



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

**Marisa Demarco**

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPAs) EM MEXILHÃO EMPREGANDO O MÉTODO  
QuEChERS E HPLC-FD**

Santa Maria, RS  
2017

**Marisa Demarco**

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM MEXILHÃO EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E HPLC-FD**

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 título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Demarco, Marisa

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPAs) EM MEXILHÃO EMPREGANDO O MÉTODO  
QuEChERS E HPLC-FD / Marisa Demarco.- 2017.

92 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes

Coorientador: Renato Zanella

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2017

1. HPAs 2. Mexilhão 3. QuEChERS 4. HPLC-FD I.  
Prestes, Osmar Damian II. Zanella, Renato III. Título.

**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

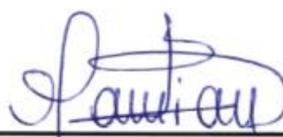
**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPAs) EM MEXILHÃO EMPREGANDO O MÉTODO  
QuEChERS E HPLC-FD**

elaborada por

**Marisa Demarco**

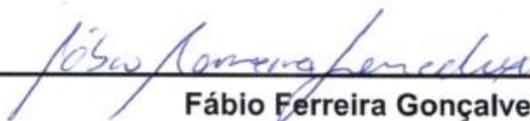
Como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

**Comissão Examinadora**



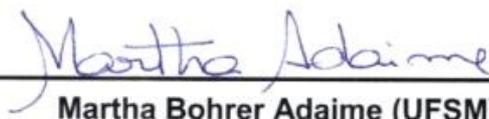
---

**Osmar Damian Prestes (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**



---

**Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)**



---

**Martha Bohrer Adaime (UFSM)**

Santa Maria, 20 de julho de 2017.

*Dedico este trabalho à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à alguma força divina que de certa forma ilumina os meus caminhos.

Ao Prof. Osmar D. Prestes agradeço pela orientação, apoio, dedicação, ensinamento e confiança à mim transmitidos para a realização deste trabalho. Agradeço também pela amizade e parceria. Sou muito grata à você!

Ao Prof. Renato Zanella agradeço pela co-orientação, ensinamentos e aprendizados adquiridos. Agradeço também pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) desde o tempo de iniciação científica.

À Prof<sup>a</sup>. Martha B. Adaime pela participação na banca com valiosas contribuições. Agradeço também pelos ensinamentos, amizade e parceria. Muito obrigada!

Ao Prof. Fábio F. Gonçalves pela participação na banca com valiosas contribuições, pela amizade e parceria. Muito obrigada!

Aos meus pais Ismar e Marli, que desde criança colocaram em minha cabeça a importância do estudo, por não terem tido a oportunidade. Acreditaram em mim desde cedo, me deixando sair de casa com 14 anos para estudar longe de casa, e depois mais longe ainda, e depois mais ainda. Sempre serei grata por tudo o que já fizeram, o que fazem e o que ainda irão fazer por mim, mesmo que passando muito mais tempo longe do que perto, fisicamente, estão constantemente presentes em mim. Ao meu irmão, Idomar, o nêne! por estar sempre me ajudando em muitas coisas e também me incomodando às vezes e vice-versa. E no geral, à toda a minha família, tios (as), primos (as), madrinhas e padrinho.

Aos meus colegas do LARP pelo companheirismo e amizade. Em especial aos meus amigos e colegas Rômulo, Janice, Giovana, Pedro, Mônica, Luana, Fernanda e Mariele, por todos os momentos de conhecimentos adquiridos juntos no laboratório, companheirismo, confiança e motivações. Também, à todas as junções, jantas, festas, eventos, viagens e acampamentos realizados conjuntamente, por toda a amizade, companheirismo e apoio de todos vocês em todos os momentos. À Nathália pelo companheirismo, por estarmos as duas no mesmo barco, nos dando

forças uma a outra. Ao Nelson, por desde o início, sempre estar me ensinando coisas, dando dicas, clareando as ideias, ajudando em tudo o que fosse preciso. À Tiele por me dar uma super ajuda neste trabalho, muitas dicas, ideias e correções. À Marília em especial pela amizade e participação em festas, que isto foi muito importante pra conseguir chegar até o fim desta caminhada.

À Mônica, minha companheira de apartamento, minha amiga, minha mãezinha, que não mede esforços para me ajudar quando for preciso, à você todo o meu sincero agradecimento por tudo.

À todos os professores do PPGQ, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica e aos funcionários do PPGQ, em especial ao Ademir, por estar sempre disposto a ajudar os alunos.

À UFSM pelo privilégio de fazer parte desta instituição.

Ao CNPq, CAPES, FINET e RENALI pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM MEXILHÃO EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E HPLC-FD

AUTORA: Marisa Demarco

ORIENTADOR: Osmar Damian Prestes

O consumo de peixes e frutos do mar é considerado um importante elemento de uma dieta equilibrada. O mexilhão é um molusco bivalve que se alimenta através da filtração de partículas orgânicas presentes em suspensão na água. Nos últimos anos, várias questões relacionadas com seu consumo têm surgido devido ao risco da exposição a contaminantes. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são poluentes orgânicos formados naturalmente ou por ação antropogênica devido à combustão incompleta da matéria orgânica, etc. Estes compostos estão incluídos na lista prioritária de poluentes da União Europeia da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Uma vez que estes animais podem ser expostos a diferentes contaminantes, o consumo destes organismos foram relatados como uma importante via de exposição humana. A determinação de HPAs em amostras de alimentos é um desafio devido à complexidade da amostra e dos baixos níveis de concentração destes compostos. Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação de um método de extração baseado no método QuEChERS para determinação de sete HPAs (fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno) em mexilhão. Os parâmetros que afetam a eficiência de extração foram estudados e depois de encontradas as melhores condições de extração o método foi avaliado. A determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD) permitiu a realização das análises com alta seletividade e detectabilidade. O método proposto para determinação dos sete HPAs foi validado, sendo que os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de 0,6 e 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Os percentuais de recuperação obtidos ficaram entre 78 e 114% com  $\text{RSD} \leq 10\%$ . Este método foi empregado na determinação de HPAs em 20 amostras de mexilhão. O somatório das concentrações obtidas em cada amostra variou entre 25,6 a 38,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Tendo em vista os resultados obtidos, o método proposto mostrou-se adequado para determinação de HPAs em mexilhão uma vez que apresentou seletividade e detectabilidade suficientes, sendo que todos os parâmetros validados foram satisfatórios.

**Palavras-chave:** HPAs. Mexilhão. QuEChERS. HPLC-FD.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN MUSSEL EMPLOYING METHOD QuEChERS AND HPLC-FD

AUTHOR: Marisa Demarco  
ADVISOR: Osmar Damian Prestes

The consumption of fish and seafood is considered an important element of a balanced diet. The mussel is a bivalve mollusk which is fed by filtration of organic particles present in suspension in water. In recent years, several issues related to its consumption have arisen due to the risk of exposure to contaminants. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic pollutants formed naturally or by anthropogenic action due to the incomplete combustion of organic matter, etc. These compounds are included in the priority list of pollutants of the European Union and the United States Environmental Protection Agency (USEPA) because of their mutagenic and carcinogenic properties. Since these animals can be exposed to contaminants, these organisms have been reported as an important route of human exposure. The determination of HPAs in food samples is a challenge due to the complexity of the sample and the low levels of concentration of these compounds. The aim of this work was to evaluate the extraction method based on the QuEChERS method to determine seven HPAs (phenanthrene, anthracene, pyrene, chrysene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene and dibenzo[a,h]anthracene) in mussels. The parameters that affect the extraction efficiency were studied and after the best extraction conditions were found they were validated. The determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) allowed the performance of the analyzes with high selectivity and detectability. The proposed method for the determination of the seven HPAs was validated, and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were 0.6 and 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The recovery percentages were between 78 and 114% with RSD  $\leq$  10%. This method was used to determine PAHs in 20 mussel samples. The sum of the concentrations obtained in each sample ranged from 25.6 to 38.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Considering the results obtained, the proposed method proved to be adequate for determination of HPA in mussels as it conferred sufficient selectivity and detectability, and all validated parameters were satisfactory.

**Keywords:** PAHs. Mussel. QuEChERS. HPLC-FD.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da morfologia de um mexilhão. ....	19
Figura 2 - Fórmula estrutural dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA para monitoramento ambiental. ....	22
Figura 3 - Demonstração das principais versões do método QuEChERS. ....	34
Figura 4 - Representação esquemática de um cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD). ....	38
Figura 5 - Representação do processamento das amostras no laboratório. ....	44
Figura 6 - Procedimento de extração realizado para as três variações do método QuEChERS. ....	47
Figura 7 - Procedimento realizado no teste com diluição final do extrato em acetonitrila (1:1, v/v), utilizando 4 diferentes sorventes (alumina, florisil, sílica e EMR-lipid®) em comparação com PSA + Z-Sep <sup>+</sup> . ....	48
Figura 8 - Procedimento realizado no teste com diluição inicial da amostra em acetonitrila (1:2, m/v), utilizando 4 diferentes sorventes (alumina, florisil, sílica e EMR-lipid®) em comparação com PSA + Z-Sep <sup>+</sup> . ....	48
Figura 9 - Procedimento de limpeza do extrato utilizando 400 mg de cada sorvente. ....	49
Figura 10 - Teste de comparação da recuperação, utilizando a técnica de limpeza da amostra por d-SPE (em tubos de PP e tubos de eppendorf) e SPE. ....	50
Figura 11 - Procedimento realizado para os diferentes tempos de interação do padrão com a amostra. ....	51
Figura 12 - Gradiente e vazão da fase móvel utilizada no sistema HPLC-FD para determinação de HPAs em amostras de mexilhão. ....	56
Figura 13 - Cromatograma obtido por HPLC-FD para a solução analítica (30 µg L <sup>-1</sup> ) preparada em acetonitrila. ....	57
Figura 14 - Avaliação da variação do sinal cromatográfico em relação aos diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão testados. ....	59
Figura 15 - Resultados dos percentuais de recuperação e RSD para os 3 métodos QuEChERS (original, acetato e citrato) avaliados durante a etapa de preparo de amostra da determinação de HPAs por HPLC-FD. ....	60

Figura 16 - Comparação dos percentuais de recuperação e RSD obtidos empregando o método QuEChERS original, diferentes sorventes na etapa de limpeza e diluições diferentes. ....	62
Figura 17 - Recuperação dos testes usando 200 mg ou 400 mg de cada sorvente..	66
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por HPLC-FD referente a extrato branco de mexilhão após a realização da etapa de d-SPE utilizando 200 mg de cada sorvente e 150 mg de MgSO <sub>4</sub> para 1 mL de extrato. ....	67
Figura 19 - Comparação entre as técnicas de limpeza de SPE (cartucho) e d-SPE (com tubos de PP de 15 mL - usando rotação de 3500 rpm e tubos eppendorf de 2 mL - com centrifugação com rotação de 10000 rpm). ....	68
Figura 20 - Resultados de recuperação para os diferentes tempos de interação do padrão com a amostra antes da etapa de extração. ....	69
Figura 21 - Fluxograma do procedimento de preparo de amostra realizado para determinação de HPAs em mexilhão. ....	71
Figura 22 - Cromatogramas obtidos por HPLC-FD para amostra branco fortificada no nível 30 µg kg <sup>-1</sup> (a), amostra branco de mexilhão (b), branco reagente (c) e acetonitrila (d).....	72
Figura 23 - Curva analítica (1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 µg L <sup>-1</sup> ) preparada no extrato branco de mexilhão obtida por HPLC-FD para os compostos avaliados neste estudo. ....	73
Figura 24 - Resultados de recuperação e RSD para os ensaios <i>intraday</i> (repetibilidade) e <i>interday</i> (precisão intermediária) nos níveis de fortificação F1 (2 µg kg <sup>-1</sup> ), F2 (10 µg kg <sup>-1</sup> ) e F3 (30 µg kg <sup>-1</sup> ). ....	75
Figura 25 - Cromatograma referente a amostra A9 (a) e amostra A9 com extrato fortificado no nível de 10 µg L <sup>-1</sup> (b). ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos HPAs englobando o número de anéis aromáticos; massa molecular (MM), solubilidade em água (S) (em 25°C), pressão de vapor (PV) (em mm Hg em 25 °C) e coeficiente de partição octanol-água (Log K <sub>ow</sub> ). .....	24
Tabela 2 - Classificação de alguns HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade. ....	28
Tabela 3 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos. ....	40
Tabela 4 - Características físico-químicas dos HPAs avaliados neste estudo. ....	43
Tabela 5 - Condições de gradientes avaliados para escolha da separação cromatográfica.....	45
Tabela 6 - Alguns trabalhos da literatura referentes as condições cromatográficas do HPLC-FD.....	55
Tabela 7 - Alguns comprimentos de onda de excitação e emissão encontrados na literatura para os compostos analisados neste trabalho. ....	58
Tabela 8 - Coeficientes de determinação (r <sup>2</sup> ) das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato branco da matriz, valores de faixa linear, equação do modelo para cada HPA estudado e efeito matriz. ....	73
Tabela 9 - Resultados de recuperação e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária realizados em níveis de concentração entre 2 e 30 µg kg <sup>-1</sup> . .	75
Tabela 10 - Resultados das análises de HPAs para as 20 amostras de mexilhão analisadas pelo método QuEChERS e HPLC-FD. ....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

C<sub>18</sub> - sílica modificada com hidrocarboneto linear C<sub>18</sub>, octadecilsilano;

d-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid-phase extraction*;

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Authority*;

EMR-lipid® - *Enhanced Matrix Removal-Lipid*

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*;

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*;

HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;

HPLC-FD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, do inglês *high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*;

IARC - Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*;

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial;

K<sub>ow</sub> - coeficiente de partição octanol água;

LARP - Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas;

LOD - limite de detecção, do inglês *limit of detection*;

LOQ - limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*;

m/v - massa por volume;

MAE - extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave assisted extraction*;

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS - Ministério da Saúde;

n - número de replicatas

PLE - extração líquida pressurizada, do inglês *pressure liquid extraction*;

PP - polipropileno

PSA - amina primária-secundária, do inglês *primary secondary amine*;

QuEChERS - rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*;

$r^2$  - coeficiente de determinação;

rpm - rotações por minuto

RSD - desvio padrão relativo;

RSD<sub>pi</sub> - desvio padrão relativo para precisão intermediária;

SANTE - Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protectiondes consommateurs*;

SCF - Comitê Científico da Alimentação Humana, do inglês *Scientific Committee on Food*;

SFE - extração com fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid extraction*;

SPE - extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*;

t<sub>R</sub> - tempo de retenção;

UE - União Europeia, do inglês *European Union*;

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*;

v/v - volume por volume;

