



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS INJETÁVEIS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliane Froncheti de Moura

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**AVALIAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS INJETÁVEIS**

por

Juliane Froncheti de Moura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof^a. Denise Borher Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**


A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS INJETÁVEIS**

elaborada por
Juliane Froncheti de Moura

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:


Denise Bohrer do Nascimento, Dr.
(Presidente/Orientadora)


Flavia Valladão Thiesen, Dr. (PUC – RS)


Marcelo Barcellos da Rosa, Dr. (UNIPAMPA – RS)

Santa Maria, 10 de setembro de 2009

Nasceste no lar que precisavas, vestiste o corpo físico que merecias, moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento.

Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo para a sua luta terrena.

Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização.

Teus parentes, amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade. Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.

Tu escolhes, recolhes, eleges, atrais, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a existência.

Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes... são as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência.

Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e observa, a mudança está em tuas mãos.

Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

Aos meus pais **Antonio** e **Serelei**, que foram desde sempre meus mestres e meus maiores exemplos, por acreditarem nos meus sonhos e por serem meus eternos amores

Ao meu grande amor **Fabio**, minha fonte de inspiração e apoio para continuar lutando todos os dias. Obrigado pelo teu carinho e compreensão.

Ao meu querido irmão, **Nataniel** meu amigo, por todo incentivo, apoio e carinho.

Agradecimentos

A Professora Dr^a. Denise Bohrer pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, meu sincero agradecimento pela orientação e paciência no decorrer desta etapa. O aprendizado adquirido foi muito além dos experimentos em laboratório.

Ao Professor Dr. Paulo Cícero Nascimento, pelo carinho, amizade e momentos de descontração vivenciada no laboratório, obrigado também pela participação como banca examinadora do Exame de Qualificação.

Ao Professor Dr. Leandro Carvalho pelo incentivo, amizade, co-orientação e participação como banca examinadora do Exame de Qualificação.

À Professora Dr^a Flavia Valadão Thiesen pela sua participação e pelas valiosas sugestões e questionamentos na defesa de dissertação, que muito contribuíram para o trabalho. Obrigado pelo carinho e incentivo.

Ao Professor Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, que se dispôs a participar da defesa de dissertação, pelas sugestões e questionamentos. Obrigado pela atenção.

À minha grande amiga e “Mãe Cromatográfica” Emilene, obrigado pela amizade e apoio em todos os momentos, mesmo distante, sempre esteve presente.

Às amigas Dani e Dai, vocês contribuíram para que esse trabalho fosse concretizado. A lembrança do convívio diário e dos bons (e também maus) momentos que passamos juntas ficarão na memória pra sempre.

Dai, não tenho palavras pra agradecer pela verdadeira amizade, pelo incentivo, pelas palavras que faziam verdadeiros milagres nos momentos de dificuldade. A você e a Tia Bea meu eterno agradecimento.

Aos colegas do Lachem aos quais convivi durante esses anos, em especial a Marlei pelos “*hold reset*” na hora do almoço, obrigado a todos pelo carinho e compreensão.

Aos meus pais, Antonio e Serelei, que me propiciaram a oportunidade de estudar, agradeço por todo o apoio, compreensão e carinho.

Se cheguei até aqui hoje, tenho certeza que vocês foram meu alicerce para edificar minha conquista. Vocês são meu maior tesouro e sinto-me muito orgulhosa de fazer parte desta família. Ao meu irmão Nataniel pelo ombro amigo, por ficar escutando eu falar em coisas que ele não tinha a mínima idéia do que se tratava, obrigado pela paciência. A vocês não tenho palavras para descrever toda a minha gratidão e o quanto me sinto feliz por ter vocês. Amo vocês!

Ao Fabio, meu grande amor, por tanto carinho, dedicação, compreensão e paciência, obrigado por acreditar em meus sonhos e me incentivar a realizá-los, por estar sempre presente, mesmo que distante. Sabes o quanto és importante em minha vida!! Te amo!!

Aos meus padrinhos Odete e Eduardo, obrigado pela força, carinho e pelas orações, minha conquista também é de vocês. Obrigado por me apoiar sempre! Estão em um lugar muito especial em meu coração.

Ao meu querido avô, Waldemar, pelo carinho, afeto, obrigado pelo abraço amigo, por participar do meu sonho. À minha querida vó Ana, sei que onde quer que estejas, está muito orgulhosa de mim. Saibas que sempre estive viva em meus pensamentos e em meu coração. Amo muito vocês!

À todos os amigos e parentes pela amizade e incentivo. Cada um de vocês sabe o quanto contribuiu para que mais um sonho fosse realizado.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Deus e meus protetores, pela oportunidade a mim concedida de viver, aprender e conviver com pessoas tão especiais!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS INJETÁVEIS

Autora: Juliane Froncheti de Moura
Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Borher Nascimento
Santa Maria, 10 de setembro de 2009

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados. Estas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais. Existe uma imensa variedade de HPAs no meio ambiente, grande parte deles possuindo características estruturais e propriedades muito similares, são conhecidos por suas propriedades carcinogênicos e/ou mutagênicos. Neste estudo foi investigado a presença de HPAs no negro de fumo, borrachas utilizadas como tampas de frascos de medicamentos, bem como algumas formulações farmacêuticas (aminoácidos e soluções lipídicas para nutrição parenteral e alguns medicamentos injetáveis) por cromatografia líquida de alta eficiência. A origem dos HPAs nas borrachas e em produtos farmacêuticos está no uso do negro de fumo, como pigmento. Para as análises, os HPAs foram extraídos do negro de fumo e de diferentes tipos de tampas de borrachas com acetona. A determinação de HPAs nas formulações farmacêuticas exigiu prévia extração em fase sólida, usando colunas de poliestireno. As extrações foram otimizadas com soluções individuais de cada formulação investigada. Os resultados mostraram que todas as amostras de borrachas analisadas estavam contaminadas por HPAs. Os níveis foram entre 0,12 mg g⁻¹ para Benzo(a)Pireno e 5,64 mg g⁻¹ para Benzo(g,h,i)Perileno. Entre os produtos farmacêuticos, as soluções de aminoácidos apresentaram níveis entre 0,02 mg L⁻¹ para Benzo(a)Pireno e 0,21 mg L⁻¹ para Pireno, e emulsões lipídicas 0,07 mg L⁻¹ e 0,19 mg L⁻¹ para os mesmos HPAs. Entre os injetáveis, a contaminação esteve entre 0,06 mg L⁻¹ e 0,03 mg L⁻¹ para o Benzo(a)Pireno.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Postgraduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

EVALUATION ON PRESENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (HPAs) IN INJETABLE PHARMACEUTICAL

AUTHOR: JULIANE FRONCHETI DE MOURA

ADVISOR: DENISE BORHER NASCIMENTO

Santa Maria, 10 September 2009.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a family of compounds which contain two or more condensed aromatic rings. These substances, including the oxygenate and nitrogenate derivatives, are widely spread in the environment, being found in several locations. A great number of PAHs, with similar structural and physicochemical characteristics, which are known by their carcinogenic and mutagenic properties, are distributed in the environment. In this study the presence of PAHs in carbon black, rubbers used as closure in medication containers, as well as in some pharmaceutical formulations (amino acid and lipid solutions for parenteral nutrition and some injectable drugs) was investigated by high performance liquid chromatography. The origin of PAHs in rubbers and in pharmaceutical products stored in containers with rubber closures is the carbon black used as pigment. For the analysis, PAHs were extracted from the carbon black itself and from different types of rubber closures with acetone. The determination in the pharmaceutical formulations demanded a previous solid phase extraction of the PAHs, using polystyrene columns. The extraction was optimized with individual solution of each formulation investigated. The results showed that all analyzed rubbers were contaminated by PAHs. The levels were within 0.12 mg g^{-1} for Benzo(a)Pyrene and 5.64 mg g^{-1} for Benzo(ghi)Perylene. Among the pharmaceutical products, amino acid solutions presented levels between 0.02 mg L^{-1} for Benzo(a)Pyrene and 0.21 mg L^{-1} for Pyrene, and lipid emulsions 0.07 mg L^{-1} and 0.19 mg L^{-1} for the same PAHs. Among the injectables, the contamination ranged between 0.06 mg L^{-1} and 0.031 mg L^{-1} for the Benzo(a)Pyrene.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 31
- FIGURA 2** – Representação mostrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ..... 51
- FIGURA 3** – Sistema HPLC para determinação dos HPAs – Detecção UV com o uso de acetonitrila e água como eluentes e fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm. Detecção Fluorimétrica com o uso de acetonitrila e água como eluente e fluxo de 1,3 mL/min, $\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm. 59
- FIGURA 4** – Gradientes para a eluição e separação dos HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica, fluxo 1,3 mL/min – (a) Gradiente 1 e (b) Gradiente 2. 61
- FIGURA 5** – Gradientes para a eluição e separação dos HPAs sensíveis por detecção UV, fluxo 1,0 mL/min – (a) Gradiente 1 e (b) Gradiente 2 62
- FIGURA 6** – Sistema empregado no estudo de purificação e pré-concentração das amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos..... 66
- FIGURA 7** – Cromatograma de separação dos HPAs detectados por fluorescência, (1) Fluoranteno 0,40 mg L⁻¹; (2) Pireno 0,40 mg L⁻¹; (3) Benzo(a)Antraceno 0,46 mg L⁻¹; (4) Benzo(b)Fluoranteno 0,50 mg L⁻¹; (5) Benzo(a)Pireno 0,50 mg L⁻¹; (6) Benzo(g,h,i)Perileno 0,55 mg L⁻¹ e (7) Indeno(1,2,3-

c,d)Pireno 0,55 mg L⁻¹ – Eluente: acetonitrila, água; fluxo 1,3 mL min⁻¹; λ_{exc} 340 nm, λ_{em} 425 nm 74

- FIGURA 8** – Cromatograma da separação dos HPAs detectados por UV, (1) Naftaleno 0,26 mg L⁻¹; (2) Acenaftaleno 0,30 mg L⁻¹; (3) Fluoreno 0,33 mg L⁻¹; (4) 2-Bromonaftaleno 0,41 mg L⁻¹ e (5) Fenantreno 0,36 mg L⁻¹ – Eluente: acetonitrila e água; Fluxo 1 mL/min; $\lambda = 254$ nm..... 75
- FIGURA 9** – Extração de HPAs de 30mg de negro de fumo com 5 mL de acetona com variação do tempo de contato da amostra com o solvente entre 30 e 180 minutos 79
- FIGURA 10** – Extração de HPAs de 30 mg de negro de fumo com 5 mL de acetonitrila, com variação do tempo de contato da amostra com o solvente entre 30 e 180 minutos..... 80
- FIGURA 11** – Extração média de HPAs de amostras de borrachas de coloração preta com acetonitrila e acetona (5 mL), variando-se o tempo de contato entre 30 e 180 minutos 83
- FIGURA 12** – Efeito da razão de fluxo na recuperação de HPAs, utilizando 10 mL de amostra em 30% de acetona como co-solvente e 2 mL de acetona como eluente 86
- FIGURA 13** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de água 87
- FIGURA 14** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de água. 88
- FIGURA 15** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de aminoácidos. 90

- FIGURA 16** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de aminoácidos.. 91
- FIGURA 17** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de lipídeos..... 92
- FIGURA 18** – Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de lipídeos. 93
- FIGURA 19** – Efeito na recuperação de HPAs em amostras de Dopamina, Dobutamina Fresofol 1% e Fresofol 2%, utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra..... 95
- FIGURA 20** – Efeito na recuperação de HPAs em amostras de Dopamina, Dobutamina Fresofol 1% e Fresofol 2%, utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra..... 96
- FIGURA 21** – Extração de HPAs das tampas de borracha em soluções sintéticas de aminoácidos após o processo de esterilização. 97
- FIGURA 22** – Concentração de HPAs em amostras de óleo de soja após o processo de esterilização..... 98
- FIGURA 23** – Concentração de HPAs em ácido caprílico, ácido cáprico e lecitina de soja após o processo de esterilização.. 99
- FIGURA 24** – Cromatogramas referentes à fortificação da amostra de aminoácidos nos níveis 1(a), 2(b) e 3(c) sensíveis por detecção fluorimétrica, concentrações em mg L^{-1} , listadas na Tabela 15, fluxo 1,3 mL/min e λ_{exc} 340 nm, λ_{em} 425 nm. Onde se tem (1) Fluoranteno, (2) Pireno, (3) Benzo(a)Antraceno, (4) Benzo(b)Fluoranteno, (5) Benzo(a)Pireno, (6) Benzo(g,h,i)Perileno e (7) Indeno(1,2,3-c,d)Pireno..... 100

FIGURA 25 – Cromatogramas referentes à fortificação da amostra de aminoácidos nos níveis 1 (a), 2 (b) e 3 (c) sensíveis por detecção UV concentrações em mg L^{-1} , listadas na Tabela 15, fluxo 1,0 mL/min e λ 254 nm. Onde se tem (1) Naftaleno, (2) Acenaftileno, (3) Fluoreno, (4) 2-Bromonaftaleno e (5) Fenantreno..... 101

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas. | 34 |
| TABELA 2 – Propriedades físico-químicos de alguns HPAs e NHPAs. | 35 |
| TABELA 3 – Evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade de alguns processos industriais e misturas complexas | 37 |
| TABELA 4 – Dados relativos aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos de alguns HPAs e NHPAs | 39 |
| TABELA 5 – Níveis de Benzo(a)Pireno (BaP) reportados na literatura para alguns alimentos | 43 |
| TABELA 6 – HPAs analisados, fornecedores, massas moleculares, massas utilizadas para o preparo das soluções analíticas estoque, concentração e volume final..... | 56 |
| TABELA 7 – Volume de solução estoque pipetado, volume final e concentração das soluções trabalho de cada analito..... | 57 |
| TABELA 8 – Concentração em mg L ⁻¹ de cada HPA em estudo, presente nas 5 soluções utilizadas para a obtenção das curvas analíticas. | 58 |
| TABELA 9 – Gradientes testados para a eluição dos HPAs para detecção fluorimétrica..... | 61 |
| TABELA 10 – Gradientes testados para eluição e separação dos HPAs por detecção UV..... | 62 |

| | |
|--|----|
| TABELA 11 – Concentração dos HPAs em 10 mL de amostra de água fortificada | 67 |
| TABELA 12 – Concentração (g L ⁻¹) dos aminoácidos em formulações comerciais..... | 69 |
| TABELA 13 – Concentração (g L ⁻¹) dos aminoácidos em formulações comerciais..... | 70 |
| TABELA 14 – Composição das emulsões lipídicas em formulações comerciais usadas em nutrição parenteral, em gramas..... | 71 |
| TABELA 15 – Dados referentes às amostras de medicamentos injetáveis analisadas..... | 72 |
| TABELA 16 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas para HPAs conforme concentrações descritas na Tabela 8..... | 76 |
| TABELA 17 – Resultados cromatográficos de LOD e LOQ para os HPAs em estudo | 77 |
| TABELA 18 – Extrações de HPAs de 30 mg de negro de fumo utilizando 2 diferentes métodos. Método 1 – amostra colocada em contato com 5 ml de acetona em banho de ultrassom por 120 minutos. Método 2 – amostra em contato com 5 mL de acetona em banho maria a 100 °C por 30 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento 4 vezes..... | 81 |
| TABELA 19 – Extrações de HPAs 50 mg de amostras de borrachas de coloração cinza, marrom avermelhada e preta utilizando 2 diferentes métodos. Método 1 – amostra colocada em contato com 5 ml de acetona em banho de ultrassom por 120 minutos. Método 2 – amostra em contato com 5 mL de acetona em banho maria a 100 °C por 30 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento 4 vezes..... | 84 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 20 – Valores de recuperação e RSD% para amostras de aminoácidos, em 3 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1..... | 102 |
| TABELA 21 – Valores de recuperação e RSD% para amostras de solução lipídica, em 3 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1..... | 103 |
| TABELA 22 – Valores de recuperação e RSD% para amostras de Fresofol 1 e 2% e Dopamina, em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1..... | 105 |
| TABELA 23 – Valores de recuperação e RSD% para amostras de Dobutamina, Ranitidina e Fenitoína em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1 | 107 |
| TABELA 24 – Valores de recuperação e RSD% para amostras de Fenobarbital e Dipirona Sódica, em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1..... | 108 |
| TABELA 25 – Determinação de HPAs em amostras comerciais de aminoácidos – Primène, Aminoped..... | 110 |
| TABELA 26 – Determinação de HPAs em amostras comerciais de aminoácidos – Aminoplasmal, Nefroamino, Aminoesteril, Aminoesteril Hepa 8%..... | 111 |
| TABELA 27 – Determinação de HPAs em amostras comerciais de emulsões lipídicas – Lipofundin 10 e 20% e Lipovenos 10 e 20%..... | 113 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 28 – Determinação de HPAs em amostras de Fresofol 1 e 2%, Dobutamina e Ranitidina..... | 114 |
| TABELA 29 – Determinação de HPAs em amostras de Fenobarbital, Dipirona Sódica, Fenitoína e Dopamina..... | 115 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| ACY | Acenaftileno |
| BaA | Benzo(a)Antraceno |
| BaP | Benzo(a)Pireno |
| BbF | Benzo(b)Fluoranteno |
| BghiP | Benzo(g,h,i)Perileno |
| BRO | Bromonaftaleno |
| C18 | Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano |
| d.i. | Diâmetro interno da coluna cromatográfica |
| FL | Fluoreno |
| FLR | Fluoranteno |
| FLU | Fluorescência |
| FM | Fase móvel |
| HPAs | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IARC | Agencia Internacional para pesquisa sobre o câncer, do inglês <i>International agency for research on cancer.</i> |
| INP | Indeno(1,2,3-cd)Pireno |
| LOD/LD | Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i> |
| LOQ/LQ | Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i> |
| NAP | Naftaleno |
| PHEN | Fenantreno |
| PYR | Pireno |
| RSD | Desvio padrão relativo |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| ANEXOS | 131 |
| ANEXO A. Método 5506 proposto pelo National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) para análise de HPAs utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV e fluorimétrica | 132 |
| ANEXO B. Estrutura e classificação dos aminoácidos | 133 |
| ANEXO C. Cromatograma obtido após injeção de 10 μL de acetona pura, com detecção fluorimétrica, eluente: acetonitrila e água; fluxo 1,3 mL min^{-1} ; $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$ | 135 |
| ANEXO D. Cromatograma obtido após injeção de 10 μL de acetona pura, com detecção UV, eluente: acetonitrila e água; fluxo 1,0 mL min^{-1} ; $\lambda = 254 \text{ nm}$ | 136 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.1 Objetivos Específicos | 25 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 26 |
| 3.1 Nutrição Parenteral..... | 26 |
| 3.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos..... | 29 |
| 3.2.1 Aspectos Históricos | 32 |
| 3.2.2 Algumas fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos | 33 |
| 3.2.3 Abundância, características físico-químicas e exposição humana.. | 34 |
| 3.2.4 Genotoxicidade (mutagenicidade e carcinogenicidade) dos HPAs e seus derivados. | 38 |
| 3.2.5 HPAs em alimentos | 40 |
| 3.2.6 Alguns métodos de extração de HPAs..... | 43 |
| 3.3 Determinação cromatográfica | 46 |
| 3.4 Validação de métodos | 47 |
| 3.4.1 Curva analítica | 48 |
| 3.4.2 Linearidade..... | 49 |
| 3.4.3 Ruído..... | 50 |
| 3.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação | 50 |
| 3.4.5 Recuperação | 51 |
| 3.4.6 Precisão | 52 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Instrumentação | 54 |
| 4.2 Reagentes e Solventes..... | 55 |
| 4.3 Descontaminação do material | 55 |
| 4.4 Preparo das soluções analíticas | 55 |
| 4.5 Cromatografia por fase reversa..... | 58 |
| 4.6 Parâmetros de otimização do sistema HPLC..... | 60 |
| 4.6.1 Avaliação da separação cromatográfica | 60 |
| 4.6.2 Gradiente para a eluição e separação dos compostos por detecção fluorimétrica e UV na coluna de fase reversa. | 60 |
| 4.7 Análise dos solventes (“branco dos solventes”)..... | 63 |
| 4.8 Validação do Método | 63 |
| 4.8.1 Curva analítica e linearidade | 63 |
| 4.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação | 63 |
| 4.9 Extração dos HPAs do negro de fumo..... | 64 |
| 4.10 Extração dos HPAs das borrachas | 65 |
| 4.11 Estudo para a determinação dos HPAs em amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos..... | 65 |
| 4.11.1 Estudo de Separação e pré-concentração das amostras..... | 66 |
| 4.12 Influência do processo de esterilização na extração dos HPAs por ação das substâncias usadas em nutrição parenteral. | 67 |
| 4.13 Ensaio de recuperação de HPAs nas amostras..... | 68 |
| 4.14 Determinação dos HPAs nas soluções comerciais. | 69 |
| | |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 73 |
| | |
| 5.1 Otimização das condições cromatográficas..... | 73 |
| 5.1.1 Gradiente para eluição e separação dos compostos por detecção fluorimétrica e UV | 73 |
| 5.2 Separação cromatográfica dos HPAs. | 74 |
| 5.3 Validação do procedimento desenvolvido | 75 |
| 5.3.1 Curva analítica | 75 |
| 5.3.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação | 76 |

| | |
|--|------------|
| 5.4 Avaliação do branco do solvente..... | 77 |
| 5.5 Avaliação da extração dos HPAs do negro de fumo..... | 78 |
| 5.5.1 Procedimento de extração do negro de fumo otimizado. | 82 |
| 5.6 Avaliação da extração dos HPAs de borrachas | 82 |
| 5.6.1 Procedimento de extração de HPAs de borrachas otimizado. | 85 |
| 5.7 Efeito da vazão na percolação de HPAs nas colunas de poliestireno. | 85 |
| 5.8 Otimização da determinação dos HPAs em amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos..... | 86 |
| 5.8.1 Influência da adição de um co-solvente na adsorção dos HPAs em poliestireno em amostras de água..... | 87 |
| 5.8.2 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de aminoácidos. | 89 |
| 5.8.3 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de lipídeos.. | 91 |
| 5.8.4 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de medicamentos. | 94 |
| 5.9 Ensaio para verificar o efeito do processo de esterilização na extração dos HPAs..... | 96 |
| 5.10 Recuperação | 99 |
| 5.10.1 Recuperação dos HPAs em amostras de aminoácidos | 99 |
| 5.10.2 Recuperação dos HPAs em amostras de soluções lipídicas..... | 103 |
| 5.10.3 Recuperação dos HPAs em amostras de medicamentos. | 105 |
| 5.11 Avaliação da presença de HPAs em amostras comerciais | 109 |
| 5.11.1 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de aminoácidos comerciais. | 110 |
| 5.11.2 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de emulsões lipídicas comerciais..... | 112 |
| 5.11.3 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de medicamentos. | 113 |
| | |
| 6 CONCLUSÕES | 116 |
| | |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 118 |

1 INTRODUÇÃO

Os HPAs são emitidos por fontes naturais e antropogênicas. A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antropogênicas representam o principal processo de emissão de HPAs (LEE, 1995).

A queima de combustíveis como petróleo e seus derivados, carvão, madeira, gás de carvão, etc, produz HPAs e muitos outros poluentes atmosféricos. A quantidade e os tipos de HPAs formados dependem das condições específicas do processo e do tipo de combustível, sendo que processos mais eficientes emitem menores quantidades de HPAs. A fumaça de cigarro, queimadas e calefação (especialmente em países de clima temperado) são importantes fontes de HPAs e derivados (LOPES *et al.* 1996).

Os HPAs são oriundos também de fontes tecnológicas que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão interna como o principal emissor destas substâncias para o ambiente. Este tipo de motor é o mais comum em diversos veículos de transporte de cargas e passageiros. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial (produção de alumínio) e de incineração (principalmente de rejeitos químicos) e podem emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta (NETTO *et al.*, 1999).

Considerados importantes contaminantes ambientais amplamente distribuídos na natureza, os HPAs têm despertado interesse crescente no cenário internacional pelo fato de muitos deles serem genotóxicos e prováveis carcinogênicos humanos (WHO, 1998).

Os HPAs são absorvidos através dos pulmões, trato gastro-intestinal e pela pele. São largamente distribuídos pelo organismo através de qualquer rota e são encontrados em praticamente todos os órgãos internos, principalmente naqueles

ricos em lipídeos. O metabolismo dos HPAs é complexo. Em geral são convertidos em epóxidos e estes posteriormente convertidos em fenóis, dióis e trióis que podem ser conjugados com o ácido sulfúrico ou glucorônico ou com a glutatona. Embora a maior parte do metabolismo resulte em detoxificação, alguns HPAs são ativados formando espécies DNA-ligantes, principalmente diol epóxidos, que podem dar início a um processo de carcinogênese. Os HPAs podem produzir tumores tanto no local de contato quanto em local distante deste, e o potencial carcinogênico do composto pode variar de acordo com a rota de exposição (WHO, 1998).

O negro de fumo, também conhecido como negro de carbono (do inglês "carbon black") é constituído por partículas finamente divididas, que são obtidas por decomposição térmica (pirólise) ou combustão parcial de hidrocarbonetos gasosos ou líquidos. O negro de fumo possui duas propriedades que definem a maioria absoluta das suas aplicações: elevado poder de pigmentação e capacidade de, em mistura com as borrachas, elevar substancialmente a resistência mecânica desses materiais.

Levando-se em consideração que estas borrachas pigmentadas com o negro de fumo são utilizadas em êmbolos de seringas e tampas de medicamentos, objetivou-se um estudo para determinação simultânea de HPAs em medicamentos que são armazenados em recipientes com tampas de borracha utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV e fluorescência.

A primeira parte deste estudo constituiu na investigação da concentração de HPAs existente no negro de fumo que é obtido de uma fração de petróleo. Uma vez definida a presença de HPAs e sua concentração no negro de fumo, verificou-se a presença dos hidrocarbonetos nas borrachas de coloração cinza, marrom avermelhada e preta utilizadas em embalagens de medicamentos, e estudou-se a possível contaminação de soluções de aminoácidos e lipídeos comerciais utilizadas em nutrição parenteral, armazenadas em frascos de vidro com tampas de borrachas.

Posteriormente, fez-se a investigação dos HPAs em alguns medicamentos utilizados por bebês prematuros que são administrados por via endovenosa, os quais ficam armazenados em seringas descartáveis e em contato com o êmbolo de borracha.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a contaminação de infusões parenterais e medicamentos injetáveis por HPAs bem como a origem desta contaminação.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Adequação da metodologia para determinação de HPAs.
- ✓ Avaliação da concentração de HPAs nas amostras de negro de fumo.
- ✓ Avaliação da contaminação de amostras de borrachas provenientes de embolos de seringas descartáveis e tampas de medicamentos.
- ✓ Avaliação da contaminação de formulações farmacêuticas injetáveis armazenadas em recipientes com tampas de borracha.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nutrição Parenteral

A Nutrição Parenteral (PN) consiste na administração de todos os nutrientes necessários, via intravenosa ou intramuscular, a indivíduos que não podem consumir nutrientes via trato gastrointestinal. O conceito nutrição parenteral foi proposto por Dudrick em 1968 (FISCHER, 1978). Este tipo de nutrição pode ser realizado de forma total ou de forma parcial. PN parcial se aplica a indivíduos capazes de se manter parcialmente por via oral, mas que necessitam de alguma assistência e apoio através de outros meios. É prescrita a pacientes portadores de diversas doenças complexas como câncer ou AIDS (HARRAKI *et al.* 1995) para pacientes cirúrgicos, pré e pós-operatório, e pacientes pediátricos.

Quando os indivíduos são completamente incapazes de comer normalmente e não podem se manter sob o ponto de vista nutricional, torna-se necessária a nutrição parenteral total como modalidade terapêutica primária.

A composição básica do preparo parenteral é relativamente padronizada. As misturas contém três categorias de nutrientes: proteínas, na forma de aminoácidos, açúcares, como a glicose e lipídios. São produzidas como soluções aquosas, hidrolizados protéicos e ainda como emulsões.

As formulações parenterais têm sido objeto de numerosos estudos, visando o melhoramento da esterilidade, apirogenicidade, o monitoramento de contaminações, a normalização da composição e estabilidade, pois, apesar de todos os cuidados, as técnicas envolvidas não são totalmente isentas de riscos, existindo tanto o risco de contaminação microbiológica, no momento da administração, como também contaminação química (PLUHATOR-MURTON, 1999; LEUNG, 1995).

A administração intravenosa fornece uma rota de dispersão rápida de grandes quantidades de fluidos e medicamentos a todas as partes do corpo, alcançando um efeito terapêutico rápido. A velocidade de infusão deve ser controlada para estabelecer e manter os níveis desejados (AVIS *et al*, 1986).

