recuperou dentro da faixa esperada a partir de $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ no segundo dia, assim foi inserido um nível de $32 \mu\text{g kg}^{-1}$, o qual foi repetido em dois dias e recuperou tanto para atrazina como tebuconazol, sendo então considerado LOQ para ambos (Tabela 8 e Tabela 9)

Tabela 8 – Exatidão do método em termos de recuperações (%) e repetibilidade obtidas em termos de desvio padrão relativo (RSD %).

	Dia 1								Dia 2								Dia 3									
	8 µg kg ⁻¹		16 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹		160 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		16 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹		160 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		16 µg kg ⁻¹		32 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹		160 µg kg ⁻¹	
	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec.</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec</i>	<i>RSD</i>	<i>Rec.</i>	<i>RSD</i>
Atr.	143,3	10,5	117,3	6,2	89,6	2,7	91,5	11,8	129,5	13,7	168,0	2,5	114,7	1,5	99,4	1,8	154,6	6,2	128,6	3,1	123,4*	4,6	98,4	2,6	83,1	5,4
Teb.	311,5	19,2	334,3	5,3	114,4	2,1	93,8	17,7	431,0	4,8	255,3	4,2	97,5	2,9	84,6	0,8	350,6	8,3	178,7	9,0	123,9*	7,9	103,5	5,1	84,6	7,2
Clo.	263,7	4,8	167,7	24,9	92,9*	4,1	103,2	12,7	335,3	16,1	369,6	9,3	729,1	55,8	448,5	18,3	96,1	5,3	99,6	10,8	91,8	3,9	92,8	12,8	71,6	7,2
Dif.	431,1	1,5	160,6	12,5	83,75	8,36	75,2	2,8	130,6	7,0	86,4	5,2	67,9	0,4	76,3	0,7	103,2	10,2	83,1	5,6	78,4*	3,9	69,4	4,1	69,8	1,5
Tri.	79,1*	8,1	92,8	5,8	69,6	10,6	76,5	4,1	97,3	13,8	76,5	9,4	61,2	12,7	69,9	0,2	76,1	16,9	79,4	5,5	68,3	2,1	67,4	10,0	71,2	2,6
Pir.	4908,9	18,1	2193,6	15,1	792,6	18,7	227,9	10,5	168,4	14,9	96,8*	8,3	77,3	5,3	84,4	2,9	139,1	30,6	92,6	21,2	105,3	10,6	95,1	7,2	85,1	6,4
Fip.	128,6	19,5	108,1*	19,5	87,5	4,0	83,5	19,6	137,3	14,0	107,0	10,8	87,2	0,4	105,9	2,7	90,6	12,0	79,5	6,0	77,9	3,9	70,5	3,6	71,5	1,6

Fonte: Autora, 2019. *Nível o qual foi selecionado para LOQm para cada analito.

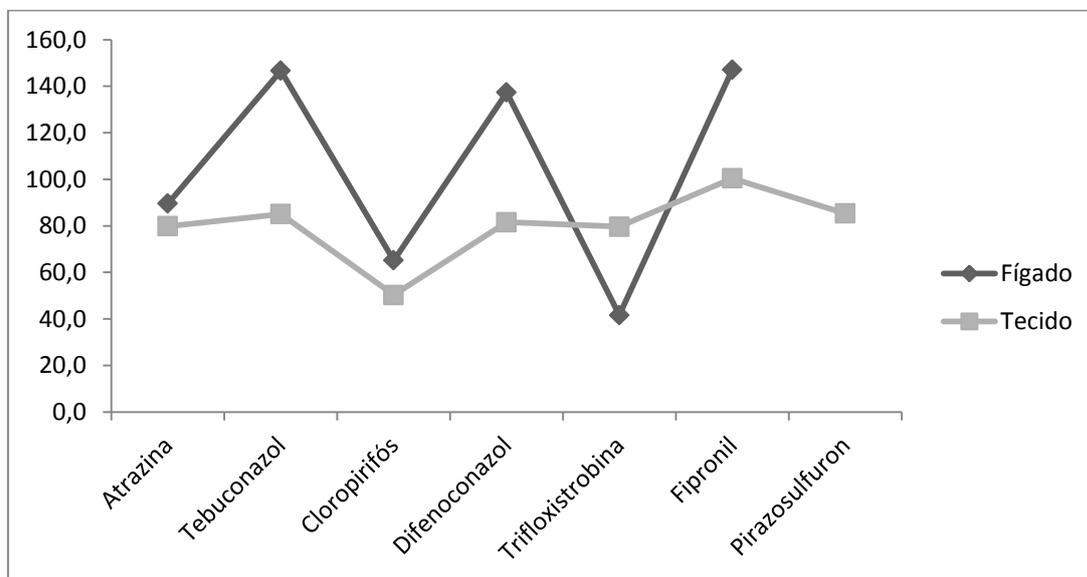
Tabela 9 – Limite de quantificação dos compostos - LOQ.

Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Atrazina	32
Tebuconazol	32
Clorpirifós	80
Difenoconazol	32
Trifloxistrobina	8
Pirazosulfuron	16
Fipronil	16

Fonte: Autora, 2019.

3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Com os experimentos realizados e com o método validado para *L. latrans*, foi possível concluir que o método também pode ser utilizado para outra espécie, *L. fuscus*, pois esta última também apresenta recuperações entre 70 - 120 % para a maioria dos agrotóxicos, no nível testado. No entanto, este método somente é válido para os 7 agrotóxicos o tecido (mistura de pele e musculo) de *L. fuscus*, uma vez que, as recuperações para fígado não foram boas para todos os agrotóxicos, especialmente para pirazosulfuron (Figura 12).

Figura 12 – Recuperações (%) obtidas em fígado e tecido de *L. fuscus*.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. *Recuperação do pirazosulfuron no fígado: 1732,8. Condições empregadas: 0,5 g de amostra, 1 g sorvente, 1 g Na_2SO_4 , 4 mL de MeCN.

Este resultado indica que possivelmente este método proposto e validado de determinação de agrotóxico em tecido, pode ser extrapolado para outras espécies de rãs ou até mesmo para outros anuros, como sapos e pererecas. Mas para tal afirmação, como sugestão futura, outros trabalhos precisam ser realizados.

O resultado obtido para o fígado, mostra que cada matriz é única, tem uma composição diferente, portanto, necessita de um método de extração específico.

3.4.1 Amostras de agroecossistemas

A partir da aplicação do método em *L. fuscus* provenientes do agroecossistema, foi possível concluir que para as amostras de tecido e fígado de indivíduos adultos e indivíduo jovem foram quantificados valores acima do LOQ os seguintes agrotóxicos: tebuconazol, difenoconazol e trifloxistrobina. Os demais agrotóxicos dos sete investigados ficaram abaixo do LOQ, não foram detectados ou ainda, não foram quantificados (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) da determinação de agrotóxicos em *L. fuscus* de agroecossistemas.

Agrotóxico	Tecido Adulto	Fígado adulto	Corpo inteiro jovem
Atrazina	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹
Tebuconazol	< LOQ	35,2	31,2
Clorpirifós	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹
Difenoconazol	36	38	ND
Trifloxistrobina	16,88	Não quantificado ²	< LOQ
Pirazosulfuron	ND	Não quantificado ²	ND
Fipronil	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Fonte: Autora, 2019. (1) Ruído alto no equipamento interferindo na determinação. (2) Não foi recuperado no teste nessa matriz. ND – Não detectado.

Como é possível notar na tabela anterior, alguns compostos tem o mesmo comportamento para ambas as amostras, como por exemplo, a atrazina e o clorpirifós que não foram possíveis quantificar por motivos de ruído do equipamento. Assim como também, para o pirazosulfuron nenhuma amostra deu positiva, indicando que ele não é usado no local, degradou-se ou não se acumulou.

Uma observação importante que pode ser feita quanto ao difenoconazol, é que em amostras de indivíduos adultos o mesmo está presente, mas no indivíduo jovem não está, sendo que, ambos foram coletas no mesmo local. Neste caso, uma justificativa seria que o acúmulo aumenta com o passar do período de exposição, como colocado por vários autores.

O interessante é que para o tebuconazol o indivíduo jovem foi quantificado com valores maiores dos detectados em tecido nos indivíduos adultos (<LOQ). Isso reforça a ideia de que possivelmente outros fatores além do tempo de exposição podem influenciar na bioacumulação destes compostos.

Os agrotóxicos que deram positivo nas amostras e que apresentam valores acima do LOQ como difenoconazol, tebuconazol e trifloxistrobina, são ambos fungicidas. Curiosamente, as rãs foram coletadas em um período onde a soja estava em um estágio onde recebe esse tratamento de fungicidas. Já o fipronil que apresentou detecções abaixo do LOQ, é um inseticida, que também é utilizado neste período de desenvolvimento da soja.

Para o difenoconazol e tebuconazol, percebe-se que no fígado os valores estão acima dos encontrados no tecido. Ao contrário do que é observado por John e Prakash (2003) em um estudo de acúmulo de carbaril e metasystox em órgãos de peixes, onde a concentração foi maior nos músculos do que no fígado. Um dos motivos para tal diferença é quanto ao tipo de vida entre anuros e peixes, pois como os peixes estão expostos o tempo todo a água, a contaminação do tecido é mais provável por difusão, já para os anuros a principal forma de contaminação provavelmente é através da dieta, fazendo com que os compostos sejam distribuídos pelo corpo, principalmente em órgão lipofílicos.

3.4.2 Amostras do local “controle”

Para as amostras do local julgado como não ou pouco contaminado, foi quantificado o pirazosulfuron no tecido acima do LOQ, cloropirifós e tebuconazol no fígado menor que LOQ e trifloxistrobina no tecido menor LOQ, como pode ser observado na tabela a seguir (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados da determinação de agrotóxicos (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) em *L. fuscus* do local “controle”.