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 MEXILHÃO .....	19
3.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS .....	21
<b>3.2.1 Definição e origem dos HPAs</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.2 Fontes e dispersão dos HPAs no meio ambiente</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.3 Propriedades físico-químicas dos HPAs</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.4 Toxicidade e efeitos dos HPAs sobre a saúde</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.5 Monitoramento de HPAs em alimentos</b> .....	<b>28</b>
3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE HPAs EM ALIMENTOS .....	30
<b>3.3.1 Método QuEChERS para determinação de HPAs</b> .....	<b>32</b>
3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS .....	37
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	41
4.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS .....	41
4.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS .....	42
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	43
4.5 ORIGEM E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	43
4.6 SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-FD PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO .....	44
4.7 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO .....	46
<b>4.7.1 Procedimento de extração</b> .....	<b>46</b>
<b>4.7.2 Influência da diluição da amostra ou extrato diante de diferentes sorventes</b> .....	<b>47</b>
<b>4.7.3 Avaliação da quantidade de sorvente empregada na etapa de limpeza por d-SPE</b> .....	<b>49</b>
<b>4.7.4 Comparação entre as técnicas de limpeza d-SPE e SPE</b> .....	<b>49</b>
<b>4.7.5 Avaliação do tempo de interação dos compostos com a amostra nos ensaios de fortificação</b> .....	<b>51</b>
4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO POR HPLC-FD .....	51

4.8.1 Seletividade .....	52
4.8.2 Linearidade e faixa linear .....	52
4.8.3 Efeito matriz .....	52
4.8.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) .....	52
4.8.5 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão .....	53
4.8.6 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária .....	53
4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS .....	54
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA HPLC-FD PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO .....	55
5.1.1 Escolha da coluna analítica e da fase móvel .....	55
5.1.2 Avaliação dos comprimentos de onda de excitação e emissão .....	57
5.2 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO POR HPLC-FD .....	59
4.7.1 Procedimento de extração .....	59
5.7.2 Influência da diluição da amostra ou extrato diante de diferentes sorventes .....	61
5.7.3 Avaliação da quantidade de sorvente empregada na etapa de limpeza por d-SPE .....	65
5.7.4 Comparação entre as técnicas de limpeza d-SPE e SPE .....	67
5.7.5 Avaliação do tempo de interação dos compostos com a amostra nos ensaios de fortificação .....	69
4.7.6 Método validado .....	70
5.3 VALIDAÇÃO .....	71
5.3.1 Seletividade .....	71
5.3.2 Curva analítica, faixa de linear e efeito matriz .....	72
5.3.3 Avaliação da exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) .....	74
5.3.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) .....	76
5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMOSTRAS DE MEXILHÃO POR HPLC-FD .....	76
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>82</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com a segurança dos alimentos tem aumentado, tanto pelos consumidores quanto pelos órgãos regulamentadores. Os consumidores estão se tornando mais críticos em relação à qualidade dos alimentos disponíveis para o consumo e em paralelo as legislações estão mais rigorosas visando assegurar a inocuidade dos alimentos.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) o consumo de frutos do mar é a principal fonte de proteína para 6,8 milhões de pessoas no mundo e seu cultivo se torna uma boa fonte de renda para o sustento dos pescadores. O consumo de mexilhão vem aumentando anualmente, sendo a aquicultura a principal fonte destes produtos (FAO, 2008). Além do consumo humano, os mexilhões podem ser utilizados como bioindicadores da presença de contaminantes como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no ambiente. Assim, o biomonitoramento da qualidade da água pode ser realizado no local em que se encontram indicando o grau de contaminação ambiental e avaliação de situações de risco.

Os HPAs são compostos que contém em sua estrutura dois ou mais anéis aromáticos condensados e sua origem no ambiente se deve principalmente às fontes antrópicas, através de processos pirolíticos como a queima de combustíveis fósseis e a processos petrogênicos (VIEIRA, 2012; DANYI et al., 2009). Estes compostos quando presentes no ar atmosférico encontram-se adsorvidos em partículas, as quais devido à própria decantação natural e/ou a precipitação pluvial são carregadas para o solo e ambientes aquáticos (MIERE et al, 2007). Além disso, quando presentes no ambiente marinho, os HPAs se tornam biodisponíveis para a fauna e flora marinha (BARHOUMI et al., 2016). Os HPAs apresentam alto nível de toxicidade, podendo causar graves problemas à saúde, como câncer e mutações. Devido ao caráter exclusivamente filtrador dos mexilhões, ao filtrarem a água acabam retendo contaminantes presentes no ambiente aquático e consequentemente acumulam esses compostos em seus tecidos. A bioacumulação ocorre devido à afinidade dos contaminantes pela camada adiposa dos mexilhões e também devido à incapacidade de metabolização destes compostos (FARRINGTON, 1983).

Diante desse contexto, o mexilhão têm sido empregado como bioindicador em programas de monitoramento em diferentes áreas através de limites máximos de contaminantes estabelecidos. Algumas legislações internacionais determinam limites máximos para alguns HPAs em alimentos de origem marinha. Entre os diversos compostos que constam na lista de poluentes prioritários, o benzo[a]pireno é utilizado como marcador de HPAs em alimentos (EC, 2005; USEPA, 2005; EC, 2011). Por outro lado, a legislação brasileira não estabelece nenhum limite para HPAs em alimentos desta origem.

Para assegurar a segurança do consumidor, a inspeção no controle de qualidade deve ser realizada, uma vez que os HPAs podem ser ingeridos em concentrações acima dos limites permitidos. A determinação destes compostos em alimentos envolve diferentes etapas. O preparo de amostra para extração dos HPAs em mexilhão incluem diferentes técnicas, tais como a extração líquido-líquido, Soxhlet, extração por solvente pressurizado (PLE, do inglês *pressure liquid extraction*), entre outros. Atualmente, o método QuEChERS tem sido amplamente empregado para o preparo de diferentes tipos de amostra visando a extração de um amplo escopo de analitos (ANASTASSIADES et al., 2003; MORRISON et al., 2016).

Associada a estes diferentes métodos de preparo de amostra destaca-se o uso da cromatografia líquida com detecção por fluorescência (HPLC-FD, do inglês *high performance liquid chromatography with fluorescence detection*) para a determinação de HPAs. Estas ferramentas são adequadas para a extração e quantificação dos HPAs em mexilhões em níveis de concentração da ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos que visam a extração e quantificação de forma eficaz a fim de fornecer informações confiáveis sobre o nível de contaminação dos alimentos por HPAs.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de mexilhão empregando o método QuEChERS e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD). Para desenvolver e validar este método, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o desempenho das três versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) em relação aos percentuais de recuperação dos HPAs avaliados;
- Avaliar o efeito de diferentes sorventes (PSA, Z-Sep<sup>+</sup>, sílica, alumina, florisil e EMR-lipid<sup>®</sup>) na etapa de limpeza do extrato através da avaliação dos percentuais de recuperação dos compostos;
- Validar o método desenvolvido de acordo com a seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.
- Aplicar o método validado para verificar a ocorrência dos HPAs avaliados em amostras de mexilhão.
- Disponibilizar dados para subsidiar a tomada de decisão e a criação de legislação no Brasil;

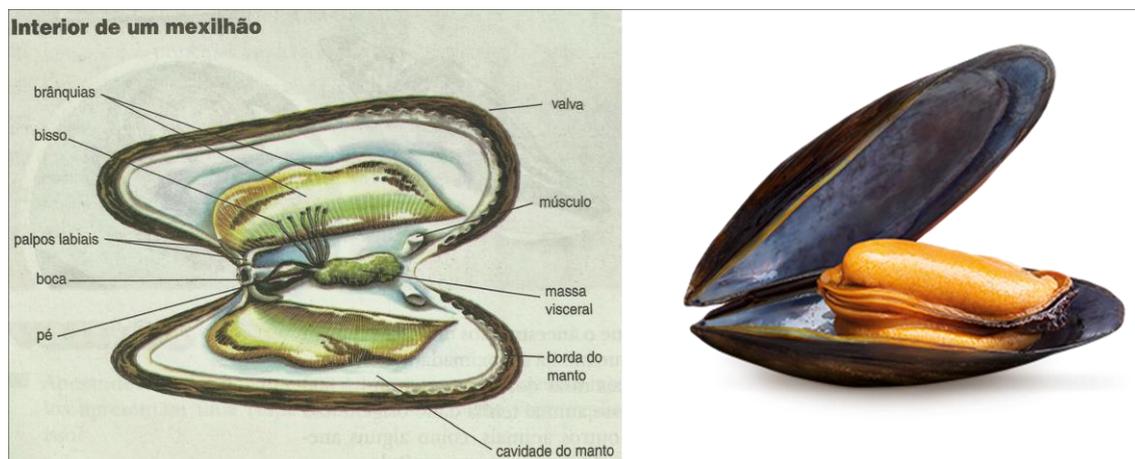
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MEXILHÃO

Os moluscos constituem o maior filo de invertebrados, neles estão inclusos os mexilhões, ostras, lulas, polvos e caramujos. Esse filo é dividido em várias classes, uma delas é a classe Bivalvia, sendo representado pelos mexilhões e ostras (VIEIRA, 2012).

Os bivalves são comprimidos nas laterais e possuem uma concha composta de duas valvas, encaixadas em dobradiça dorsal que envolve o corpo todo, sendo esse, lateralmente comprimido. Além disso, possuem cabeça pouco desenvolvida, como pode ser observado na Figura 1. Nesta classe, as brânquias são responsáveis pelas trocas gasosas e também pela captura de alimentos (VIEIRA, 2012).

Figura 1 - Representação da morfologia de um mexilhão.



Fonte: Segundo Ano Biologia, 2013.

Entre os bivalves estão os pertencentes a família Mytilidae, estes apresentam um corpo com formato adaptado para o embate de ondas. Mexilhão é o termo usado para denominar as diversas espécies de moluscos bivalves da família Mytilidae, sendo os gêneros mais comuns *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. Dependendo da região do país, recebem nomes populares, como marisco e sururu (VIEIRA, 2012).

Dentre as diferentes espécies de mexilhão, o *Perna perna* é o mais cultivado e mais importante da costa brasileira, pois atinge os maiores tamanhos, cresce relativamente rápido, possui alta taxa de produção, é nutritivo e facilmente coletado.

Tem um tamanho médio de 5 a 8 cm de comprimento e 3 cm de espessura, é uma das espécies de maior interesse comercial principalmente para o consumo humano (FERREIRA et al., 2013).

O mexilhão é um organismo dióico, porém não apresenta dimorfismo sexual externo. A distinção é percebida internamente quando os animais se tornam sexualmente maduros, além de apresentarem distinção de cores, tendo os machos cor esbranquiçada e as fêmeas cor alaranjada (VIEIRA, 2012; FONTES, 2011).

O mexilhão apresenta um regime alimentar exclusivamente filtrador, com uma capacidade que pode variar de 0,5 a 5 litros por hora, dependendo das condições ambientais e do indivíduo. Este processo é contínuo, sendo interrompido somente quando os animais são expostos ao ar. Além da função respiratória, suas brânquias retêm alimentos, que são capturados pela corrente da água produzida pelo movimento de seus cílios. A alimentação destes animais é constituída basicamente de fitoplâncton, bactérias e detritos orgânicos, sendo a eficiência de retenção de partículas em suspensão na água (séston) de 100% para partículas superiores a 4  $\mu\text{m}$ , já as menores são capturadas com menor eficiência (FONTES, 2011).

Outra característica importante desses organismos é a baixa capacidade de biotransformação. Um indivíduo adulto pode filtrar até 100 litros de água por dia e consegue acumular em seus tecidos a fração biodisponível do contaminante presente diretamente na coluna d'água, refletindo o perfil de poluição ao qual esteve exposto (FONTES, 2011).

A assimilação de poluentes orgânicos pelos mexilhões é influenciada tanto por fatores externos, intimamente ligados à biodisponibilidade do poluente, quanto aos fatores internos do próprio organismo. Variações sazonais, proximidade de fontes poluidoras, temperatura, salinidade e material particulado em suspensão são exemplos de fatores externos. A capacidade de metabolização seguida, ou não, pela excreção do poluente são os fatores determinantes para sua concentração nos tecidos analisados. Em geral, os mexilhões apresentam uma rápida assimilação dos poluentes enquanto que a excreção dos mesmos ocorre de maneira lenta (FONTES, 2011).

O mexilhão tem sido recomendado por muitos pesquisadores como o melhor organismo para o biomonitoramento de ambientes marinhos, uma vez que filtra grandes quantidades de água estando exposto à substâncias tóxicas solúveis ou associadas a partículas (FARRINGTON, 1983). Porém, estes seres são fontes de

alimentos comercialmente importantes nas áreas costeiras, e o consumo destes quando contaminados com HPAs podem gerar graves problemas aos consumidores. Para isso, se tornam necessários métodos de determinação capazes de averiguar a presença desses contaminantes em baixas concentrações.

Estes animais são uma fonte de proteína para as populações costeiras e são amplamente cultivados, atividade esta denominada miticultura (FERREIRA et al., 2013). No Brasil, a produção está presente principalmente, no litoral do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. No litoral gaúcho restringe-se a poucos locais como Torres e Tramandaí (VIEIRA, 2012). O consumo de moluscos, nos últimos anos, vem crescendo pelo fato de ser uma gastronomia atrativa, associada com a diversidade de espécies e suas características sensoriais e também pelo bem estar dos consumidores (FURLAN et al., 2011).

Quanto à composição centesimal ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) do mexilhão *Perna perna*, FURLAN et al. (2011) relataram em seus estudos valores de umidade de 83,8%, proteína 9,1%, lipídeos 1,1%, carboidratos 4,2%, e teor de cinzas de 1,8%. Para a mesma espécie, CORDEIRO et al. (2007), obtiveram valores para umidade de 85,8%, proteína 7,1%, lipídeos 1,2%, carboidratos 3,8%, e teor de cinzas de 1,9%. Já, PARISENTI et al. (2008) encontraram valores superiores para proteína (próximos a 20%). Levando-se em consideração a composição centesimal do mexilhão, pode-se constatar que o mexilhão é uma importante fonte protéica e de reduzido conteúdo lipídico. No entanto, variações nos percentuais são afetadas por sazonalidade, alimentação do animal, condições fisiológicas, etc (FURLAN et al., 2011).