3.1.1 Procedimento de esterilização das soluções parenterais

Apesar do conceito de esterilização não ser novo, a responsabilidade primária da indústria farmacêutica para esta questão é recente e tem ocorrido simultaneamente com o advento da produção em massa de medicamentos pré-preparados. Para produzir um medicamento estéril, os fabricantes devem levar em consideração uma série de fatores, sistemas e técnicas.

Esterilidade é definida como ausência completa de microorganismos. O processo de esterilização, contudo, pode ser definido probabilisticamente, devido à ordem logarítmica da destruição microbiológica e à ausência de métodos absolutos para confirmação de esterilidade (AVIS *et al*, 1986). Visto que a determinação de esterilidade é vulnerável a erros e limitações nos sistemas usados para controle, esterilidade é melhor definida como a ausência total de microorganismos, dentro de limites especificados de probabilidade.

A confiança da esterilidade de qualquer produto, material ou substância é dependente do método de esterilização utilizado. Os métodos de esterilização mais utilizados são o calor úmido, o calor seco, a irradiação ou o uso de agentes químicos como, por exemplo, o óxido de etileno, o formaldeído e o peróxido de hidrogênio. Entretanto, deve-se considerar que cada processo de esterilização tem suas limitações específicas. Não existe um método universal que possa ser aplicado a todos os produtos, materiais e substâncias. Os fatores determinantes na escolha do método apropriado são: (a) sua compatibilidade com o produto, material ou substância a ser esterilizada; (b) a resistência da embalagem; (c) a penetração do agente em áreas remotas, que podem conter microorganismos; (d) um alto nível de atividade letal, resultando na necessidade de pequenas quantidades do agente esterilizante; (e) baixo custo; (f) alto grau de segurança e baixa toxicidade do homem; (g) simplicidade; (h) tempo requerido para o processo e (i) sua adaptabilidade para processos em linha.

O calor úmido pode ser classificado como um agente físico de esterilização. O vapor saturado tem um alto nível de atividade letal, com a destruição de todos os tipos de microorganismos, incluindo esporos altamente resistentes, num período de tempo de 15 minutos, a 121 °C. Seu custo é relativamente baixo, comparado a outros agentes esterilizantes. As vantagens da esterilização com vapor saturado são a simplicidade, por requerer apenas monitoramento de tempo, temperatura e pressão, e a velocidade. Uma das maiores desvantagens é sua incompatibilidade com muitos materiais sensíveis ao calor.

O vapor saturado tem sido usado para esterilização de numerosos materiais, incluindo recipientes para soluções parenterais aquosas ou meios bacteriológicos, luvas cirúrgicas, tanques de fermentação, materiais de vidro e instrumentos e utensílios de aço inoxidável. A esterilização é feita em batelada, em uma autoclave.

O calor seco é geralmente aplicado a materiais tolerantes ao calor, por exemplo, metais, vidros, gorduras e óleos. O calor seco tem sido usado para destruir não somente microorganismos, mas também pirogênios. É considerado um dos métodos de esterilização mais seguros. A temperatura e tempo típicos são 160 °C e 60 minutos. O método é relativamente simples, porém é essencial que haja uma boa circulação do calor sobre o produto a ser esterilizado. Estudos com relação à resistência de alguns esporos mostram ser necessários um tempo de até três horas para garantir a sua esterilidade (AVIS *et al*, 1986).

A radiação gama, proveniente da aceleração de elétrons e do ^{60}Co , é outro método de esterilização utilizado. Este método tem excelente atividade letal e alto nível de penetração na maioria dos materiais, sendo esta dependente da fonte de energia e do tipo de material. A esterilização por radiação não é um método universalmente aceito, mas têm sido aplicado mais a alimentos, itens médicos, seringas plásticas e cosméticos. Raramente é utilizado para medicamentos, devido aos danos que pode causar ao produto como, por exemplo, rompimento das ligações químicas e ainda devido ao alto custo inicial, bem como segurança no processo (AVIS *et al*, 1986).

O agente químico mais utilizado para esterilização é o óxido de etileno. É altamente reativo, alquilante, tóxico, inflamável e explosivo e é empregado para esterilizar, principalmente, materiais médicos. A destruição dos microorganismos é

diretamente dependente da umidade, concentração de gás, temperatura e tempo de exposição (AVIS *et al*, 1986).

O método comumente usado para esterilização de soluções parenterais armazenadas tanto em recipientes de vidro, como em embalagens plásticas, é a esterilização por calor úmido (vapor saturado) (AVIS *et al*, 1986).

3.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados. Estas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais.

De maneira geral, tanto os HPAs quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de câncer no homem (NETTO, *et al*. 2000).

A elevada taxa de mortalidade (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente) e o fato de que os tratamentos para estas doenças são dispendiosos, demorados e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer, particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes. No caso dos HPAs e seus derivados, isto é feito geralmente através do monitoramento dos níveis ambientais desta substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos biológicos. Vários componentes deste grupo são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos (NETTO, *et al*. 2000).

Dentre os hidrocarbonetos existem os que apresentam dois ou mais anéis benzênicos e são denominados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são classificados como apresentando núcleos isolados como as bifenilas e núcleos condensados como o naftaleno, antraceno e fenantreno (Figura 1) (XUE e WARSHAWSKY, 2004). Existe uma imensa variedade de HPAs no meio ambiente, grande parte deles possuindo características estruturais e propriedades muito similares, sendo comum à existência de estruturas isoméricas. Muitas vezes certos isômeros são mais carcinogênicos ou mutagênicos do que outros (RIBEIRO, 2001).

As propriedades químicas e físico-químicas dos HPAs são em grande parte determinadas por seus sistemas de duplas conjugadas, que variam com o número de anéis e, portanto, com sua massa molecular (COSTA, 2001). Os HPAs são compostos relativamente inertes e suas reações mais comuns são as reações de substituição ou de adição eletrofílica.

As reações de adição destroem a aromaticidade do sistema conjugado, diminuindo assim a estabilidade da molécula. Muitas vezes, elas são acompanhadas por reações de eliminação, que regeneram o sistema aromático e dão origem a um produto final de substituição (COSTA, 2001).

Os compostos aromáticos são tóxicos, porém alguns apresentam maior toxicidade (GUILLEN & SOPELANA, 2003). Evidentemente a gravidade da intoxicação depende da natureza do composto aromático, da quantidade ingerida ou inalada e do tempo de exposição a ele.

Os HPAs podem apresentar ainda em sua estrutura átomos de oxigênio e nitrogênio, estas estruturas participam como misturas complexas e podem ser identificadas em segmentos ambientais variados. Segundo Wania e Mackay (1996), HPAs são poluentes orgânicos persistentes, ou seja, resistem a degradação ambiental. Devido a este fator os HPAs podem acumular-se no meio ambiente atingindo concentrações que podem prejudicar a saúde, sendo o caso mais conhecido o do Benzo(a)Pireno, presente na queima de combustível fóssil bem como no tabaco do cigarro e que possui efeito carcinogênico comprovado, pois interage diretamente no DNA das células provocando mutações e conseqüentemente câncer (JUHASZ & NAIDU, 2000; SAMANTA et al., 2002; BENGTTSSON & ZERHOUNI, 2003;).

| Nomenclatura (IUPAC) | Estrutura | Nomenclatura (IUPAC) | Estrutura |
|-------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| Naftaleno | | Fluoranteno | |
| 1-metilnaftaleno | | Pireno | |
| 2-metilnaftaleno | | Benzo(a)antraceno | |
| Bifenil | | Criseno | |
| 2,6-dimetilnaftaleno | | Benzo(b)fluoranteno | |
| Acenaftileno | | Benzo(k)fluoranteno | |
| Acenafteno | | Benzo(e)pireno | |
| 2,3,5-trimetilnaftaleno | | Benzo(a)pireno | |
| Fluoreno | | Perileno | |
| Fenantreno | | Indeno[1,2,3-cd]pireno | |
| Antraceno | | Dibenzo(ah)antraceno | |
| 1-metil-fenantreno | | Benzo(ghi)perileno | |

Figura 1 – Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (COSTA A.F., 2001).

3.2.1 Aspectos Históricos

Considera-se como o início da química dos HPA o isolamento do benzo(a)pireno (BaP) do carvão, em 1931 e, subsequentemente, a sua síntese no mesmo ano. A sua identificação como uma nova substância química, em 1933, permitiu demonstrar que o BaP é um forte agente cancerígeno em animais (COSTA, 2001).

As primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HPA foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram cancerígenos em animais (Passey, 1922) e, também pela atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental (Leiter, 1943). Posteriormente, a atividade biológica foi também observada em extratos de material particulado ambiental coletados em Los Angeles (COSTA, 2001).

O BaP foi identificado em fuligem doméstica e posteriormente em material particulado ambiental. Em 1970 o BaP (e outros HPAs) foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, e como constituinte de aerossóis urbanos (COSTA, 2001).

Nos anos 70 foi reconhecida a carcinogenicidade dos extratos de partículas atmosféricas até então atribuída ao BaP e demonstrado que a atividade cancerígena não é somente devida a esta substância mas, também, à presença de outras substâncias orgânicas ainda desconhecidas. Estas estão presentes, também, no material orgânico policíclico (MPO) de fontes de emissão primárias (COSTA, 2001).

Também nos anos 70 foi introduzido um método muito sensível e eficaz para a determinação da mutagenicidade de substâncias químicas, por meio de bactérias do gênero *Salmonella* que ficaria conhecido como ensaio de mutagenicidade ou “Teste de Ames - *Salmonella*” em homenagem a seus autores (COSTA, 2001).

A partir desta época muita atenção tem sido dada a avaliação de HPAs em matrizes ambientais e biológicas.

3.2.2 Algumas fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A introdução no meio ambiente dos HPAs pode ocorrer por fontes naturais e antrópicas. Combustão acidental em florestas, materiais orgânicos diversos e combustíveis fósseis são considerados fontes naturais. As fontes antrópicas (causadas pelo homem) incluem queima de combustível fóssil (indústria petrolífera e carvoeira), produção de plásticos, borrachas sintéticas, fibras e fertilizantes (KO & BAKER, 2003; PALM *et al.*, 2004).

A quantidade de HPAs no meio ambiente tem crescido dramaticamente, tendo como maior fonte de emissão a queima de combustíveis fósseis, principalmente em veículos automotivos (MAZZERA *et al.*, 1999; MASTRAL e CALLEN, 2000; PISUPATI *et al.*, 2000;). Vazamentos de petróleo tão comuns atualmente, apesar de provocarem grandes impactos ambientais localizados, não são os maiores responsáveis pela presença destes hidrocarbonetos na contaminação de ambientes. Segundo Apitz e colaboradores (1999), processos industriais relacionados a combustíveis fósseis, sua exaustão e escoamento ainda depositam uma quantidade maior destes compostos no meio ambiente.

O petróleo constitui uma das fontes mais importantes de hidrocarbonetos. O petróleo é um líquido oleoso, pouco denso ($d=0,65$ a $0,9$ g/cm³) e não miscível em água. Dependendo da região onde foi formado pode apresentar cor negra ou avermelhada, sendo constituído por milhares de compostos orgânicos, com grande predominância de hidrocarbonetos diversos (ZAKARIA *et al.*, 2002 e STOUT *et al.*, 2004).

Segundo Connell e colaboradores (1988) os principais contaminantes orgânicos nocivos a saúde que derivam principalmente do petróleo são as bifenilas policloradas (BPC); os hexaclorociclohexanos (HCH); os hexaclorobenzenos (HCB) e o objeto de estudo do nosso trabalho, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPA são contaminantes orgânicos semivoláteis e são encontrados no petróleo com diferentes massas moleculares (BENLAHCEN *et al.*, 1997; BISPO *et al.*, 1999; OLLIVON *et al.*, 1999).

Outra fonte de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos é a hulha, também conhecida como carvão mineral (SCHAUER *et al.*, 1996; DIDYK *et al.*, 2000), e o xisto betuminoso (LÓPEZ-RAMOS, 1979; MORENO GARCÍA & FUNES, 1991),

formado por rochas sedimentares orgânicas impregnadas de material oleoso (5 a 10%) semelhante ao petróleo. A combustão natural ou provocada de material orgânico como madeira, serragem e derivados por sua vez também liberam quantidades significantes de HPA na atmosfera.

3.2.3 Abundância, características físico-químicas e exposição humana.

A exposição humana aos HPAs se dá principalmente através da contaminação ambiental. Estudos realizados na Inglaterra estimam que um total de cerca de 54.000 toneladas destas substâncias contaminam atualmente o ambiente no território do Reino Unido. Processos de combustão de matéria orgânica seriam responsáveis pela introdução de cerca de 1000 toneladas/ano, das quais os veículos motorizados responderiam por cerca de 80 toneladas/ano. Esta contribuição é mais significativa (> 35%) nas grandes cidades, mas outros processos, como incêndios em florestas, também podem emitir quantidades significativas de HPA para atmosfera (NETTO, *et al.* 2000).

Os níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas são mostrados da Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas. (NETTO, *et al.* 2000).

| Tipo de amostra | Concentração |
|-----------------|--|
| Ar | 1,3 a 500 (ng m ³) ⁻¹ |
| Solo | 0,8 ng/Kg – 100mg Kg ⁻¹ |
| Água | 2,5 a 500 ng L ⁻¹ |
| Plantas | < 150 µg Kg ⁻¹ |
| Alimentos | 0,1 a 20 µg Kg ⁻¹ |

Em geral, as concentrações ambientais de seus derivados nitrados e oxigenados são cerca de 100 a 1000 vezes inferiores às das correspondentes HPAs. Algumas propriedades físico-químicas importantes para se entender o comportamento ambiental e biológico de representantes do grupo dos HPAs são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns HPAs e NHPAs (NETTO, *et al.* 2000).

| Substância | Peso molecular (g mol ⁻¹) | Pressão de vapor (Pa, 25°C) | Log K _(o/a) | Constante de Henry (M. atm ⁻¹) | Solubilidade em água (mg L ⁻¹) |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------|--|--|
| Naftaleno | 128 | 36,8 | 3,37 | 1,74 X 10 ⁻³ | 31 |
| Acenaftileno | 152 | 4,14 | 4,00 | 3,39 X 10 ⁻³ | 16,1 |
| Fluoreno | 166 | 0,71 | 4,18 | 3,18 X 10 ⁻³ | 1,9 |
| Fenantreno | 178 | 0,113 | 4,57 | 1,31 X 10 ⁻³ | 1,1 |
| Antraceno | 178 | 0,0778 | 4,54 | 1,60 X 10 ⁻³ | 0,045 |
| Pireno | 202 | 0,0119 | 5,18 | 3,72 X 10 ⁻⁴ | 0,132 |
| Benzo(a)Pireno | 252 | 2,13 X 10 ⁻⁵ | 6,04 | 1,86 X 10 ⁻⁵ | 0,0038 |
| Benzo(g,h,i) Perileno | 276 | 2,25 X 10 ⁻⁵ | 6,5 | 3,03 X 10 ⁻⁵ | 0,00026 |
| Coroneno | 300 | 1,98 X 10 ⁻¹⁰ | 6,75 | 1,72 X 10 ⁻⁷ | 0,00014 |

Como podem ser observadas na Tabela 2, estas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. HPAs apresentam também, coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula.

Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, HPAs de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry que diminui com o aumento do peso molecular destas substâncias (NETTO, *et al.* 2000).

Como conseqüência destas propriedades, na atmosfera, estas substâncias podem ser encontradas tanto na fase gasosa quanto adsorvidas no material particulado. A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas.

No solo, HPAs encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores. As meias vidas dos compostos de maior peso molecular são relativamente elevadas e indicam que sua degradação é lenta (NETTO, *et al.* 2000).

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. De fato, devido ao seu caráter lipofílico, HPAs e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo.

A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau de contaminação atmosférico, que está diretamente relacionado com a urbanização, tráfego de veículos automotores (principalmente motores diesel) e com o tipo e a industrialização da área. Em ambientes fechados, a fumaça de cigarro e as fontes de aquecimento podem contribuir para o aumento dos níveis ambientais de HPAs. Alguns processos industriais (Tabela 3) também contribuem significativamente para o aumento da concentração atmosférica destas substâncias.

Tabela 3. Evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade de alguns processos industriais e misturas complexas (NETTO, *et al.* 2000).

| Processos/Misturas | Evidências epidemiológicas | Evidências Experimentais | Classificação pelo IARC; grupo |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Produção de alumínio | Suficientes | - | 1 |
| Gaseificação de carvão | Suficientes | - | 1 |
| Produção de coque | Suficientes | - | 1 |
| Produção de eletrodos de carbono | Suficientes | - | 1 |
| Betumes (extratos) | - | Suficientes | 2 B |
| Negro de carvão | Inadequadas | Suficientes | 2 B |
| Exaustão de motores a diesel | Limitadas | Suficientes | 2 A |
| Exaustão de motores a gasolina | Inadequadas | Suficientes | 2 B |
| Óleos minerais (não ou pouco tratados) | Suficientes | Suficientes | 1 |
| Óleo de xisto | Suficientes | Suficientes | 1 |
| Fuligem | Suficientes | - | 1 |

1 – O agente é carcinogênico para humanos.; 2A – O agente é provavelmente carcinogênico para humanos.; 2B – O agente é possivelmente carcinogênico para humanos.

A absorção dérmica é bastante importante em algumas atividades industriais, podendo ser a responsável por até 90% da quantidade absorvida pelo organismo.

Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição humana, tanto devido à formação de HPAs durante o cozimento, quanto devido à deposição atmosférica sobre grãos, vegetais e frutas.

Estudos realizados com pessoas não fumantes e não ocupacionalmente expostas estimam uma ingestão diária de cerca de 3,12 µg de 8 HPAs (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b] fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno) sendo os alimentos, responsáveis por cerca de 96% desta ingestão. O restante é absorvido diretamente do ar (1,6%), da água (0,2%) e do solo (0,4%). Fumantes que consomem 1 maço de cigarros sem filtro por dia podem ingerir um adicional entre 1 a 5 µg (NETTO, *et al.* 2000).

Quando absorvidos diretamente da fase gasosa, os HPAs são rapidamente metabolizados e eliminados pelo organismo (o BaP, por exemplo, é metabolizado em cerca de 1 hora). Entretanto, quando estão associados a partículas respiráveis, esta eliminação é bem mais demorada podendo levar semanas. Por serem rapidamente metabolizados nos tecidos corpóreos, a bioacumulação não é observada, mesmo nos tecidos ricos em gorduras. As maiores rotas de eliminação destas substâncias após metabolismo hepático, são as fezes e a urina.

3.2.4 Genotoxicidade (mutagenicidade e carcinogenicidade) dos HPAs e seus derivados.

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em limpadores de chaminés. Muitos anos depois desta publicação esta atividade carcinogênica foi atribuída à presença de Benzo(a)Pireno (BaP) nas amostras.

Posteriormente foi comprovado experimentalmente que a presença do BaP, por si só, não justificava toda a atividade carcinogênica observada nestas amostras, sendo este “excesso de carcinogenicidade”, atribuído à presença conjunta de outros membros da família dos HPAs e de alguns de seus derivados,

principalmente nitroderivados. Dados sobre a carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs e seus derivados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Dados relativos aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos de alguns HPAs e NHPAs (NETTO, *et al.* 2000).

| HPA | Carcinogenicidade | Genotoxicidade | Mutagenicidade |
|------------------------|-------------------|----------------|----------------|
| Fluoreno | I | L | - |
| Fenantreno | I | L | + |
| Antraceno | N | N | - |
| Fluoranteno | N | L | + |
| Pireno | N | L | + |
| Benzofluorenos | I | I | ? |
| Benzofluorantenos | S | I | + |
| Ciclopental(cd)Pireno | L | S | + |
| Benzo(a)Antraceno | S | S | + |
| Criseno | L | L | + |
| Trifenileno | I | I | + |
| Benzo(e)Pireno | I | L | + |
| Benzo(a)Pireno | S | S | + |
| Perileno | I | I | + |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | S | I | + |
| Dibenz(ac)Antraceno | L | S | + |
| Dibenz(a)Antraceno | S | S | + |

| | | | |
|------------------------|---|---|---|
| Dibenz(aj)Antraceno | L | I | + |
| Benzo(ghi)Perileno | I | I | + |
| Antraceno | L | I | + |
| Coroneno | I | I | + |
| Dibenzo(ae)Fluoranteno | L | N | |
| Dibenzopirenos | S | I | + |
| 2-nitronaftaleno | N | L | - |
| 1-nitropireno | I | S | + |
| Dinitropireno | | | + |

Dados disponíveis para a comprovação do efeito: S = suficientes; I = insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico. Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica, mutagenicidade. Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconclusivo)

Estudos posteriores conduziram à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico atribuídos a presença destas substâncias. Alguns destes processos e misturas são mostrados na Tabela 3.

3.2.5 HPAs em alimentos

A presença de HPAs em alimentos deve-se principalmente à sua formação durante certos tipos de processamentos como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, à poluição do ar e da água, além de sua presença em solos terrestres e marinhos (WHO, 1998). Existem muitos estudos sobre a ocorrência de HPAs em diversos tipos de alimentos, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos defumados, chás, café,

cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados entre outros (GRIMMER & BÖHNKE, 1975; LAWRENCE & WEBER, 1984; BIRKHOLZ *et al.*, 1988; TOUMINEN *et al.* 1988; DE VOS *et al.* 1990; SERRA *et al.*, 1995; CHEN *et al.* 1996; KAYALI *et al.* 1996; TOLEDO & CAMARGO, 1998; GARCIA *et al.*, 1999; CAMARGO & TOLEDO, 2000; CAMARGO & TOLEDO, 2002a; CAMARGO & TOLEDO, 2002b; SIMKO, 2002; CAMARGO & TOLEDO, 2003; KISHIKAWA *et al.* 2003; YABIKU *et al.* 2003, GARCIA *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005).

No caso dos óleos vegetais, a presença desses compostos é atribuída à etapa de secagem dos grãos, sendo a secagem à lenha a técnica que mais contribui para a formação dos compostos e sua presença no produto final. Embora a desodorização reduza os teores de HPAs, seu efeito não é substancial, sendo necessário o controle do óleo bruto ou a utilização de carvão ativo para remoção dos HPAs (DENNIS *et al.*, 1991; CAMARGO & TOLEDO, 1998).

A ocorrência de HPAs em frutas e vegetais se deve principalmente à poluição ambiental. Neste caso, o material particulado se deposita na superfície destes, onde são concentrados pela camada de cera através de adsorção superficial (WHO, 1998; CAMARGO & TOLEDO, 2002c). O nível de contaminação depende da localização da plantação e da área de superfície do alimento exposta à contaminação. As plantações situadas próximas a rodovias dão origem a produtos com maiores teores de HPAs (CAMARGO & TOLEDO, 2002a).

A contaminação de cereais se dá de maneira análoga à de frutas e vegetais, sendo a área de cultivo um fator muito importante. Outra via de contaminação dos grãos é a secagem dos mesmos pela aplicação de gases de combustão, com os teores de HPAs variando em função do tipo de combustível utilizado e das condições de sua queima (CAMARGO & TOLEDO, 2002b).

Em produtos defumados os HPAs são formados pela queima da madeira utilizada no processo. A maior concentração de HPAs nesses produtos se dá imediatamente após a defumação, após o que a concentração diminui devido à decomposição na presença de luz e à interação com outros compostos. Os HPAs podem penetrar no alimento, onde ficam protegidos da luz e do oxigênio; depois de algum tempo, a concentração se estabiliza em um valor constante (SIMKO, 2002).

A contaminação do café ocorre no processo de torrefação dos grãos. Quando se prepara a bebida no modo tradicional (café coado em processo direto), 20 a 30% dos HPAs presentes no pó de café são extraídos para a bebida;

entretanto, quando o pó de café é fervido juntamente com a água antes da filtração, forma-se um complexo HPA-cafeína que facilita a passagem dos hidrocarbonetos para a bebida, resultando em um café com maiores níveis de HPAs (KRUIJF *et al.*, 1987; CAMARGO & TOLEDO, 2002b).

O chá geralmente apresenta níveis superiores de HPAs em relação ao café torrado; no entanto, apenas uma pequena quantidade é transferida para a bebida durante a infusão. A contaminação do chá se dá devido à poluição ambiental aliada à secagem direta das folhas de chá (CAMARGO & TOLEDO, 2002b; CAMARGO & TOLEDO, 2002c).

A presença de HPAs nos produtos de origem marinha se deve principalmente à contaminação ambiental que ocorre através de derramamento ou vazamento de óleo, efluentes industriais, ou de deposição de HPAs da atmosfera. Esses compostos são absorvidos e acumulados por organismos marinhos. Em geral, os peixes apresentam maior capacidade de metabolizar os HPAs, apresentando menor acúmulo nos tecidos. Os moluscos, por sua vez, tendem a apresentar maiores níveis de HPAs pois são incapazes de metabolizá-los e excretá-los (PHILLIPS, 1999; CAMARGO & TOLEDO, 2002c).

Quando alimentos são preparados em contato com a chama, como acontece com as carnes de churrasco, a gordura da carne pinga sobre o fogo, sofre pirólise e então retorna à carne na forma de fumaça, carregando os HPAs que contaminam a carne. Quanto maior o teor de gordura da carne, maior a quantidade de HPAs presente no produto (PHILLIPS, 1999; CAMARGO & TOLEDO, 2002c).

A tabela 5 apresenta a faixa dos níveis de benzo(a)pireno disponíveis na literatura para alguns tipos de alimentos.

Tabela 5. Níveis de Benzo(a)Pireno (BaP) reportados na literatura para alguns alimentos (CAMARGO & TOLEDO, 2002).

| Alimento | BaP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) |
|------------------------|-------------------------------|
| Alimentos defumados | nd – 66,90 |
| Alface | 0,1 – 31,7 |
| Óleo de oliva | nd – 164,4 |
| Óleo de soja | nd – 42,90 |
| Óleo de milho | nd – 8,0 |
| Óleo de girassol | 1,51 – 58,9 |
| Peixes e frutos do mar | < 0,005 – 4,54 |

3.2.6 Alguns métodos de extração de HPAs

A escolha do método para a extração depende principalmente da matriz da amostra. Óleos e gorduras se dissolvem facilmente em solventes apolares, podendo ser submetidos diretamente a uma partição líquido-líquido (LARSSON, 1986). Alimentos com alto teor de proteínas necessitam de uma etapa prévia de saponificação, que pode aumentar em até 60% a quantidade de HPAs extraídos dessas matrizes (GRIMMER & BOHNKE, 1975).

Muitos autores baseiam os seus métodos de extração naquele proposto por Grimmer e Bohnke (1975) que envolve as etapas de saponificação, extração com cicloexano, partição líquido-líquido com N,N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) e limpeza em coluna de vidro empacotada com sílica-gel. Adaptações do método original têm sido utilizadas para determinação dos HPAs em diferentes tipos de alimentos (DENNIS *et al.*, 1983; LAWRENCE & WEBER, 1984; LARSSON, 1986; DE VOS *et al.*, 1990; SPEER *et al.*, 1990; SERRA *et al.*, 1995; HUSAIN *et al.*, 1997; TOLEDO & CAMARGO, 1998; GARCIA *et al.*, 1999; CAMARGO & TOLEDO, 2000;

CAMARGO & TOLEDO, 2002a; CAMARGO & TOLEDO, 2002b; CAMARGO & TOLEDO, 2003).

Shimmo e colaboradores (2002) descrevem varias técnicas de extração de HPA em sólidos, dentre elas a extração por microondas, soxhlet, ultra-som e fluídos supercríticos, contudo Bouloubassi & Saliot, (1991) utilizam o método de agitação mecânica para suas extrações em solo seco. Com relação a algumas destas técnicas citadas na literatura podemos observar também resultados satisfatórios nos trabalhos de Xu e colaboradores (2001) e Ricking & Schulz (2002), utilizando a técnica do ultra-som; Budzinski e colaboradores (1997) utilizando a técnica de extração por soxhlet e Kim e colaboradores (2003) e Dupeyron e colaboradores (1999) a técnica do microondas.

Segundo Dupeyron, a metodologia que oferece melhores resultados envolve a extração por microondas. Todos os métodos descritos são amplamente utilizados para extração de HPA em solos e outros materiais sólidos encontrados no meio ambiente. Os métodos citados também foram descritos como sendo muito eficientes na recuperação de HPA em solos por ISO (1995) e Song e colaboradores (1995) Contudo, extrações utilizando diferentes métodos feitos por Sun (2004) demonstraram que o peso molecular dos HPA pode influenciar na eficiência destes métodos.

Com relação aos solventes utilizados nos métodos descritos, segundo Jonker & Koelmans (2002) o mais utilizado nas extrações de sólidos é o diclorometano. A utilização de mistura de solventes com proporções fixas também é muito utilizada.

Vários trabalhos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de aprimorar as técnicas de extração e com isto conseguir uma recuperação maior destes poluentes. Recentemente Sun e colaboradores (2005), utilizando diclorometano como solvente, compararam as técnicas de extração por ultra-som e soxhlet tradicional chegando a resultados que identificava o soxhlet como o método mais eficiente.