Agrotóxico	Tecido	Fígado
Atrazina	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹
Tebuconazol	ND	< LOQ
Cloropirifós	ND	< LOQ
Difenoconazol	ND	ND
Trifloxistrobina	< LOQ	Não quantificado ²
Pirazosulfuron	30,6	Não quantificado ²
Fipronil	Não quantificado ¹	Não quantificado ¹

Fonte: Autora, 2019. (1) Ruído alto no equipamento interferindo na determinação. (2) Não foi recuperado. ND – Não detectado.

Os resultados obtidos para as amostras deste local indicam que mesmo sendo um local próximo a zona urbana e mais distante de propriedades agrícolas, onde existe o maior uso de agrotóxicos, pode estar ocorrendo o processo de contaminação das rãs por outros meios, como dieta, contato com o solo, poeira, chuva, etc. (MORESCO; MARGARIDO e DE OLIVEIRA, 2014).

Fazendo um comparativo entre as duas áreas de estudo, percebe-se que uma variedade maior de agrotóxicos foi encontrada em amostras de rãs do agroecossistema, provavelmente pela diversidade de compostos usados nestes locais. Neste sentido, é possível afirmar que os agroecossistemas apresentam maior risco de contaminação, justamente por essa variedade de contaminantes que segundo alguns estudos, o efeito da mistura de agrotóxicos pode ser uma problemática ainda maior (HEYES *et al.*, 2006). Em um estudo de Taylor *et al.*, (2005) ficou evidente que a malformação não traumática ou ausências de membros de anuros estava relacionado ao habitat em áreas agrícolas ou próximas a elas.

3.5 ANÁLISE DA ÁGUA

Para a água que foi coletada do mesmo local que as amostras de *L. fuscus*, foram encontrados os agrotóxicos atrazina acima do LOQ, sendo que o LOQ para atrazina corresponde a $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Também foi quantificado o agrotóxico fipronil que estava abaixo do LOQ ($8 \mu\text{g L}^{-1}$). Pirazosulfuron e clorpirifós não estão no scopo do método e difenoconazol e trifloxistrobina não foram detectados em água. Se comparados os resultados encontrados para matriz de rãs e água, percebemos uma divergência, pois o tebuconazol, difenoconazol e trifloxistrobina estão presentes nas rãs, no entanto, na água não foram detectados, o que pode indicar uma bioacumulação, uma vez que estes compostos tem a propriedade de serem mais hidrofóbicos.

A atrazina foi o único agrotóxico que foi quantificado acima do LOQ na água ($0,01 \mu\text{g L}^{-1}$). Segundo a IUPAC, é um herbicida com solubilidade alta em água e é consideravelmente tóxica para animais aquáticos (IUPAC, 2019). A concentração encontrada na água não apresenta risco, pois de acordo com algum estudos anteriores, os efeitos como anomalias nas gônadas, hermafroditismo dos machos e imunossupressão, somente são observados na exposição à $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (HAYES *et al.* 2002). Nas amostras de rãs não foi possível quantificar devido a um ruído de alta intensidade no equipamento, durante o período que foi realizada a análise dessas amostras.

O fipronil foi o único agrotóxico que foi possível detectar tanto na água como nas amostras de rãs de agroecossistemas e em ambos está abaixo do LOQ. Fipronil é um inseticida que tem baixa solubilidade na água, é pouco persistente nessa matriz, indicando que seu aporte pode ter sido recente na água e aportado em concentrações maiores ao encontrado, além disso é consideravelmente tóxico para peixes (IUPAC, 2019).

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível obter um método validado usando a Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex (VA-MSPD) e detecção por LC-MS para determinação de sete agrotóxicos em matriz de tecido de rãs e três em fígado. Como o método para esta matriz proposto não tem muitos estudos, foi necessária a otimização das principais variáveis do preparo de amostra.

Assim, as condições empregadas que apresentarem resultados satisfatórios foram 0,5 g de amostra, 1 g de C18, 1 g de sulfato de sódio, 4 mL de acetonitrila. O método foi validado respeitando parâmetros obrigatórios de validação de métodos analíticos como seletividade, linearidade, exatidão, precisão e limite de quantificação, propostos pela ANVISA (2017) e INMETRO (2018).

Sendo assim, o método é seletivo, pois apesar de interferentes presentes, no tempo de retenção dos analitos não houve nenhum outro sinal. É linear, apresentando coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2) acima de 0,99 para todos agrotóxicos. Quanto à exatidão os resultados também estão dentro do estabelecido pelas normativas, as recuperações foram de 67-128% consideradas aceitáveis, pois os resultados obtidos para amostras fortificadas e padrão são relativos e apresentaram recuperações entre 70 - 120 %. Da mesma forma que, o parâmetro da precisão do método também foi atingido, em termos de repetibilidade, tendo 0,4-21%. Os limites de quantificação do método ficaram entre 8 e 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

De modo geral, o método desenvolvido e validado mostrou-se eficiente pelos resultados obtidos na validação. Aplicando o mesmo em rãs *L. fuscus* de um agroecossistema foram detectados difenoconazol e trifloxistrobina acima do LOQ e tebuconazol e fipronil abaixo do LOQ. Assim como em rãs da área controle foram pirazosulfuron acima do LOQ e tebuconazol, trifloxistrobina e cloropirifós abaixo do LOQ. Na amostra de água do agroecossistema foram encontrados atrazina acima do LOQ e fipronil abaixo do LOQ.