## 3.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

### 3.2.1 Definição e origem dos HPAs

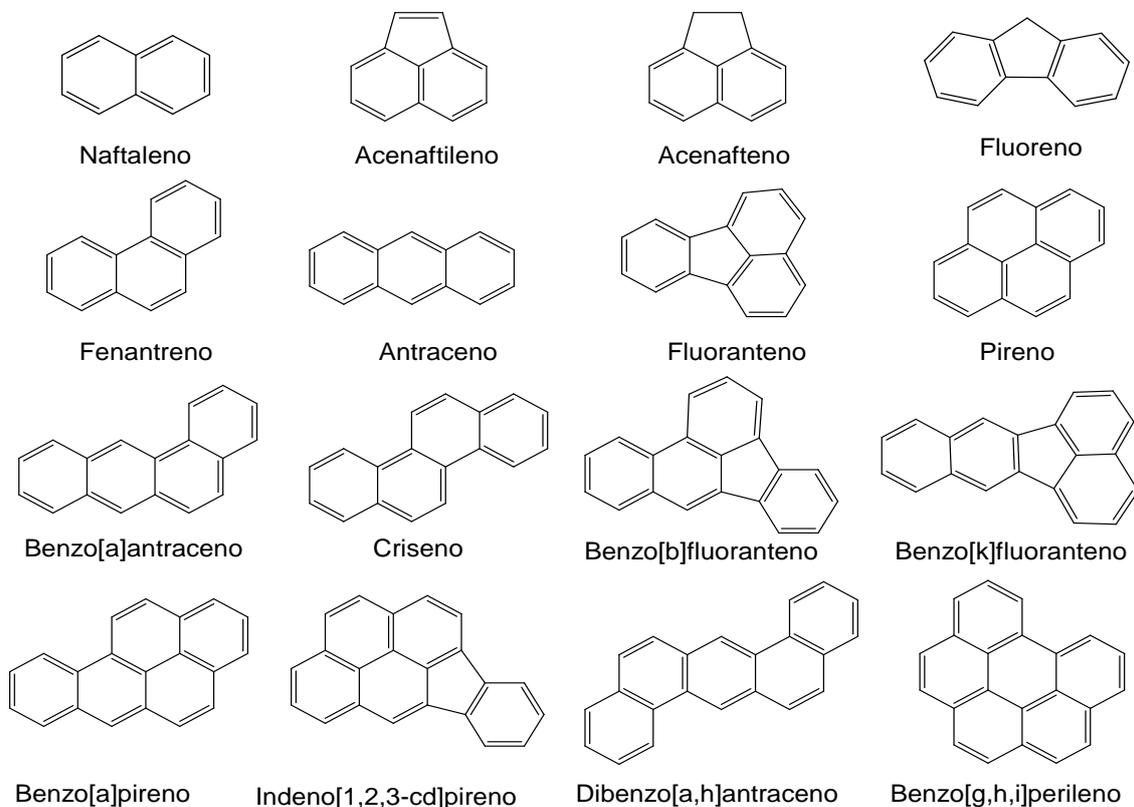
Os HPAs são compostos formados a partir de átomos de carbono e hidrogênio que possuem dois ou mais anéis aromáticos fundidos em arranjos lineares, angulares ou agrupados podendo apresentar substituições em um ou mais anéis (VIEIRA, 2012; DANYI et al., 2009). De acordo com NEFF (2001) sua origem pode ser:

- i. biogênica: gerados pela biossíntese direta dos organismos;

- ii. diagenética: formados a partir de transformações rápidas (dias à anos) de classes de compostos orgânicos presentes no solo e sedimentos;
- iii. pirolítica: formados a partir da queima incompleta da matéria orgânica sob alta temperatura (>700 °C);
- iv. petrogênica: presentes nos combustíveis fósseis, formados pelo rearranjo e transformação da matéria orgânica e biogênica em temperaturas moderadas (100 - 300 °C).

Existem mais de 100 diferentes tipos de HPAs e de acordo com as Diretrizes para Avaliação de Risco Carcinogênico da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - *United States Environmental Protection Agency*) 16 HPAs são considerados prioritários. Estes compostos são importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários devido ao seu impacto negativo no ambiente e na saúde humana (USEPA, 2005). Na Figura 2 estão apresentadas as fórmulas estruturais destes compostos.

Figura 2 - Fórmula estrutural dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA para monitoramento ambiental.



### 3.2.2 Fontes e dispersão dos HPAs no meio ambiente

As fontes de HPAs no meio ambiente podem ser de origem natural ou antrópica. As fontes naturais liberam HPAs em baixos níveis, porém constantemente, sendo considerada uma contaminação crônica na qual o meio ambiente se adapta naturalmente com a entrada desses contaminantes. Esta é conhecida como uma concentração *background*, de fundo ou nível de referência. Já as fontes antrópicas são as que mais afetam o meio ambiente, uma vez que emitem HPAs em altos níveis de concentração (FONTES, 2011).

As fontes naturais, devido a processos geoquímicos ao longo de milhares de anos dão origem aos HPAs pirolíticos, petrogênicos e biogênicos, sendo este último em menor quantidade, pois a biossíntese direta não é considerada uma importante fonte quantitativa de HPAs, principalmente para o ambiente marinho. Já as fontes antropogênicas são associadas pela influência direta do homem no meio ambiente e originam principalmente, assim como as fontes naturais, HPAs pirolíticos e petrogênicos (NEFF, 2001).

Os HPAs petrogênicos caracterizam-se pelo predomínio de compostos com 2 a 3 anéis aromáticos (LIGUORI et al., 2006). São naturalmente liberados para o meio ambiente, e especialmente no meio marinho, através da exsudação de petróleo a partir do assoalho oceânico. Já às fontes antropogênicas são ocasionadas através do transporte e processamento de petróleo, armazenamento irregular de óleo e descarte de combustíveis, derramamento direto de petróleo no meio ambiente, como no caso de acidentes com navios tanques e dutos (NEFF, 2001; VIEIRA, 2012).

Os HPAs pirolíticos são formados pela combustão incompleta da matéria orgânica e caracterizam-se por formarem principalmente compostos de 4 a 6 anéis aromáticos. No caso das fontes naturais são formados através de queimadas e erupções vulcânicas, já as fontes antrópicas são devido à queima de combustíveis fósseis e florestas, incineração de resíduos, emissão de motores e processos industriais (WENZL et al., 2006; DANYI et al., 2009).

A dispersão de HPAs no meio ambiente se dá principalmente pelo ar associado ao material finamente particulado, uma vez que, emitidos na atmosfera podem ser transportados por grandes distâncias. A eliminação da atmosfera ocorre pela precipitação seca ou úmida, sendo que estes compostos podem se depositar sobre sistemas terrestres e/ou aquáticos (MIERE et al, 2007).

### 3.2.3 Propriedades físico-químicas dos HPAs

As propriedades físico-químicas dos HPAs são amplamente determinadas pelo sistema de ligações duplas conjugadas características das estruturas desta classe de compostos. Em temperatura ambiente estes compostos são sólidos e normalmente apresentam altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressão de vapor e solubilidade em água. Os valores referentes a estas duas últimas propriedades tendem a diminuir com o aumento da massa molecular (CARUSO & ALABURDA, 2008).

Na Tabela 1 estão expressas algumas características físico-químicas dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA para monitoramento ambiental.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos HPAs englobando o número de anéis aromáticos; massa molecular (MM), solubilidade em água (S) (em 25°C), pressão de vapor (PV) (em mm Hg em 25 °C) e coeficiente de partição octanol-água (Log  $K_{ow}$ ).

Compostos	Nº de anéis	Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )	Pressão de vapor (Pa)	Log $K_{ow}$
Naftaleno	2	128	31	10,4	3,37
Acenaftileno	3	152	3,9	0,9	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	4,46
Antraceno	3	178	0,045	0,001	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00126	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	5,18
Benzo[a]antraceno	4	228	0,011	2,8 x 10 <sup>-5</sup>	5,91
Criseno	4	228	0,0002	5,7 x 10 <sup>-7</sup>	5,86
Benzo[b]fluoranteno	5	252	0,0015	5,0 x 10 <sup>-7</sup>	5,80
Benzo[k]fluoranteno	5	252	0,0008	5,2 x 10 <sup>-8</sup>	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	7 x 10 <sup>-7</sup>	6,04
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	276	0,00069	1,2 x 10 <sup>-10</sup>	6,70
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	3,7 x 10 <sup>-10</sup>	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	276	0,00026	1,0 x 10 <sup>-10</sup>	6,63

Fonte: PubChem; LATIMER & ZHENG, 2003.

Os HPAs são constituídos somente por átomos de carbono e hidrogênio e por isso apresentam características hidrofóbicas, ou seja, baixa solubilidade em água. Isto proporciona a partição dos HPAs entre a fase aquosa e a adsorvida em partículas, sendo esta responsável pela forte ligação entre os HPAs e o material

particulado. A solubilidade em água varia entre os menos solúveis (maior massa molecular) aos mais solúveis (menor massa molecular), enquanto a pressão de vapor varia entre compostos altamente voláteis com ampla dispersão ambiental e compostos relativamente pouco voláteis (MIERE et al, 2007).

Como consequência há o acúmulo desses compostos nos sedimentos e nas partículas em suspensão dos sistemas aquáticos. Posteriormente, são remobilizados, tornando-se então biodisponíveis para os organismos aquáticos, resultando na contaminação ambiental (BARHOUMI et al., 2016; JACQUES, BENTO, & CAMARGO, 2007). Outra fonte de contaminação de HPAs no ambiente aquático pode ocorrer por derramamento ou vazamento de óleo e efluentes industriais (PHILLIPS, 1999).

A solubilidade não depende apenas da natureza do composto, mas também de diversos fatores como a temperatura, força iônica, pH, concentração de materiais em suspensão e do teor de matéria orgânica dissolvida (VIEIRA, 2012). É difícil determinar a concentração desses compostos na água, pois apenas a fração dissolvida está disponível para os organismos vivos (RUIZ et al., 2011).

O comportamento dos HPAs no ambiente marinho também pode ser explicado devido ao seu elevado coeficiente de partição octanol-água ( $\text{Log } K_{ow} > 4$ ), uma vez que este parâmetro expressa a tendência dos HPAs em se associarem ao material orgânico particulado em suspensão e em sedimentos marinhos, sendo possível prever possíveis processos cumulativos em organismos aquáticos (FONTES, 2011; MIERE et al, 2007).

Quanto maior o teor de matéria orgânica de uma matriz, maior será a adsorção dos HPAs. Somando-se as características intrínsecas dos HPAs com o tipo de material em que estão adsorvidos, a degradação destes compostos irá influenciar na sua concentração na coluna d'água. Os principais mecanismos de degradação natural são a fotooxidação e a degradação microbiana (SUESS, 1976).

A fotooxidação é o processo mais importante, sendo influenciada por fatores como concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, profundidade e radiação solar. Já, a degradação microbiana de HPAs é uma forma dos microorganismos adquirirem carbono para seu crescimento através da oxidação, sendo que neste processo são gerados: água, dióxido de carbono e diversos metabólitos. A biodisponibilidade de nitrogênio e fósforo são alguns fatores que influenciam a degradação microbiana (SUESS, 1976).

Uma vez biodisponíveis no ambiente marinho, estes compostos, devido ao seu elevado  $K_{ow}$ , atravessam facilmente a membrana lipídica dos organismos aquáticos e seu teor depende muito da capacidade desses organismos de metabolizá-los. No entanto, por apresentarem uma estrutura química complexa e estável devido à ressonância dos anéis aromáticos, a maioria dos microrganismos não possui enzimas capazes de reconhecê-los e degradá-los (JACQUES, BENTO, & CAMARGO, 2007). Por exemplo, os peixes apresentam menor acúmulo de HPAs nos tecidos, uma vez que possuem maior capacidade para metabolizar estes compostos. Os mexilhões, por outro lado, tendem a acumular os HPAs, pois são incapazes de metabolizá-los e excretá-los totalmente (NWAICHIA & NTORGBO, 2016; DANYI et al., 2009; PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH & VIDAL, 2010).

Nesse sentido, os mexilhões, podem ser utilizados para medir a bioacumulação de contaminantes traços em ambientes aquáticos devido à capacidade de acumularem poluentes. Estes seres alimentam-se filtrando o fitoplâncton e as partículas em suspensão na água e também ingerem formas particuladas e dissolvidas de contaminantes lipofílicos, como os HPAs, concentrando-os a níveis superiores aos da água do mar circundante. No entanto, o acúmulo desses compostos não depende apenas das características físico-químicas dos contaminantes, mas também da capacidade do sistema enzimático de metabolizar os compostos e do teor de lipídio do organismo (RUIZ et al., 2011).

### **3.2.4 Toxicidade e efeitos dos HPAs sobre a saúde**

A presença de HPAs no ambiente é preocupante, uma vez que estes compostos apresentam alta toxicidade. Sua exposição à humanos pode ocorrer de diferentes formas, como por inalação, exposição oral ou dérmica (CARUSO & ALABURDA, 2007).

No organismo, os HPAs são metabolicamente ativados, visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar a sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela urina e/ou fezes (NETTO et al., 2000). No entanto, esses compostos intermediários podem reagir com a guanina da estrutura do DNA e formar adutos dando origem a processos mutagênicos e carcinogênicos (WENZL et al., 2006).

A quantidade absorvida por inalação depende do grau de contaminação atmosférica, que está diretamente relacionado à urbanização, tráfego de veículos e industrialização do local. A absorção dérmica é importante em pessoas que residem ou trabalham em ambientes diretamente influenciados por estas fontes (NETTO et al., 2000). Já, a alimentação é uma das principais vias de exposição humana de HPAs, exceto para indivíduos fumantes, em que a contribuição da fumaça de cigarro pode ser preponderante (PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH & VIDAL, 2010).

Avaliar os impactos ambientais dos HPAs e identificar seus efeitos sobre os organismos são tarefas complicadas, pois cada composto possui uma toxicidade distinta. Além disso, podem ocorrer efeitos de sinergismo ou antagonismo entre os contaminantes. Além de que, há diferentes vias de exposição e os organismos podem metabolizar os contaminantes em diferentes níveis (VIEIRA, 2012).

Embora para a maioria das pessoas o consumo de mariscos representa apenas uma pequena parte da dieta total, para as pessoas que fazem seu consumo regular, a contribuição deste grupo alimentar para ingestão diária é a mais importante (RAMALHOSA et al., 2009). Os danos causados a saúde pelos HPAs ocorrem, geralmente, por ingestão crônica (quantidades pequenas por longos períodos).

Alguns HPAs não são classificados como prováveis carcinogênicos ao homem, principalmente os que contêm 2 ou 3 anéis benzênicos. Porém, apresentam toxicidade aguda quando ingeridos ou inalados, levando a efeitos adversos ao sistema imunológico, no desenvolvimento fetal e alterações na regulação endócrina. Por outro lado, os compostos que possuem mais de 4 anéis benzênicos são em sua maioria considerados carcinogênicos e/ou mutagênicos aos seres humanos. O benzo[a]pireno (B[a]P), por exemplo, tem efeito mutagênico e teratogênico para uma variedade de organismos (invertebrados, peixes, anfíbios, aves, mamíferos e o homem) (VIEIRA, 2012).

A exposição de humanos a HPAs individuais não ocorre, porque estes são encontrados como misturas complexas e de composição variável, dificultando a avaliação das consequências para a saúde. No entanto, alguns estudos têm mostrado correlação entre a exposição à HPAs individuais e ocorrência de câncer, constatando que independentes do seu potencial carcinogênico servem como marcadores para a exposição de toda a mistura (WENZL et al., 2006).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC), os HPAs são classificados de acordo com a evidência de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais (IARC, 2002). A Tabela 2 apresenta a classificação de alguns HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade.