Para a técnica de extração em soxhlet, Besombes e colaboradores (2001) obtiveram bons resultados analisando a concentração das partículas de HPAs no ar atmosférico coletadas nos arredores de um incinerador municipal na França. Besombes utilizou uma mistura de solventes com diclorometano e ciclohexano na proporção de 2/1 respectivamente e tempo de extração de três horas. Os solventes

então foram evaporados e reduzidos a 2 mL, conseguindo assim detectar 11 HPA com estimativa de erro entre 7% e 34% dependendo do HPA.

Korenková, (2005) também utilizando amostras de cinzas extraiu HPAs, fazendo uso da técnica de ultra-som. Pesando 5g de amostra e misturando ao sólido 10 mL de acetonitrila com tempos de sonicação diferentes 1, 2 e 4h. A mistura foi resfriada e centrifugada a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi filtrado e reduzido com nitrogênio para 1mL. Os resultados obtidos foram satisfatórios, contudo Korenková conclui que mais estudos deveriam ser feitos utilizando novas misturas de solventes.

Song e colaboradores (2002) realizaram um estudo comparando métodos de extração para determinar a contaminação de solos e sedimento por HPA. Os métodos comparados foram dois por agitação; o alemão VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten) utilizando uma mistura de água (50mL), acetona (100mL) e dicloro metano - DCM (75mL) e o ISO A da International Organization for Standardization no qual utilizou 100mL de acetona e 100mL de éter de petróleo. Foram utilizados 20g de amostras para ambos os métodos. Song e colaboradores utilizaram também a técnica de extração por ultrassom com 25mL de diclorometano para amostras de solo seco sonicadas por duas horas a 35°C e por fim utilizou para comparação um terceiro método o soxhlet (ISSO B), também da International Organization for Standardization utilizando 15-30g de amostra de solo seco dissolvidos em 50-100mL de tolueno com tempo de extração de 4-8 h.

Verificou-se, contudo que para amostras com baixo nível de contaminação não houve diferenças significativas na comparação entre a eficiência de extração dos métodos descritos, mas para amostras com alto nível de contaminação a eficiência de extração decresce segundo a ordem: agitação VDLUFA > agitação (ISO A) > ultrassom > soxhlet (ISO B).

3.3 Determinação cromatográfica

Dentre os métodos mais utilizados na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ambas associadas a diversos tipos de detectores que auxiliam na identificação destes compostos (COLLINS *et al.*, 1995). De um modo geral estes tipos de cromatografia são aplicáveis à separação e análise de misturas cujos constituintes sejam voláteis com pontos de ebulição de até 300 °C e que sejam termicamente estáveis (VOLLHARDT & SCHORE, 2004).

Existem dois tipos de cromatografia gasosa: cromatografia Gás – Sólido (CGS) e cromatografia Gás - Líquida (CGL). A cromatografia Gás - Sólido se baseia na fase sólida estacionária, na qual a retenção das substâncias analisáveis é a consequência da adsorção física. A cromatografia Gás -Líquido é útil para separar íons ou moléculas dissolvidas em um solvente. A cromatografia basicamente é uma separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido ou sólido) e uma fase móvel (líquido ou gás). Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a fase móvel é líquida e na cromatografia gasosa (GC) a fase móvel é gasosa, contudo para a GC sua fase estacionária pode ser sólida (cromatografia gás-sólido; CGS) ou líquida (cromatografia gás-líquido; CGL), (BROWN *et al.*, 2005).

A identificação de um hidrocarboneto policíclico aromático – HPA por cromatografia pode ser confirmada também através da análise das características físico-químicas do composto.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência tem sido amplamente utilizada na determinação de HPAs em alimentos (DENNIS *et al.*, 1983; DE VOS *et al.*, 1990; SERRA *et al.*, 1995; KAYALI-SAYADI *et al.*, 1996; PUPIN & TOLEDO, 1996; TOLEDO & CAMARGO, 1998; GARCIA *et al.*, 1999; CAMARGO & TOLEDO, 2000; CAMARGO & TOLEDO, 2002a; CAMARGO & TOLEDO, 2002b; WEIBHAAR, 2002; CAMARGO & TOLEDO, 2003; KISHIKAWA *et al.*, 2003; LAGE-YUSTY & CORITZO-DAVIÑA, 2005). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens sobre as outras, principalmente na determinação simultânea de vários HPAs. Entre as vantagens obtidas são citadas: sensibilidade, alta especificidade do detector de fluorescência, determinação dos HPAs de alta massa

molar que apresentam baixa volatilidade e limite de detecção na ordem de ng kg^{-1} (BARTLE, 1991; WHO, 1998).

Um único detector pode fornecer confirmação de identidade através da razão entre as fluorescências em cromatografia líquida de alta eficiência (SCOTT 1991). O espectro de fluorescência do analito deve possuir comprimentos de onda suficientemente distintos e significativos onde ocorrem máximos ou mínimos de fluorescência. O padrão e o analito devem ser analisados no mesmo sistema cromatográfico.

Em seu trabalho de comparação da eficiência de três diferentes técnicas de extração, agitação, ultra-som e soxhlet, Song e colaboradores (2002) utilizaram o detector de fluorescência para quantificar 16 HPA com base no tempo de retenção obtendo assim bons resultados para a extração de HPA em solo seco e sedimentos contaminados.

Entre as colunas, a de fase reversa (C18) polimérica tem se mostrado muito eficiente na separação dos HPAs. Estudos realizados com 16 HPAs mostram que a coluna C18 polimérica separa todos os compostos, enquanto que na monomérica os pares de isômeros criseno e benzo(a)antraceno, benzo(ghi)pirileno e indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno não são bem resolvidos (WISE *et al.*, 1993). A fase móvel utilizada é normalmente uma mistura de acetonitrila ou metanol com água (LAWRENCE & WEBER, 1984; KICINSKI *et al.*, 1989; BARTLE, 1991; CHEN *et al.*, 1996)

3.4 Validação de métodos

A validação de um método analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com a precisão e exatidão consideradas na prática como satisfatórias. A variabilidade associada a um método analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, soluções de referência, calibrações, ao analista e ao ambiente. É, também, parte integral de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, EUA e outros países, quando se pretende o registro de métodos

usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos (RIBANI *et al.*, 2004).

Referindo-se a um método que emprega técnicas cromatográficas, a validação pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de se avaliar suas características. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (CDER, 2009; HILL, 1999).

Geralmente os parâmetros envolvidos no procedimento de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, seletividade, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e limite de quantificação (INMETRO, 2003).

3.4.1 Curva analítica

A obtenção da curva analítica é um dos estágios fundamentais na análise química. É o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear é observada entre a resposta do detector (y) que medida em altura ou área do pico e a concentração (x) do composto em estudo. A equação de regressão linear $y = ax + b$, relaciona as duas variáveis, onde a correspondente a inclinação da reta e b corresponde a interseção da curva analítica (PIMENTEL *et al.*, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

3.4.2 Linearidade

Linearidade de um método analítico é a capacidade de gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, na qual é possível relacionar o valor de uma variável dependente (y), que é a resposta do detector, através do conhecimento da concentração que é a variável independente (x) (CHASIN *et al.*, 1998; ETTRE, 1993).

A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas, de diferentes concentrações, variando estas de acordo com a finalidade da análise.

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida pela equação 1:

$$(S/Q)_i \% = \left(\frac{S_i - b}{Q_i} \right) \cdot 100/a \quad (1)$$

Onde: b = coeficiente linear; a = coeficiente angular

Os valores de S e Q são obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área ou altura do pico e concentração do analito (ETTRE, 1993).

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com $r^2 = 1$, e dentro da faixa linear, pode-se provar que $(S/Q)_i = a$ para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ($r^2 < 1$), que é o que ocorre na prática, e dentro da faixa linear, $(S/Q)_i \approx a$. Se $(S/Q)_i \ll a$ ou $(S/Q)_i \gg a$, então o resultado pode ser assumido como fora da faixa linear. Conforme normas da IUPAC são considerados dentro da faixa linear, os pontos cujas razões sinal/concentração não ultrapassam mais de 5% do coeficiente angular da reta (ETTRE, 1993).

3.4.3 Ruído

O ruído é a flutuação da linha base do cromatograma, é indicado pela amplitude máxima do ruído, não relacionado a nenhum composto detectado. Com o tempo, têm-se mudança no ruído e conseqüentemente o Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantitation*). Desta forma, os instrumentos devem ser averiguados rotineiramente e os dados reportados de acordo com a variação em cada aquisição de dados.

3.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade de um procedimento analítico como um todo é normalmente definida em termos de LOD e LOQ.

O LOD é a menor concentração de analito detectada pelo procedimento em estudo e geralmente expresso em unidades de concentração (FRANCOTTE, 1996).

O LOQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e é geralmente, expresso em unidades de concentração.

Para determinar o LOD foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi três vezes maior, em relação ao ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse. Para determinar o LOQ foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi dez vezes maior, em relação ao sinal do ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse. A Figura 2 mostra de forma representativa como são obtidos o LOD, o LOQ e o ruído da linha base.

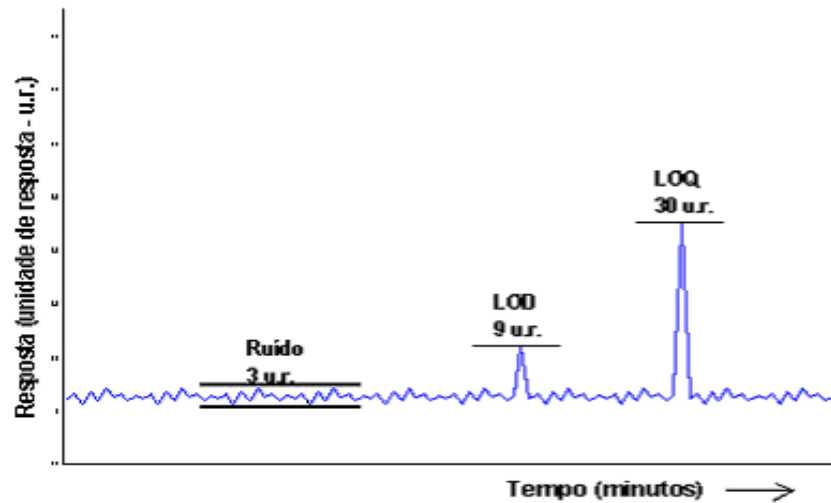


Figura 2. Representação demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ. (BECKER, 2006).

3.4.5 Recuperação

A recuperação (R) avalia a eficiência do procedimento de extração do analito de amostras fortificadas. A recuperação, geralmente, é dependente da concentração, por isso, deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra.

A recuperação é calculada através da equação (2) e é expressa em porcentagem.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C_3 = concentração adicionada.

3.4.6 Precisão

O valor numérico usado para avaliar a precisão, em termos de RSD, pode ser calculado através da equação 3

$$\text{RSD} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média de uma série de medidas;

N = número de medidas.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2003; FRANCOTE *et al.*, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

- Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo (FRANCOTE *et al.*, 1996; RIBANI *et al.*, 2004). O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO (2000). Por outro lado, a ANVISA (2002) utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e deve ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*).

- Precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais). Esta indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos ou uma

combinação destes fatores (ICH, 1995). Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório, como tal, mais aconselhável de usar (INMETRO, 2003). É considerado um excelente resultado quando o RSD é menor que 5% (CAUSON, 1998; RIBANI *et al.*, 2004).

O número de ensaios para avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da medida de repetitividade que, segundo a ICH é de no mínimo nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada uma) (RIBANI *et al.*, 2004).

- Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre os laboratórios e deve ser considerada em condições como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do Codex Alimentarius, etc. (RIBANI *et al.*, 2004). A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de 5 laboratórios e recomenda 8 laboratórios em seu guia atual (THOMPSON *et al.*, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

4.1.1 Equipamentos e materiais

- ✓ Cromatógrafo Líquido Dionex DX-300 (Sunnyvale, USA) com sistema de eluição por gradiente;
- ✓ Detector de Fluorescência HP 1100, Agilent Technologies (Palo Alto, EUA);
- ✓ Detector Espectrofotométrico UV – Visível SPD-10 AV (Shimatzu);
- ✓ Coluna analítica C18 Supercosil (150 x 4,6 mm de d.i.; 5 µm) Knauer (Berlin, Alemanha);
- ✓ Integrador para aquisição dos dados Shimatzu C-R6A Chromatopac;
- ✓ Bomba peristáltica ICP Ismatec (Glattbrugg-Zürich, Suíça).
- ✓ Balança Analítica (Sartorius) com quatro casas decimais de precisão;
- ✓ Sistema de purificação de água Milli – Q Millipore (18,2 MΩ cm);
- ✓ Ultra-som (Thornton) potência 200 W;'
- ✓ Agitador Vortéx;
- ✓ Micropipetadores automáticos de volumes variáveis (10-100 µL; 100-1000 µL – Digipet).
- ✓ Autoclave vertical Phoenix A V 50 N 6281.

4.2 Reagentes e Solventes

- ✓ Padrões do HPAs: Acenaftileno (ACY, Sigma & Aldrich), 1,2-Benzo(a)Antraceno (BaA, Sigma & Aldrich), Benzo(a)Pireno (BaP, Supelco), Benzo(b)Fluoranteno (BbF, Supelco), Benzo(g,h,i)Perileno (BghiP, Supelco), Bromonaftaleno (BRO, Sigma & Aldrich), Fenantreno (PHEN, Supelco), Fluoranteno (FLR, Sigma & Aldrich), Fluoreno (FL, Supelco), Indeno(1,2,3-c,d)Pireno (INP, Sigma & Aldrich), Naftaleno (NAP, Supelco) e Pireno (PYR, Supelco);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Acetona p.a. (Vetec, Brasil);
- ✓ Metanol grau HPLC (Merck);
- ✓ Diclorometano (E.M. Science);
- ✓ Hexano (Merck);
- ✓ Tolueno (Merck);
- ✓ Poliestireno 20-60 mesh (Aldrich) – utilizados na confecção de colunas de separação e pré-concentração dos analitos.

4.3 Descontaminação do material

Para garantir superfícies livres de contaminação inorgânica, a vidraria utilizada para o preparo e o armazenamento das soluções utilizadas no presente estudo foi deixada no mínimo 24 horas antes do uso em solução aquosa de HNO₃ 1 % (v/v). Posteriormente, o material foi lavado com água ultrapura em abundância antes do uso.

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoques foram preparadas individualmente através da dissolução dos respectivos padrões analíticos em acetona.

Na tabela 6 estão os 12 HPAs selecionados para este estudo, onde estão descritos também seus fornecedores, massas molecular, a massa utilizada para o preparo das soluções analíticas estoques, a concentração e o volume final da solução.

Tabela 6. HPAs analisados, fornecedores, massas moleculares, massas utilizadas para o preparo das soluções analíticas estoque, concentração e volume final.

| HPAs | Fornecedores | Massa molecular (g mol ⁻¹) | Massa (g) | Vol. (mL) | Concentração (g L ⁻¹) |
|-------------------------|---------------|---|-----------|-----------|-----------------------------------|
| 2-Bromonaftaleno | Sigma-Aldrich | 207,07 | 2,588 | 25 | 103,52 |
| Acenaftileno | Sigma-Aldrich | 152,2 | 1,900 | 25 | 76,00 |
| Benzo(a)Antraceno | Sigma-Aldrich | 228,29 | 0,200 | 10 | 20,00 |
| Benzo(a)Pireno | Sigma-Aldrich | 252,32 | 0,04 | 10 | 4,00 |
| Benzo(b)Fluoranteno | Sigma-Aldrich | 252,30 | 0,05 | 10 | 5,00 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | Sigma-Aldrich | 276,30 | 0,05 | 10 | 5,00 |
| Fenantreno | Sigma-Aldrich | 178,23 | 2,227 | 25 | 89,11 |
| Fluoranteno | Sigma-Aldrich | 202,26 | 2,528 | 25 | 101,13 |
| Fluoreno | Sigma-Aldrich | 166,0 | 2,075 | 25 | 83,00 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | Sigma-Aldrich | 276,0 | 0,02 | 10 | 2,00 |
| Naftaleno | Sigma-Aldrich | 128,0 | 1,600 | 25 | 64,00 |
| Pireno | Sigma-Aldrich | 202,0 | 2,525 | 25 | 101,00 |

As soluções foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -15 °C. A partir destas soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho, descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Volume de solução estoque pipetado, volume final e concentração das soluções trabalho de cada analito.

| HPAs | Abreviação para os HPAs | Volume pipetado (μL) | Volume (mL) | Concentração (mg L^{-1}) |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| 2-Bromonaftaleno | BRO | 10 | 10 | 0,103 |
| Acenaftileno | ACY | 76 | 10 | 0,076 |
| Benzo(a)Antraceno | BaA | 23 | 10 | 0,02 |
| Benzo(a)Pireno | BaP | 126 | 10 | 0,004 |
| Benzo(b)Fluoranteno | BbF | 100 | 10 | 0,05 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | BghiP | 110 | 10 | 0,005 |
| Fenantreno | PHEN | 10 | 10 | 0,089 |
| Fluoranteno | FLR | 10 | 10 | 0,101 |
| Fluoreno | FL | 10 | 10 | 0,083 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | INP | 276 | 10 | 0,002 |
| Naftaleno | NAP | 10 | 10 | 0,064 |
| Pireno | PYR | 10 | 10 | 0,101 |

As soluções de trabalho foram utilizadas para os ensaios de fortificação, e também para preparar as soluções analíticas, através da sua diluição. Para a obtenção das curvas analíticas, diferentes diluições das soluções trabalho foram realizadas a fim de se obter diferentes níveis de concentração (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração em mg L⁻¹ de cada HPA em estudo, presente nas 5 soluções utilizadas para a obtenção das curvas analíticas.

| HPAs | Sol.1 | Sol. 2 | Sol. 3 | Sol. 4 | Sol. 5 |
|-------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 2-Bromonaftaleno | 0,10 | 0,21 | 0,41 | 0,83 | 1,66 |
| Acenaftileno | 0,07 | 0,15 | 0,30 | 0,61 | 1,22 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,11 | 0,23 | 0,46 | 0,91 | 1,83 |
| Benzo(a)Pireno | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1,01 | 2,02 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1,01 | 2,02 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,14 | 0,28 | 0,55 | 1,11 | 2,21 |
| Fenantreno | 0,09 | 0,18 | 0,36 | 0,71 | 1,42 |
| Fluoranteno | 0,10 | 0,20 | 0,40 | 0,81 | 1,21 |
| Fluoreno | 0,08 | 0,17 | 0,33 | 0,66 | 1,33 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | 0,14 | 0,28 | 0,55 | 1,11 | 2,21 |
| Naftaleno | 0,06 | 0,13 | 0,26 | 0,51 | 1,02 |
| Pireno | 0,10 | 0,20 | 0,40 | 0,81 | 1,21 |

Todas as soluções analíticas foram armazenadas a – 4 °C, sendo que, antes de serem utilizadas, foram deixadas em bancada para atingir temperatura ambiente.

4.5 Cromatografia por fase reversa

Para verificar a possibilidade de determinar as espécies de HPAs sensíveis à detecção ultravioleta e sensíveis à detecção fluorimétrica cada um dos padrões foi injetado separadamente. Sendo assim, os HPAs foram divididos em dois

grupos; sensíveis a detecção ultravioleta: Acetonaftileno, Bromonaftaleno, Fenantreno, Fluoreno e Naftaleno; e os sensíveis a detecção fluorimétrica: 1,2-Benzo(a)Antraceno, Benzo(a)Pireno, Benzo(b)Fluoranteno, Benzo(g,h,i)Perileno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3-c,d)Pireno e Pireno.

O sistema cromatográfico (figura 3) constituiu-se de uma coluna analítica C18 Supercolsil (150 x 4,6 mm de d.i. 5 μ m), onde para o sistema de detecção ultravioleta esteve equipado com detector espectrofotométrico UV-visível (Shimadzu) ajustado em 254 nm (Anexo A). Já para o sistema de detecção fluorimétrica esteve equipado com detector de Fluorescência (Agilent Technologies) ajustado em 340 nm para excitação e 425 nm para emissão (Anexo A). O volume da alça de injeção foi de 10 μ L. O registro do sinal foi feito através do acoplamento de um integrador Shimadzu C-R6A (Chromatopac) ao detector, para aquisição dos dados, integração e registro.

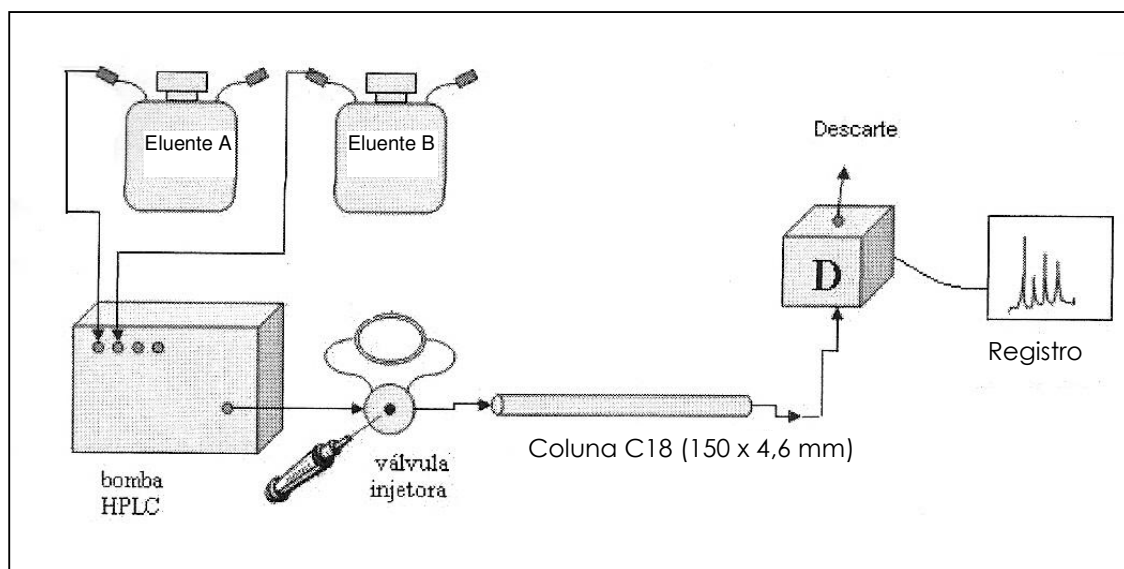


Figura 3. Sistema HPLC para determinação dos HPAs – Detecção UV com o uso de acetonitrila e água como eluentes e fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm. Detecção Fluorimétrica com o uso de acetonitrila e água como eluente e fluxo de 1,3 mL/min, $\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm.

4.6 Parâmetros de otimização do sistema HPLC

4.6.1 Avaliação da separação cromatográfica

Inicialmente o método 5506 (Apêndice 1) proposto pelo National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) com eluição isocrática foi utilizado, para verificar o tempo de retenção dos HPAs em estudo utilizando acetonitrila:água 70:30 como fase móvel, bem como para verificar a separação dos mesmos. Para este teste foram injetados 10 µL de todos os padrões analíticos individualmente no sistema HPLC com coluna de fase reversa C18, com a vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Cada composto foi identificado individualmente, avaliando-se primeiro a solução analítica contendo cada HPA separadamente. Todas as injeções foram sob as mesmas condições cromatográficas, observando-se e confirmando-se o tempo de retenção de cada composto.

4.6.2 Gradiente para a eluição e separação dos compostos por detecção fluorimétrica e UV na coluna de fase reversa.

O modo de eluição isocrática apresentou longo tempo de análise (80 min) e baixa resolução. Para que houvesse uma eficiente eluição dos compostos em estudo, e para evitar efeito memória na coluna C18, testaram-se diferentes gradientes (Tabela 9).

O gradiente 1 (figura 4a) foi utilizado para diminuir o tempo de análise e melhorar a sensibilidade do método. Este gradiente apresentou boa separação dos compostos, no entanto o tempo de análise de 45 minutos pode ser reduzido.

Tabela 9. Gradientes testados para a eluição dos HPAs para detecção fluorimétrica

| | Tempo (min) | Acetonitrila:Água (A) 70:30 (%) | Acetonitrila (B) (%) |
|-------------|-------------|------------------------------------|-------------------------|
| Gradiente 1 | 0 | 30 | 70 |
| | 15,0 | 30 | 70 |
| | 45 | - | 100 |
| Gradiente 2 | 0 | 30 | 70 |
| | 7 | 30 | 70 |
| | 19 | - | 100 |
| | 26 | - | 100 |

Para melhorar o tempo total de análise utilizou-se o gradiente 2 (figura 4b), sendo que a separação utilizando estas condições mostrou-se satisfatória, com picos bem separados, apresentando menor tempo de análise.

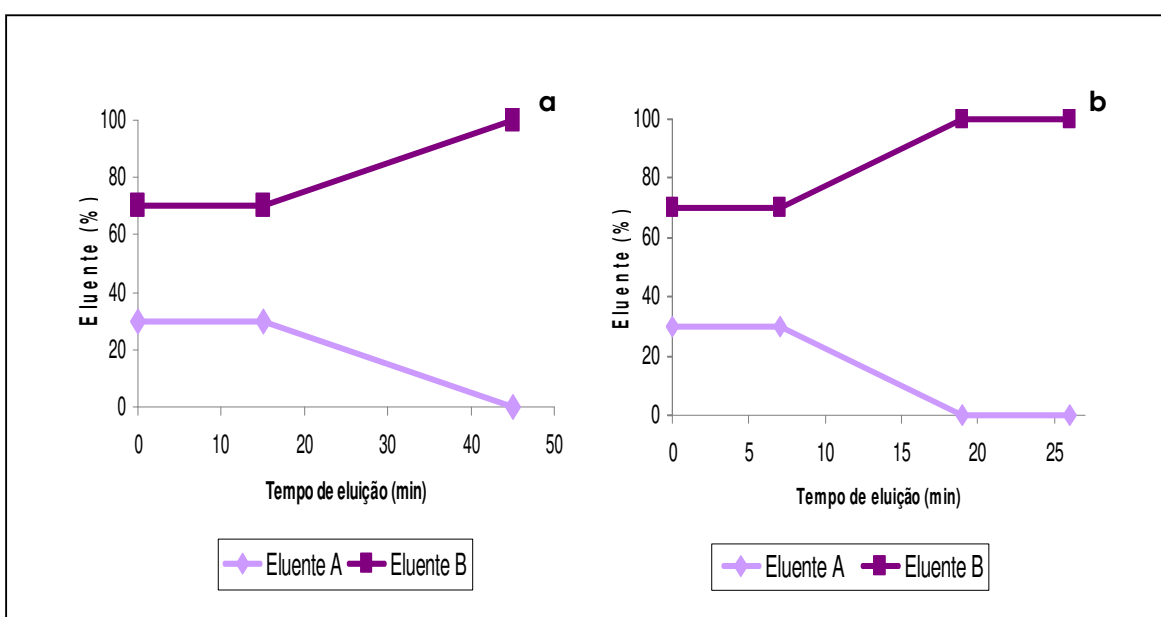


Figura 4. Gradientes para a eluição e separação dos HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica, fluxo $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ – (a) Gradiente 1 e (b) Gradiente 2.

O mesmo método utilizado inicialmente para a separação dos analitos no modo de detecção fluorimétrico também foi utilizado para o modo de detecção UV (Tabela 10). Sendo que este também apresentou longo tempo de análise e picos mal resolvidos.

Tabela 10. Gradientes testados para eluição e separação dos HPAs por detecção UV.

| | Tempo (min) | Acetonitrila:Água (A) 70:30 (%) | Acetonitrila (B) (%) |
|-------------|-------------|------------------------------------|-------------------------|
| Gradiente 1 | 0 | 57 | 43 |
| | 25 | 57 | 43 |
| Gradiente 2 | 0 | 57 | 43 |
| | 3 | 57 | 43 |
| | 15 | - | 100 |

Sendo assim, um segundo modo de eluição foi utilizado (figura 5a), no entanto o tempo de análise de 25 minutos poderia ser reduzido. Para melhorar o tempo total de análise utilizou-se o gradiente 2 (figura 5b), sendo que utilizado estas condições, a separação dos analitos mostrou-se satisfatória.