Estes resultados mostram que a espécie que habita em agroecossistemas apresentam uma maior variedade de agrotóxicos detectados se comparado com aquelas mais afastadas de lavouras, indicando que estes ambientes apresentam maior risco para os animais. Observou-se também no estudo que, mesmo uma área mais afastada das áreas agrícolas, a contaminação de rãs também pode ocorrer por diversas vias indiretas, como água, dieta, vento, poeira.

Embora ainda não se tenha conhecimento sobre os efeitos dos agrotóxicos para os anuros *in natura*, não exista uma referência estabelecida para saber em quais concentrações

cada agrotóxico apresenta perigo para os anuros e devido às inúmeras variáveis que podem contribuir para a contaminação dos indivíduos, considera-se que o método validado no presente estudo seja um passo importante para o monitoramento destes compostos em rãs, uma vez que, os agrotóxicos estão sendo cada vez mais utilizados. Além disso, o avanço das fronteiras agrícolas permite com que algumas espécies de anuros cada vez mais habitam estes locais que apresentam grandes riscos de contaminação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários testes realizados indicam a confiabilidade dos resultados, no entanto por se tratar de matrizes bastante complexas e análise de traços, seria indicado numa continuação do trabalho, uso de padrões internos e cálculos de efeito de matriz.

Também seria indicado o uso de outro equipamento como GC-MS ou LC-MS/MS para confirmação de resultados, assim como o aumento do escopo de compostos contemplados no método.

Os anuros têm periodicidade para serem capturados, pois no inverno, esses hibernam e estão em atividade somente no período reprodutivo. Assim as amostras analisadas foram conservadas em freezer até a validação completa do método, de 8 a 11 meses aproximadamente. Deveriam ser analisadas novas amostras recém coletadas, mas não foi possível captura-los nos últimos meses. Assim, novas amostras serão capturadas nos próximos meses para que se tenham um melhor panorama da problemática na região. Ressaltando que estudos de monitoramento devem ser ao longo de vários anos, assim o presente trabalho foi o primeiro passa para um monitoramento futuro.

REFERÊNCIAS

- ALCOCK, R. E. *et al.* Dioxin-like PCBs in the environment-human exposure and the significance of sources. **Chemosphere**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.1457-1472, out. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753761>. Acesso em: 02 mai. 2019.
- ALBERO, B. *et al.* Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge-amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 39-45, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465128>. Acesso em: 07 set. 2019.
- ALMEIDA, P. R. **Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (anura, leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (anura, bufonidae)**. Orientador: Marcos Vinícius Rodrigues. 2014. 95 f. dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2014. Disponível em: <http://bdtd.unifal-mg.edu.br:8080/bitstream/tede/610/5/DISSERTA%20Priscilla%20Renno%20Almeida%202014.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2019.
- ALONSO, M. B. *et al.* Occurrence of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from Ubatuba and Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Latin American Journal Of Aquatic Mammals**, [s.l.], v. 8, n. 1-2, p.123-130, dez. 2010. Disponível em: <http://lajamjournal.org/index.php/lajam/article/view/338/264>. Acesso em: 16 maio 2019.
- ANDRADE, J. A. B.. **Biocidas anti-incrustantes de terceira geração nas áreas costeiras do Panamá**. Orientador: Ednei Gilberto Primel. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande- RS, 2017. Disponível em: <https://lacom.furg.br/images/Dissertao-Jahir-A-Batista-A-2016.pdf>. Acesso em: 23 maio 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017(Publicada no DOU no.141, de 25 de julho de 2017) Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. 2017. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 16 out. 2019.
- BARKER, S. A.. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 880, n. 1-2, p.63-68, jun. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01290-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01290-X). Acesso em: 27 maio 2019.
- BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, Charles R.. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 475, n. 2, p.353-361, jan. 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301896898?via%3Dihub>. Acesso em: 04 jun. 2019.
- BLAUSTEIN, A. R.; BANCROFT, B. A.. Amphibian Population Declines: Evolutionary Considerations. **Bioscience: Teaching Biology**, [s.l.], v. 57, n. 5, p.437-444, mar. 2007. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/54fe/64dd47ea167fa10de0365df704fc01f3867b.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2019.