Tabela 2 - Classificação de alguns HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade.

Compostos	Grupo	Compostos	Grupo
Benzo[a]pireno	1	Antraceno	3
Dibenzo[a,h]antraceno	2A	Benzo[e]pireno	3
Benzo[a]antraceno	2B	Benzo[g,h,i]fluoranteno	3
Benzo[b]fluoranteno	2B	Dibenzo[a,c]antraceno	3
Benzo[c]fenantreno	2B	Dibenzo[a,j]antraceno	3
Benzo[j]fluoranteno	2B	Fluoranteno	3
Benzo[k]fluoranteno	2B	Fluoreno	3
Criseno	2B	Naftaleno	3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	2B	Pireno	3

Grupo 1: cancerígeno para os humanos

Grupo 2A: provavelmente cancerígeno para os humanos

Grupo 2B: possivelmente cancerígeno para os humanos

Grupo 3: não classificável como cancerígeno para os humanos

Fonte: CASTRO, 2010; IARC, 1985.

### 3.2.5 Monitoramento de HPAs em alimentos

Valores de limites máximos permitidos de HPAs em alimentos são estabelecidos por legislações internacionais a fim de assegurar que concentrações acima da indicada possam afetar a saúde dos consumidores (BARHOUMI et al., 2016). No geral, são amplamente monitorados os 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA (2005).

Dentre os HPAs, o B[a]P é um dos mais conhecidos e estudados, devido sua carcinogenicidade em animais (embriotóxico e teratogênico); e por esta razão tem sido utilizado como indicador da presença de outros HPAs em alimentos. De acordo com o Comité Científico da Alimentação (SCF, do inglês *Scientific Committee on Food*) da Comissão Europeia, os níveis de HPAs e especialmente o B[a]P nos alimentos devem ser reduzidos a concentrações tão baixas quanto possível (EC, 2002).

Diante disso, a Comissão da Comunidade Europeia, através do Regulamento EC nº 208 de 04 de fevereiro de 2005, estabeleceu níveis máximos de B[a]P e de certos contaminantes presentes nos alimentos, com objetivo de garantir uma maior segurança do consumidor. Os limites estabelecidos para alguns alimentos estão apresentados a seguir: peixes, óleos e gorduras ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); crustáceos, carnes e peixes defumados ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); moluscos bivalves ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e alimentos infantis ( $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (EC, 2005).

Contudo, em uma avaliação realizada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) concluiu-se que o B[a]P não é um marcador adequado, uma vez que alguns alimentos podem conter níveis tão baixos a ponto de não ser detectado, porém podem conter outros HPAs. Assim, deve ser adotado um sistema de monitoramento de 4 HPAs (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno e benzo[b]fluoranteno) como indicadores mais adequados da presença de HPAs em alimentos (EC, 2006; EFSA, 2008). O documento EC nº835/2011 alterou a legislação anterior (EC nº 208/2005), adicionando novas regras em relação ao limite máximo permitido de B[a]P. Esta legislação estabelece limites máximos de HPAs para moluscos bivalves de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para B[a]P e  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma dos 4 HPAs, já para moluscos bivalves defumados estabelece valores máximos de  $6 \mu\text{g kg}^{-1}$  para B[a]P e  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma dos 4 HPAs (EC, 2011).

No Brasil, tanto o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quanto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não estabeleceram limites máximos permitidos para a maioria dos alimentos passíveis de contaminação por HPAs. Existem Portarias e Resoluções Normativas da ANVISA que determinam limites máximos permitidos de B[a]P somente para a água e alimentos que passaram por processo de defumação. A Resolução RDC nº2/2007 estabeleceu limite máximo permitido de  $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$  para B[a]P em alimentos defumados (produtos submetidos a fumaça líquida) (BRASIL, 2007) e a Portaria nº518/2004 (BRASIL, 2004) juntamente com a Resolução RDC nº274/2005 (BRASIL, 2005) estabeleceram limite máximo permitido de  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  em água.

### 3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE HPAs EM ALIMENTOS

Uma das tarefas mais difíceis na análise de resíduos, contaminantes e compostos tóxicos presentes em baixas concentrações no meio ambiente é ter um processo fácil, eficiente, rápido e de baixo custo na extração a partir de amostras biológicas (PENSADO et al., 2005). Do ponto de vista analítico, isolar compostos de matrizes biológicas envolve frequentemente procedimentos de extração complexos além de, se necessário, uma etapa de limpeza para fornecer extratos adequados para uma determinação analítica precisa (RAMALHOSA et al., 2009).

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) é uma técnica muito utilizada na limpeza de extratos obtidos a partir de inúmeros métodos de extração. As suas principais aplicações são utilizando sorventes como sílica, florisil e alumina. A SPE consiste em percolar uma quantidade específica de extrato sob um cartucho contendo o recheio com o sorvente que for conveniente. Este cartucho pode ser adquirido comercialmente ou confeccionado no próprio laboratório de acordo com a finalidade da análise. Pode-se ou não aplicar vácuo ao sistema para facilitar a percolação do extrato e tornar resultados mais reprodutíveis. Em geral, a SPE é empregada para pré-concentrar amostras, mas também pode ser utilizada para a limpeza de extratos (CALDAS et al, 2011), como é o caso deste trabalho e diversos outros citados na literatura.

Métodos tradicionais empregando técnicas cromatográficas para extração de HPAs em matrizes biológicas muitas vezes envolvem hidrólise alcalina ou saponificação e subsequente utilização de solvente, seguido por um processo de limpeza dos extratos.

WONGMANEEPRA TIP & VANGNAI (2017) determinaram os 16 HPAs recomendados pelo EPA em amostras de frango grelhado por HPLC-DAD. 10 g de amostra foram saponificadas em refluxo com 100 mL de hidróxido de potássio (2 M) numa mistura com metanol e água (80:20, v/v). Para a limpeza do extrato a técnica de SPE foi utilizada com cartuchos de florisil (6 mL/1000 mg). Obtiveram percentuais de recuperação satisfatórios (67 e 112%) para todos os HPAs avaliados.

BALCIOĞLU (2016) determinaram 16 HPAs em mexilhão por HPLC. Como preparo de amostra utilizaram 10 g de amostra e saponificaram com KOH metílico e posteriormente extraíram com ciclohexano. Para a limpeza dos extratos utilizaram a SPE com uma coluna contendo florisil e sulfato de sódio.

Um grande número de estudos empregam para a extração de HPAs a partir de produtos marinhos procedimentos baseados em extração por Soxhlet, o qual demonstra ser eficiente nas recuperações de analitos (SANTIAGO et al., 2016; ZHOU et al., 2017; YOSHIMINE et al., 2012). Por outro lado, alguns autores relatam as desvantagens deste procedimento de preparo de amostra, uma vez que, é uma extração que demanda tempo e que consome grandes volumes de solventes e amostra (PENSADO et al., 2005).

ZHOU et al. (2017) determinaram os 16 HPAs recomendados pelo EPA em material particulado por GC-MS. Empregaram Soxhlet para a extração dos compostos utilizando 100 mL de diclorometano e hexano na proporção 1:1 (v/v) como solventes extratores. O tempo de extração foi de 24 h. Na limpeza do extrato utilizaram cartuchos de sílica, alumina e florissil pela técnica de SPE. Obtiveram valores de recuperações variando de 64 a 101%.

YOSHIMINE et al. (2012) analisaram 38 HPAs em amostras de mexilhão por GC-MS. Como preparo de amostra utilizaram 5 g de amostra extraídas em sistema Soxhlet durante 24 h usando 200 mL de diclorometano como solvente extrator. Para a limpeza do extrato utilizaram a SPE com uma coluna de vidro contendo alumina, sílica e sulfato de sódio. Obteram valores médios de recuperação de  $100 \pm 19\%$ .

SANTIAGO et al. (2016) determinaram os 16 HPAs recomendados pelo EPA em amostras de mexilhão por GC-MS. Como preparo de amostra utilizaram 3 g de amostra extraídos em sistema Soxhlet por 24 h utilizando 200 mL de diclorometano. Os extratos foram limpos por SPE em uma coluna de sílica. Os valores de recuperação variaram de 66 a 95%.

Vários autores também fazem o uso da extração líquido-líquido. ZHANG et al. (2016) determinaram os 16 HPAs recomendados pelo EPA em amostras de sedimentos marinhos por GC-MS. Na extração líquido-líquido utilizaram 5 g de amostra com diferentes volumes de diclorometano (30 e 50 mL). Na etapa de limpeza de extrato utilizaram uma coluna multicamada contendo 5 g de sílica, 6 g de florissil e 5 g de sulfato de sódio. Os percentuais de recuperação variaram de 80 a 115%.

ZHAO et al. (2017) determinaram os 16 HPAs recomendados pelo EPA em amostras de amendoim por GC-MS. Utilizaram 100 g de amostra na extração líquido-líquido com 350 mL de hexano e uma etapa adicional de sonificação por 1 h. Também utilizaram cartuchos de florissil na etapa de limpeza do extrato por SPE.

Nos últimos anos, técnicas alternativas foram desenvolvidas para a extração de HPAs em amostras sólidas, incluindo extração por solvente pressurizado (PLE, do inglês *pressure liquid extraction*) (ALBINET, TOMAZ & LESTREMAU, 2013; PURCARO, MORET & CONTE, 2009; BIACHEA et al., 2017). AVAGYAN & WESTERHOLM (2017) determinaram 11 HPAs hidroxilados em material particulado por UHPLC-HRMS (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução). Utilizaram como preparo de amostra a extração por solvente pressurizado (PLE) com metanol. Na limpeza do extrato utilizaram cartuchos de sílica pela técnica de SPE.

Outras técnicas de preparo de amostra também são utilizadas, entre elas a extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*) (BERG et al., 1999), a extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*) (PURCARO, MORET & CONTE, 2009) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix-solid phase dispersion*) (GUTIÉRREZ-VALENCIA & DE LLASERA, 2017).

Visando à uma diminuição do volume de solvente envolvido no preparo de amostra, originou-se a técnica microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase micro extraction*). Uma aplicação desta técnica foi apresentada no trabalho de PURCARO et al (2013), aplicado em amostras de óleo para determinação de 10 HPAs por GC-MS. A amostra foi extraída com acetonitrila e re-extraída com hexano, solvente no qual uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) foi exposta para adsorção dos analitos.

Todos estes procedimentos apresentam vantagens em termos de tempo e consumo de solvente, embora para as amostras com alto teor de gordura a coextração de lipídeos seja inevitável. Assim, é necessária uma etapa de limpeza dos extratos para remover estas interferências provenientes da matriz que pode ser realizada utilizando diversos sorventes tais como amina primária-secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), ocatadecilsilano (C18), sílica (SiO<sub>2</sub>), alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e florisil (MgSiO<sub>3</sub>) (RAMALHOSA et al., 2009; PENSADO et al., 2005).

### **3.3.1 Método QuEChERS para determinação de HPAs**

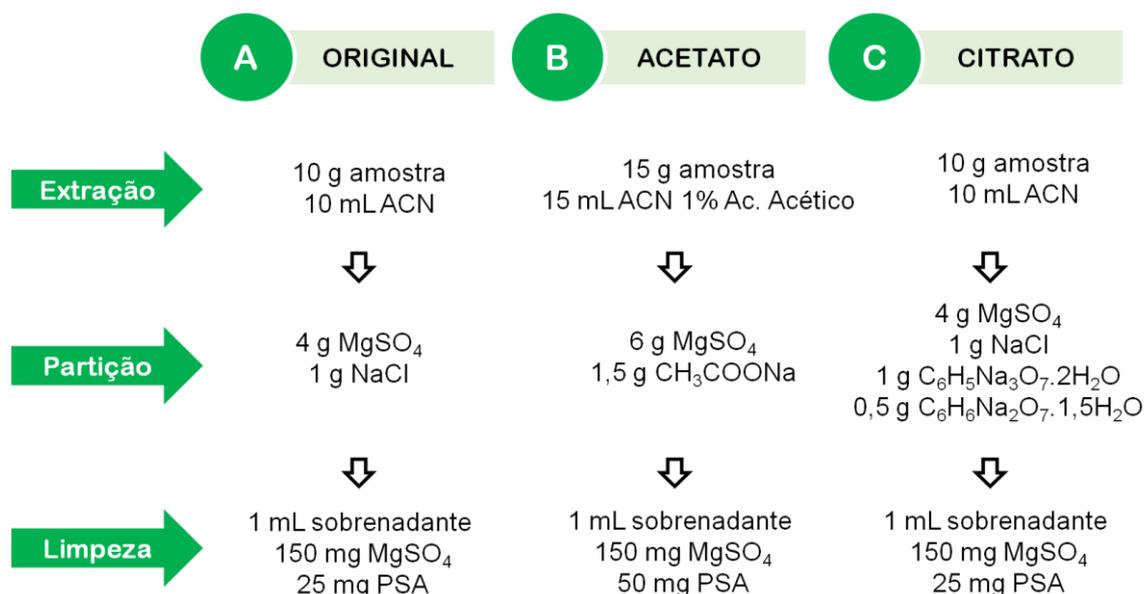
Em 2003, ANASTASSIADES et al. (2003) desenvolveram uma abordagem que denominaram de rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura (QuEChERS,

acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que engloba etapas de extração, partição e limpeza da amostra em um mesmo procedimento. Este método é caracterizado por extração com acetonitrila, seguida de adição de sais (NaCl, MgSO<sub>4</sub>) promovendo o efeito *salting out* e a partição das fases orgânica e aquosa. Após, na etapa de limpeza do extrato propuseram uma nova técnica denominada extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*), na qual uma quantidade do sobrenadante é colocada em contato com sorventes e sais que são agitados vigorosamente e centrifugados para obtenção de um extrato com menor teor de impurezas.

Nos últimos anos, a eficiência de extração e a grande aceitação do método QuEChERS propuseram uma substituição de métodos analíticos complicados, por procedimentos mais simples, a fim de agilizar o manuseio das amostras. Devido à sua simplicidade e procedimentos de limpeza adaptáveis, este método tem sido bastante utilizado na análise de multi-classe de diferentes compostos em várias amostras, fornecendo percentuais de recuperações satisfatórias (MORRISON, et al., 2016).

Originalmente o método foi proposto para determinação de diversos resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Posteriormente, devido às limitações para analitos que apresentam problemas de estabilidade de acordo com o pH da matriz, criaram-se adaptações deste método incluindo uma etapa de tamponamento. O método QuEChERS acetato, proposto por LEHOTAY et al. (2005), baseado no uso de acetonitrila em meio ácido, inclui uma etapa de tamponamento (pH 4,8) obtida pela adição de acetato de sódio promoveu um aumento no percentual de recuperações para compostos dependentes do pH. Em 2007, ANASASSIADES et al. (2007) propuseram o método QuEChERS citrato, no qual uma mistura de citrato de sódio di e sesquiidratados são responsáveis pelo efeito tamponante mantendo o pH em uma faixa de 5,0 a 5,5. Todas essas adaptações foram realizadas para garantir uma eficiência na extração dos resíduos de interesse. Uma demonstração dos procedimentos das principais versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) podem ser visualizadas na Figura 3.