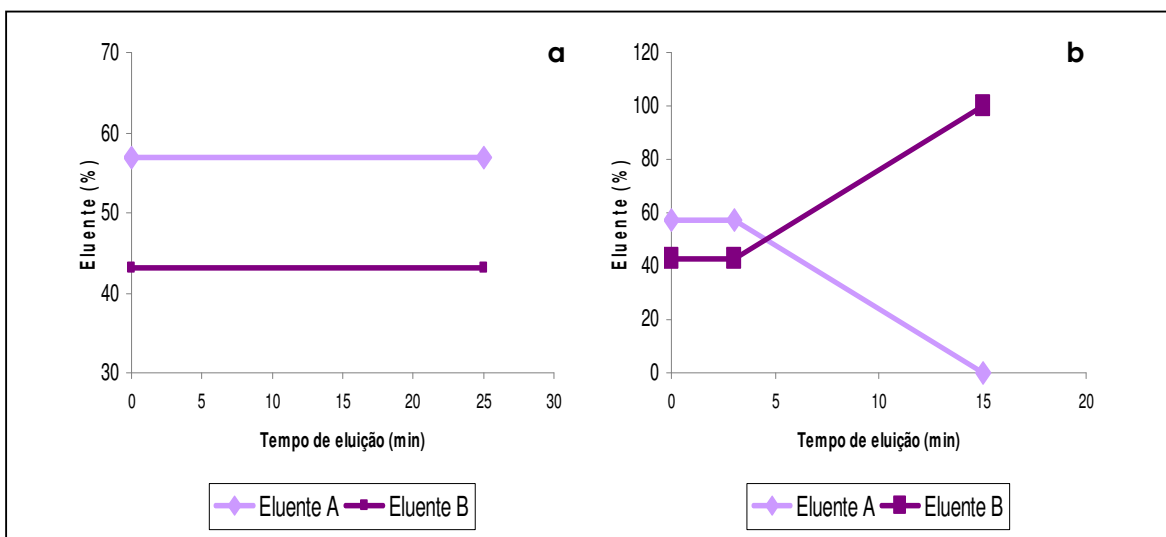


Figura 5. Gradientes para a eluição e separação dos HPAs sensíveis por detecção UV, fluxo 1,0 mL min⁻¹ – (a) Gradiente 1 e (b) Gradiente 2.

4.7 Análise dos solventes (“branco dos solventes”)

Realizou-se um teste em branco para avaliar se os solventes utilizados em todo o processo apresentavam interferências nos tempos de retenção dos HPAs em estudo. Para tal, os solventes utilizados foram injetados no sistema cromatográfico seguido de todo procedimento de análise. Os seguintes solventes foram injetados: acetona, acetonitrila, diclorometano, hexano, metanol e tolueno.

4.8 Validação do Método

Definidas as melhores condições de separação entre os HPAs em estudo, validou-se o procedimento segundo os parâmetros descritos no item 3.4.

4.8.1 Curva analítica e linearidade

Os HPAs em estudo foram quantificados utilizando-se o método da padronização externa. As curvas analíticas dos compostos em estudo foram obtidas preparando-se misturas das soluções analíticas dos HPAs, em acetonitrila. Injetou-se três vezes ($n=3$) no cromatógrafo, 10 μL das soluções nº 1, 2, 3, 4, 5 (Tabela 8), obtendo-se as áreas e o tempo de retenção de cada um dos compostos, com o auxílio do integrador Shimatzu C-R6A Chromatopac.

4.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) para os HPAs foram calculados pela equação da curva analítica e três vezes o desvio padrão do branco ($3\sigma_B/b$) após 10

medidas do branco de acordo com Skoog [2007]. Similarmente, os limites de quantificação (LOQ) foram calculados a partir de $10\sigma_B/b$. Para o cálculo do LOD e LOQ, curvas analíticas foram confeccionadas conforme a tabela 8.

4.8.3 Repetitividade

O estudo da repetitividade da resposta do instrumento (RSD_{ri}) foi avaliado efetuando-se três injeções ($n = 3$) no sistema cromatográfico, para cada nível de concentração das soluções analíticas, em solvente, empregadas na obtenção das curvas analíticas.

A repetitividade do método (RSD_{rm}) foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras fortificadas em três níveis de fortificação, 1, 5 e 10 vezes o valor de LOQ. Cada nível de concentração foi efetuado em triplicata e cada extrato analisado três vezes ($n = 9$).

4.9 Extração dos HPAs do negro de fumo

Para verificar a quantidade de HPAs presentes no negro de fumo, realizaram-se testes de extração do mesmo com diferentes solventes.

Uma massa de 30 mg de negro de fumo foi colocada em contato com 3 e 5 mL separadamente, de cada um dos diferentes solventes citados no item 4.7. posteriormente foram colocados em banho de ultrassom variando-se o tempo de contato entre 30 e 180 minutos. Após decorrido o tempo de contato, as amostras foram levadas para a centrifuga por 5 minutos, e o sobrenadante injetado no sistema cromatográfico. No entanto, os resultados não foram satisfatórios. Sendo assim, uma massa igual a citada anteriormente foi colocada em contato com 5 mL de acetona (que apresentou melhores resultados na extração anterior) e aquecido a 100 °C em banho maria, permanecendo assim por 30 minutos. Este procedimento repetiu-se 4 vezes para a mesma amostra, e as extrações foram feitas em triplicata.

4.10 Extração dos HPAs das borrachas

Foram testadas amostras de borrachas de coloração marrom avermelhada, cinza e preta provenientes dos êmbolos de seringas e tampas de frascos contendo aminoácidos e lipídeos. Uma massa de 50 mg de cada amostra foi picada com auxílio de tesoura e então colocada em contato com 3, 5 e 10 mL dos diferentes solventes já citados anteriormente. Após foram deixadas em banho de ultrassom. Os tempos de contato com a amostra e subsequente extração seguem o item 2.8. Após o tempo de contato decorrido, as amostras foram levadas para a centrifuga por 5 minutos, e o sobrenadante injetado no sistema cromatográfico. Assim como as amostras de negro de fumo, as extrações das amostras de borrachas não foram satisfatórias, e então o mesmo procedimento utilizado para aquelas, foi efetuado com estas amostras.

4.11 Estudo para a determinação dos HPAs em amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos.

Como as amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos não podem ser injetadas diretamente na coluna cromatográfica, e provavelmente a concentração dos HPAs nas amostras é muito baixa, uma etapa de separação e pré-concentração foi desenvolvida

A separação e pré-concentração dos HPAs a partir de soluções de aminoácidos e lipídeos foi realizada utilizando-se colunas de poliestireno em pó. Colunas do polímero foram confeccionadas com a união de duas ponteiros descartáveis de micropipetas com capacidade de 1000 µL. Colocou-se uma pequena quantidade de lã de vidro nas extremidades das ponteiros a fim de sustentar o polímero em pó e adicionou-se cerca de 2 g do polímero previamente descontaminado com solução de HNO₃ 10% (v/v) em etanol.

4.11.1 Estudo de Separação e pré-concentração das amostras.

O condicionamento das colunas de polímero foi realizado pela passagem de 1 mL de etanol em seguida 2 mL de água purificada foram eluídos para retirar o excesso de etanol. As amostras foram então percoladas através das colunas em fluxos de 0,2, 1, 5 e 10 mL min⁻¹. Após as colunas foram lavadas com 10 mL de água. A eluição foi conduzida através da passagem de solvente orgânico com volumes de 2x5 ou 3x5 mL.

O efeito da velocidade do fluxo sobre a recuperação dos HPAs foi estudado através dos fluxos de 0,2, 1, 5 e 10 mL min⁻¹, foram avaliados como solventes de eluição dos HPAs nas colunas, acetona e acetonitrila.

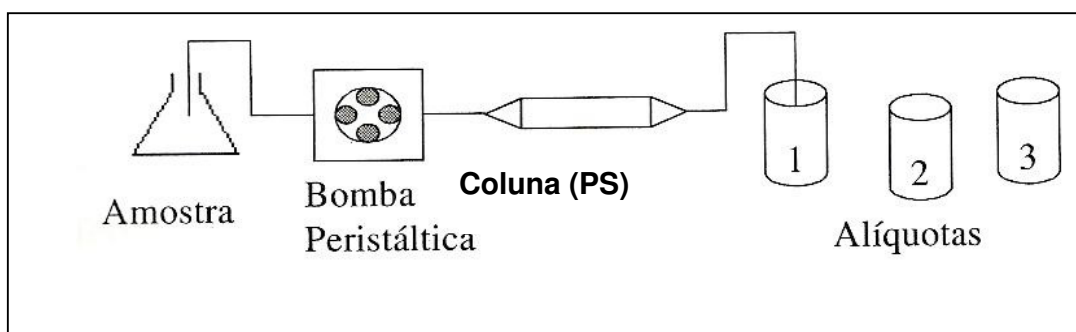


Figura 6 - Sistema empregado no estudo de purificação e pré-concentração das amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos.

Primeiramente, fez-se um teste em água para verificar a retenção dos HPAs no polímero, montando um sistema (Figura 6) em que a bomba peristáltica conduz a amostra através de uma mangueira de tygon (d.i 1,02 mm). Como a partir de uma amostra de água pura os HPAs não ficaram adsorvidos na coluna, investigou-se a possibilidade de melhorar a adsorção pela presença de um solvente orgânico. Para cada ensaio, 10 mL de amostra contendo os HPAs nas concentrações mostradas na Tabela 11, diferentes percentagens de acetonitrila ou acetona, foram adicionadas. As percentagens de 10, 20, 30 e 40% foram testadas.

Após a etapa inicial, amostras de aminoácidos (tabelas 12 e 13), lipídeos (tabela 14) e medicamentos injetáveis (tabela 15) foram testadas. Todas as amostras

foram injetadas no sistema cromatográfico no mesmo dia em que a purificação/pré-concentração foi realizada.

Tabela 11. Concentração dos HPAs em 10 mL de amostra de água fortificada.

| HPAs | Concentração da amostra em mg L ⁻¹ |
|-------------------------|---|
| 2-Bromonaftaleno | 0,41 |
| Acenaftileno | 0,30 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,46 |
| Benzo(a)Pireno | 0,50 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,50 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,55 |
| Fenantreno | 0,36 |
| Fluoranteno | 0,40 |
| Fluoreno | 0,33 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | 0,55 |
| Naftaleno | 0,26 |
| Pireno | 0,40 |

4.12 Influência do processo de esterilização na extração dos HPAs por ação das substâncias usadas em nutrição parenteral.

Soluções sintéticas de 7 aminoácidos, entre eles um aminoácido básico (lisina), um ácido (ácido glutâmico), três polares neutros (cisteína, glicina e metionina) e dois apolares (isoleucina e leucina) (Apêndice 2) bem como soluções

de ácido caprílico, ácido cáprico, lecitina de soja e óleo de soja, foram utilizados nos ensaios. As soluções foram preparadas na concentração de 0,5% (m/v), sendo que foram armazenadas em ampolas de vidro novas com tampas de borracha cinza para uso de medicamentos. Após armazenamento, as ampolas foram lacradas com anel de alumínio e colocadas em autoclave a 121°C, por 15 minutos, como no processo de esterilização. Após este processo, a determinação dos HPAs foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV e Fluorimétrica. As amostras foram preparadas em triplicata. Dez ampolas (tipo penicilina) foram envasadas apenas com água ultrapura, sofrendo o mesmo processo de esterilização das soluções usadas em nutrição parenteral para obter-se o branco e para efeito de comparação.

4.13 Ensaios de recuperação de HPAS nas amostras

A recuperação dos HPAs foi realizada com o objetivo de avaliar a interferência da matriz na determinação dos analitos e o estudo de reprodutibilidade do método.

Para avaliar a recuperação empregando-se o método proposto utilizaram-se amostras de aminoácidos (Primène, Aminoplasmal, Aminoped, Nefroamino, Aminoesteril Hepa 8% e Aminoesteril), emulsões lipídicas (Lipofundin 10 e 20% e Lipovenos 10 e 20%) e de medicamentos injetáveis (Fresofol 1 e 2%, Dobutamina, Ranitidina, Fenobarbital, Dipirona Sódica, Fenitoína e Dopamina) onde amostras de aminoácidos e lipídios foram fortificadas em 3 níveis (1, 5 e 10 vezes o valor do LOQ) e amostras de medicamentos injetáveis em 2 níveis (1 e 10 vezes o valor de LOQ). Os HPAs foram extraídos das amostras e após a etapa de purificação, foram separados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência e quantificados por UV e Fluorescência. Os resultados obtidos após a análise foram denominados de valor obtido, e o valor real foi considerado como sendo aquele adicionado na fortificação da amostra.

4.14 Determinação dos HPAs nas soluções comerciais.

Soluções comerciais usadas em nutrição parenteral foram analisadas pelo método proposto, a fim de determinar a concentração dos HPAs nelas presentes. Foram analisadas pelo menos três amostras de cada lote, incluindo soluções de aminoácidos, emulsões lipídicas e medicamentos injetáveis. As diferentes marcas analisadas são mostradas nas seguintes tabelas. Nas tabelas 12 e 13 estão descritas as formulações dos aminoácidos comerciais, em gramas por litro; na tabela 9 a composição das soluções lipídicas e, na tabela 15 a composição dos medicamentos injetáveis usados no presente trabalho.

Tabela 12. Concentração (g L^{-1}) dos aminoácidos em formulações comerciais.

| Formulações Aminoácidos | Aminoesteril 10% | Aminoped 10% | Aminoesteril Hepa 8% |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| L-isoleucina | 5,0 | 6,4 | 10,4 |
| L-leucina | 6,6 | 7,1 | 13,1 |
| L-lisina | 6,6 | 7,1 | 6,9 |
| L-metionina | 4,3 | 4,6 | 1,1 |
| L-cisteína | - | 0,4 | 0,5 |
| L-fenilalanina | 5,1 | 4,6 | 0,9 |
| L-trionina | 4,4 | 5,1 | 4,4 |
| L-triptofano | 2,0 | 1,8 | 4,4 |
| L-valina | 6,2 | 7,1 | 10,1 |
| L-arginina | 12,0 | 6,4 | 10,7 |
| L-histidina | 3,0 | 4,4 | 2,8 |
| L-alanina | 15,0 | 7,2 | 4,6 |

| | | | |
|-------------------|------|------|-----|
| L-serina | - | 9,0 | 2,2 |
| L-prolina | 15,0 | 16,2 | 5,7 |
| L-tirosina | - | 5,5 | - |
| L-ácido málico | - | 4,8 | - |
| Ácido acético | 8,0 | - | 7,2 |
| L-ornitina | - | - | - |
| L-aspargina | - | - | - |
| L-ácido aspártico | - | - | - |
| L-ácido glutâmico | - | - | - |
| L-cisteína | - | - | - |
| Glicina | 14,0 | 4,1 | 5,8 |

Tabela 13. Concentração (g L⁻¹) dos aminoácidos em formulações comerciais.

| Formulações | Aminoplasma | Nefroamino | Primène |
|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| Aminoácidos | L 10 A | AEH | 10% |
| L-isoleucina | 5,1 | 7,0 | 6,0 |
| L-leucina | 8,9 | 11,0 | 7,3 |
| L-lisina | 7,9 | 11,3 | 5,8 |
| L-metionina | 3,8 | 11,0 | 4,0 |
| L-cisteína | 0,6 | - | - |
| L-fenilalanina | 5,1 | 11,0 | 5,6 |
| L-trionina | 4,1 | 5,0 | 4,2 |

| | | | |
|---------------------|------|-----|------|
| L-triptofano | 1,8 | 2,5 | 1,8 |
| L-valina | 4,8 | 8,0 | 5,8 |
| L-arginina | 9,2 | - | 11,5 |
| L-histidina | 5,2 | 5,5 | 4,8 |
| L-alanina | 13,7 | - | 20,7 |
| L-serina | 2,4 | - | 5,0 |
| L-prolina | 8,9 | - | 6,8 |
| L-tirosina | - | - | 0,4 |
| N-Acetil L-tirosina | 1,6 | - | - |
| L-ornitina | 3,2 | - | - |
| L-aspargina | 1,3 | - | - |
| L-ácido aspártico | 8,9 | - | - |
| L-ácido glutâmico | 4,6 | - | - |
| Glicina | 7,9 | - | 10,3 |

Tabela 14. Composição das emulsões lipídicas em formulações comerciais usadas em nutrição parenteral, em gramas.

| Substância | Lipofundin | Lipofundin | Lipovenos | Lipovenos |
|---------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| | 10% | 20% | 10% | 20% |
| Fosfolípidos de ovo | - | - | 6,0 | 12,0 |
| Glicerol | 2,5 | 2,5 | 25,0 | 25,0 |
| Hidróxido de sódio | - | - | 0-0,20 | 0-0,20 |

| | | | | |
|-----------------------------------|------|------|------|-------|
| Lecitina de Soja | 0,8 | 1,2 | - | - |
| Oleato de Soja | 0,03 | 0,03 | 0,15 | 0,30 |
| Óleo de soja | 5,0 | 10,0 | 50,0 | 100,0 |
| Triglicerídeos de cadeia média | 5,0 | 10,0 | 50,0 | 100,0 |
| A-tocoferol | 10,0 | 20,0 | - | - |
| Água para injeção q.s.p | 100 | 100 | 1000 | 1000 |

Tabela 15. Dados referentes às amostras de medicamentos injetáveis analisadas.

| Amostras | Medicamentos Injetáveis |
|-----------------|------------------------------------|
| 1 | Dipirona Sódica |
| 2 | Dobutamina |
| 3 | Dopamina |
| 4 | Fenintoína |
| 5 | Fenobarbital |
| 6 | Fresofol 1% |
| 7 | Fresofol 2% |
| 8 | Ranitidina |

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização das condições cromatográficas.

5.1.1 Gradiente para eluição e separação dos compostos por detecção fluorimétrica e UV

O gradiente otimizado para a detecção dos HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica (Tabela 9, gradiente 2) consistiu inicialmente da concentração de 30% de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 70% de acetonitrila, permanecendo nesta concentração por 7 minutos, após um gradiente de 12 minutos até atingir a concentração de 100% de acetonitrila, sendo que este permaneceu por mais 6 minutos de volta a concentração inicial de 30% de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 70% de acetonitrila permanecendo por 5 min para reequilibrar o sistema. Com o aumento do fluxo para 1,3 mL/min, obteve-se uma diminuição no tempo de análise.

O gradiente otimizado para os compostos sensíveis por detecção UV (Tabela 10, gradiente 2), consistiu em partir da concentração de 57% de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 43% de acetonitrila, permanecendo nesta concentração por 3 minutos, após um gradiente de 12 minutos até atingir a concentração de 100% de acetonitrila, de volta a concentração inicial de 57% de acetonitrila/água (70:30 v/v) e 43% de acetonitrila, permanecendo por 5 min para reequilibrar o sistema. Com estes gradientes obteve-se boa separação dos HPAs na coluna C18.

5.2 Separação cromatográfica dos HPAs.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 utilizando acetonitrila como eluente, com detecção por fluorescência e por UV. Nas figuras 7 e 8 estão os cromatogramas de separação dos HPAs.

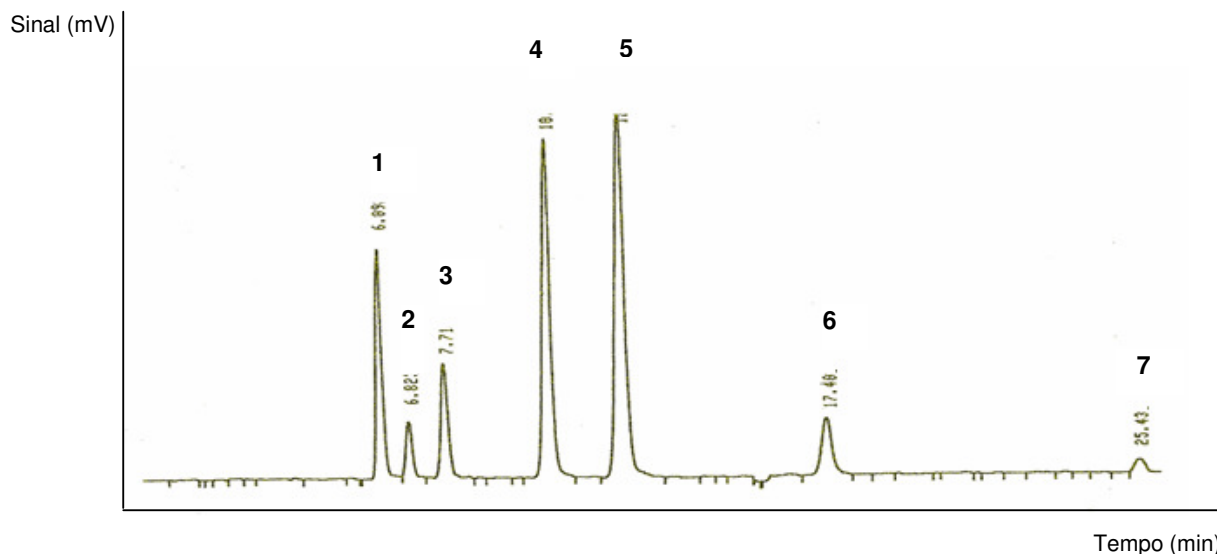


Figura 7. Cromatograma de separação dos HPAs detectados por fluorescência, (1) Fluoranteno $0,40 \text{ mg L}^{-1}$; (2) Pireno $0,40 \text{ mg L}^{-1}$; (3) Benzo(a)Antraceno $0,46 \text{ mg L}^{-1}$; (4) Benzo(b)Fluoranteno $0,50 \text{ mg L}^{-1}$; (5) Benzo(a)Pireno $0,50 \text{ mg L}^{-1}$; (6) Benzo(g,h,i)Perileno $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ e (7) Indeno(1,2,3-c,d)Pireno $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ – Eluente: acetonitrila, água; fluxo $1,3 \text{ mL min}^{-1}$; λ_{exc} 340 nm, λ_{em} 425 nm

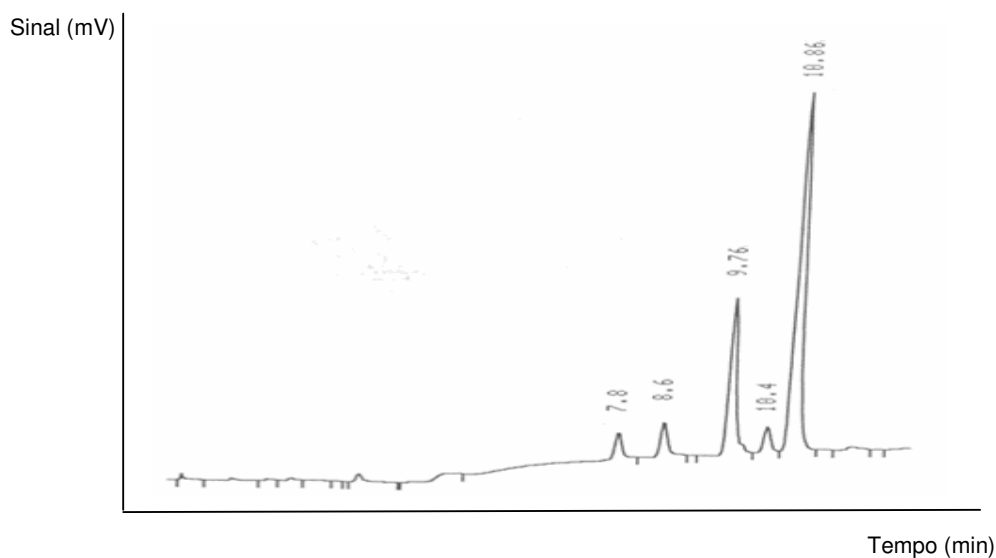


Figura 8. Cromatograma da separação dos HPAs detectados por UV, (1) Naftaleno 0,26 mg L⁻¹; (2) Acenaftaleno 0,30 mg L⁻¹; (3) Fluoreno 0,33 mg L⁻¹; (4) 2-Bromonaftaleno 0,41 mg L⁻¹ e (5) Fenantreno 0,36 mg L⁻¹ – Eluente: acetonitrila e água; Fluxo 1 mL/min; λ 254 nm.

5.3 Validação do procedimento desenvolvido

Definidas as melhores condições de separação para os compostos estudados, o passo seguinte foi à avaliação da metodologia para análise, segundo os parâmetros descritos na seqüência.

5.3.1 Curva analítica

Prepararam-se soluções analíticas, conforme descrito no item 4.12.1, com a mistura dos HPAs em acetonitrila. A Tabela 16 apresenta a inclinação (a) e a interseção (b) das curvas analíticas, obtidas com as soluções analíticas preparadas em solvente, para todos os compostos estudados.

Tabela 16. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para HPAs conforme concentrações descritas na Tabela 8.

| HPAs | Intervalo linear (mg L ⁻¹) | a | b | r ² |
|-------------------------|---|--------|--------|----------------|
| 2-Bromonaftaleno | 0,10 – 1,66 | 3906 | 164,33 | 0,9891 |
| Acetonaftaleno | 0,07 – 1,22 | 7166,2 | 300,12 | 0,9932 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,11 – 1,83 | 38495 | 886,18 | 0,9982 |
| Benzo(a)Pireno | 0,13 – 2,00 | 188600 | 4008 | 0,9996 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 1,13 – 2,00 | 102321 | 2109,5 | 0,9995 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,14 – 2,21 | 22200 | 1736,4 | 0,9965 |
| Fenantreno | 0,09 – 1,42 | 56709 | 1089,2 | 0,9900 |
| Fluoranteno | 0,10 – 1,21 | 67237 | 442,16 | 0,9940 |
| Fluoreno | 0,08 – 1,33 | 27260 | 526,86 | 0,9899 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | 0,14 – 2,21 | 9638,5 | 1297,3 | 0,9973 |
| Naftaleno | 0,06 – 1,02 | 6559 | 363,5 | 0,9965 |
| Pireno | 0,10 – 1,21 | 25918 | 655,4 | 0,9894 |

De acordo com as equações obtidas das curvas analíticas, o método é linear e adequado para os HPAs em estudo. O coeficiente de determinação (r^2) é maior que 0,98, considerado satisfatório para a análise de HPAs.

5.3.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LOD) para os HPAs foram calculados pela equação da curva analítica e três vezes o desvio padrão do branco ($3\sigma_B/b$) após 10

medidas do branco de acordo com Skoog (2007). Similarmente, os limites de quantificação (LOQ) foram calculados a partir de $10\sigma_B/b$. Para o cálculo do LOD e LOQ, curvas analíticas foram confeccionadas conforme a tabela 3. Os resultados podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados cromatográficos de LOD e LOQ para os HPAs em estudo.

| HPAs | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 2-Bromonaftaleno | 0,025 | 0,09 |
| Acetonaftaleno | 0,044 | 0,15 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,097 | 0,33 |
| Benzo(a)Pireno | 0,018 | 0,06 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,028 | 0,14 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,140 | 0,47 |
| Fenantreno | 0,179 | 0,60 |
| Fluoranteno | 0,037 | 0,13 |
| Fluoreno | 0,0175 | 0,06 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | 0,573 | 1,91 |
| Naftaleno | 0,064 | 0,22 |
| Pireno | 0,020 | 0,07 |

5.4 Avaliação do branco do solvente.

Os solventes utilizados para a extração do negro de fumo, borrachas e também para a concentração e *clean up* das amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos foram analisados para a verificação de possíveis interferentes nos

tempos de retenção dos HPAs. Sabendo-se inicialmente que nenhum dos solventes utilizados é fluorescente, o cromatograma do teste em branco com detecção fluorimétrica está representado no Anexo C. Já para os solventes injetados no sistema com detecção UV, a acetona apresentou um sinal no tempo de 3 minutos. No entanto comparando-se o cromatograma dos analitos com o mesmo podemos perceber, nenhum dos HPAs possui este tempo de retenção. O cromatograma da injeção de acetona no sistema com detecção UV esta representado no Anexo D.

Levando-se em consideração que a acetona foi o solvente utilizado para extração dos HPAs das amostras e também para a purificação das mesmas quando se fez necessário, apresentamos aqui somente os cromatogramas para análise deste solvente.

5.5 Avaliação da extração dos HPAs do negro de fumo.

Testes preliminares foram executados empregando-se os seguintes solventes: acetona, acetonitrila, diclorometano, hexano, metanol e tolueno para a extração dos HPAs.

Uma massa de 30 mg de negro de fumo foi colocada em contato com 3 mL dos diferentes solventes após colocado em banho de ultrassom por 30 minutos.

A extração utilizando-se de diclorometano e tolueno não foi possível, devido à dificuldade em separar o negro de fumo do solvente após a extração. Hexano e metanol foram insuficientes para a extração dos HPAs do negro de fumo, uma vez que os sinais obtidos ao injetar as frações no sistema cromatográfico foram desprezíveis. Já com os solventes acetona e acetonitrila, apareceram sinais dos HPAs no cromatograma, no entanto esse eram pequenos.

Com a intenção de melhorar o rendimento de extração, um aumento no volume do solvente e aumento no tempo de contato da amostra com o mesmo foi estudado. Para tal, um volume de 5 mL de solvente foi utilizado e o tempo de contato com amostra foi testado num intervalo de 30, 60, 120 e 180 minutos.

Os resultados obtidos neste estudo com a acetona e acetonitrila em função do tempo de extração podem ser visualizados nas figuras 10 e 11 respectivamente.

Como podemos observar comparando as figuras 9 e 10, as extrações do negro de fumo com acetona apresentaram maior rendimento. Para o PYR, que foi o HPA que apresentou maior concentração na extração com acetonitrila, obteve-se uma extração de $0,97 \text{ mg g}^{-1}$ em 120 minutos de contato com a amostra, enquanto a extração com acetona no mesmo tempo de contato com a amostra obteve-se $6,54 \text{ mg g}^{-1}$.