BLAUSTEIN, A. R. *et al.* UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: A link to population declines? **Proc Natl Acad Sci Eua**, Estados Unidos, v. 91, n. 5, p.1791-1795, mar. 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43249/pdf/pnas01127-0201.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M.. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.597-608, jul. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>. Acesso em: 21 maio 2019.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D.. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**, [s.l.], v. 272, n. 4, p.52-57, abr. 1995. Disponível em: <http://www.as.wvu.edu/~bio105/pdf/Amphibian%20Decline.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2019.

BEEBEE, T. J.c.; GRIFFITHS, R. A.. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology?. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 125, n. 3, p.271-285, out. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>. Acesso em: 27 maio 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Agrofit. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em 01 de dezembro de 2019.

BRODKIN, M. A. *et al.* ATRAZINE IS AN IMMUNE DISRUPTOR IN ADULT NORTHERN LEOPARD FROGS (RANA PIPIENS). **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.80-84, dez. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1897/05-469.1>. Acesso em: 07 maio 2019.

CALDAS, S. S. *et al.* Antifouling booster biocide extraction from marine sediments: a fast and simple method based on vortex-assisted matrix solid-phase extraction. **Environ Sci Pollut Res Int.**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.7553-7565, mar. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282665>. Acesso em: 03 jun. 2019.

CALDAS, S. S. *et al.* Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.190-213, 2013. Disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v5n3.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

CALDAS, S. S. *et al.* A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. **Talanta**, [s.l.], v. 112, p.63-68, ago. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013002038>. Acesso em: 27 maio 2019.

CHENG, J. *et al.* Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. **Meat Science**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.407-412, ago. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.09.011>. Acesso em: 10 maio 2019.

DÓREA, A. S. Dispersão da matriz em fase sólida. *In*: BORGES, Keyller Bastos; FIGUEIREDO, Eduardo Costa de; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Ltc, 2015. Cap. 9. p. 80-87.

COLLINS, C. H. *et al.* Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP, Brasil: UNICAMP, 2006. 452p.

DÓREA, H. S; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de agrotóxicos em quiabo por CG-EM. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.892-896, dez. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n6/22276.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2019.

ERNST, F. *et al.* Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 631-632, p. 169-179, ago. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718307204?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio 2019.

FELLERS, G. M. *et al.* Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. **Environ Toxicol Chemystri**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.2170-2177, set. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378994>. Acesso em: 07 mar. 2019.

FLORES, A. V. *et al.* **Ambiente & Sociedade**. Organoclorados: um problema de saúde pública. Vol. 7 nº. 2 jul./dez. São Paulo, 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/%0D/asoc/v7n2/24690.pdf> Acesso em: 12 mar.2019.

GADAJ, A. *et al.* Determination of nitroimidazole residues in aquaculture tissue using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Jurnal Of Chromatography B.**, [s.i.], v. 960, p.105-115, jun. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214002621?via%3Dihub>. Acesso em: 31 maio 2019.

GILBERTSON, M. K. *et al.* Immunosuppression in the northern Leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.i.], v. 22, n. 1, p.101-110, nov. 2003. Disponível em: file:///C:/Users/USER/Downloads/Gilbertson_et_al-2003-Environmental_Toxicology_and_Chemistry.pdf. Acesso em: 16 abr. 2019.

HADDAD, C. F. B. **Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção**. Rio Claro. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumeII/Anfibios.pdf>. Acesso em: 29 maio 2019.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A.. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.207-217, mar. 2005. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/anuros/PDFs/Haddad%20&%20Prado%202005%20-%20Reproductive%20modes.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2019.

HAYES, T. B. *et al.* Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact?. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 114, n. 1,

p.40-50, abr. 2006. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.8051>. Acesso em: 27 nov. 2019.

HAYES, T. B. *et al.* Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **PNAS, USA**, v. 99, n. 8, p.5476-5480, abr. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122794/pdf/pq0802005476.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2019.

HEREK, J. S. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. Orientador: Marília Teresinha Hartmann. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Erechim, Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/1780/1/HEREK.pdf>. Acesso em: 25 maio 2019.

HERTZOG, G. I. *et al.* Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 407, n. 16, p.4793-4803, 25 abr. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25910883>. Acesso em: 01 jun. 2019.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>. Acesso em: 30 nov. 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Resultado dos Dados Preliminares do Censo 2017. Rio de Janeiro: IBGE.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=cali_bensaios. Acesso em: 09 out. 2019.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSRVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1 ed. Brasília: ICMBio/MMA. 492 p.. Disponível em: http://icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol1.pdf. Acesso em: 13 de mar. 2019.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2018. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>. Acesso em: 11 dez. 2018.

JOHN, P. J.; PRAKASH, A.. Bioaccumulation of Pesticides on Some Organs of Freshwater Catfish *Mystus vittatus*. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 70, n. 5, p.1013-1016, maio 2003. Disponível em <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00128-003-0083-4.pdf> . Acesso em: 02 mar. 2019.

LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 0, n. 0, p. 17-44, 2008.

LANNON, M. **Declínio de anfíbios: o status de conservação das espécies dos Estados Unidos**. Berkeley: Califórnia, 2005. 1115 p.