Figura 3 - Demonstração das principais versões do método QuEChERS.



Devido a flexibilidade de execução, diversos tipos de sorventes podem ser utilizados na etapa de limpeza do extrato por d-SPE antes da injeção no sistema cromatográfico garantido a integridade do equipamento e remoção e/ou diminuição de interferência de sinal causada pelos componentes da matriz. A escolha do sorvente é dependente totalmente do tipo de amostra, dos analitos que se deseja determinar e dos possíveis interferentes no extrato. Para remoção de ácidos orgânicos polares, pigmentos, açúcares e ácidos graxos o sorvente PSA, é indicado, uma vez que à presença dos grupamentos amino primário e secundário em sua estrutura apresenta efeito quelante sob os interferentes. Para amostras que possuem alto teor de lipídios e ácidos graxos emprega-se sorventes apolares, como por exemplo, o C18.

Atualmente, inseriu-se no mercado um novo tipo de material utilizado para remoção de lipídios, que são os sorventes Z-Sep e Z-Sep<sup>+</sup>, ambos contêm ZrO<sub>2</sub> em sua composição. No entanto, o Z-Sep contêm partículas de sílica ligadas com ZrO<sub>2</sub> e no sorvente Z-Sep<sup>+</sup> a mesma partícula de sílica está ligada com ZrO<sub>2</sub> e C18 (REJCZAK & TUZIMSKI, 2017). Outro material disponibilizado comercialmente para remoção de lipídeos é o EMR-lipid<sup>®</sup> (do inglês *enhanced matrix removal*). Sabe-se que este sorvente possui mecanismos que atuam tanto por exclusão por tamanho como interações hidrofóbicas. Os hidrocarbonetos de cadeia longa associados aos lipídios se encaixam dentro da estrutura do EMR, onde são aprisionados. O

complexo EMR-lipid® é precipitado da solução ou permanece na fase aquosa durante o passo final de desagregação. Em qualquer caso, este sorvente elimina seletivamente os lipídios dos extratos provenientes do método QuEChERS de alimentos ricos em lipídios, tais como, abacate e tecidos animais, sem perda de analitos (HANA et al., 2016).

Diversos autores utilizam o método QuEChERS para determinação de HPAs em diversas matrizes. Entre eles, ALBINET, TOMAZ & LESTREMAU (2013) utilizaram o método QuEChERS para determinação de HPAs associados ao material particulado fino. Compararam a eficiência do método QuEChERS com a extração por solvente pressurizado (PLE). No entanto QuEChERS se mostrou mais eficaz, uma vez que minimizou erros experimentais, apresentou rapidez e menor custo.

MORRISON et al. (2016), utilizaram o método QuEChERS na extração de vários poluentes orgânicos persistentes, entre eles os HPAs, em amostras de peixe com posterior determinação por GC-MS. Os valores de recuperação obtidos (60-107%) demonstraram que o método QuEChERS pode ser usado na determinação de vários poluentes orgânicos que são bioacumulados. Para o preparo da amostra 5 g de amostra foram extraídas com 5 mL de acetonitrila, homogeneizadas em Ultra-Turrax e sonificadas por 30 min. Os sais de partição foram  $MgSO_4$  e NaCl. Para a limpeza do extrato por d-SPE foi empregado 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 150 mg de  $MgSO_4$ .

SU et al. (2017) utilizaram o método QuEChERS na determinação de 16 HPAs em amostras de sedimento por GC-MS. Utilizam 1 g de amostra e adicionaram 10 mL de diclorometano e hexano (1:1, v/v) para extração, seguida de uma etapa de sonificação. Na etapa de limpeza de extrato por d-SPE utilizaram kits de sorventes da Agilent (n°5982-5421).

KAO et al. (2014) analisaram 16 HPAs em amostras de carne e frutos do mar por GC-MS. Como preparo de amostra utilizaram o método QuEChERS, 5 g de amostra foram extraídas com 10 mL de acetonitrila. Para partição, 6 g de  $MgSO_4$  e 1,5 g de acetato de sódio foram utilizados. Na etapa de limpeza do extrato por d-SPE utilizaram os sorventes 400 mg de PSA, 400 mg de sílica e 1200 mg  $MgSO_4$  para 6 mL de extrato. Obtiveram percentuais de recuperação entre 71 a 104%.

MADUREIRA et al. (2014) analisaram 16 HPAs em amostras de mexilhão por GC-MS/MS utilizando o método QuEChERS. Extraíram 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila. Para partição utilizaram 4 g de  $MgSO_4$  e 1g de NaCl. Na etapa de

limpeza do extrato por d-SPE utilizaram 150 mg de PSA e 900 mg de  $MgSO_4$  para 6 mL de extrato. Obtiveram percentuais de recuperação entre 89 a 112%.

CAI, STEVENS & SYAGE (2012) analisaram 16 HPAs em amostras de ostras por UHPLC-MS. Como preparo de amostra aplicaram o método QuEChERS, 10 g de amostra foram extraídas com 15 mL de acetonitrila. Na etapa de partição utilizaram 6 g de  $MgSO_4$  e 1,5 g de NaCl. Na etapa de limpeza do extrato por d-SPE empregou-se 50 mg de PSA e 150 mg de  $MgSO_4$  para 2 mL de extrato, obtendo valores de recuperação entre 71 a 110%.

YOO et al. (2014) analisaram 14 HPAs em amostras de ostras empregando o método QuEChERS e HPLC-FD. 2 g de amostra foram extraídos com 5 mL de acetonitrila. Para partição utilizaram 2 g de  $MgSO_4$  e 0,5 g de NaCl. Na etapa de limpeza do extrato por d-SPE utilizaram 50 mg do sorvente PSA e 150 mg de  $MgSO_4$  para limpeza de 1,5 mL de extrato. Obtiveram percentuais de recuperação entre 87 a 116%.

RAMALHOSA et al. (2009) analisaram 16 HPAs em amostras de peixe por HPLC-FD. Durante a execução do método QuEChERS, 5 g de amostra foram extraídas com 8 mL de acetonitrila. Na etapa de partição utilizaram os sais  $MgSO_4$  e acetato de sódio. Na etapa de limpeza do extrato por d-SPE utilizaram os sorventes PSA, C18 e  $MgSO_4$ , obteve-se percentuais de recuperação entre 70 a 120%.

ANGIONI et al. (2012) analisaram 17 HPAs em amostras de ouriço-do-mar por GC-MS/MS. 1 g de amostra foi extraída com 1 mL de acetonitrila. Na etapa de partição empregou-se os sais  $MgSO_4$  e acetato de sódio. Na etapa de limpeza do extrato por d-SPE utilizaram os sorventes PSA, C18 e  $MgSO_4$ . Obtiveram percentuais de recuperação entre 70 a 120%.

CLOUTIER et al. (2017) que utilizaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (GC-HRMS) na determinação de 45 HPAs em amostras de mexilhão azul (*Mytilus edulis*). A extração foi realizada pelo método QuEChERS e a limpeza do extrato por SPE. Utilizaram 6 g de amostra extraídos com 10 mL de acetato de etila. Posteriormente na etapa de partição utilizaram 2 g de NaCl e 4 g de  $MgSO_4$ . Para a limpeza do extrato prepararam uma coluna de SPE contendo 2 g de sílica e sulfato de sódio.

### 3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A determinação de HPAs é geralmente realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) ou por cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) (PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH & VIDAL, 2010).

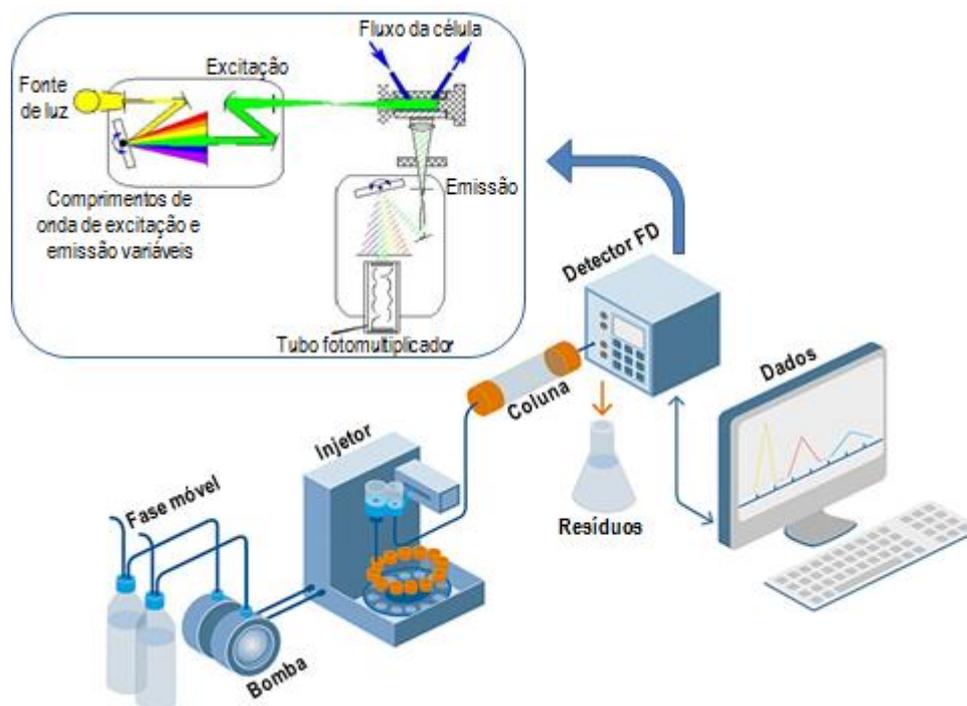
A HPLC é uma técnica analítica muito utilizada na análise de HPAs devido a possibilidade fato de separar eficientemente estas espécies, proporcionando determinações precisas e com alta detectabilidade (SILVA, 2013; LOURENÇO, 2013). Os detectores mais utilizados são os de ultravioleta (UV) e de fluorescência (FD). A detecção por UV quando comparada à FD apresenta algumas desvantagens, como problemas com seletividade e limitação de detectabilidade. Além disso, o detector UV não consegue discriminar interferentes provenientes de matrizes complexas como os alimentos (LAI & FRANKE, 2013).

A HPLC-FD tem sido amplamente aplicada na determinação destes compostos em alimentos (PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH&VIDAL, 2010). A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção seletivo, uma vez que é o detector de maior detectabilidade para compostos que fluorescem. Em boas condições tem a capacidade de atingir limites de detecção no nível de picogramas ( $10^{-12}$ ) (LAI & FRANKE, 2013).

A detecção por fluorescência é uma técnica baseada na emissão de fótons de moléculas excitadas que possuem campos de fluorescência intrínsecos suficientemente grandes para serem detectados analiticamente. Os compostos fluorescentes naturalmente são relativamente raros e incluem aqueles que contêm pelo menos duas ligações conjugadas (doadores de elétrons) ou grupos específicos capazes de doar elétrons para um sistema e por consequência aumentar a intensidade de fluorescência. Para compostos não fluorescentes é possível adquirir essa característica por reações pré ou pós-coluna. Os HPAs apresentam fluorescência molecular devido a sua estrutura eletrônica, e esta propriedade pode ser usada para sua detecção nos mais diversos tipos de matrizes e com grande sensibilidade (NETTO et al., 2000).

Um esquema de um HPLC com detecção por fluorescência é mostrado na Figura 4. No detector de FD, a luz de uma fonte UV atravessa um sistema óptico, composto por lentes e monocromador, que focaliza o feixe e seleciona o comprimento de onda adequado para incidir sobre a amostra e excitá-la. Quando uma substância fluorescente está presente na cela da amostra, ao retornar ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior ao incidido. Outra lente coleta a energia fluorescente e focaliza-a na fotomultiplicadora, que mede a intensidade da radiação. O monocromador primário é escolhido para deixar passar somente o comprimento de onda excitante, já o secundário elimina o comprimento de onda excitante, mas deixa passar o comprimento de onda emitido pela amostra (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

Figura 4 - Representação esquemática de um cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD).



Fonte: Pharma, 2009; Emaze.

Como a principal alternativa à técnica de HPLC-FD, diversos autores utilizam a GC-MS para análise de HPAs aplicada em vários tipos de amostras (ZHANG et al., 2016; SANTOS et al., 2017; PURCARO et al., 2013). A utilização da GC-MS mostra várias vantagens em comparação com à HPLC-FD, principalmente em sua

capacidade de resolução. A GC oferece alto poder de resolução cromatográfica e o MS fornece alta seletividade de massa e informações estruturais. Além disso a GC-MS permite a determinação de HPAs não fluorescentes ou com pouca fluorescência (PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH & VIDAL, 2010).

Normalmente são amplamente utilizadas colunas com fase estacionária baseada em 5% de fenil-95% de metilpolisiloxano. No entanto, a obtenção de uma resolução adequada pode se tornar um ponto crítico dependendo dos PAHs em estudo, uma vez que existem vários grupos de compostos que podem co-eluir. Esta questão é particularmente importante quando estes PAHs não podem ser resolvidos no espectrômetro de massas de baixa resolução (utilizando quadruplo) devido à fragmentações com o mesmo perfil. Se os compostos sobrepostos mostram íons isobáricos, uma quantificação precisa é, portanto, difícil ou impossível. Faz-se necessária assim, a utilização de colunas que proporcionem separação adequada ou um espectrômetro de massas de alta resolução, como tempo de voo e setores magnéticos, mas por causa de seu alto custo, sua aplicação não é comum (PLAZA-BOLAÑOS, FRENICH & VIDAL, 2010).

### 3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A garantia da confiabilidade dos resultados analíticos em técnicas cromatográficas é assegurada através da validação de métodos. A validação pode ser definida como sendo uma comprovação, através de evidências objetivas, de que os requisitos para uma determinada aplicação ou uso específicos foram alcançados (INMETRO, 2011). De acordo com LANÇAS (2004), a validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, sendo necessária a realização de procedimentos que comprovem que o método proposto fornece resultados confiáveis.