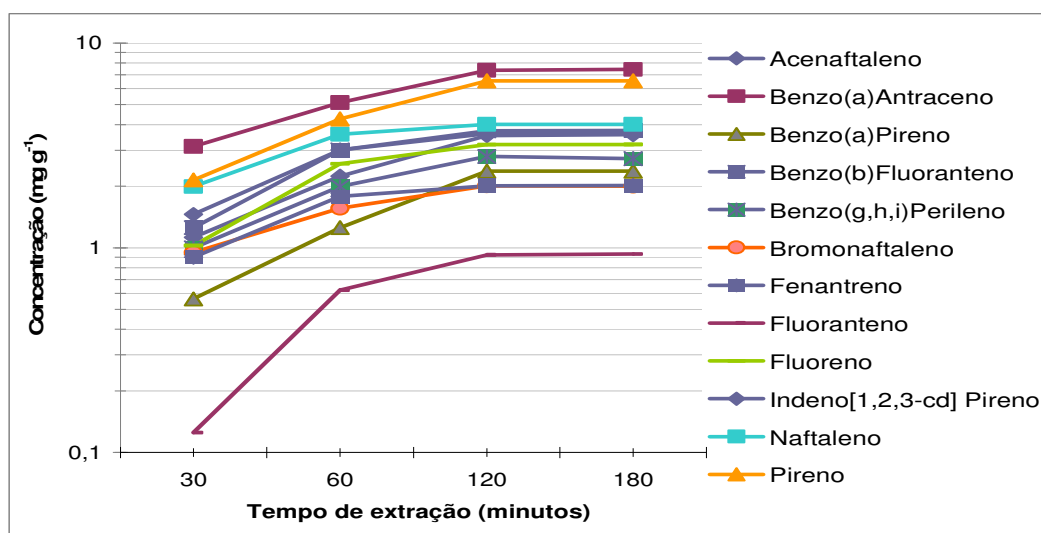


Figura 9. Extração de HPA's de 30mg de negro de fumo com 5 mL de acetona com variação do tempo de contato da amostra com o solvente entre 30 e 180 minutos

O tempo de contato da amostra com o solvente também teve grande influência na extração dos HPA's do negro de fumo. Analisando as figuras 9 e 10, podemos perceber que um aumento no tempo de contato, leva a um aumento na concentração da extração dos HPA's. Para os tempos de 120 e 180 minutos não ocorreu um aumento significativo na extração.

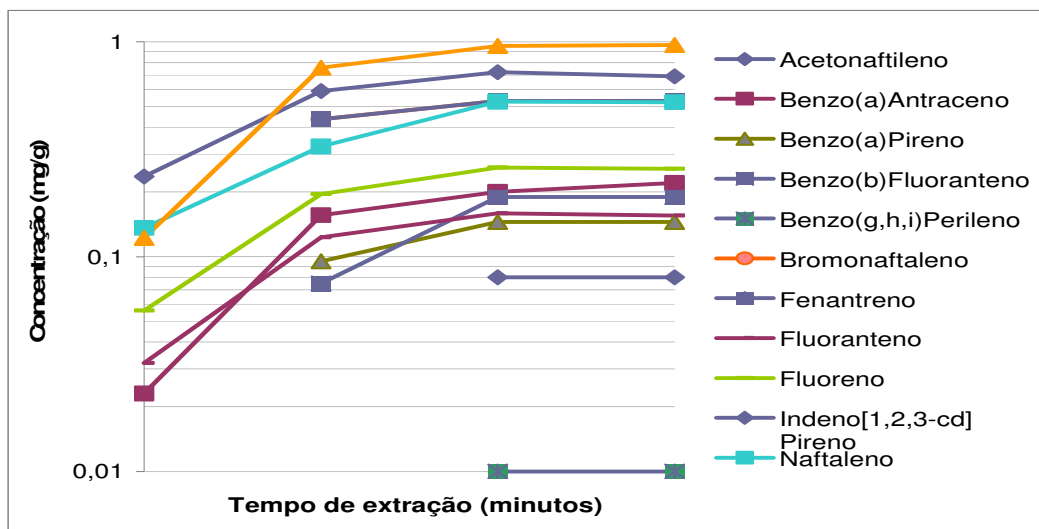


Figura 10. Extração de HPAs de 30 mg de negro de fumo com 5 mL de acetonitrila, com variação do tempo de contato da amostra com o solvente entre 30 e 180 minutos

Para certificar-se de que não houvesse uma concentração maior de HPAs nas amostras de negro de fumo, já que este é desconhecido, um segundo procedimento foi efetuado, com a mesma massa de negro de fumo que foi colocada em contato com 5 mL de acetona (que apresentou melhores resultados na extração anterior) e aquecido a 100 °C em banho maria, permanecendo assim por 30 minutos. Este procedimento repetiu-se 4 vezes para a mesma amostra, onde o sobrenadante foi injetado no sistema cromatográfico. As amostras foram analisadas em triplicatas.

Na tabela 18, podemos observar um comparativo entre os dois métodos efetuados para a extração dos HPAs do negro de fumo. Pode-se perceber o segundo método utilizado (com extração a quente), as concentrações de todos os analitos foram superiores aqueles que utilizaram o primeiro método (extração por ultra-som). Sendo assim, o método que utilizou extração a quente foi o selecionado para extrações de amostras de negro de fumo e borrachas.

Tabela 18. Extrações de HPAs de 30 mg de negro de fumo utilizando 2 diferentes métodos. Método 1 – amostra colocada em contato com 5 ml de acetona em banho de ultrassom por 120 minutos. Método 2 – amostra em contato com 5 mL de acetona em banho maria a 100°C por 30 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento 4 vezes.

| Composto | Concentração (mg g ⁻¹) | |
|------------------------|------------------------------------|------------|
| | Média ± RSD% | |
| | Método 1 | Método 2 |
| 2-Bromonaftaleno | 2,01 ± 2,1 | 3,54 ± 1,8 |
| Acetonaftaleno | 3,53 ± 3,0 | 4,05 ± 3,5 |
| Benzo(a)Antraceno | 7,37 ± 4,5 | 7,55 ± 3,2 |
| Benzo(a)Pireno | 2,37 ± 1,9 | 3,26 ± 1,5 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 3,73 ± 4,0 | 4,30 ± 2,0 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 6,79 ± 3,2 | 7,02 ± 3,0 |
| Fenantreno | 2,01 ± 2,6 | 3,69 ± 2,6 |
| Fluoranteno | 0,92 ± 5,0 | 2,32 ± 3,1 |
| Fluoreno | 3,19 ± 2,8 | 4,05 ± 3,5 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 3,62 ± 2,5 | 4,59 ± 2,8 |
| Naftaleno | 4,00 ± 2,1 | 4,89 ± 3,3 |
| Pireno | 6,54 ± 3,0 | 6,76 ± 2,5 |

5.5.1 Procedimento de extração do negro de fumo otimizado.

Pesou-se 30 mg de amostra em frasco de vidro, onde adicionou-se 5 mL de acetona. Homogeneizou-se e colocou-se em banho maria a 100°C, onde permaneceu por 30 minutos, sendo que para uma mesma amostra o procedimento de extração citado, foi efetuado 4 vezes. Após esta etapa, o sobrenadante foi filtrado e injetado no sistema cromatográfico com detecção UV e fluorimétrica.

5.6 Avaliação da extração dos HPAs de borrachas

Para avaliar a possível contaminação das borrachas provenientes de êmbolos de seringas descartáveis, e também aquelas que são utilizadas como tampas de soluções de aminoácidos e lipídeos adotou-se o mesmo método já descrito no item 5.5.

Uma massa de 50 mg de cada amostra foi colocada em contato com diferentes solventes já citados anteriormente. Após foram deixadas em banho de ultrassom com variação do tempo entre 30 e 180 minutos.

As alíquotas provenientes das extrações com o solvente tolueno, hexano, diclorometano e metanol ao serem analisadas no sistema cromatográfico não apresentaram nenhum sinal significativo nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Quando utilizado acetonitrila e acetona como solventes para as extrações dos HPAs das borrachas, obteve-se sinais cromatográficos nos tempos de retenção dos analitos. Com a intenção de melhorar a extração, um aumento no volume do solvente e aumento no tempo de contato da amostra com o mesmo foi estudado. Para tal, uma variação de volume de 3, 5 e 10 mL de solvente foi utilizado e o tempo de contato com amostra foi testado num intervalo de 30, 60, 120 e 180 minutos. Obteve-se melhores resultados com adição de 5 mL do solvente, sendo que dobrando o volume de solvente o rendimento de extração não apresentou variação significativa.

A figura 11 mostra as extrações com acetonitrila e acetona respectivamente, das amostras de borrachas variando-se o tempo de contato do solvente com as mesmas.

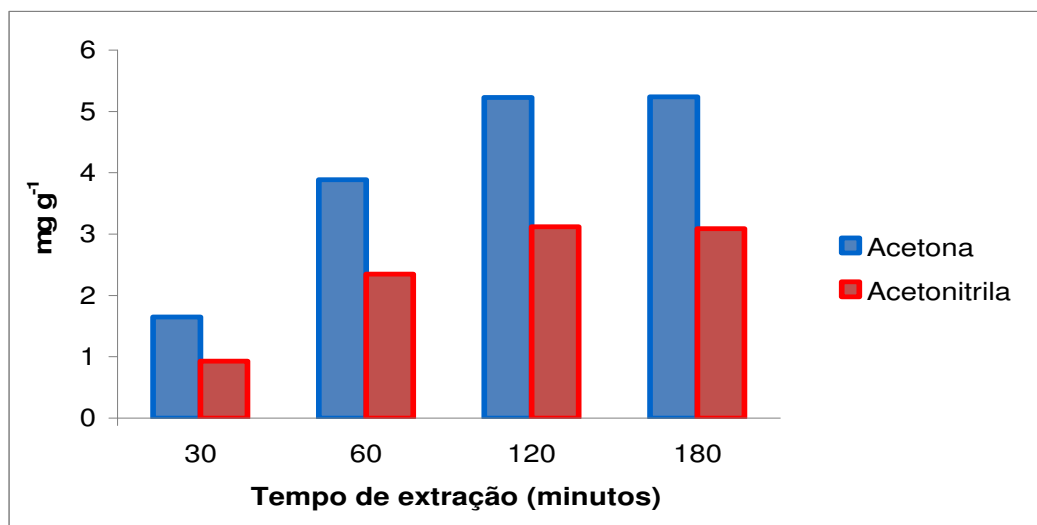


Figura 11. Extração média de HPAs de amostras de borrachas de coloração preta com acetonitrila e acetona (5 mL), variando-se o tempo de contato entre 30 e 180 minutos.

Observando-se a figura 11 onde temos a média de HPAs extraído das amostras de borrachas pode-se perceber que acetona utilizada como solvente apresentou melhor extração, e aumento-se o tempo de contato da amostra com o solvente ocorreu um aumento significativo no rendimento de extração. Sendo que os tempos de 120 e 180 minutos não apresentaram variações significativas nos rendimentos de extração.

Assim como efetuado para as amostras de negro de fumo, o mesmo procedimento de extração foi utilizado para as amostras de borrachas, onde a mesma massa de amostra de borracha foi colocada em contato com 5 mL de acetona (que apresentou melhores resultados na extração anterior) e aquecido a 100 °C em banho maria, permanecendo assim por 30 minutos. Este procedimento repetiu-se 4 vezes para a mesma amostra, onde o sobrenadante foi injetado no sistema cromatográfico. As amostras foram analisadas em triplicatas.

Na tabela 19, podemos observar um comparativo entre os dois procedimentos efetuados para a extração dos HPAs das amostras de borrachas.

Tabela 19. Extrações de HPAs 50 mg de amostras de borrachas de coloração cinza, marrom avermelhada e preta utilizando 2 diferentes métodos. Método 1 – amostra colocada em contato com 5 ml de acetona em banho de ultrassom por 120 minutos. Método 2 – amostra em contato com 5 mL de acetona em banho maria a 100 °C por 30 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento 4 vezes.

| Composto | Concentração (mg g ⁻¹) | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Média ± RSD% | | | | | |
| | Método 1 | | | Método 2 | | |
| | Borracha Cinza | Borracha Marrom | Borracha Preta | Borracha Cinza | Borracha Marrom | Borracha Preta |
| 2-Bromonaftaleno | n.d | n.d | n.d | 0,58 ± 2,6 | 0,35 ± 3,0 | 0,46 ± 2,0 |
| Acetonaftaleno | n.d | n.d | 0,88 ± 1,6 | 2,02 ± 1,8 | 0,75 ± 3,2 | 0,91 ± 3,6 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,20 ± 2,3 | 0,24 ± 3,6 | 0,33 ± 2,2 | 2,11 ± 3,3 | 0,55 ± 3,0 | 0,94 ± 2,3 |
| Benzo(a)Pireno | n.d | n.d | n.d | 1,53 ± 3,0 | 0,36 ± 1,5 | 0,85 ± 2,1 |
| Benzo(b)Fluoranteno | n.d | 0,32 ± 5,0 | 0,54 ± 3,2 | 2,24 ± 3,5 | 0,50 ± 1,3 | 0,81 ± 3,2 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | n.d | 0,23 ± 2,0 | 5,64 ± 2,3 | 0,94 ± 1,6 | 0,74 ± 2,0 | 6,02 ± 1,8 |
| Fenantreno | n.d | n.d | 0,98 ± 4,5 | 1,20 ± 3,3 | 0,98 ± 2,5 | 1,25 ± 3,8 |
| Fluoranteno | n.d | 0,14 ± 1,9 | 0,12 ± 2,0 | 1,78 ± 3,0 | 0,25 ± 1,8 | 0,75 ± 2,1 |
| Fluoreno | n.d | n.d | 0,64 ± 2,9 | 1,02 ± 3,0 | 2,05 ± 2,9 | 0,63 ± 1,8 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | n.d | 0,43 ± 3,8 | 2,74 ± 3,3 | 0,56 ± 3,3 | 1,0 ± 2,5 | 3,25 ± 2,0 |
| Naftaleno | n.d | n.d | 2,88 ± 4,2 | 2,30 ± 2,8 | 1,23 ± 3,5 | 2,80 ± 3,9 |
| Pireno | n.d | 0,23 ± 4,1 | 0,16 ± 2,9 | 3,31 ± 3,6 | 0,65 ± 3,8 | 1,98 ± 2,3 |

Podemos observar que para os resultados do método 1, as borrachas cinza, apresentaram a menor contaminação, apenas um HPA, BaA numa concentração de 0,20 mg g⁻¹. As amostras de borrachas marrom avermelhada apresentaram uma maior contaminação, com a presença de seis HPAs. Entre eles

esta o FLU com $0,14 \text{ mg g}^{-1}$ e o INP com $0,43 \text{ mg g}^{-1}$. Já para as amostras de borrachas pretas a contaminação foi maior que as anteriores, sendo que dos 12 HPAs estudados, somente 2 não foram detectados. A maior contaminação de HPA provém do B(g,h,i)P, que apresentou uma concentração de mg g^{-1} .

Já para o método 2, em todas as amostras de borrachas foram identificados HPAs em concentrações acima daqueles encontrados no método 1. Para as amostras de coloração cinza, a maior concentração de HPA encontrado provém do PYR, $3,31 \text{ mg g}^{-1}$, enquanto para as amostras de borracha marrom provém FLU onde foram encontrados mg g^{-1} . Já para as amostras de borracha preta, a maior fonte de contaminação originou-se de $6,02 \text{ mg g}^{-1}$ de BghiP.

5.6.1 Procedimento de extração de HPAs de borrachas otimizado.

Pesou-se 50 mg de amostra em frasco de vidro, onde adicionou-se 5 mL de acetona. Homogeneizou-se e colocou-se em banho maria a 100°C , onde permaneceu por 30 minutos, sendo que para uma mesma amostra o procedimento de extração citado, foi efetuado 4 vezes. Após esta etapa, o sobrenadante foi filtrado e injetado no sistema cromatográfico com detecção UV e fluorimétrica. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.7 Efeito da vazão na percolação de HPAs nas colunas de poliestireno.

Diversas vazões de percolação através dos cartuchos de SPE são utilizadas para HPAs. Muitos trabalhos utilizaram 2 a 25 mL min^{-1} (KISS, G. *et al.*, 1996; MARTINEZ, E.; *et al.*, 2004; LI e LEE, 2001), fabricantes recomendam uma faixa de trabalho entre 2 a 50 mL min^{-1} . O fluxo de percolação através dos cartuchos é um fator governante, uma vez que diminui o tempo de preparo das amostras e, conseqüentemente, de análise. Em contrapartida, altos fluxos podem diminuir o tempo de equilíbrio necessário na adsorção, levando à diminuição na eficiência da

recuperação dos compostos estudados (KISS, G., *et al.*, 1996; GRYNKIEWICZ, M., *et al.*, 2002). Como este estudo é semelhante ao SPE, utilizou-se os mesmos critérios para a escolha do fluxo.

Neste estudo, a recuperação de HPAs variou de 53,2 a 74,2% ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$), 81,3 a 100,1% (1 mL min^{-1}), 59,1 a 79,1% (5 mL min^{-1}) e 35,3 a 57,9% (10 mL min^{-1}). Na figura 12 podemos verificar essas variações.

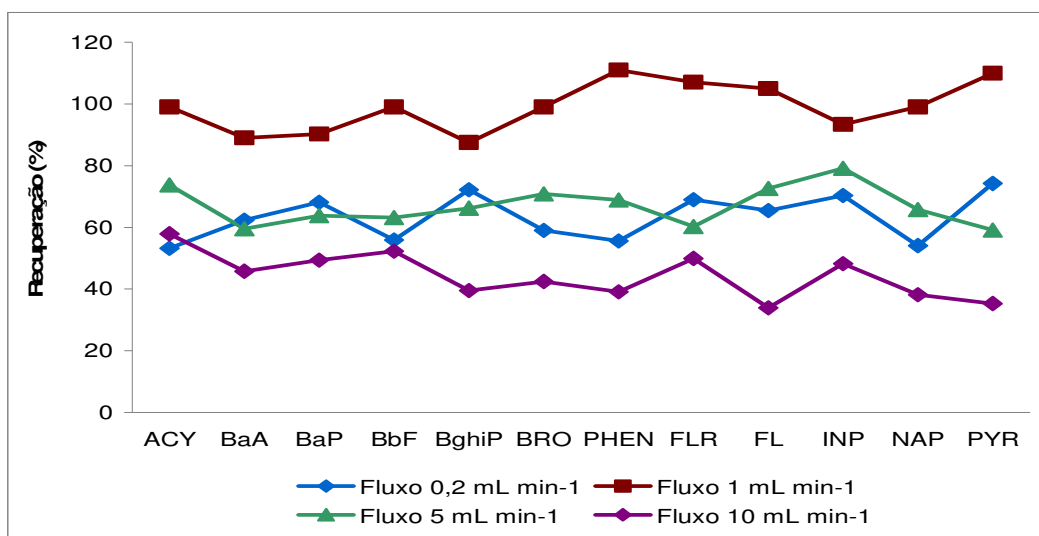


Figura 12. Efeito da razão de fluxo na recuperação de HPAs, utilizando 10 mL de amostra em 30% de acetona como co-solvente e 2 mL de acetona como eluente

Em virtude da necessidade de menor tempo para análise e dificuldade em manter o fluxo homogêneo para todas as colunas de poliestireno foi adotada a velocidade de fluxo entre 1 e 3 mL min^{-1} na percolação das amostras.

5.8 Otimização da determinação dos HPAs em amostras de aminoácidos, lipídeos e medicamentos.

Em virtude da baixa solubilidade dos HPAs, a qual decresce com o aumento da massa molecular, a amostragem dos respectivos compostos pode ser prejudicada devido a adsorção nas paredes dos recipientes utilizados para tal procedimento (Grynkiewicz *et al.*, 2002). Portanto a adição de solventes orgânicos (acetona e acetonitrila), chamados também de co-solventes ou modificantes

orgânicos, é um recurso para aumentar a solubilidade dos HPAs, diminuindo a adsorção nas paredes dos frascos de amostragem (Gryniewicz *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2004; Urbe, I.; Ruana, J, 1997). Entretanto a concentração do co-solvente é um parâmetro crítico, o qual deve ser avaliado precisamente, levando-se em consideração que se adicionado em baixa proporção pode não dissolver completamente os compostos de maiores massas moleculares, mas que se adicionado em alta proporção dificulta a adsorção dos compostos com menores massas moleculares (Gryniewicz *et al.*, 2002). Além da atenção que deve-se ter com a adsorção dos HPAs com as paredes dos recipientes, deve-se levar em consideração que um pequeno ou grande volume de solvente orgânico adicionado na amostra pode-se também levar a uma variação na adsorção dos HPAs com o polímero da coluna. Desta forma, para cada tipo de adsorvente e co-solvente esse parâmetro deve ser otimizado.

5.8.1 Influencia da adição de um co-solvente na adsorção dos HPAs em poliestireno em amostras de água.

Primeiramente, fez-se um teste em água para verificar a retenção dos HPAs no polímero, descrito anteriormente no item 2.10.1. A iniciativa de fazer-se estudos em água inicialmente, teve o objetivo de utilizar uma matriz livre de qualquer interferente, como aquelas presentes nas soluções de aminoácidos e lipídicas.

Como pode ser observado na figura 13 utilizando-se 10% de acetona como co-solvente a recuperação do BaA, PYR e FLU foi satisfatória. O BbF, BaP, BghiP e o INP também apresentaram recuperações satisfatórias (87 a 99%). Diferentemente, isto não foi observado para os demais HPAs estudados em outras concentrações de acetona como co-solvente (Figura 13a). Como pode ser verificado na Figura 13b, utilizando a acetonitrila na concentração de 10%, a recuperação da maioria dos HPAs foi superior quando comparada à concentração de 20, 30 e 40%. A recuperação dos HPAs variou de 35,6 a 64,5% (20% de acetonitrila), 21,2 a 55,5% (30% de acetonitrila) e 15,8 a 25,6% (40% de acetonitrila). Utilizando-se a acetona como co-solvente, melhores resultados foram obtidos, comparados aos da acetonitrila (Figuras 13a e 13b).

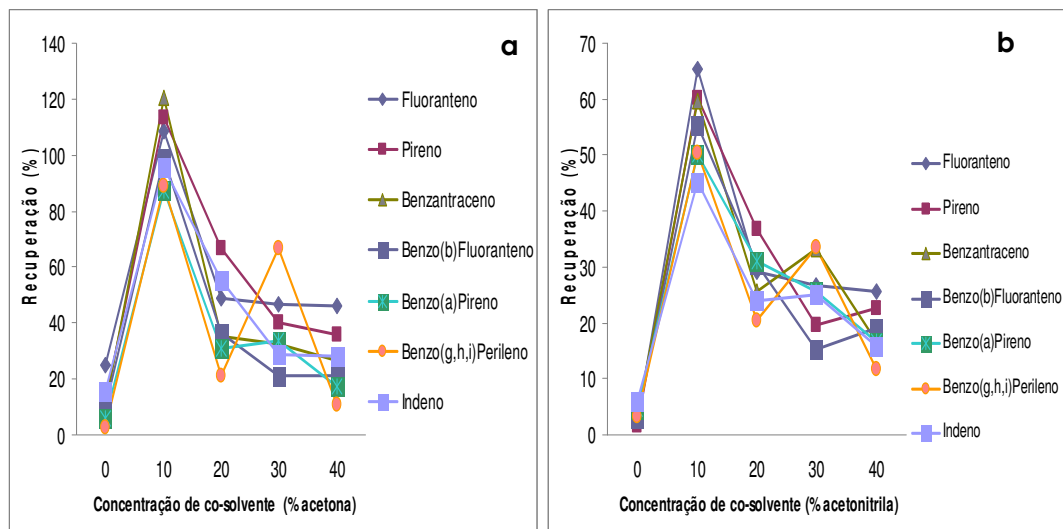


Figura 13. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de água.

Para os HPAs sensíveis por detecção UV os resultados foram semelhantes aos anteriores, como pode ser observado na figura 14, com uma concentração de 10% de acetona como co-solvente, todos os HPAs tiveram recuperações satisfatórias, entre 89,6 e 112,5%. Para as demais concentrações de acetona como co-solvente (20, 30 e 40%) os HPAs estudados apresentaram recuperações entre 15,8 e 64,5% (Figura 14a). Verificando-se a figura 14, os maiores valores de recuperação utilizando 10% de acetonitrila como co-solvente não ultrapassaram 70%. Já para as demais concentrações de acetonitrila (20, 30 e 40%) os valores variaram entre 17,8 e 45,5%.

Como pode ser observado nas figuras 13 e 14, sem o uso de um co-solvente (acetona e acetonitrila, respectivamente) não seria possível a recuperação dos HPAs, isto está mostrado nos pontos zero de cada figura.

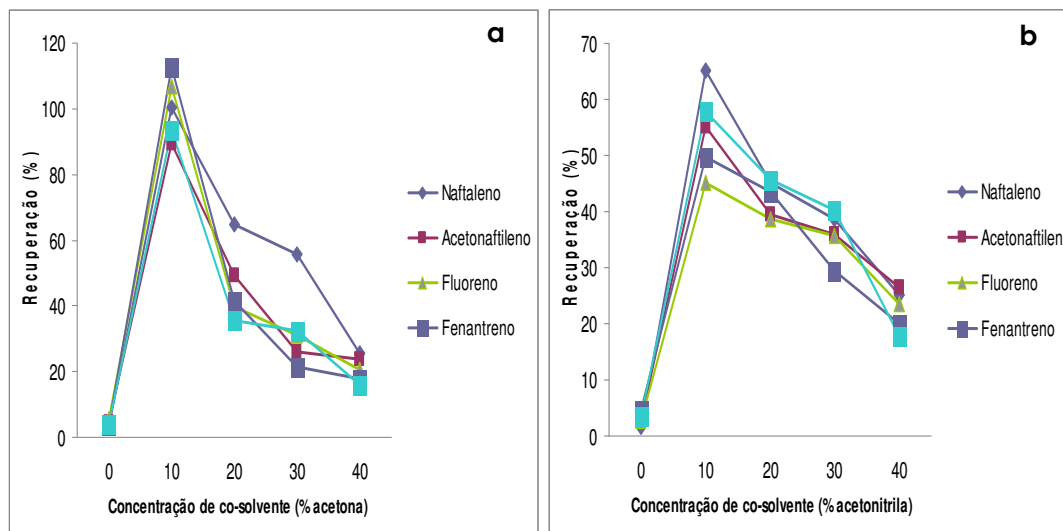


Figura 14. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de água.

5.8.2 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de aminoácidos.

Na figura 15 pode-se observar que utilizando 10% de acetona como co-solvente as recuperações dos HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica apresentaram resultados satisfatórios, variando entre 87,4 e 122,7%. Quando a concentração do co-solvente foi aumentada, nota-se também uma diminuição nos valores de recuperação dos HPAs, sendo que para uma concentração de acetona de 20%, os níveis de recuperação estiveram entre 20,7% para INP e 70,1% para FLR. Para as concentrações de 30 e 40 % de acetona como co-solvente os níveis de recuperação resultaram entre 23,2% para BbF e 58,5% para PYR; e entre 20,1 para FLR e 65% para BbF, respectivamente (figura 15a).

Quando utilizado acetonitrila como co-solvente os níveis de recuperação foram diminuídos. Com a utilização de 10% de acetonitrila os valores de recuperação ficaram entre 34,8% para INP e 58,2% para BaA, aumentando-se para 20% a concentração de co-solvente (acetonitrila) os valores ficaram entre 20,7 para INP e 48,1% para BbF. Utilizando 30% de acetonitrila as recuperações ficaram ainda menores, entre 22,6 para BaA e 35,5 para INP e com 40% de co-solvente entre 15,5 para BghiP e 30,5 para BbF (figura 15b).

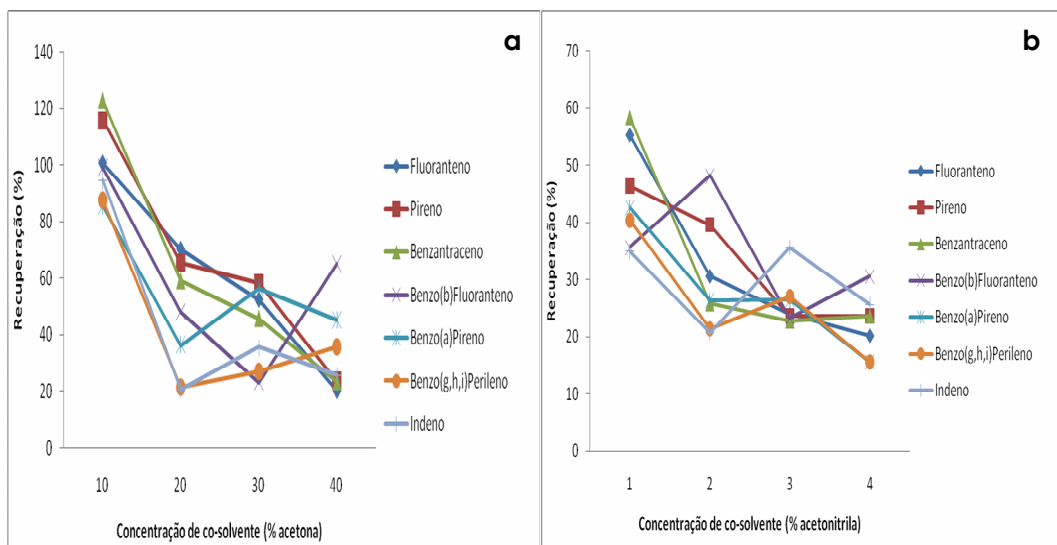


Figura 15. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de aminoácidos.