LEITE, G. S. dos *et al.* **Determinação de agrotóxicos na água de vertente e poços artesianos próximos a lavouras de soja no município de Senador Salgado Filho- RS**. IX Seminário de Ensino Pesquisa e Extensão – SEPE. Universidade Federal da Fronteira Sul. Cerro Largo, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Nova%20pasta/de%20hoje/13082-Resumo-48101-1-10-20190924.pdf>. Acesso em: 29 nov 2019.

LEMA, T. de; MARTINS, L. A. **Anfíbios do Rio Grande do Sul : catálogo, diagnoses, distribuição, iconografia**. Porto Alegre: Edipucrs, 2011. 196 p. Disponível em: <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/anfibios.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2019.

LEÓN-GONZÁLEZ, M.e.; ROSALES-CONRADO, N.. Determination of ibuprofen enantiomers in breast milk using vortex-assisted matrix solid-phase dispersion and direct chiral liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1514, p.88-94, set. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967317310907?via%3Dihub>. Acesso em: 11 dez. 2019.

MARAGNO, F. P.; CECHIN, S. Z.. Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, [s.l.], v. 99, n. 3, p.237-241, set. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/isz/v99n3/02.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; OLIVEIRA, C. de. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. **Environmental Research**, [s.l.], v. 132, p.6-11, jul. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935114000759>. Acesso em: 12 mar. 2019.

NERIN, C. *et al.* Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides and some metabolites in frogs from National Park of Ordesa and Monte Perdido. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 464, n. 2, p.303-312, ago. 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002004348?via%3Dihub>. Acesso em: 04 jun. 2019.

OLIVEIRA, Lenise Guimarães de. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas para determinação de resíduos em amostras de peixes**. Orientador: Fábio Ferreira Gonçalves. 2019. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

PEREIRA, Janara Pontes. **Espacialização do uso de agrotóxicos por região de saúde no RS**. Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/115201/000956749.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 mar. 2019.

PERES, F., MOREIRA, JC., DUBOIS, GS. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. Fiocruz: Rio de Janeiro, pg. 21-41, 2003. Disponível em:

https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf. Acesso em: 02 de março de 2019.

PÉREZ-RUZAFÁ, A. *et al.* Presence of Pesticides throughout Trophic Compartments of the Food Web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.140-151, fev. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(99\)00193-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(99)00193-9). Acesso em: 13 maio 2019.

PIGNATI, W. A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciênc. saúde coletiva**. 2017, vol.22, n.10, p.3281-3293. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v22n10/1413-8123-csc-22-10-3281.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2019.

QUIROGA, L. B. *et al.* **Chemosphere**. Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? 2019 v 219, p. 671-677. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518323816> Acesso em: 08 mar. 2019.

RELYEA, R. A.. THE LETHAL IMPACT OF ROUNDUP ON AQUATIC AND TERRESTRIAL AMPHIBIANS. **Ecological Applications**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.1118-1124, ago. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1890/04-1291>. Acesso em: 26 abril 2019.

ROCHA, A. A. *et al.* Monitoring of Pesticide Residues in Surface and Subsurface Waters, Sediments, and Fish in Center-Pivot Irrigation Areas. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 26, n. 11, p.2269-2278, nov. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v26n11/0103-5053-jbchs-26-11-2269.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

RODRIGUES, S. A. *et al.* Comparison of matrix solid-phase dispersion and modified QuEChERS methods for extraction of pesticide residues from onion. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.1820-1824, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2ay05491d>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/AY/c2ay05491d#!divAbstract>. Acesso em: 27 nov. 2019.

SANTE. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. SANTE/11945/2015, Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf. Acesso em: 02 maio 2019.

SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H.. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quím. Nova**, São Paulo, v.34, n.4, p.665676, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n4/20.pdf>. Acesso em: 12 Mar. 2019.

SILVA, C. M. M. de S.; FAY, E. F. (Ed.). **Agrotóxico e meio ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400 p.

SILVA, L. A. da; CUNHA, A. de L.; SANTOS, H. S. dos. LEVANTAMENTO DAS ESPÉCIES DE ANUROS (AMPHIBIA: ANURA) NO LAGO PÔR DO SOL E EM SUAS PROXIMIDADES NO MUNICÍPIO DE IPORÁ, GOIÁS, BRASIL. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p.1177-1192, nov. 2011. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20ambientais/levantamento%20das%20especies.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2019.

SILVA, T. V. G. IMPORTÂNCIA DOS ANUROS PARA O EQUILÍBRIO DOS ECOSSISTEMAS.

<http://repositorio.faema.edu.br:8000/bitstream/123456789/529/1/SILVA%2c%20T.%20V.%20G.%20-%20IMPORT%2c%20NCIA%20DOS%20ANUROS%20PARA%20O%20EQUIL%2c%20RIO%20DOS%20ECOSSISTEMAS.pdf>. Acesso em 05 maio 2019.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V.. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.653-658, jun. 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1523-1739.2005.00681.x>. Acesso em: 27 maio 2019.