Para assegurar a credibilidade dos dados analíticos devem ser avaliados os parâmetros analíticos durante o processo de validação do método. Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação estão destacados na Tabela 3, entre eles: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Definição</b>	<b>Aplicação</b>
Seletividade	Distinção de respostas entre analitos	Extração da matriz "branco"
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva analítica ( $y = ax + b$ )
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva analítica ( $y = ax + b$ )
Limite de detecção		S/R = 3
Limite de quantificação	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 10
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e reprodutibilidade
Exatidão	Proximidade de resultados em relação a uma referência	Ensaio de fortificação
Efeito matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco da matriz

Fonte: INMETRO, 2011; ANVISA, 2003; SANTE, 2015; RIBANI et al., 2004.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ Agitador vortex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Centrífuga refrigerada Nova Técnica, modelo NT 825, com rotação máxima de 3500 rpm (Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada SOLAB, modelo SL 703, com rotação máxima de 10000 rpm (Brasil);
- ✓ Coluna Acclaim™ 120 C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Processador de alimentos VariMix (Targo, Espanha);
- ✓ Sistema de aquisição de dados Perkin Elmer (Shelton, USA) TotalChrom 3.0);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV® (Millipore, França);
- ✓ Sistema HPLC-FD Perkin Elmer (Shelton, USA), Bomba Quaternária Series 200, Detector Series 200a, Desgaseificador Series 200, Autosampler Series 225 e Interface NCI 900;

### 4.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV® com resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- ✓ Alumina neutra com tamanho de partícula de 100-125 mesh (Merck, USA);
- ✓ Cartuchos (vazio) de polipropileno, com volume de 3 mL (Phenomenex, EUA);

- ✓ Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Detergente Extran<sup>®</sup> neutro (Merk, Brasil);
- ✓ Filtros de PTFE de 0,22 µm de porosidade (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ✓ Florisil<sup>®</sup> com tamanho de partícula de 60 a 100 mesh (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudos de Dr. Erhenstorfer (Alemanha);
- ✓ Sílica gel com tamanho de partículas de 50 µm (Merck, USA);
- ✓ Sorvente Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-lipid<sup>®</sup>) (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C<sub>18</sub> (ocatadecilsilano) com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Supel<sup>™</sup> QuE Z-Sep<sup>+</sup> (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J. T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Tubos tipo eppendorf de 2 mL (Labcon, USA);
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

### 4.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS

Foram selecionados para o desenvolvimento deste estudo 7 HPAs. Todos os padrões sólidos utilizados foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer. Informações gerais como fórmula molecular, massa molar, ponto de fusão e ebulição, Log K<sub>ow</sub> e pureza dos padrões estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características físico-químicas dos HPAs avaliados neste estudo.

Compostos	Fórmula molecular	Massa molar (g)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Pureza (%)
Fenantreno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	101	340	4,46	99,5
Antraceno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	218	342	4,54	99,0
Pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,26	151	404	5,18	99,0
Criseno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	258	448	5,91	98,7
Benzo[k]fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32	217	480	6,04	99,0
Benzo[a]pireno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32	179	496	6,75	99,6
Dibenzo[ah]antraceno	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,35	267	524	6,75	99,8

Fonte: PubChem.

#### 4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram preparadas soluções analíticas estoque individuais na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar em temperatura menor que -10 °C. A partir destas soluções, preparou-se soluções individuais e uma mistura de todos os HPAs na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. A partir da solução de 10 mg L<sup>-1</sup> foi preparou-se uma solução na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> e a partir dessa foram realizados os ensaios de fortificação e preparo da curva analítica nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 µg L<sup>-1</sup>. Acetonitrila foi o solvente empregado para o preparo das soluções estoque, mistura e demais diluições.

#### 4.5 ORIGEM E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As etapas de avaliação e validação do método foram realizadas empregando amostras “branco” de mexilhão adquiridas no comércio local de Santa Maria (RS).

As amostras de mexilhão (desconchado) utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) localizado na cidade de São José (SC). As amostras foram coletadas em fazendas marinhas dedicadas à miticultura localizadas na região de Florianópolis (SC), armazenadas em embalagens individuais, congeladas e remetidas para o LARP-UFSM.

Todas as amostras foram processadas inteiras com processador tipo mixer e acondicionadas em recipientes adequados e posteriormente armazenadas no

freezer sob temperatura  $\leq -10$  °C até o momento da análise. O processamento das amostras empregado neste trabalho pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 - Representação do processamento das amostras no laboratório.



#### 4.6 SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC-FD PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO

Neste trabalho, empregou-se a técnica de HPLC-FD para determinação dos HPAs. Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna de fase reversa Acclaim™ 120 C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) a temperatura ambiente (25°C).

A escolha dos comprimentos de onda de excitação e emissão baseou-se em valores encontrados na literatura (os quais estão apresentados na Tabela 7) sendo adaptada para este trabalho. Os compostos foram analisados em um único comprimento de onda apresentando intensidade de sinal adequada para os 7 compostos avaliados.

Nesta técnica, fez-se o uso da cromatografia de fase reversa o qual utiliza uma coluna com fase estacionária (FE) de C18. Assim, é esperado que os analitos menos polares interajam por mais tempo com a FE da coluna e com isso sejam eluídos em um maior  $t_R$  em comparação àqueles que não possuem tanta afinidade pela FE da coluna. A fase móvel empregada neste trabalho foi composta de água ultrapura e acetonitrila. A eluição da fase móvel foi realizada no modo gradiente

sendo testadas diferentes vazões e proporções de fase móvel durante a análise cromatográfica, as quais estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições de gradientes avaliados para escolha da separação cromatográfica.

Tempo (min)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Água (%)	ACN (%)
Condição 1 - Tempo total: 25 min			
0,5	0,5	40	60
5	0,5	40	60
5	0,5	0	100
13	1	0	100
1	0,5	40	60
1	0,5	40	60
Condição 2 - Tempo total: 25 min			
0,5	0,5	30	70
5	0,5	30	70
8	0,5	0	100
10	1	0	100
1	0,5	30	70
1	0,5	30	70
Condição 3 - Tempo total: 25 min			
0,5	0,5	20	80
5	0,5	20	80
5	0,5	0	100
13	1	0	100
1	0,5	20	80
1	0,5	20	80
Condição 4 - Tempo total: 23 min			
0,5	0,5	20	80
5	1	20	80
4	1	0	100
12	0,7	0	100
1	0,5	20	80
1	0,5	20	80

As condições cromatográficas utilizadas na separação dos HPAs selecionados foram avaliadas através da injeção de 20 µL de cada solução padrão no HPLC-FD. Estas foram preparadas individualmente em acetonitrila na concentração de 30 µg L<sup>-1</sup>. Com isso, foi possível obter os tempos de retenção ( $t_R$ ) e o perfil de separação para cada um dos compostos.

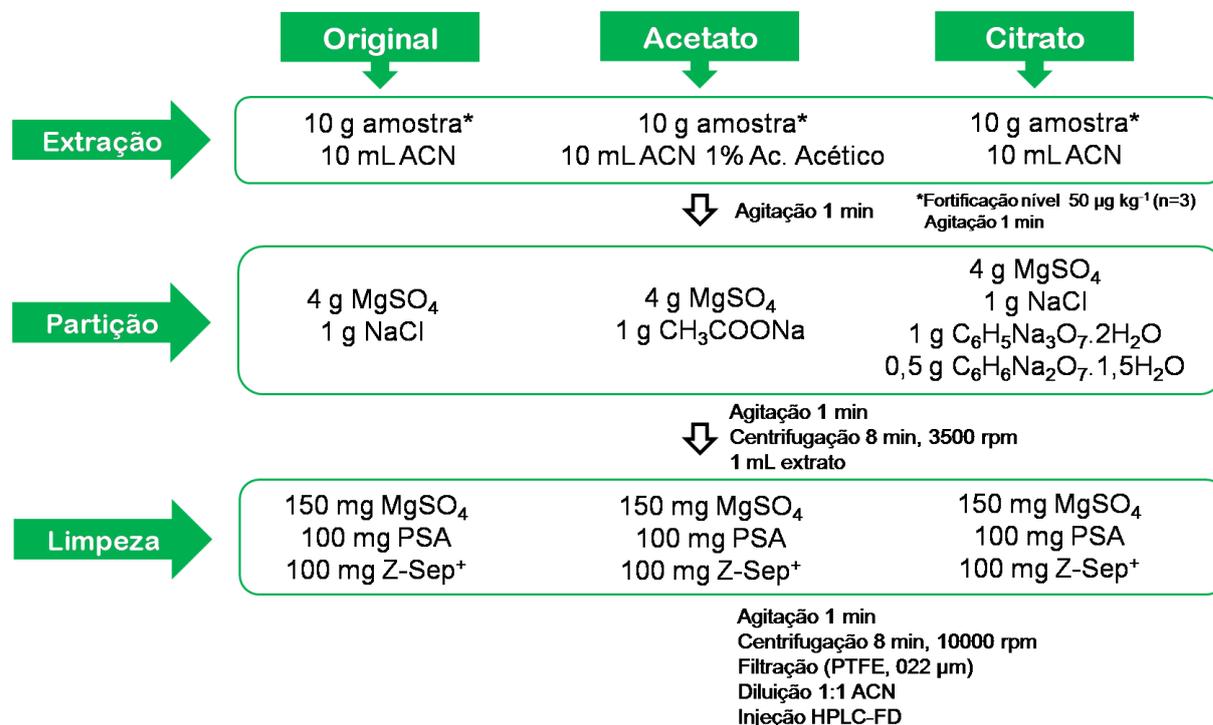
## 4.7 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO

Os testes de preparo de amostra descritos a seguir foram realizados na matriz branco de mexilhão. A avaliação dos percentuais de recuperação dos HPAs nestes ensaios foi realizada através de fortificações no nível de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  realizadas em triplicata. Para cada teste foi injetou-se um extrato branco, uma solução analítica preparada na matriz branco e fortificações ( $n=3$ ) na mesma concentração. Todos os testes realizados estão descritos a seguir.

### 4.7.1 Procedimento de extração

Os testes iniciais de extração foram propostos visando a escolha do melhor procedimento de extração através da avaliação dos percentuais de recuperação dos compostos em estudo. Diferentes ensaios de extração baseados no método QuEChERS foram utilizados: QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003) e suas versões tamponadas acetato (LEHOTAY et al., 2005) e citrato (ANASTASSIADES et al., 2007). Em todos os procedimentos a etapa de limpeza por d-SPE foi realizada da mesma maneira, empregando os sorventes Z-Sep<sup>+</sup> e PSA de acordo com os estudos de REJCZAK & TUZIMSKI (2017) e MORENO-GONZÁLEZ et al. (2014). Na Figura 6 estão demonstrados os três procedimentos realizados nos testes iniciais.

Figura 6 - Procedimento de extração realizado para as três variações do método QuEChERS.



#### 4.7.2 Influência da diluição da amostra ou extrato diante de diferentes sorventes

Nos testes subsequentes, avaliou-se na etapa de limpeza do extrato, o uso dos sorventes alumina, florisil, sílica, EMR-lipid<sup>®</sup> e a combinação já utilizada de Z-Sep<sup>+</sup> e PSA. Paralelamente a este teste foi realizado um procedimento para avaliar a influência da etapa de diluição através da comparação da diluição do extrato em acetonitrila realizada antes da injeção do extrato no equipamento (1:1, v/v) e a diluição durante a etapa de extração (1:2, m/v).

O ensaio realizado com a diluição do extrato final em acetonitrila na proporção de 1:1 (v/v) consistiu na extração de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila. Para a diluição durante a etapa de extração, utilizou-se 5 g de amostra e 10 mL de acetonitrila (1:2, m/v), sem a necessidade de diluição final. Ambos os procedimentos podem ser vistos na Figura 7 (diluição 1:1, v/v) e Figura 8 (diluição 1:2, m/v).

Cabe salientar que os sorventes alumina, florisil e sílica não foram ativados termicamente e o EMR-lipid<sup>®</sup> foi utilizado sem as etapas de ativação e posterior polimento, como recomenda o fabricante.

Figura 7 - Procedimento realizado no teste com diluição final do extrato em acetonitrila (1:1, v/v), utilizando 4 diferentes sorventes (alumina, florisil, sílica e EMR-lipid®) em comparação com PSA + Z-Sep<sup>+</sup>.

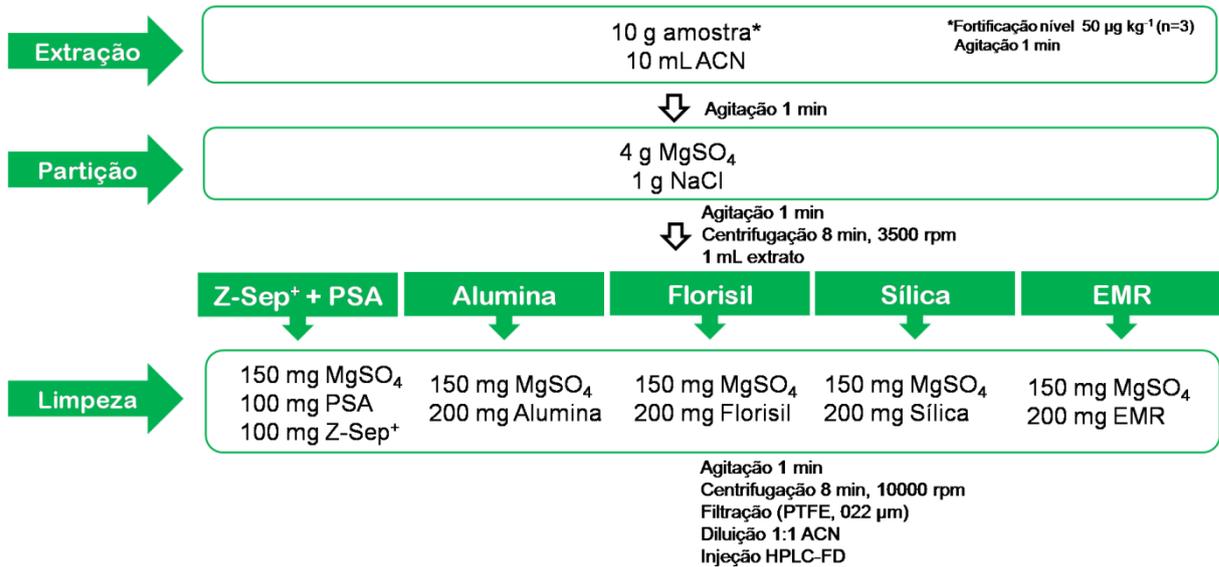
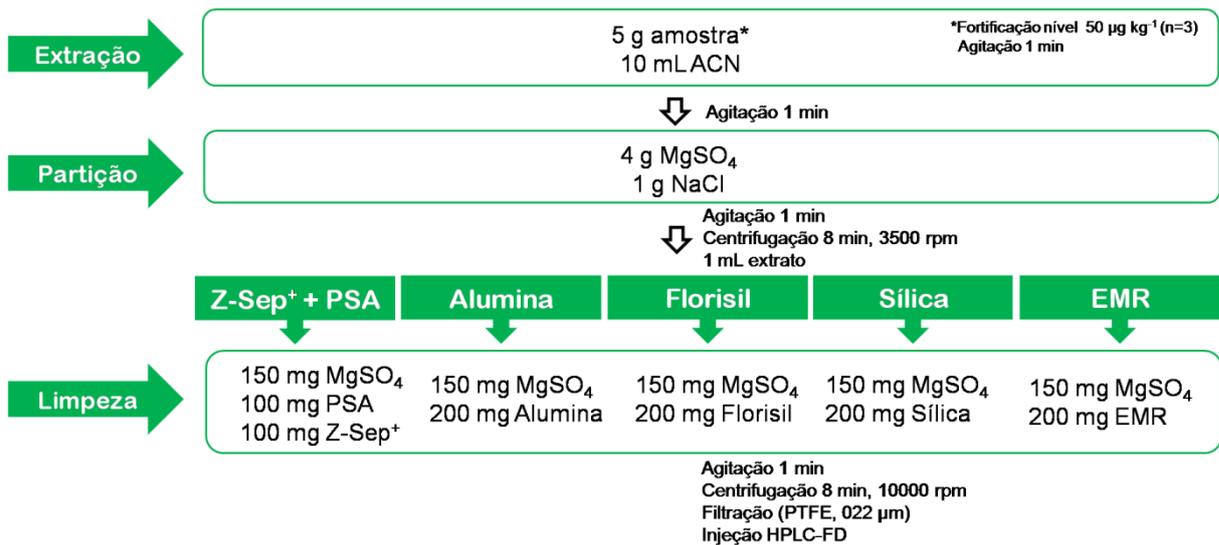