Observando a figura 16, onde temos os níveis de recuperação para os HPAs sensíveis por detecção UV, notamos que uma menor concentração de acetona como co-solvente apresentou melhores níveis de recuperação, onde com 10% de acetona os níveis ficaram entre 89,5% para PHEN e 109% para BRO. Com o uso de 20% de acetona os valores de recuperação ficaram entre 40,3% (BRO) e 66,5% (NAP), aumentando para 30% a concentração do co-solvente obtivemos recuperações entre 25,6% (FL) e 59,5% (BRO). Utilizando 40% de acetona, obtiveram-se valores de recuperações entre 12,3 (BRO) e 25,6% (ACY) (figura 16a).

Nota-se também que como anteriormente (figura 15), as recuperações com o uso de acetonitrila como co-solvente se comparado com a utilização de acetona, foram inferiores. Usando acetonitrila como co-solvente na proporção de 10%, obteve-se os melhores níveis de recuperação para este, que estiveram entre 32,3 e 57,2% (figura 16b).

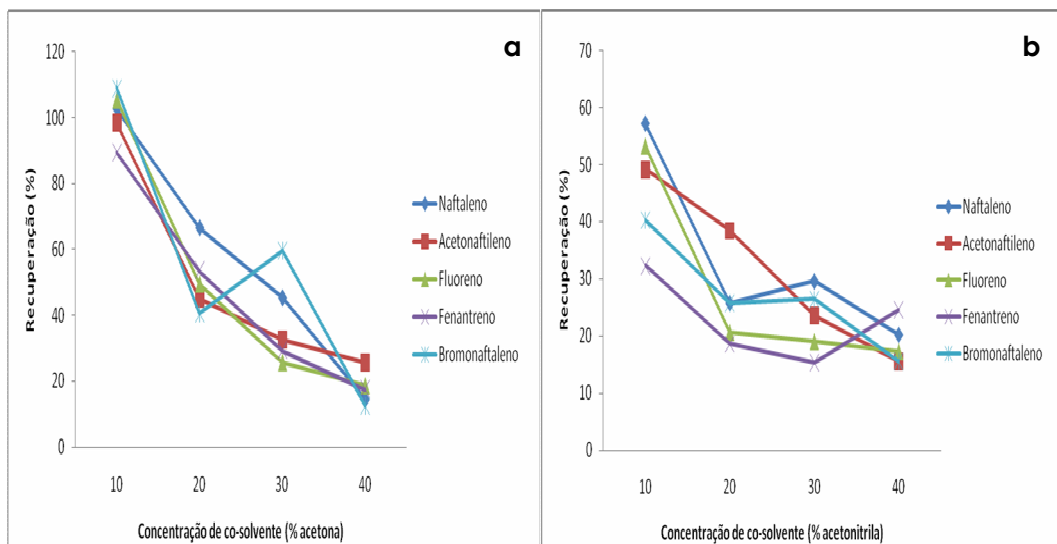


Figura 16. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de aminoácidos.

Comparando-se as Figuras 16a e 16b, quando usado acetona como co-solvente, este foi mais eficaz para os níveis de recuperações dos HPAS nas amostras de aminoácidos, sendo que este foi o co-solvente utilizado para tais amostras.

5.8.3 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de lipídeos.

Como pode ser observado na figura 17, utilizando 10% de acetona como co-solvente os níveis de recuperação não apresentaram resultados satisfatórios, variando entre 48,0% (INP) e 75,6% (BaP). Com o aumento da concentração de acetona para 20%, os resultados não apresentaram maiores recuperações, ficando entre 21,2% (BghiP) e 76,6% (PYR). Adicionando-se 30% de acetona nas amostras de lipídeos, os níveis de recuperação foram satisfatórios onde BghiP, FLU, BaA, apresentaram recuperações de 80,6; 86,4 e 90,5%, respectivamente. BaP, IND e BbF apresentaram resultados acima de 100%. Quando utilizado 40% de acetona (4mL) nas amostras de lipídeos observou-se um decréscimo nos níveis de recuperação que variaram entre 11,9% (BghiP) e 46,5% (PYR) (Figura 17a).

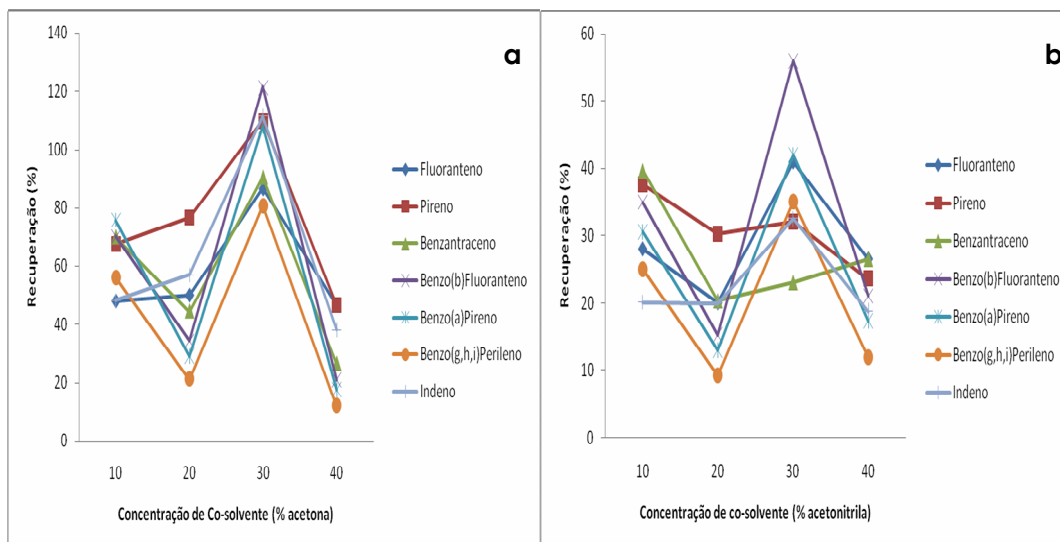


Figura 17. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de lipídeos.

Na figura 17b onde se utilizou acetonitrila como co-solvente, pode-se observar de um modo geral um decréscimo nos níveis de recuperação dos HPAs. Quando utilizado 10% de acetonitrila, os resultados de recuperações variaram entre 20,08% (IND) e 39,6% (BaA). Com a adição de 20% de acetonitrila na amostra, ocorreu um decréscimo nos níveis de recuperação, onde se obteve valores entre 9,2% (BghiP) e 30,2% (PYR). Quando se adicionou 30% de co-solvente, obteve-se um aumento significativos nas recuperações comparando-se com os resultados anteriores com o mesmo, variando de 23,02% (BaA) e 56,02% (BbF). Um grande decréscimo pode ser observado quando adicionado 40% de co-solvente, onde os valores variaram entre 15,6% (BaP) e 30,5% (BbF).

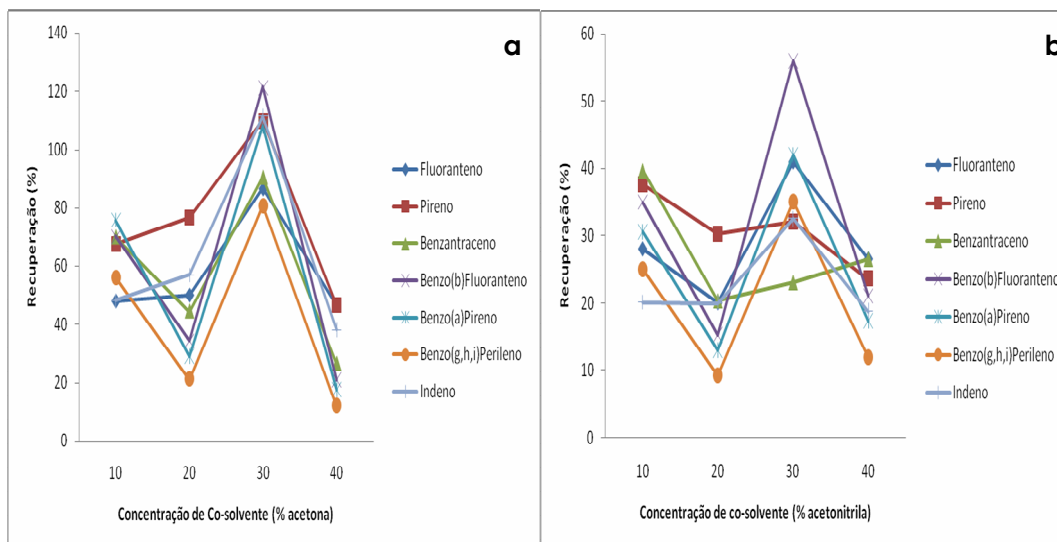


Figura 18. Efeito na recuperação de HPAs sensíveis por detecção UV utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra de lípidios.

Na figura 18 podemos observar o comportamento dos HPAs sensíveis por detecção UV nas amostras de lípidios.

Quando adicionado 10% de acetona como co-solvente nas amostras, pode-se perceber que os valores de recuperação dos HPAs foram baixos, variando de 39,9% (BRO) e 61,5% (PHEN). Utilizando 20% de acetona, não houve acréscimo nos valores, alguns até apresentando valores menores que os anteriores, sendo que os níveis de recuperação variaram entre 35,2% (BRO) e 59,5% (PHEN). Com 30% de acetona nas amostras obteve-se os valores satisfatórios de recuperação que ficaram entre 92,9% (PHEN) e 111,5% (FL). Quando adicionado 40% do co-solvente nas amostras de lípidios, os níveis de recuperação voltaram a diminuir, apresentando resultados que variaram entre 17,2% (NAP) e 29,5 (FL) (Figura 18a).

Na figura 18 observa-se o comportamento dos mesmos HPAs da figura 18a, sendo que nesta utiliza-se acetonitrila como co-solvente nas amostras de lípidios. Com adição de 10% de acetonitrila nas amostras de lípidios obteve-se recuperações entre 13,8% (ACY) e 41,2% (PHEN), com aumento para 20% de co-solvente os resultados tiveram variações entre 24,5% (PHEN) e 37% (BRO). O uso de 30% de acetonitrila nas amostras apresentou os melhores resultados para este co-solvente que variaram entre 39,9% (PHEN) e 58,6% (ACY). Já com a adição de 40% da mesma, os níveis de recuperação tiveram novamente uma diminuição, apresentando valores entre 12,3% (NAP) e 39,9% (FL).

Comparando-se as figuras 17 e 18 pode-se perceber que em ambas, o uso de acetona como co-solvente apresentou uma melhor recuperação para os HPAs nas amostras de lipídeos que variaram entre 80,6 e 121,3%.

5.8.4 Influência da adição de um co-solvente nas amostras de medicamentos.

Na figura 19, esta demonstrada a influência do uso de um co-solvente nos diferentes tipos de amostras de medicamentos. Podemos observar que utilizando concentrações de 10 e 20% de acetona como co-solvente nenhum dos quatro medicamentos aqui testados ultrapassou 65% de recuperação. Com o uso de 30% de co-solvente os medicamentos Dobutamina e Dopamina apresentaram um máximo de recuperação de 88 e 95,1% respectivamente, sendo que um aumento da concentração de acetona, levou a um decréscimo na recuperação dos HPAs para os mesmos. Já para os medicamentos Fresofol 1 e 2%, utilizando 40% de acetona obteve-se valores máximos nos níveis de recuperação, 97 e 99,1%, respectivamente (Figura 19a).

Na figura 19b, temos o comportamento de recuperações de HPAs quando utilizado acetonitrila como co-solvente. O uso de acetonitrila, teve um comportamento semelhante para os valores de recuperação entre os HPAs, no entanto utilizando este solvente os níveis foram menores, onde os níveis máximos não ultrapassaram 65%.

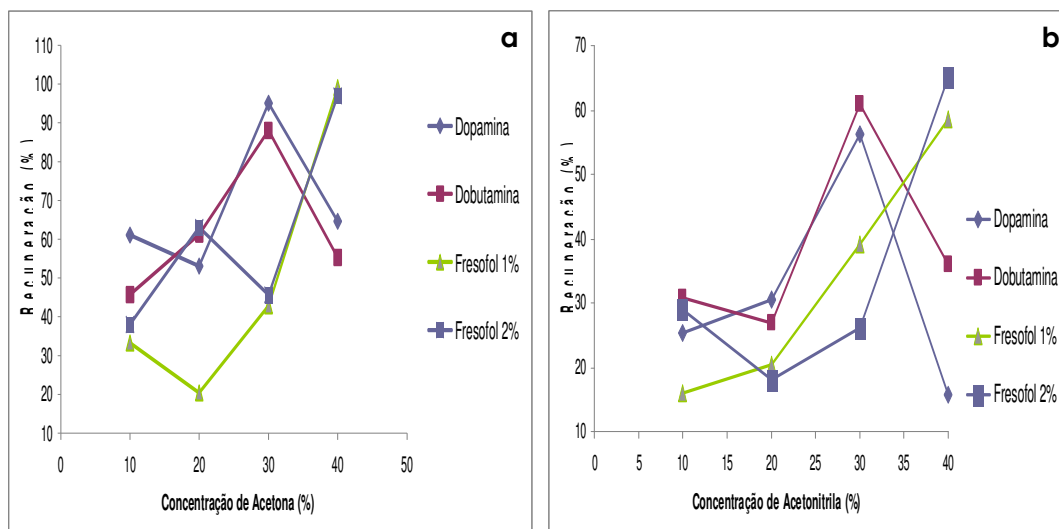


Figura 19. Efeito na recuperação de HPAs em amostras de Dopamina, Dobutamina Fresofol 1% e Fresofol 2%, utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra.

Observando a figura 20, onde temos a recuperação de HPAs em amostras de Fenobarbital, Fenitoína, Dipirona Sódica e Ranitidina, pode-se perceber que utilizando apenas 10% de acetona nas amostras dos respectivos medicamentos dois deles apresentam valores máximos de recuperação. Para Fenitoína e Fenobarbital obteve-se 100,3 e 103,6% respectivamente. Com o aumento do co-solvente para 20%, pode-se perceber que os valores máximos de recuperação para Dipirona Sódica e Ranitidina são obtidos, sendo 96,3% e 99,2% respectivamente. O aumento da concentração do mesmo nas amostras para 30 e 40% levou a um decréscimo nos níveis de recuperação para os quatro medicamentos testados.

Utilizando acetonitrila como co-solvente (figura 20b), obteve-se um gráfico de comportamento semelhante ao anterior. Contudo pode-se observar que os níveis de recuperação para este foram inferiores ao anterior.

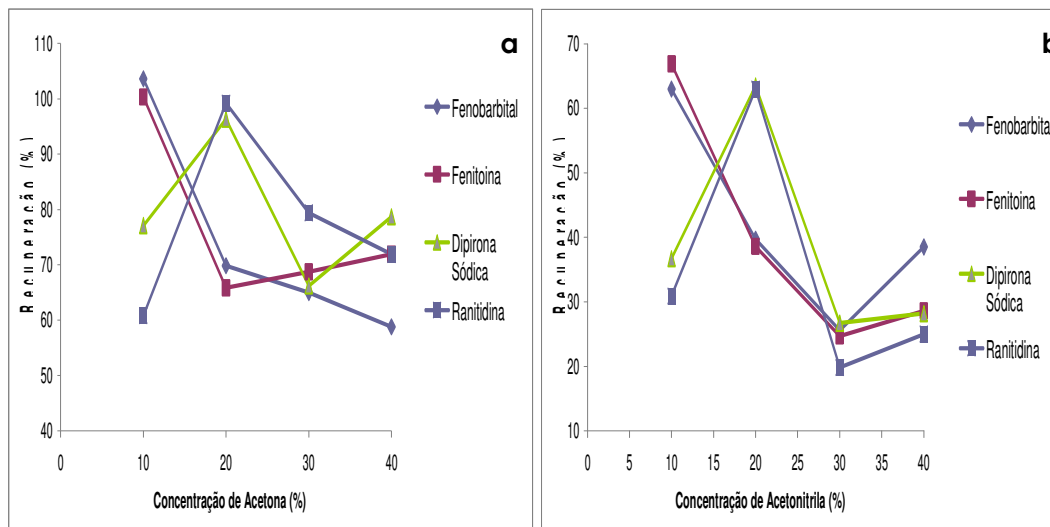


Figura 20. Efeito na recuperação de HPAs em amostras de Fenobarbital, Fenitoína, Dipirona Sódica e Ranitidina, utilizando (a) acetona e (b) acetonitrila como co-solvente em 9 mL de amostra.

5.9 Ensaio para verificar o efeito do processo de esterilização na extração dos HPAs.

Como as soluções parenterais são, via de regra, esterilizadas após o envase e, portanto o aquecimento ocorre em contato com a borracha das tampas, há o risco de extração dos HPAs por ação da temperatura.

O objetivo deste ensaio foi verificar a influência do processo de esterilização na extração dos HPAs presentes na borracha das tampas, em função da natureza das diferentes substâncias utilizadas na nutrição parenteral, o qual foi realizado de acordo com o item 4.11.

Para efeitos de comparação frente aos diversos tipos de amostras, o primeiro passo na investigação sobre a extração dos HPAs foi realizado com repetidos ensaios com água, considerando que todas as soluções são aquosas. Neste estudo não se observou nenhuma contaminação nas amostras de água após o processo de esterilização das mesmas, sendo que pode-se concluir que o aumento da temperatura não é suficiente para acelerar o processo de extração dos HPAs provenientes das tampas de borrachas das embalagens em água pura. No

entanto, na presença dos constituintes das soluções parenterais o efeito observado não foi o mesmo.

O efeito do processo de esterilização na extração dos HPAs, por ação das soluções de aminoácidos, é mostrado na figura 21. Pode-se observar FLR e BaA foram extraídos em maior quantidade nas amostras de cisteína, metionina e glicina. FLU e BRO apresentaram maior afinidade com o ácido glutâmico e leucina, enquanto, PYR e BbF com aminoácido básico (lisina).

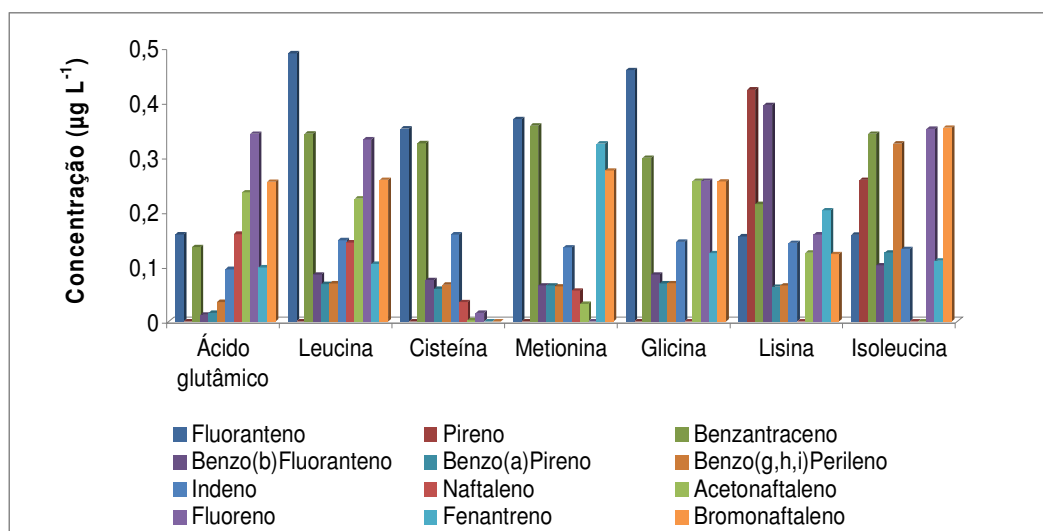


Figura 21. Extração de HPAs das tampas de borracha em soluções sintéticas de aminoácidos após o processo de esterilização.

É possível ver claramente que a contaminação por HPAs ocorre em concentrações consideráveis após o processo de esterilização nas soluções de todos os aminoácidos. Como com água pura não houve extração, pode concluir-se que os aminoácidos são responsáveis pela extração dos HPAs.

Já para as amostras de lipídeos, para efeito de comparação quanto as mesmas, foi realizado com repetidos ensaios com óleo de soja, sendo que todas as amostras de lipídeos utilizadas em nutrição parenteral são oleosas. A figura 22 mostra os HPAs extraídos das amostras de óleo de soja quando submetidas ao processo de esterilização.

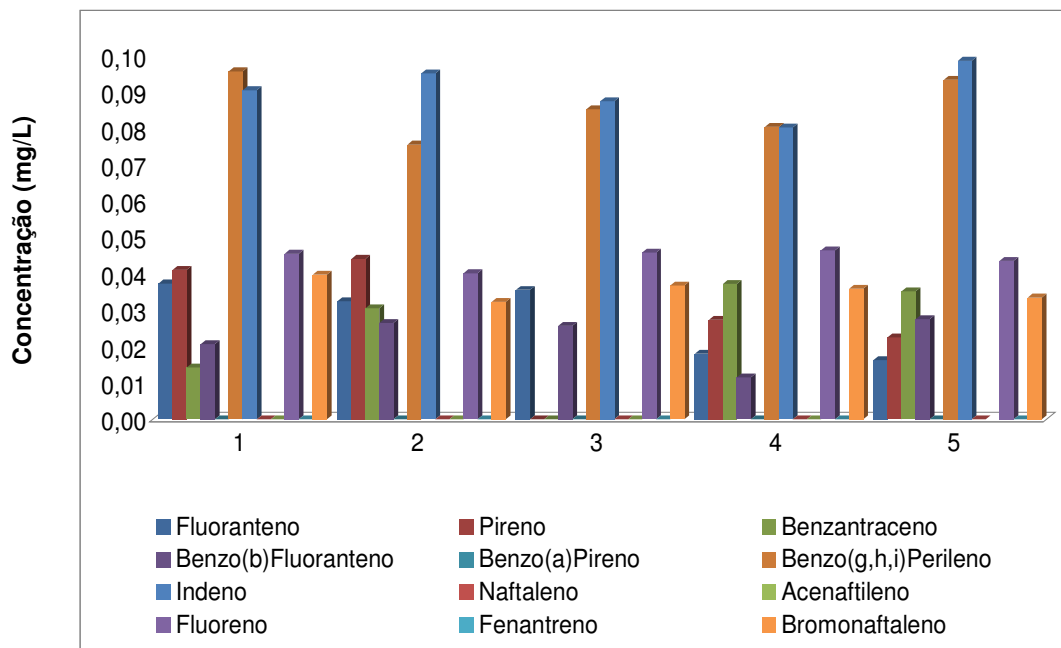


Figura 22. Concentração de HPAs em amostras de óleo de soja após o processo de esterilização.

Pode-se observar, pelos resultados obtidos, que o óleo de soja é capaz de extrair HPAs no processo de esterilização, ou seja, o aumento da temperatura é suficiente para acelerar o processo de extração dos mesmos. A quantidade média extraída foi $0,04 \text{ mg L}^{-1}$, e entre os HPAs os que mais foram extraídos foram BghiP e IND.

Os componentes das soluções lipídicas como ácido caprílico, ácido cáprico e lecitina de soja também extraíram HPAs das tampas de borrachas pela ação da temperatura. Como podem ser visto na figura 23, estas soluções mostram um comportamento semelhante ao do óleo de soja.

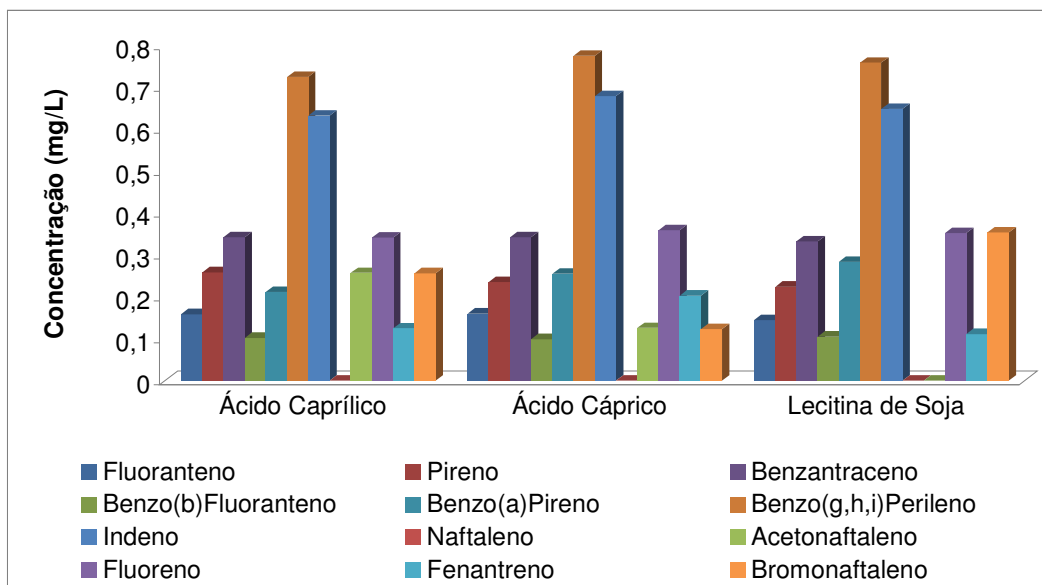


Figura 23. Concentração de HPAs em ácido caprílico, ácido cáprico e lecitina de soja após o processo de esterilização.

5.10 Recuperação

5.10.1 Recuperação dos HPAs em amostras de aminoácidos

A Tabela 20 apresenta os valores de recuperação para as amostras de aminoácidos, com o respectivo RSD%, para fortificações em três diferentes níveis de concentração (1 vez, 5 vezes e 10 vezes o valor do LOQ). Optou-se por escolher uma das soluções de aminoácidos para representar todas as amostras da classe, sendo assim utilizou-se aminoesteril, pois para esta havia um volume maior de amostra. A Figura 24 apresenta os cromatogramas para os HPAs sensíveis por detecção fluorimétrica e a Figura 25, os HPAs sensíveis por detecção UV para as mesmas fortificações.