SMALLING, K. L. *et al.* **Science of the Total Environment**. Pesticide concentrations in the tissues of frogs and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. EU, 2015. v.502 p. 80-90. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714012947?via%3Dihub>. Acesso em: 08 mar. 2019.

SMALLING, K. L. *et al.* Accumulation of pesticides in pacific chorus frogs (*Pseudacris regilla*) from California's Sierra Nevada Mountains, USA. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 9, p.2026-2034, 26 jul. 2013a. Disponível em: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/etc.2308>. Acesso em: 22 maio 2019.

SMALLING, K. L. *et al.* Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.144-153, ago. 2013b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X13002750>. Acesso em: 22 maio 2019.

SMALLING, K. L.; MORGAN, S.; KUIVILA, K. K.. Accumulation of current-use and organochlorine pesticides in crab embryos from northern California, USA. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.2593-2599, 29 jul. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.317>. Acesso em: 10 maio 2019.

SOARES, K. L. **Desenvolvimento de métodos para determinação simultânea de fármacos, filtros UV e biocidas em matrizes ambientais utilizando VA-MSPD E HPLC-(QqLIT)-ESI-MS/MS**. Orientador: Ednei Gilberto Primel. 2019. 184 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

SOUZA, M. R. dos R. *et al.* Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 110, p.395-401, set. 2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X13000891?via%3Dihub>. Acesso em: 04 jun. 2019.

SOUZA, S. P. de. Prefácio. *In*: BASTOS, R. P. *et al.* **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. Goiás: Stylo Gráfica e Editora, 2003. p. 7-8. Disponível em: https://lherp.ecoevol.ufg.br/up/199/o/Parte_1_-_Introdu%C3%A7%C3%A3o.pdf . Acesso em: 13 mar. 2019.

TANG, Yu Y. *et al.* Development of a Quantitative Multi-Class Method for 18 Antibiotics in Chicken, Pig, and Fish Muscle using UPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.1459-1468, 24 mar. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9388-4>. Acesso em: 09 maio 2019.

TAYLOR, B. *et al.* Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb Malformation. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 113, n. 11, p.1497-1501, nov. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310909/>. Acesso em: 28 nov. 2019.

TEMPONE, A. G. *et al.* Amphibian Secretions for Drug Discovery Studies: A Search for New Antiparasitic and Antifungal Compounds. **Letters In Drug Design & Discovery**. [s.l.], p. 67-73. jan. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/233588892_Amphibian_Secretions_for_Drug_Discovery_Studies_A_Search_for_New_Antiparasitic_and_Antifungal_Compounds. Acesso em: 10 maio 2019.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURSIO, F.F.. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, (s.l.), v. 24, n. 68, p.161-172, fev. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n68/14.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2019.

VIEIRA, A. A. *et al.* Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 242, p.475-480, mar. 2018a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617315601?via%3Dihub>. Acesso em: 06 maio 2019.

VIEIRA, A. Alves *et al.* Extraction of chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT, and TCMTB from fish tissues employing the vortex assisted matrix solid-phase dispersion. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 143, p.92-98, dez. 2018b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.034>. Acesso em: 27 maio 2019.

WEBER, J.B. Interaction of Organic Pesticides with Particulate Matter in Aquatic and Soil Systems. **Advances In Chemistry**, [s.l.], v. 111, p.55-120, jun. 1972. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ba-1972-0111.ch004>. Acesso em: 10 abr. 2019.

WRUBLEWSKI, J. **TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae)**. Orientadora: Marília Teresinha Hartmann. 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/1560/1/WRUBLEWSKI.PDF>. Acesso em: 17 maio 2019.

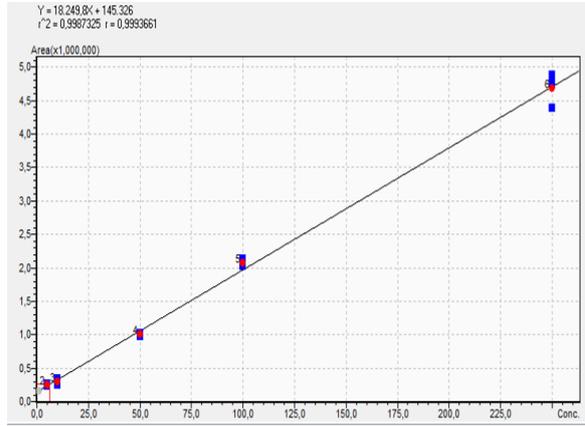
XU, P.; HUANG, L. **Ecotoxology Environmental Safety**. Effects of α -cypermethrin enantiomers on growth, biochemical parameters and bioaccumulation in tadpoles of amphibians of the species *Rana nigromaculata*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651317300799>. Acesso em: 08 mar. 2019.

ZHAO, Z. *et al.* Bioaccumulation and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in freshwater fishes: a case study performed in Poyang Lake, China's largest lake. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 21, n. 14, p.8740-8749, 8 abr. 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-014-2805-z#citeas>. Acesso em: 21 fev. 2019.