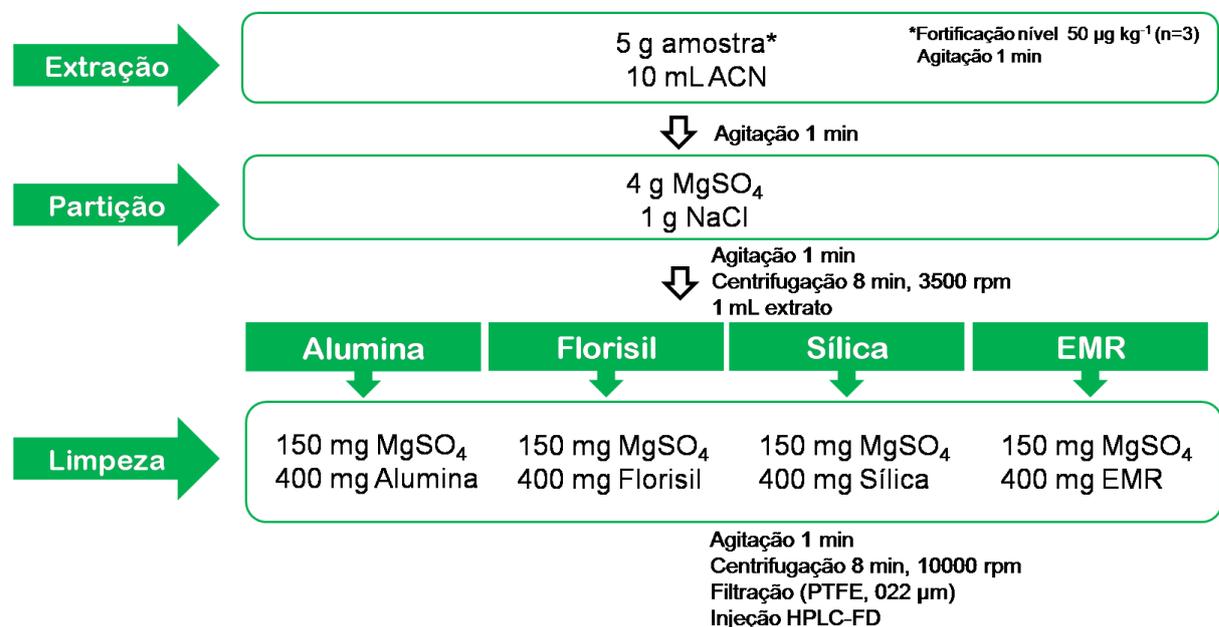
Figura 8 - Procedimento realizado no teste com diluição inicial da amostra em acetonitrila (1:2, m/v), utilizando 4 diferentes sorventes (alumina, florisil, sílica e EMR-lipid®) em comparação com PSA + Z-Sep<sup>+</sup>.



### 4.7.3 Avaliação da quantidade de sorvente empregada na etapa de limpeza por d-SPE

Conforme demonstrado na Figura 9, novos testes utilizando o dobro da quantidade de sorvente (400 mg) para o mesmo volume de extrato (1 mL) foram realizados a fim de verificar uma maior eficiência na remoção de coextrativos da matriz. Foram novamente testados os sorventes alumina, florisil, sílica e EMR-lipid®.

Figura 9 - Procedimento de limpeza do extrato utilizando 400 mg de cada sorvente.



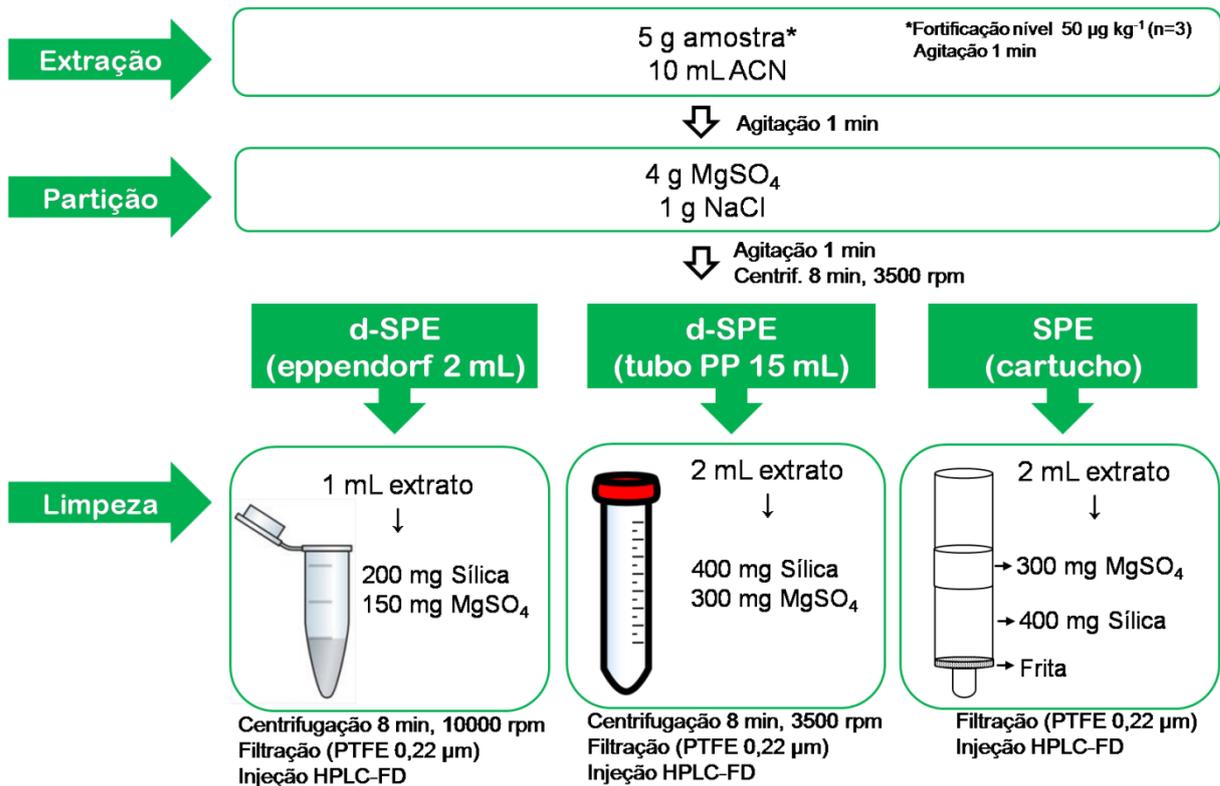
### 4.7.4 Comparação entre as técnicas de limpeza d-SPE e SPE

Durante a etapa de limpeza dos extratos relatada no item 4.7.3, após a etapa de filtração o volume de extrato obtido era de aproximadamente 300 µL. Assim, era necessário o uso de *inserts* nos vial de injeção. Visando eliminar o uso deste dispositivo optou-se por realizar ensaios com o dobro do volume de extrato e de massa de sorventes.

Realizou-se dois procedimentos de limpeza utilizando a técnica d-SPE. O primeiro conforme descrito no item 4.7.3 empregou tubos tipo eppendorf de 2 mL e centrifugação com rotação de 10000 rpm por 8 min. Por outro lado, o segundo teste foi realizado empregando tubos de PP de 15 mL e centrifugação à 3500 rpm por

8min. Paralelamente a este teste realizou-se a comparação dos percentuais de recuperação empregando o método dispersivo (d-SPE - utilizando tubo de PP de 15 mL) e não dispersivo (SPE - utilizando cartucho). Para a avaliação da etapa de limpeza da amostra por SPE, empregou-se um cartucho de polipropileno com volume de 3 mL, o qual foi preenchido com as mesmas quantidades de sorvente utilizados na etapa de d-SPE. A montagem do cartucho foi realizada colocando uma frita na parte inferior, seguida da adição de 400 mg de sílica, 300 mg de  $MgSO_4$  e outra frita na parte superior. Posteriormente percolou-se 2 mL de extrato com auxílio de um *manifold* para aplicação de vácuo. Os extratos foram coletados em tubo de vidro e posteriormente filtrados com filtros de PTFE (0,22  $\mu m$ ). Os ensaios realizados nesta etapa estão demonstrados na Figura 10.

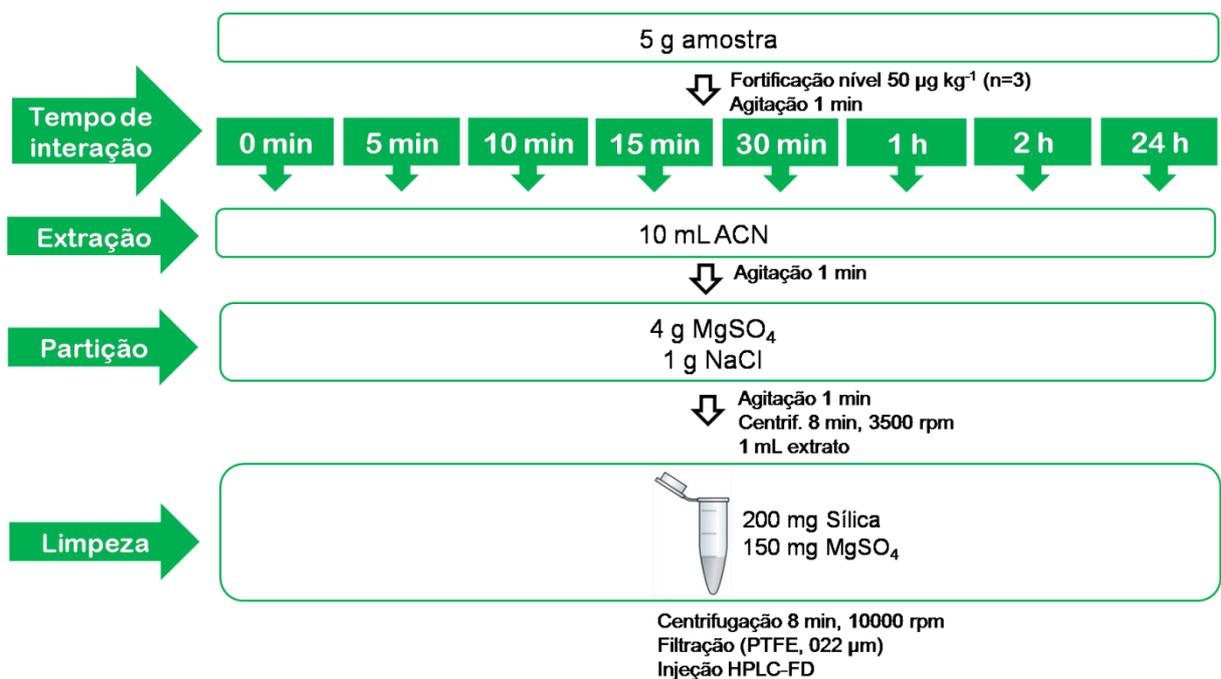
Figura 10 - Teste de comparação da recuperação, utilizando a técnica de limpeza da amostra por d-SPE (em tubos de PP e tubos de eppendorf) e SPE.



#### 4.7.5 Avaliação do tempo de interação dos compostos com a amostra nos ensaios de fortificação

Após a escolha do melhor método de extração e limpeza avaliou-se o tempo de interação da solução padrão, contendo a mistura dos analitos alvo deste estudo, com a amostra branco de mexilhão, a fim de verificar a interação dos analitos com a amostra. Avaliou-se os seguintes períodos de tempo: 0, 5, 10, 15 e 30 min, bem como 1, 2 e 24 horas. O procedimento deste teste está mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Procedimento realizado para os diferentes tempos de interação do padrão com a amostra.



#### 4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO POR HPLC-FD

Após a avaliação das melhores condições de preparo de amostra, o método foi validado em função dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e faixa linear, avaliação do efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão (em termos de repetibilidade e precisão intermediária).

#### 4.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos de injeções no sistema HPLC-FD de extratos da amostra “branco” de mexilhão, isenta dos compostos em estudo, e de amostra “branco” fortificada ( $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) com os compostos avaliados neste estudo.

#### 4.8.2 Linearidade e faixa linear

A fim de verificar a faixa de trabalho e o comportamento da resposta analítica realizou-se a injeção em triplicata das soluções analíticas nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e  $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$  correspondentes a uma concentração na amostra de 2, 4, 10, 30,40 e  $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

#### 4.8.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi determinado através da comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato "branco" de mexilhão através da Equação 1 (SANTE, 2015).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left( \frac{X_1 - X_2}{X_2} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$X_1$  = Média das inclinações da curva (para cada analito) preparada no extrato da matriz (CTM);

$X_2$  = Média das inclinações da curva (para cada analito) preparada no solvente (CTS);

#### 4.8.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOQ do método foi definido como a menor concentração de fortificação na matriz ( $n=7$ ) com resultados aceitáveis de exatidão (recuperações entre 70 e 120%) e precisão ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ) (SANTE, 2015). O LOD do método foi calculado dividindo o valor do LOQ por 3,33. Ambos os resultados são expressos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

#### 4.8.5 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, sendo realizadas fortificações na amostra “branco” de mexilhão em três níveis de concentração (2, 10 e 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), com 7 réplicas de extração para cada nível de fortificação, injetadas uma vez cada.

A exatidão, expressa a percentagem de recuperação dos analitos. Conforme recomendações do guia de validação do INMETRO (2011), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a Equação 2. Neste trabalho, a recuperação foi calculada com o auxílio do *software* Microsoft Excel®.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$C_1$  = Concentração determinada na amostra fortificada;

$C_2$  = Concentração determinada na amostra não fortificada;

$C_3$  = Concentração usada para fortificação;

#### 4.8.6 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária

A precisão do método, em termos de repetibilidade ( $RSD_r$ ), é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) e foi avaliada nos mesmos níveis de fortificação realizados para a exatidão.

A precisão pode ser calculada através da fórmula do RSD, conforme a Equação 3.

$$RSD (\%) = \left( \frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

$\bar{X}$  = Média das medidas em replicatas.