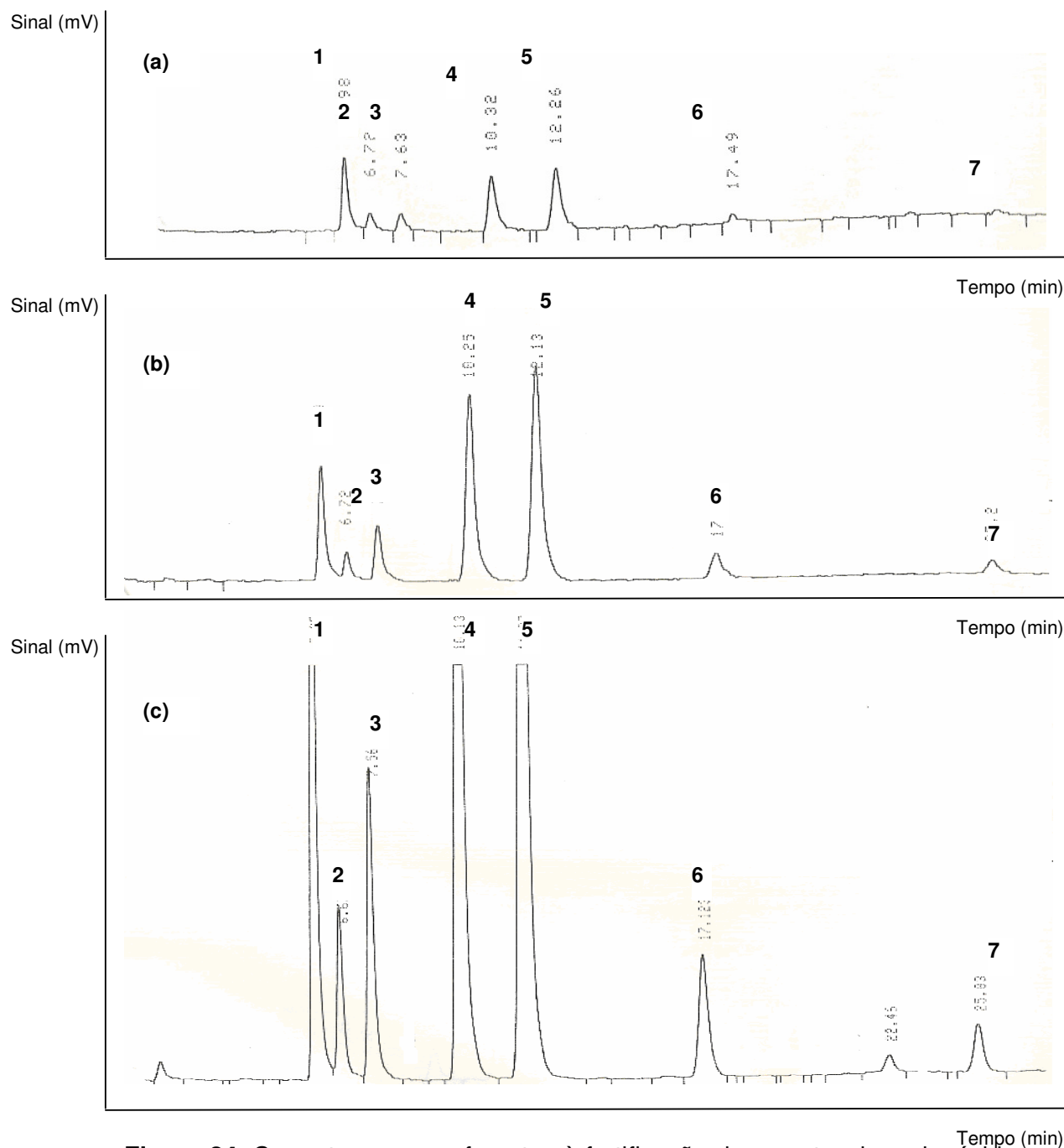


Figura 24. Cromatogramas referentes à fortificação da amostra de aminoácidos nos níveis 1(a), 2(b) e 3(c) sensíveis por detecção fluorimétrica, concentrações em mg L^{-1} , listadas na Tabela 15, fluxo $1,3 \text{ mL/min}$ e $\lambda_{\text{exc}} 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 425 \text{ nm}$. Onde se tem (1) Fluoranteno, (2) Pireno, (3) Benzo(a)Antraceno, (4) Benzo(b)Fluoranteno, (5) Benzo(a)Pireno, (6) Benzo(g,h,i)Perileno e (7) Indeno(1,2,3-c,d)Pireno.

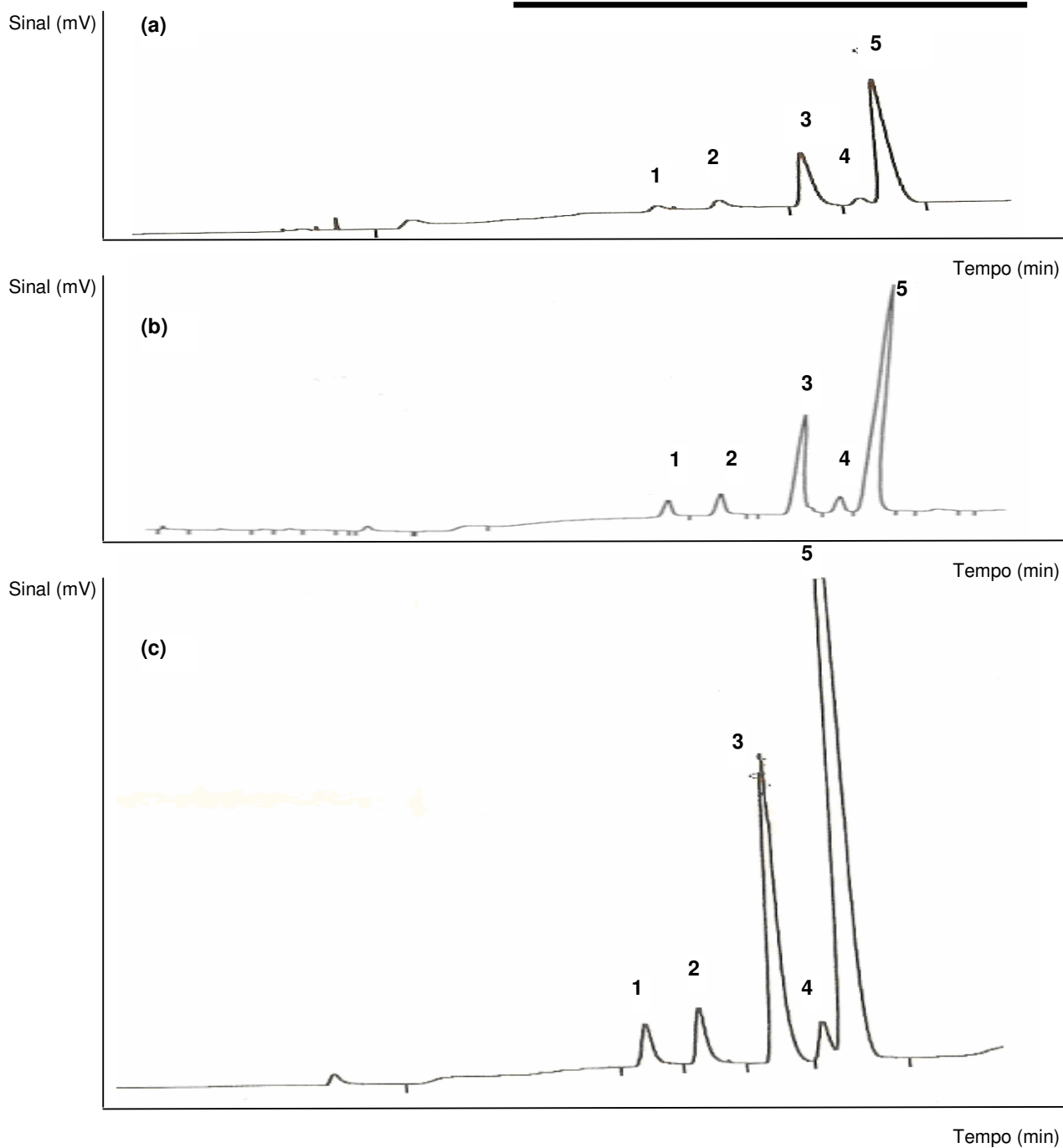


Figura 25. Cromatogramas referentes à fortificação da amostra de aminoácidos nos níveis 1 (a), 2 (b) e 3 (c) sensíveis por detecção UV concentrações em mg L^{-1} , listadas na Tabela 15, fluxo 1,0 mL/min e λ 254 nm. Onde se tem (1) Naftaleno, (2) Acenaftileno, (3) Fluoreno, (4) 2-Bromonaftaleno e (5) Fenantreno

Tabela 20. Valores de recuperação e RSD% para amostras de aminoácidos, em 3 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1.

| Composto | Fortificação (mg L ⁻¹) | Recuperação* Média ± RSD% |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 2-Bromonaftaleno | 0,09 | 99,9 ± 4,2 |
| | 0,45 | 114,8 ± 1,5 |
| | 0,90 | 117,1 ± 10,3 |
| Acetonaftaleno | 0,15 | 119,1 ± 0,9 |
| | 0,75 | 120,1 ± 0,4 |
| | 1,50 | 97,8 ± 6,1 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,33 | 118,0 ± 1,3 |
| | 1,65 | 122,1 ± 2,6 |
| | 3,30 | 117,3 ± 4,3 |
| Benzo(a)Pireno | 0,06 | 114,8 ± 6,3 |
| | 0,30 | 113,4 ± 7,1 |
| | 0,60 | 116,3 ± 1,6 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,14 | 119,8 ± 1,2 |
| | 0,70 | 119,0 ± 0,7 |
| | 1,40 | 119,9 ± 1,6 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,47 | 118,8 ± 1,7 |
| | 2,35 | 115,1 ± 2,0 |
| | 4,70 | 119,2 ± 1,0 |
| Fenantreno | 0,60 | 99,21 ± 4,5 |
| | 3,00 | 102,44 ± 3,0 |
| | 6,00 | 104,87 ± 3,5 |
| Fluoranteno | 0,12 | 120,1 ± 0,6 |
| | 0,60 | 122,8 ± 7,1 |
| | 1,20 | 109,4 ± 4,9 |
| Fluoreno | 0,06 | 95,6 ± 1,8 |
| | 0,30 | 98,7 ± 3,5 |
| | 0,60 | 100,5 ± 2,6 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 1,91 | 97,5 ± 2,8 |
| | 9,55 | 99,3 ± 1,5 |
| | 19,10 | 103,3 ± 2,5 |

| | | |
|-----------|------|-------------|
| Naftaleno | 0,22 | 115,6 ± 4,0 |
| | 1,10 | 112,1 ± 3,2 |
| | 2,20 | 113,9 ± 4,1 |
| Pireno | 0,07 | 103,8 ± 5,2 |
| | 0,35 | 98,9 ± 3,8 |
| | 0,70 | 100,5 ± 2,3 |

*n= 9 (3 extrações para 3 níveis de fortificação diferentes e 3 injeções cada extração).

Para todas as amostras analisadas, o valor encontrado para os HPAs já presentes nas mesmas foi descontado do adicionado.

Como podem ser observados na Tabela 20, os valores de recuperação dos analitos a partir das amostras de aminoácidos foram em média de 110,6%, mostrando que o método desenvolvido é satisfatório para a avaliação da presença e quantificação de HPAs em amostras de aminoácidos. Os valores de desvio padrão relativos ficarem entre 0,7 e 7,1% para os analitos em questão.

5.10.2 Recuperação dos HPAs em amostras de soluções lipídicas

A Tabela 21 apresenta os valores de recuperação para as amostras de soluções lipídicas, com o respectivo RSD%, para fortificações em três diferentes níveis de concentração (1 vez, 5 vezes e 10 vezes o valor do LOQ). Optou-se aqui, por escolher uma das emulsões lipídicas para representar todas as amostras da mesma classe, sendo assim, utilizou-se Lipovenos 20%.

Tabela 21. Valores de recuperação e RSD% para amostras de solução lipídica, em 3 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1.

| Composto | Fortificação (mg L ⁻¹) | Recuperação* Média ± RSD% |
|------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 2-Bromonaftaleno | 0,09 | 108,9 ± 2,4 |
| | 0,45 | 106,8 ± 5,1 |

| | | |
|------------------------|------|--------------|
| | 0,90 | 101,3 ± 4,1 |
| | 0,15 | 98,58 ± 1,9 |
| Acetonaftaleno | 0,75 | 102,58 ± 2,6 |
| | 1,50 | 97,5 ± 1,6 |
| | 0,33 | 87,5 ± 3,3 |
| Benzo(a)Antraceno | 1,65 | 107,9 ± 6,2 |
| | 3,30 | 96,9 ± 3,4 |
| | 0,06 | 122,7 ± 3,6 |
| Benzo(a)Pireno | 0,30 | 118,5 ± 3,51 |
| | 0,60 | 114,3 ± 3,6 |
| | 0,14 | 99,1 ± 2,1 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,70 | 105,0 ± 1,7 |
| | 1,40 | 110,9 ± 2,6 |
| | 0,47 | 87,5 ± 3,7 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 2,35 | 85,6 ± 1,0 |
| | 4,70 | 95,6 ± 2,0 |
| | 0,60 | 89,5 ± 3,5 |
| Fenantreno | 3,00 | 92,9 ± 3,0 |
| | 6,00 | 102,5 ± 5,3 |
| | 0,12 | 100,5 ± 6,0 |
| Fluoranteno | 0,60 | 97,5 ± 5,3 |
| | 1,20 | 100,6 ± 4,5 |
| | 0,06 | 105,5 ± 3,5 |
| Fluoreno | 0,30 | 111,5 ± 5,3 |
| | 0,60 | 101,6 ± 6,2 |
| | 1,91 | 94,5 ± 6,3 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 9,55 | 111,4 ± 5,1 |

| | | |
|-----------|-------|--------------|
| | 19,10 | 98,7 ± 5,2 |
| | 0,22 | 102,5 ± 3,5 |
| Naftaleno | 1,10 | 98,5 ± 2,3 |
| | 2,20 | 100,6 ± 1,4 |
| | 0,07 | 115,9 ± 2,5 |
| Pireno | 0,35 | 109,96 ± 8,3 |
| | 0,70 | 111,9 ± 3,2 |

Como podem ser observados na Tabela 21, os valores de recuperação dos analitos a partir das amostras de aminoácidos foram em média de 102,5%, mostrando que o método desenvolvido é satisfatório para a avaliação da presença e quantificação de HPAs em amostras lipídicas. Os valores de desvio padrão relativos ficaram entre 1 e 8,3% para os analitos em questão.

5.10.3 Recuperação dos HPAs em amostras de medicamentos.

Na Tabela 22 temos os valores de recuperação para as amostras de Fresofol 1 e 2% e Dopamina, com o respectivo RSD%, para fortificações em dois diferentes níveis de concentração (1 vez e 10 vezes o valor do LOQ).

Tabela 22. Valores de recuperação e RSD% para amostras de Fresofol 1 e 2% e Dopamina, em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1.

| Composto | Fortificação (mg L ⁻¹) | Recuperação* | | |
|------------------|---------------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| | | Fresofol 1% | Fresofol 2% | Dopamina |
| 2-Bromonaftaleno | 0,09 | 102,3 ± 4,5 | 108,9 ± 2,4 | 100,1 ± 3,5 |
| | 0,90 | 101,5 ± 3,2 | 99,8 ± 3,0 | 98,9 ± 2,9 |

| | | | | |
|------------------------|-------|-------------|-------------|-------------|
| Acetonaftaleno | 0,15 | 99,5 ± 2,5 | 95,8 ± 4,1 | 97,8 ± 2,6 |
| | 1,50 | 103,5 ± 2,3 | 97,9 ± 2,3 | 99,5 ± 1,2 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,33 | 89,5 ± 4,6 | 92,5 ± 1,5 | 90,7 ± 1,3 |
| | 3,30 | 95,9 ± 3,0 | 84,3 ± 3,5 | 97,5 ± 2,0 |
| Benzo(a)Pireno | 0,06 | 101,9 ± 3,9 | 105,0 ± 6,0 | 89,6 ± 4,2 |
| | 0,60 | 103,0 ± 4,0 | 98,9 ± 5,1 | 93,6 ± 2,5 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,14 | 96,3 ± 2,5 | 84,6 ± 2,8 | 95,3 ± 1,3 |
| | 1,40 | 98,5 ± 2,2 | 83,7 ± 3,6 | 100,9 ± 1,9 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,47 | 93,8 ± 2,3 | 88,6 ± 1,5 | 98,3 ± 3,0 |
| | 4,70 | 99,8 ± 1,9 | 98,3 ± 2,0 | 99,6 ± 3,8 |
| Fenantreno | 0,60 | 103,1 ± 3,0 | 89,9 ± 2,5 | 101,5 ± 1,2 |
| | 6,00 | 100,5 ± 1,9 | 93,6 ± 2,0 | 99,8 ± 1,8 |
| Fluoranteno | 0,12 | 96,7 ± 3,8 | 127,5 ± 5,0 | 95,0 ± 2,0 |
| | 1,20 | 91,2 ± 3,5 | 124,5 ± 6,1 | 110,2 ± 4,5 |
| Fluoreno | 0,06 | 95,6 ± 2,8 | 100,3 ± 2,1 | 98,5 ± 1,5 |
| | 0,60 | 105,1 ± 4,2 | 102,0 ± 2,6 | 96,5 ± 1,8 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 1,91 | 98,9 ± 3,1 | 98,9 ± 3,8 | 90,6 ± 3,0 |
| | 19,10 | 99,2 ± 2,0 | 99,7 ± 4,00 | 102,8 ± 2,9 |
| Naftaleno | 0,22 | 97,8 ± 1,5 | 100,2 ± 1,1 | 89,6 ± 2,7 |
| | 2,20 | 96,3 ± 1,8 | 103,5 ± 2,0 | 98,5 ± 3,6 |
| Pireno | 0,07 | 89,2 ± 2,6 | 82,0 ± 4,5 | 106,7 ± 2,5 |
| | 0,70 | 87,9 ± 2,1 | 94,1 ± 2,6 | 100,9 ± 2,1 |

*n= 9 (3 extrações para 2 níveis de fortificação diferentes e 3 injeções cada extração).

A Tabela 23 apresenta os valores de recuperação para as amostras de Dobutamina, Ranitidina e Fenitoína com o respectivo RSD%, para fortificações em dois diferentes níveis de concentração (1 vez e 10 vezes o valor do LOQ).

Tabela 23. Valores de recuperação e RSD% para amostras de Dobutamina, Ranitidina e Fenitoína em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1.

| Composto | Fortificação (mg L ⁻¹) | Recuperação* | | |
|------------------------|---------------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| | | Dobutamina | Ranitidina | Fenitoína |
| 2-Bromonaftaleno | 0,09 | 82,5 ± 5,1 | 95,6 ± 3,1 | 88,9 ± 2,9 |
| | 0,90 | 95,3 ± 2,1 | 95,9 ± 2,1 | 102,4 ± 2,3 |
| Acetonaftaleno | 0,15 | 99,2 ± 4,0 | 89,3 ± 2,6 | 105,2 ± 3,1 |
| | 1,50 | 103,6 ± 2,6 | 103,3 ± 2,5 | 96,8 ± 2,3 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,33 | 80,9 ± 3,9 | 105,6 ± 3,6 | 101,2 ± 2,4 |
| | 3,30 | 86,9 ± 1,9 | 98,8 ± 3,2 | 95,8 ± 2,8 |
| Benzo(a)Pireno | 0,06 | 95,8 ± 2,5 | 85,2 ± 5,4 | 110,4 ± 4,3 |
| | 0,60 | 97,2 ± 1,8 | 92,5 ± 3,1 | 102,1 ± 3,0 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,14 | 90,1 ± 3,9 | 102,0 ± 3,3 | 100,3 ± 2,9 |
| | 1,40 | 96,2 ± 4,0 | 100,9 ± 2,6 | 99,5 ± 1,5 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,47 | 89,7 ± 3,1 | 87,7 ± 3,9 | 89,5 ± 3,5 |
| | 4,70 | 105,0 ± 2,3 | 103,1 ± 2,4 | 99,5 ± 3,0 |
| Fenantreno | 0,60 | 100,9 ± 3,2 | 96,9 ± 2,3 | 98,8 ± 1,8 |
| | 6,00 | 95,6 ± 2,2 | 96,3 ± 2,8 | 100,5 ± 1,9 |
| Fluoranteno | 0,12 | 94,3 ± 2,5 | 121,1 ± 5,2 | 119,8 ± 5,1 |
| | 1,20 | 103,3 ± 2,9 | 102,0 ± 2,5 | 89,9 ± 3,2 |
| Fluoreno | 0,06 | 96,9 ± 2,1 | 97,7 ± 3,1 | 96,8 ± 2,9 |
| | 0,60 | 99,9 ± 2,2 | 90,9 ± 2,1 | 105,2 ± 2,7 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 1,91 | 87,5 ± 3,9 | 87,1 ± 4,0 | 90,1 ± 2,5 |
| | 19,10 | 92,9 ± 2,9 | 95,8 ± 2,3 | 99,8 ± 1,9 |
| Naftaleno | 0,22 | 97,1 ± 1,3 | 100,6 ± 2,1 | 97,8 ± 2,0 |
| | 2,20 | 99,6 ± 1,5 | 105,0 ± 3,0 | 98,9 ± 2,1 |

| | | | | |
|--------|------|------------|-------------|------------|
| Pireno | 0,07 | 87,9 ± 2,6 | 106,8 ± 2,9 | 90,5 ± 1,8 |
| | 0,70 | 96,9 ± 2,0 | 101,5 ± 2,6 | 96,5 ± 2,3 |

*n= 9 (3 extrações para 2 níveis de fortificação diferentes e 3 injeções cada extração).

A Tabela 24 apresenta os valores de recuperação para as amostras de Fenobarbital e Dipirona Sódica, com o respectivo RSD%, para fortificações em dois diferentes níveis de concentração (1 vez e 10 vezes o valor do LOQ).

Tabela 24. Valores de recuperação e RSD% para amostras de Fenobarbital e Dipirona Sódica, em 2 níveis de fortificação, obtidos com as curvas analíticas preparadas em solvente, conforme condições cromatográficas descritas no item 5.1.

| Composto | Fortificação (mg L ⁻¹) | Recuperação* | |
|----------------------|---------------------------------------|--------------|-----------------|
| | | Fenobarbital | Dipirona Sódica |
| 2-Bromonaftaleno | 0,09 | 89,8 ± 3,5 | 107,0 ± 3,8 |
| | 0,90 | 98,5 ± 2,5 | 100,3 ± 2,5 |
| Acetonaftaleno | 0,15 | 99,5 ± 3,2 | 95,3 ± 2,1 |
| | 1,50 | 103,5 ± 2,9 | 98,4 ± 2,0 |
| Benzo(a)Antraceno | 0,33 | 119,8 ± 4,9 | 97,7 ± 1,8 |
| | 3,30 | 101,9 ± 3,9 | 99,6 ± 2,3 |
| Benzo(a)Pireno | 0,06 | 94,0 ± 1,8 | 85,9 ± 4,5 |
| | 0,60 | 96,3 ± 2,8 | 92,8 ± 2,5 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,14 | 108,2 ± 3,9 | 101,9 ± 3,0 |
| | 1,40 | 102,8 ± 3,0 | 102,5 ± 3,1 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,47 | 82,4 ± 2,5 | 84,4 ± 4,8 |
| | 4,70 | 96,2 ± 2,9 | 89,6 ± 4,6 |
| Fenantreno | 0,60 | 96,8 ± 5,2 | 100,9 ± 2,1 |
| | 6,00 | 95,9 ± 3,1 | 103,5 ± 2,8 |

| | | | |
|------------------------|-------|-------------|-------------|
| Fluoranteno | 0,12 | 113,0 ± 3,6 | 121,6 ± 5,0 |
| | 1,20 | 99,8 ± 2,9 | 91,0 ± 1,8 |
| Fluoreno | 0,06 | 87,9 ± 5,6 | 86,1 ± 2,1 |
| | 0,60 | 102,5 ± 3,8 | 95,6 ± 3,1 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pireno | 1,91 | 96,5 ± 2,0 | 89,6 ± 2,0 |
| | 19,10 | 98,5 ± 2,5 | 103,1 ± 3,0 |
| Naftaleno | 0,22 | 102,8 ± 3,9 | 99,3 ± 2,1 |
| | 2,20 | 96,5 ± 3,0 | 98,6 ± 3,8 |
| Pireno | 0,07 | 94,7 ± 2,9 | 93,0 ± 2,6 |
| | 0,70 | 95,8 ± 3,8 | 96,8 ± 3,5 |

*n= 9 (3 extrações para 2 níveis de fortificação diferentes e 3 injeções cada extração).

Observando as tabelas 22, 23 e 24 pode-se perceber que os valores de recuperação dos analitos a partir das diferentes amostras de medicamentos estiveram entre 80,9 e 127,5%, sendo que a maior parte das amostras apresentou níveis de recuperação muito próximo de 100%. Pode-se observar também que os valores de desvio padrão relativo ficou entre 1,1 e 6,1% para os analitos em questão.

5.11 Avaliação da presença de HPAs em amostras comerciais

O procedimento desenvolvido foi aplicado em 6 amostras de aminoácidos (Tabelas 12 e 13), sendo que para Primène foi analisado três diferentes lotes da mesma formulação; 4 amostras de soluções lipídicas (Tabela 14) e 8 amostras de medicamentos injetáveis (Tabela 15). A escolha do número de amostras deve-se a quantidade das mesmas que estavam disponíveis. A análise das amostras indicou a contaminação das mesmas por HPAs, algumas amostras apresentaram até 4 diferentes analitos.

A aplicação do procedimento desenvolvido não apresentou dificuldades, pois durante as etapas de desenvolvimento e validação empregou-se amostra real para os testes de recuperação dos compostos.

5.11.1 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de aminoácidos comerciais.

A concentração dos HPAs em soluções comerciais de aminoácidos usadas na nutrição parenteral é mostrada nas tabelas 25 e 26. Foram analisadas três amostras de cada lote.

Três diferentes lotes das amostras de Primène (Tabela 25) foram analisadas, onde nas três amostras foram identificados 4 HPAs, entre estes que apresentou maior concentração foi o B(ghi)P que teve uma variação entre 0,14 e 0,17 mg L⁻¹. As amostras de Aminoped, apresentaram 3 diferentes HPAs, destacando-se aqui PYR com uma concentração de 0,16 mg L⁻¹.

Tabela 25. Determinação de HPAs em amostras comerciais de aminoácidos – Primène, Aminoped

| HPAs (mg L ⁻¹) | Primène (1) | Primène (2) | Primène (3) | Aminoped |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Baxter | Baxter | Baxter | Fresenius |
| Média ± RSD% | | | | |
| 2-Bromonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Acetonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Antraceno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Pireno | 0,02 ± 5,1 | 0,02 ± 0,83 | 0,03 ± 2,14 | 0,11 ± 2,54 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,03 ± 2,96 | 0,03 ± 3,77 | 0,03 ± 2,35 | 0,04 ± 0,81 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | 0,13 ± 3,51 | 0,17 ± 14,8 | 0,17 ± 6,15 | < LD |

| | | | | |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Fenantreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoranteno | 0,13 ± 2,3 | 0,13 ± 3,84 | 0,14 ± 1,53 | n.d |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Naftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Pireno | < LD | < LD | < LD | 0,16 ± 11,2 |

Na tabela 26, tem-se a análise de HPAs em amostras de Aminoplasmal, Nefroamino, Aminoesteril e Aminoesteril Hepa 8%. As amostras de Aminoplasmal apresentaram-se contaminadas por dois HPAs, (BaP e PYR), nas de Nefroamino foram identificados três contaminantes que variaram a concentração entre 0,07 mg L⁻¹ (BaP) e 0,08 mg L⁻¹ (PYR)

Já para as amostras de Aminoesteril detectou-se apenas PYR, 0,11 mg L⁻¹ e as amostras de Aminoesteril Hepa 8% não foi detectado nenhum dos HPAs estudados.

Tabela 26. Determinação de HPAs em amostras comerciais de aminoácidos – Aminoplasmal, Nefroamino, Aminoesteril, Aminoesteril Hepa 8%

| HPAs (mg L ⁻¹) | Aminoplasmal | Nefroamino B. | Aminoesteril | Aminoesteril |
|----------------------------|---------------|---------------|--------------|----------------------|
| | B. Braum Lab. | Braum Lab. | Fresenius | Hepa 8% Fresenius |
| Média ± RSD% | | | | |
| 2-Bromonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Acetonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Antraceno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Pireno | 0,16 ± 1,01 | 0,07 ± 1,07 | < LD | < LD |

| | | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|------|
| Benzo(b)Fluoranteno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(g,h,i)Perileno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fenantreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoranteno | < LD | 0,17 ± 3,83 | < LD | < LD |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Naftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Pireno | 0,21 ± 2,97 | 0,18 ± 7,9 | 0,11 ± 7,89 | < LD |

5.11.2 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de emulsões lipídicas comerciais.

A concentração de HPAs em amostras de emulsões lipídicas comerciais está mostrada na tabela 27, sendo que para estas apenas um lote de cada foi analisado.

Como pode ser observado na Tabela 27, as 4 diferentes amostras de emulsões lipídicas apresentaram contaminação por BaP e PYR, onde houve variação na concentração dos mesmos entre 0,07 mg L⁻¹ (PYR em amostras de Lipofundim 10%) e 0,19 mg L⁻¹ (BaP em amostras de Lipovenos 20%). Nas amostras de Lipovenos 10 e 20% foram detectados 0,15 e 0,13 mg L⁻¹ de FLR, respectivamente.

Tabela 27. Determinação de HPAs em amostras comerciais de emulsões lipídicas – Lipofundin 10 e 20% e Lipovenos 10 e 20%

| HPAs (mg L ⁻¹) | Lipofundin | Lipofundin | Lipovenos | Lipovenos |
|----------------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| | 10% Fresenius | 20% Fresenius | 10% | 20% |
| Média ± RSD% | | | | |
| 2-Bromonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Acetonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Antraceno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Pireno | 0,14 ± 3,3 | 0,15 ± 0,88 | 0,14 ± 4,1 | 0,19 ± 4,45 |
| Benzo(b)Fluoranteno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(g,h,i)Perileno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fenantreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoranteno | < LD | < LD | 0,15 ± 4,44 | 0,13 ± 2,99 |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Naftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Pireno | 0,07 ± 3,37 | 0,07 ± 7,3 | 0,08 ± 9,3 | 0,08 ± 2,3 |

5.11.3 Determinação cromatográfica de HPAs em amostras de medicamentos.

A concentração de HPAs em amostras de medicamentos injetáveis utilizadas em bebês prematuros está mostrada nas tabelas 28 e 29.

Como pode ser observado na Tabela 28, todas as amostras de medicamentos injetáveis, Fresofol 1%, Fresofol 2%, Dobutamina e Ranitidina

apresentaram contaminação por HPAs, sendo que nos 4 diferentes medicamentos foram identificados os mesmos quatro analitos em concentrações que variaram de 0,12 mg L⁻¹ (PYR) em amostras de Ranitidina e 0,31 mg L⁻¹ (BaP) em amostras de Fresofol 1%.