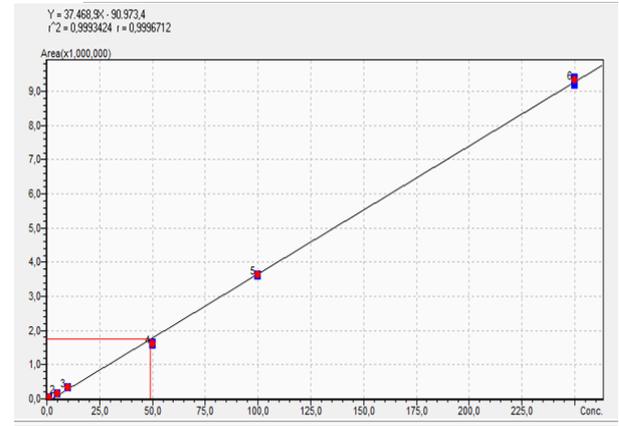
ANEXOS

Anexo A – Curvas de calibração dos agrotóxicos, no solvente.

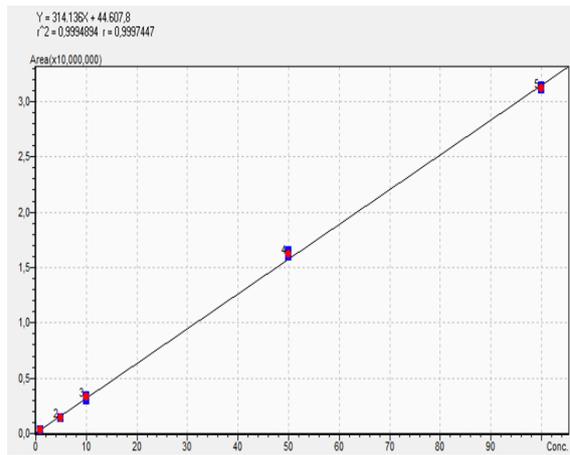
Atrazina



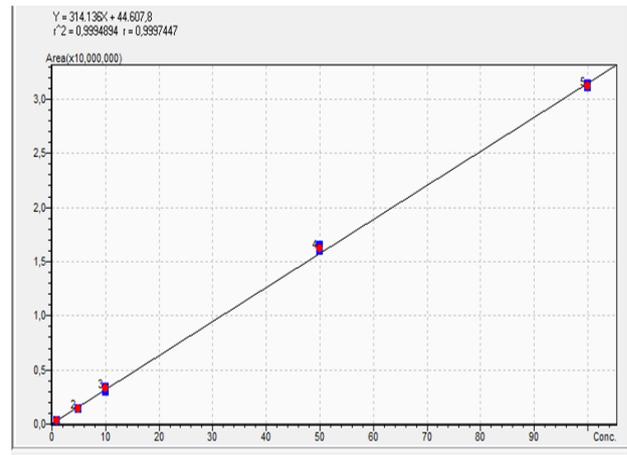
Tebuconazol



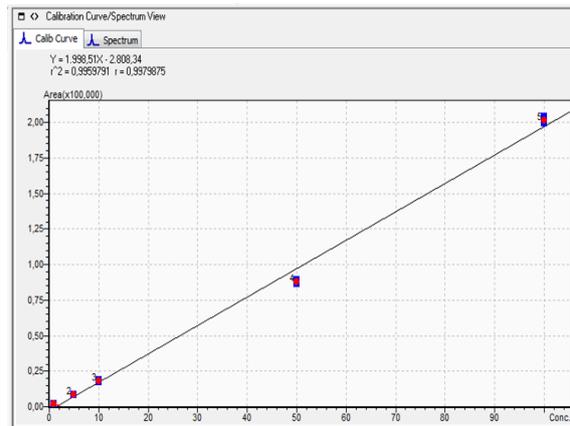
Clorpirifós



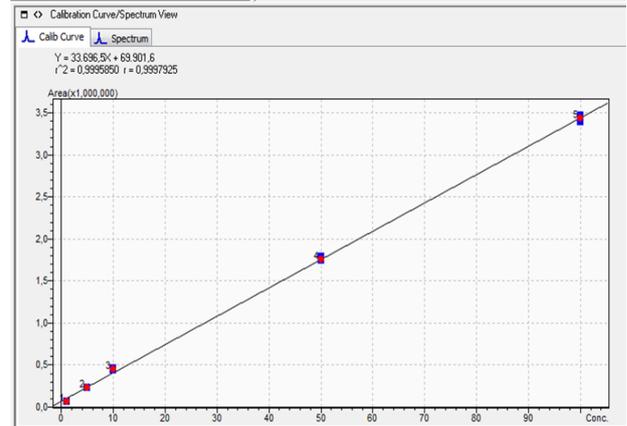
Trifloxistrobina



Pirazosulfuron



Fipronil



Difenoconazol