Para os demais medicamentos analisados (Tabela 29), as amostras de Fenobarbital apresentaram contaminação somente por BaP, 0,06 mg L⁻¹, Dipirona Sódica teve dois HPAs detectados, BaP (0,07 mg L⁻¹) e PYR (0,10 mg L⁻¹), em Fenitoína três analitos que variaram entre 0,09 e 0,29 mg L⁻¹. As amostras de Dopamina apresentaram contaminação por PYR, numa concentração de 0,10 mg L⁻¹.

Tabela 28. Determinação de HPAs em amostras de Fresofol 1 e 2%, Dobutamina e Ranitidina

| HPAs (mg L ⁻¹) | Fresofol 1% | Fresofol 2% | Dobutamina | Ranitidina |
|----------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | Média ± RSD% | | | |
| 2-Bromonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Acetonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Antraceno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Pireno | 0,31 ± 4,54 | 0,24 ± 3,88 | 0,25 ± 8,6 | 0,31 ± 4,73 |
| Benzo(b)Fluoranteno | 0,24 ± 4,42 | 0,19 ± 2,54 | 0,19 ± 5,0 | 0,15 ± 7,59 |
| Benzo(g,h,i)Perileno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fenantreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoranteno | 0,19 ± 3,11 | 0,16 ± 1,20 | 0,14 ± 7,5 | 0,13 ± 5,53 |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Naftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Pireno | 0,18 ± 3,61 | 0,15 ± 2,9 | 0,14 ± 1,77 | 0,12 ± 4,33 |

Tabela 29. Determinação de HPAs em amostras de Fenobarbital, Dipirona Sódica, Fenitoína e Dopamina

| HPAs (mg L ⁻¹) | Fenobarbital | Dipirona Sódica | Fenitoína | Dopamina |
|----------------------------|--------------|-----------------|------------|------------|
| | Média ± RSD% | | | |
| 2-Bromonaftaleno | < LD | < LD | 0,09 ± 3,5 | < LD |
| Acetonaftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Antraceno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(a)Pireno | 0,06 ± 2,09 | 0,07 ± 3,09 | < LD | < LD |
| Benzo(b)Fluoranteno | < LD | < LD | 0,14 ± 4,8 | < LD |
| Benzo(g,h,i)Perileno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fenantreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoranteno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pireno | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Naftaleno | < LD | < LD | 0,29 ± 5,8 | < LD |
| Pireno | < LD | 0,10 ± 1,84 | < LD | 0,10 ± 3,8 |

6 CONCLUSÕES

Os métodos de HPLC com detecção fluorimétrica e UV utilizados demonstram sensibilidade adequada para detecção dos HPAs estudados em amostras de soluções lipídicas, de aminoácidos e medicamentos injetáveis testados, sendo considerada uma medida adequada de exposição aos HPAs. A metodologia testada apresenta baixa interferência da matriz nas análises, sendo que apenas separação e pré-concentração através de colunas de poliestireno de confecção própria foram necessárias para o preparo das amostras antes da análise. Desta forma, um grande número de amostras pode ser analisado em intervalo de tempo relativamente curto.

Na primeira etapa deste trabalho foi analisado a concentração de HPAs presentes no negro de fumo e posterior em amostras de borracha utilizadas para fechar as embalagens. O método de extração para as amostras foi satisfatório, sendo que um pequeno consumo de solvente e um tempo de extração também pequeno foi necessário para identificar, bem como quantificar os analitos. As amostras de borracha analisadas estavam contaminadas por HPAs, sendo assim de grande importância esta etapa. Uma vez que estas estão contaminadas, pode haver a contaminação de soluções de aminoácidos e lipídeos, os quais ficam em contato com as mesmas.

A segunda etapa deste trabalho consistiu na aplicação do método de separação/pré-concentração com as colunas de poliestireno para verificar os teores de contaminação de HPAs em amostras de aminoácidos, soluções lipídicas e de medicamentos injetáveis. O objetivo foi verificar o impacto do uso de tampas de borrachas, nas quais foi detectada contaminação por HPAs. Dentre as amostras analisadas, o BaP foi encontrado em 16 amostras, seguido por PYR, 14 amostras e,

FLR 10 amostras. O NAP e o BRO foram encontrados apenas em amostras de Fenitoína.

Os resultados apresentados indicam que as borrachas de seringas e aquelas utilizadas em tampas de medicamentos podem ser uma fonte de contaminação de HPAs para os usuários dos mesmos. Levando em consideração os efeitos mutagênicos e carcinogênicos dos HPAs, justifica-se a importância destas análises.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RE nº 475 de 19/03/2002, apud RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. et al. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quím. Nova**, 2004.

APITZ, S. E.; ARIAS, E.; SHERI A. C.; LIN, E. W.; MELCHER, R. J.; HEMMINGSEN, B. B. Aged Marine Sediment for Biodegradation Experiments: Chemical Results. **Organic Geochemistry**. v. 30, p. 891 - 900.,1999.

AVIS, K. E. LACHMAN, L. LIERBMAN, H. A. Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications, Vol. 2, Ed. **Marcel Dekker Inc.**, New York, 1986.

BARTLE, K.D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **Cambridge: The Royal Society of Chemistry**, Cap. 3, p 41 – 60, 1991.

BECKER, E.M. **Estudo da distribuição de selênio em animais experimentais em função da espécie de selênio ingerida e da via de administração**. Tese de doutorado – Centro de Ciências Sociais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2006

BENGTSSON, G.; ZERHOUNI, P. Effects of Carbon Substrate Enrichment and DOC Concentration on Biodegradation of PAHs in Soil. **Journal Appl. Microbiol. Elsevier**. v. 94, p. 608 – 617, 2003

BENLAHCEN, K. T.; CHAOU, A.; BUDZINSKY, H.; BELLOCQ, J.; GARRIGUES, P. H. Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Mediterranean Coastal Sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v. 34, n.5, 298 – 305, 1997.

BESOMBES, J. L.; MAÎTRE, A.; PATISSIER, O.; MARCHAND, N.; CHEVRON, N.; STOKLOV, M.; MASCLLET, P. Particulate PAHs Observed in the Surrounding of a Municipal Incinerator. **Atmospheric Environment**. V. 35, p. 6093 – 6104, 2001.

BIRKHOLZ, D.A., COUTTS, R.T.; HURDEY, S.E. Determination of polycyclic aromatic compounds in fish tissue. **Journal of Chromatography**, v. 449, p. 251 - 260, 1988.

BISPO, A., JOURDAIN, M. J.; FAREED, K. H. Toxicity and Genotoxicity of Industrial Soil Polluted by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HPA). **Organic Geochemistry**. v. 30, p. 947 – 952, 1999.

BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A. Sources and Transport of Hydrocarbons in the Rhone Delta Sediments (Northwestern Mediterranean). **Analytical Chemistry**. v. 399, p. 765 – 771, 1991

BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURTEN, B. E. **Chemistry – The Central Science**. ed.9, p. 919 – 921, 2005.

BUDZINSKI, H.; JONES, I.; BELLOCQ, J.; PIÉRARD, C.; GARRIGUES, P. Evaluation of Sediment Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Gironde Estuary. **Marine Chemistry**. v. 58, p. 85 – 97, 1997.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 19 - 26, 2002a.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22 (1), p. 49 - 53, 2002b.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – uma Revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36 (1), p. 69 - 78, 2002c.

CAMARGO, M.S.F.O.; TOLEDO, M.C.F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, creme vegetal e maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20 (1), p. 51 - 55, 2000.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. **Food Control**, v. 14 (1), p. 49 - 53, 2003.

CAUSON, R. **J. Chromatogr. B**, v. 689; p.175 –180, 1997.

CDER- Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance – **Validation of Chromatographic Methods**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder> na seção “Regulatory Guidance”. Acessado em 10 de julho de 2009.

CHASIN, A. A.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; et al. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, 1998.

CHEN, B.H.; WANG, C.Y.; CHIU, C.P. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44 (8), p. 2244 - 2251, 1996.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da Unicamp. Campinas. S.P. ed.6, p.279. 1995.

CONNELL, D. W.; WU, R. S. S.; RICHARDSON, B. J.; LEUNG, K.; P. S. K.; CONNELL, P. A. Occurrence of Persistent Organic Contaminants and Related Substances in Hong Kong Marine Areas: an Overview. **Marine Pollution Bulletin**. v. 36, n.5, p. 376 – 384, 1998.

COSTA, A. F. de. **Avaliação da contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos : 1-hidroxipireno–urinário**. 2001. Dissertação de Mestrado-Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; MCWEENY, D. J. KNOWLWES, M.E. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK total diets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 21 (5), p. 569 - 574, 1983.

DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HOWARTH, N.; LEE, G. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 8 (4), p. 517 - 530, 1991.

DE VOS, R.H.; VAN DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; DE JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). **Food and Chemical Toxicology**, v. 28 (4), p. 263 - 268, 1990.

DUPEYRON, S.; DUDERMEL, P.M.; COUTURIER, D.; GUARINI, P.; DELATTRE, J.M. Extraction of PAHs from Soils - A Comparison Between Focused Microwave-Assisted Extraction, Supercritical- Fluid Extraction, Subcritical Solvent-Extraction Sonication and Soxhlet Techniques. *Int. J. Env. Anal. Chemistry*. v.73, p. 191–210, 1999.

ETTRE, L. S. **Pure & Appl Chem.**, 65 (1993) 852. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acessado em: 23 jun. 2009.

FISCHER, J. E. **Nutrição Parenteral**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.

FRANCOTTE, E., DAVTZ, A. RICHERT, R. **J. Chromatogr. B.**, v. 686, p. 77 – 83, 1997.

GARCIA, F.M.S.; GONZÁLEZ, A.S.; LAGE, Y.M.A.; SIMAL, L.J. Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. **Food Additives and Contaminants**, v.16 (1), p. 9 -14, 1999.

GARCIA, F.M.S.; CANCHO, G.B.; SIMAL, L. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. **Food Chemistry**, v. 90 (4), p. 643 - 647, 2005.

GRIMMER, G.; BOHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile of high protein foods, oil and fats by gas chromatography. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 58 (4), p. 724 - 733, 1975.

GRYNKIEWICZ, M.; POLKOWSKA, Z.; NAMIESNIK, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk precipitation and runoff waters in an urban region (Poland). **Atmospheric Environmental**, v. 36, p. 361 – 369, 2002.

GUILLEN, M.D. & SOPELANA, P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Divers Food. In: J.P.F. D'Mello Editor. **Food Safety: Contaminants and Toxins**. 2003.

HARRAKI, B. GUIRAUD, P. ROCHAT, M. H. ALARY, J. FAVIER, A. Interactions related to trace elements in parenteral nutrition. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 269 – 278, 1995.

HILL, A. (Coord.) **2nd EU Workshop on Coordinated Analytical Quality Control**, Athens, Greece, 15-17 November, 1999.

HUSAIN, A.; NAEEMI, E.; DASHTI, B.; AL-OMIRAH, H.; AL-ZENKI, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. **Food Additives and Contaminants**, v. 14 (3), p. 295 - 299, 1997.

ICH – International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1995, Apud RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. et al. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quím. Nova**, 2004.

INMETRO – **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Revisão 01. DOQ-CGCRE-008, 2003

IRIS, Integrated Risk Information System. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris>>. Acessado em 15 jan. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Soil quality determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) – High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Method, ISO 13877**. 1995.

JONKER, T.; KOELMANS, A. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soot and Sediment: Solvent Evaluation and Implications for Sorption Mechanism. **Environmental Science Technology**. v. 36, p. 4107 – 4113, 2002.

JUHASZ, A.L. & NAIDU, R. Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: a Review of the Microbial Degradation of Benzo[a]pyrene. **Int. Biodet. Biodeg**. v. 45, p. 57–88. 2000.

KAYADI-SAYADI, M.N.; RUBIO-BARROSO, S.; BECEIRO-ROLDAN, C.; POLO-DIEZ, L.M. Rapid determination of PAHs in drinking water samples using solid-phase extraction and HPLC with programmed fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 19 (19), p. 3135 -3146, 1996.

KICINSKI, H.G.; AADAMEK, S.; KETTRUP, A. Trace enrichment and HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, using solid phase extraction in connection with UV/VIS diode array and fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 28, p. 203 - 208, 1989.

KIM, E.J.; OH, J.E.; CHANG, Y.S. Effects of Forest Fire on the Level and Distribution of PCDD/Fs and PHAs in Soil. **The Science of the Total Environment**. v. 311, p. 177 – 189, 2003.

KISHIKAWA, N.; WADA, M.; KURODA, N.; AKIYAMA, S.; NAKASHIMA, K. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatograph B**, v. 789, p. 257 - 264, 2003.

KO, L.P. & BAKER, J.E. Internal Cycling of Particle Reactive Organic Chemicals in the Chesapeake Bay Water Column. **Marine Chemistry**, v. 81, p.163–176. 2003.

KORENKOVÁ, E.; MATISOVÁ, E.; SLOBODNÍK, J. Application of Large Volume Injection GC-MS to Analysis of Organic Compounds in the Extracts and Leachates of Municipal Solid Waste Incineration Fly Ash. **Waste Management**, 2005.

KRUIJF, N.; SCHOUTEN, T.; VAN, G.H.D. Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35 (4), p. 545 - 549, 1987.

KISS, G.; VARGA-PURCHONY, Z.; HLAVAY, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 72, p. 261 – 272, 1996.

LAGE-YUSTY, M.A.; CORITZO-DAVIÑA, J.L. Supercritical fluid extraction and highperformance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. **Food Control**, v. 16 (1), p. 59 - 64, 2005.

LARSSON, B.K. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish food – Aspects on analysis, occurrence and intake**. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 1986.

LAWRENCE, J.F. WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetables and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32 (4), p. 794 - 797, 1984.

LEE, H. K. Recent applications of gas and high-performance liquid chromatographic techniques to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. **Journal of Chromatography A**, v. 710, p. 79 – 92, 1995.

LEUNG, F. Y. Trace elements in parenteral micronutrition. **Clinical Biochemistry**, v. 28(6) p. 561 – 566, 1995.

LI, N.; LEE, H. K. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water Negative effect of humic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 255 – 263, 2001.

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food and Chemical toxicology**, v. 43 (1), p. 41 - 48, 2005.

LÓPEZ-RAMOS, E. **Geología de México**. Ed. Tesis Reséndiz. p. 28. 1979.

MARTINEZ, E.; GROS, M.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 181 – 188, 2004.

MASTRAL, A. M.; CALLEN, M. S. A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) Emissions from Energy Generation. **Environment Science Technology**, v. 34, p. 3051 - 3057. 2000.

MAZZERA, D.; HAYES, T.; LOWENTHAL, D.; ZIELINSKA, B. Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil at McMurdo Station, Antarctica. **The Science of the Total Environmental**, v. 229, p. 65 - 71. 1999.

MORENO GARCÍA AND FUNES, 1991 MORENO GARCÍA, H., FUNES, S., Chapala el lago. **Comisión del Agua**. México, 1991.

NETTO, D. P. A.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Química Nova**. V. 23 (6), p. 765 – 773, 2000.

NETTO, D. P. A. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Amostras Ambientais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

OLLIVON, D.; BLANCHARD, M.; GARBAN, B. PAH Flutuations in Rivers in the Paris Regions (France); Impacts of Flood and Rainy Events. **Water, Air and Soil Pollution**. v. 115, p. 429 – 444, 1998.

PALM, L.; COUSINS, Ö.; GUSTAFSSON, J.; AXELMAN, K.; GRUNDER, D.; BROMAN, E. Evaluation of Equentially-Coupled POP Fluxes Estimated from Simultaneous Measurements in Multiple Compartments of an Air–Water–Sediment System. **Environmental Pollution**, v.128, p. 85–97. 2004.

PHILLIPS, D.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutation Research**, v. 443, p. 139 - 147, 1999.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Quím. Nova**, v. 19, p. 268 – 277, 1996.

PISUPATÍ, S. V.; WASCO, R. S.; SCARONI, A. W. An Investigation on polycyclic Aromatic Hydrocarbons Emissions from Pulverized Coal Combustions Systems. **J. Hazard. Mater**. v. 74, p. 91 – 107, 2000.

PLUHATOR-MURTON, M. M. FEDORAK, R. N. AUDETTE, R. J. MARRIAGE, B. J. YATSCOFF, R. W. GRAMLICH, L. M. Trace element contamination of total parenteral nutrition. 1. Contribution of component solutions. **J. Parenter. Enteral Nutr**, v. 23(4), p. 222 – 227, 1999.

PUPIN, A.M.; TOLEDO, M.C.F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils. **Food Additives and Contaminants**, v. 55 (2), p. 185 - 188, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. et al., Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quim. Nova**, 2004.

RIBEIRO, F.A. **Aplicação de Método de Análise Multivariada no Estudo de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos**. 2001. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Campinas, Unicamp. São Paulo. 2001.

RICKING, M.; SCHULZ, H-M. PAH – Profiles in Sediment Cores from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 565 – 570, 2002.

SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Pollution and Bioremediation. **Trends in Biotechnology**. v. 20, p. 243 – 248, 2002.

SCOTT, P.M. Methods of Analysis for Mycotoxins – an Overview. Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods. **Elsevier Applied Science**. London. p.141 – 184, 1991.

SERRA, G.E.; PUPIN, A.M.; TOLDO, M.C.F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29 (2), p. 134 - 137, 1995.

SHIMMO, M.; ADLER, H.; HYÖTYLÄINEN, T.; HARTONEN, K.; KULMALA, M.; RIEKKOLA, M-L. Analysis of Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Coupled Supercritical Fluid Extraction–Liquid Chromatography–Gas

Chromatography–Mass Spectrometry. **Atmospheric Environment**. v. 36, p. 2985 – 2995, 2002.

SIMKO, P. Review - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 3 -18, 2002.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.L. **Fundamentos de Química Analítica**, 8 ed., USA, Ed. Saunders College Publishing, p. 999, 2007.

SONG, Y. F.; JING, X.; FLEISCHMANN, S.; WILKE B. M. Comparative Study of Extraction Methods for the Determination of PAHs from Contaminated Soils and Sediments. **Chemosphere**. v. 48, p. 993 -1001, 2002.

SPEER, K.; STEEG, E.; HORTSMANN, P.; KUHN, T.; MONTAG, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 13, p. 104 - 111, 1990.

STOUT, S.A.; UHLER, A.D.; EMSBO-MATTINGLY, S.D. Comparative Evaluation of Background Anthropogenic Hydrocarbons in Surficial Sediments from Nine Urban Waterway. **Environmental Science and Technology**. V. 38, p. 2987 – 2994, 2004

SUN, P.; WEAVERS, K. L.; TAERAKUL, P.; WALKER, H. W. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Lime Spray Dryer (LSD) Ash Using Different Extraction Methods. **Chemosphere**, 2005.

THOMPSON, M. et al., Pure & Appl. Chem., 2002. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. et al., Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quím. Nova**, 2004.

TOLEDO, M.C.F.; CAMARGO, M.S.F.O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18 (1), p. 73 - 76, 1998.

TUOMINEN, J.P.; PYSSALO, H.S.; SAURI, M. Cereal products as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 36, p. 118 - 120, 1988.

URBE, I.; RUANA, J. Application of solid-phase extraction discs with a glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 337 – 345, 1997.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Organic Chemistry: Structure and Function**. University of California. Estados Unidos. Bookman. ed.4, p.81-94, 2004.

XU, S.; GAO, X.; LIU, M.; CHEN, Z. China's Yangtze Estuary II. Phosphorus and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tidal Flat Sediments. **Geomorphology**. v. 4, p. 207 – 217, 2001.

XUE, W.L.; WARSHAWSKY, D. Metabolic Activation of Polycyclic and heterocyclic aromatic Hydrocarbons and DNA Damage: a Review. **Toxicology and Pharmacology**. v. 206, p.73 – 93, 2004.

ZAKARIA, M.P.; TAKADA, H.; TSUTSUMI, S.; OHNO, K.; YAMADA, J.; KOUNO E.; KUMATA, H. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Rivers and Estuaries in Malaysia: A widespread Input of Petrogenic PAHs. **Environmental Science and Technology**. v. 36, p. 1907 – 1918, 2002.

WANIA, F.; MACKAY, D. T. Tracking the Distribution of Persistent Organic Pollutants. **Environment Science Technology**. v. 30, p. 390–396. 1996.

WEIBHAAR, R. Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104 (5), p. 282 - 285, 2002.

WISE, S.A.; SANDER, L.C.; MAY, W.E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 642, p. 329 - 349, 1993.

WHO. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.202, 1998.

YABIKU, H.Y.; MARTINS, M.; TAKAHASHI, M.Y. Levels of benzo(a)pyrene and others of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 10 (4), p. 339 - 405, 1993.

ANEXOS

ANEXO A

Método 5506 proposto pelo National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) para análise de HPAs utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV e fluorimétrica.

POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS by HPLC 5506

Formulae: Table 1 MW: Table 1 CAS: Table 2 RTECS: Table 2

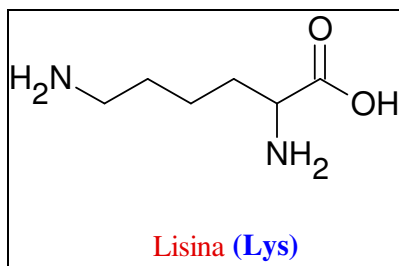
| | | | | | |
|---|--|---|---|---------------------------------|--|
| METHOD: 5506, issue 3 | | EVALUATION: PARTIAL | | Issue 1: 15 May 1985 | |
| | | | | Issue 3: 15 January 1988 | |
| OSHA : Table 3 | | PROPERTIES: Table 1 | | | |
| NIOSH: Table 3 | | | | | |
| ACGIH: Table 3 | | | | | |
| Compounds | acenaphthene acenaphthylene anthracene benzo[a]anthracene benzo[b]fluoranthene benzo[k]fluoranthene | benzo[ghi]perylene benzo[a]pyrene benzo[e]pyrene chrysene dibenz[a,h]anthracene fluoranthene | fluorene indeno[1,2,3-cd]pyrene naphthalene phenanthrene pyrene | | |
| NAMES & SYNONYMS: Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs; also see Table 2. | | | | | |
| SAMPLING | | | MEASUREMENT | | |
| SAMPLER: FILTER + SORBENT TUBE (37-mm, 2- μ m, PTFE + washed XAD-2, 100 mg/50 mg) | | | TECHNIQUE: HPLC, FLUORESCENCE/UV DETECTION | | |
| FLOW RATE: 2 L/min | | | ANALYTE: compounds listed above | | |
| VOL-MIN: 200 L | | | EXTRACTION: 5 mL acetonitrile; ultrasonic bath, 30 to 60 minutes | | |
| -MAX: 1000 L | | | INJECTION VOLUME: 10 to 50 μ L | | |
| SHIPMENT: transfer filters to culture tubes; wrap sorbent and culture tubes in Al foil; ship @ 0 °C | | | MOBILE PHASE: acetonitrile/water gradient @ ambient temperature, 1 mL/min | | |
| SAMPLE STABILITY: unknown; protect from heat and UV light | | | COLUMN: 250 x 4.6-mm, reversed-phase, 5- μ m C ₁₈ | | |
| FIELD BLANKS: 3 to 10 field blanks per set | | | DETECTOR: UV @ 254 nm; fluorescence @ 340 nm (excitation), 425 nm (emission) | | |
| MEDIA BLANKS: 6 to 10 media blanks per set | | | CALIBRATION: standards in acetonitrile | | |
| ACCURACY | | | RANGE: see EVALUATION OF METHOD | | |
| RANGE STUDIED: not determined | | | ESTIMATED LOD: see EVALUATION OF METHOD | | |
| BIAS: not determined | | | PRECISION (S_r): see EVALUATION OF METHOD | | |
| OVERALL PRECISION (S_r): not determined | | | | | |
| ACCURACY: not determined | | | | | |
| APPLICABILITY: This method is applicable to samples that can be extracted with acetonitrile. This method is not applicable to samples that require a different extraction solvent or contain large amounts of highly adsorptive particulate matter, e.g., fly ash or diesel soot; also, this method is not applicable to asphalt fume samples. | | | | | |
| INTERFERENCES: Any compound that elutes at the same HPLC retention time may interfere. Heat, ozone, NO ₂ , or UV light may cause sample degradation. | | | | | |
| OTHER METHODS: This revises P&CAM 206 and 251 [1]. Method 5515 uses the same sampling technique, with gas chromatographic measurement [2]. Method 5800 uses the same sampling technique, and a flow-injection method to determine total polycyclic aromatic compounds at two different sets of fluorescent wavelengths [3]. | | | | | |

ANEXO B

Estrutura e classificação dos aminoácidos.

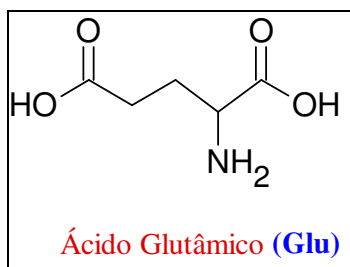
✓ Aminoácidos básicos

pK_1 (α -COOH): 2,16 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,06



✓ Aminoácido ácido

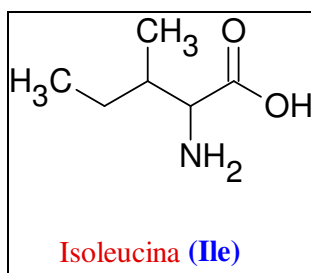
pK_1 (α -COOH): 2,10 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,47



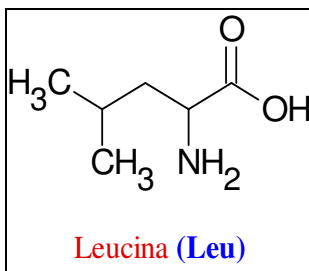
134

✓ Aminoácidos apolares

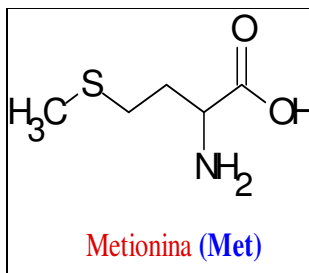
pK_1 (α -COOH): 2,32 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,76



pK_1 (α -COOH): 2,33 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,74

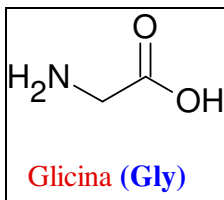


pK_1 (α -COOH): 2,13 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,28



✓ Aminoácidos polares

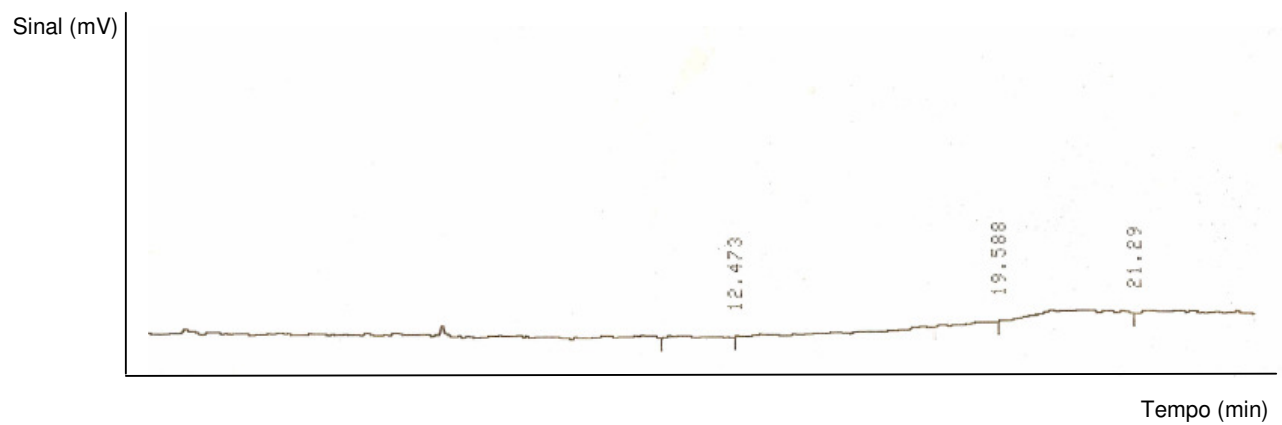
pK_1 (α -COOH): 2,35 pK_2 (α -NH₃⁺): 9,78



Fonte: <http://www.moodle.ufba.br/>

ANEXO C

Cromatograma obtido após injeção de 10 μL de acetona pura, com detecção fluorimétrica. Eluente: acetonitrila, água; fluxo 1,3 mL min^{-1} ; $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$



ANEXO D

Cromatograma obtido após injeção de 10 μL de acetona pura, com detecção UV - Eluente: acetonitrila e água, 1 mL min^{-1} e $\lambda = 254\text{ nm}$.