$s$  = Estimativa de desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - \bar{x}_m)^2/n-1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = Valores individuais;

$n$  = Números de medidas;

A precisão intermediária ( $RDS_{pi}$ ) do método foi avaliada realizando o mesmo procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco fortificadas nos mesmos níveis utilizados na repetibilidade (2, 10 e 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### 4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido e validado foi aplicado em 20 amostras comerciais de mexilhão cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) coletadas na região de Florianópolis em Santa Catarina.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA HPLC-FD PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO

#### 5.1.1 Escolha da coluna analítica e da fase móvel

A escolha da coluna analítica e da composição da fase móvel neste trabalho para a análise de 7 HPAs em mexilhão baseou-se em alguns trabalhos na literatura, mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Alguns trabalhos da literatura referentes as condições cromatográficas do HPLC-FD.

Amostra	Coluna	Dimensões	Fase móvel	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Vol. inj. (µL)	Referência
Mexilhão	C18 (Rapid Resolution HT)	50x2,1 mm; 1,8 µm	Gradiente: acetonitrila e água	0,4	20	SERPE et al., 2010
Peixe	C18 (CC 150/4 Nucleosil 100-5 C18 PAH)	15x4 mm; 5 µm	Gradiente: acetonitrila e água	0,8	15	RAMALHOSA et al., 2009
Mariscos	C18 (Phenomenex C18 Envirosep)	125x4,6 mm; 3 µm	Gradiente: acetonitrila e água	1,4	20	PERUGINI et al., 2007
Mexilhão	LC-PAH (Supelcosil LC-PAH Supelco)	250x4,6 mm; 5 µm	Gradiente: acetonitrila e água	1	50	PERUGINI et al., 2007
Material particulado	C18 (Pinnacle II PAH Restek)	150x3,0 mm; 4 µm	Gradiente: acetonitrila e água	1	20	LIAUD, MILLET & LE CALVÉ, 2015

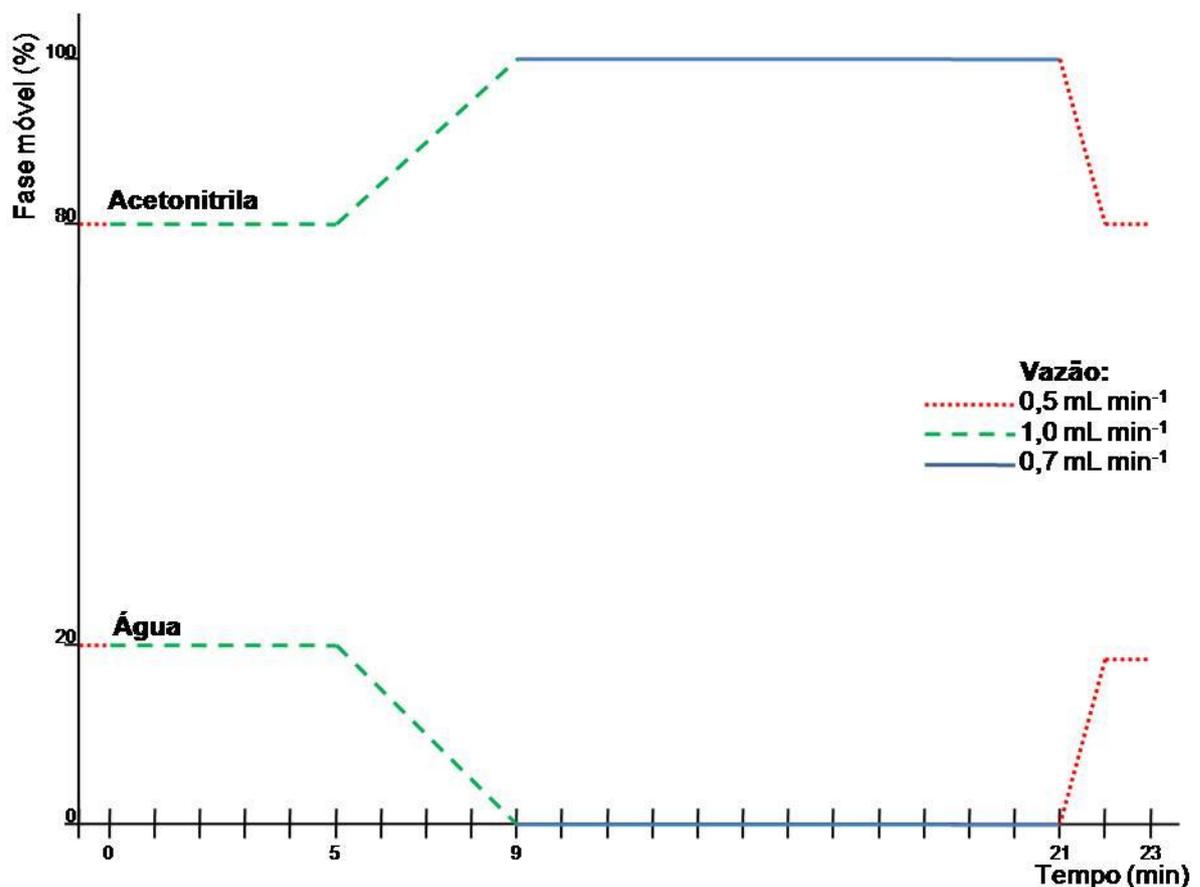
A maioria dos trabalhos relatam o uso de colunas analíticas de fase reversa com tamanho de partícula de 5 µm para a separação de HPAs por HPLC-FD Assim, neste trabalho foi utilizada uma coluna analítica Acclaim™ 120 C18 nas dimensões de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula. Empregou-se um volume de amostra de 20 µL para injeção no sistema cromatográfico (SILVA, 2013).

A acetonitrila e água são os solventes mais utilizados como fase móvel na separação de HPAs. Portanto, estes solventes foram escolhidos como fase móvel neste trabalho, e para uma melhor separação dos compostos utilizou-se um

gradiente de fase móvel. As injeções individuais das soluções analíticas de cada composto em estudo possibilitaram a identificação da ordem de eluição dos compostos através dos respectivos  $t_R$ .

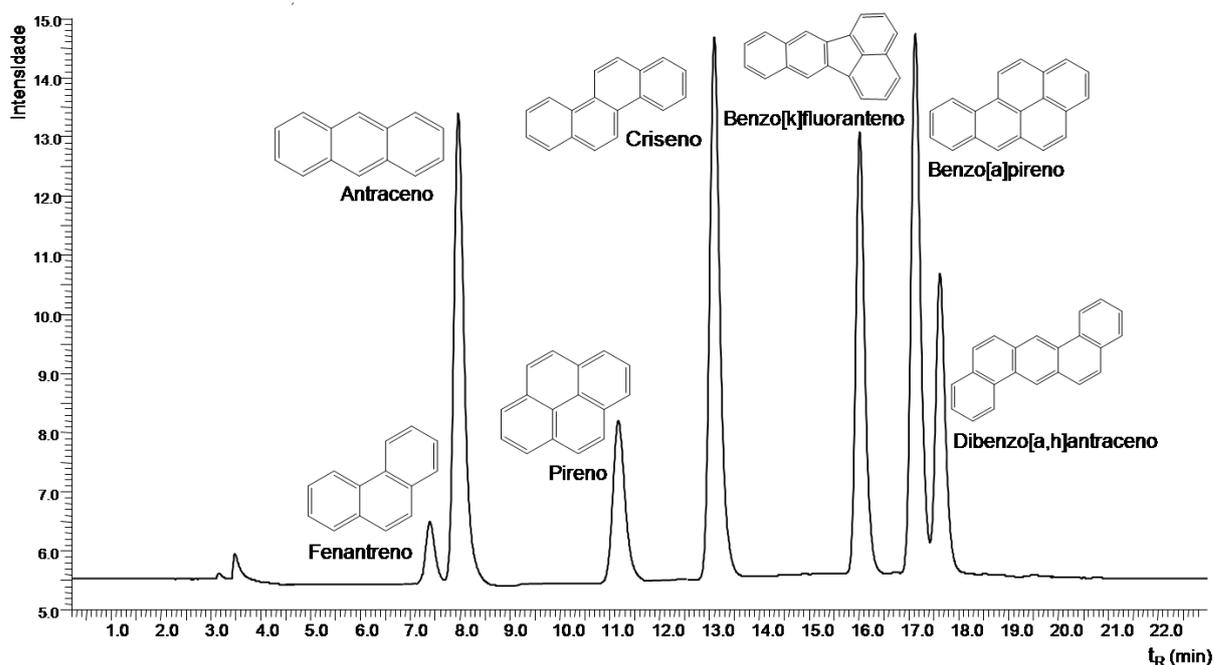
A primeira condição de fase móvel testada (condição 1 - Tabela 5) foi a que utilizou uma maior proporção de água (40%). No entanto, no início da separação cromatográfica, os picos demoraram muito para eluir. A partir desta condição, avaliou-se uma diminuição da proporção de água até se obter uma condição que proporcionasse uma boa eluição e separação dos picos. Após várias alterações na proporção dos solventes e vazão de fase móvel (condição 2 e 3 - Tabela 5) visando o aprimoramento da separação cromatográfica, chegou-se a proporção (condição 4 - Tabela 5) que promoveu uma separação adequada. O método satisfatório para separação dos 7 HPAs em estudo foi alcançado com um tempo de análise cromatográfica de 23 min nas condições de fase móvel e vazão apresentadas na condição 4 da Tabela 6 que também podem ser visualizadas na Figura 12.

Figura 12 - Gradiente e vazão da fase móvel utilizada no sistema HPLC-FD para determinação de HPAs em amostras de mexilhão.



A Figura 13 apresenta o cromatograma obtido por HPLC-FD para uma solução padrão em acetonitrila na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  contendo todos compostos em estudo. As condições de fase móvel e vazão utilizadas foram as da condição 4 (Tabela 5) e os comprimentos de onda de excitação de 260 nm e emissão de 395 nm (descritos no item 5.1.2).

Figura 13 - Cromatograma obtido por HPLC-FD para a solução analítica ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada em acetonitrila.



### 5.1.2 Avaliação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Alguns valores de comprimentos de onda de excitação e emissão foram obtidos na literatura e estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Alguns comprimentos de onda de excitação e emissão encontrados na literatura para os compostos analisados neste trabalho.

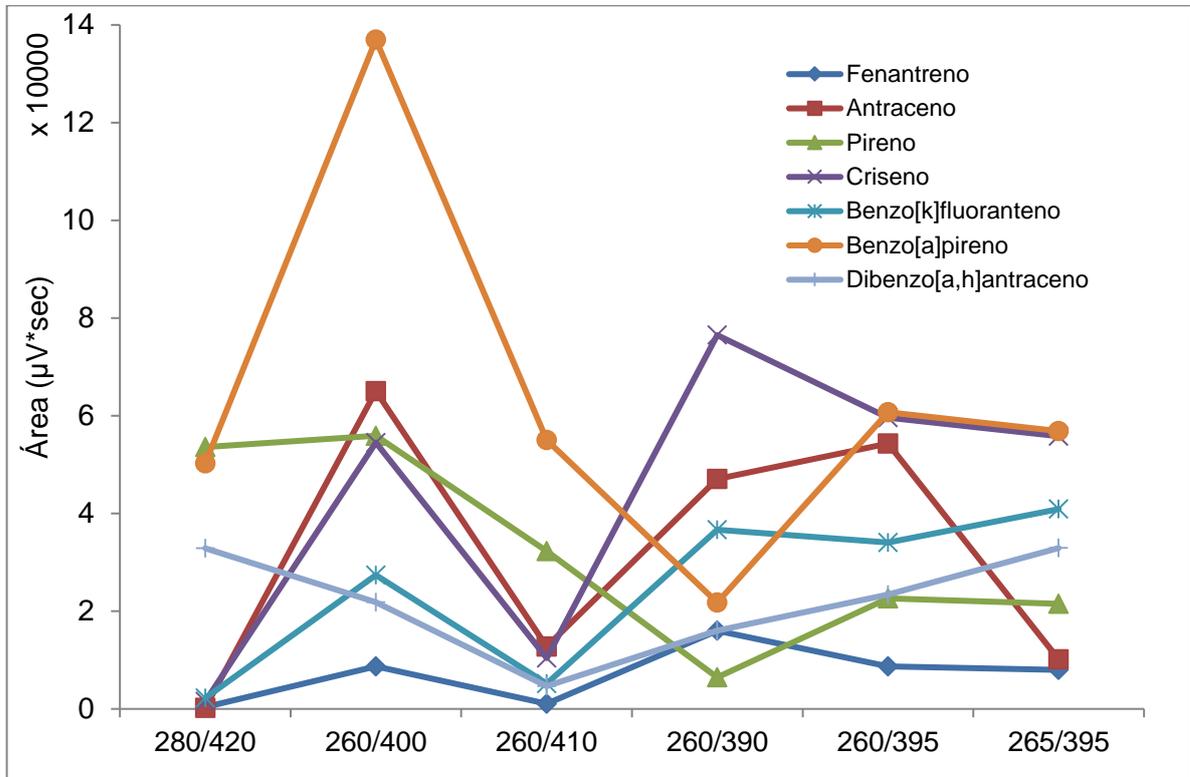
Compostos	Comprimentos de onda de excitação/emissão (nm)				
Fenantreno	250/370	252/365	252/370	265/389	-
Antraceno	250/400	250/402	252/402	265/389	-
Pireno	270/400	332/378	270/390	265/389	-
Criseno	270/390	277/384	270/390	265/389	-
Benzo[k]fluoranteno	290/430	303/432	290/410	-	263/410
Benzo[a]pireno	290/430	280/410	290/410	-	263/410
Dibenzo[ah]antraceno	290/430	294/398	290/410	-	263/410
Referência	LIAUD, MILLET & LE CALVÉ, 2015	LONDOÑO, REYNOSO & RESNIK, 2015	HUANG et al., 2013	FALCIGLIA et al., 2016	GUTIÉRREZ- VALENCIA & DE LLASERA, 2017

Com base nestes valores os comprimentos de onda de 280/420, 260/400, 260/410, 260/390 e 260/395 foram avaliados para análise os 7 HPAs em mexilhão por HPLC-FD.

Utilizando o comprimento de onda de 280/420 nm apenas três compostos apresentaram intensidade de sinal cromatográficos satisfatória. Assim, optou-se por diminuir o valor do comprimento de onda para 260/400, valor mais próximo daqueles que não apresentaram sinal. Neste comprimento de onda obteve-se uma relação de intensidade mais elevada para o composto benzo[a]pireno em relação aos demais compostos. Essa grande diferença na intensidade não é ideal, uma vez que o fenantreno apresentou uma intensidade muito baixa (6,4% do valor de área) quando comparado ao benzo[a]pireno.

Os conjuntos de comprimento de onda de excitação/emissão (260/410, 260/390, 260/395 nm) foram testados (Figura 14). Os comprimentos de onda selecionados foram 260/395 nm, uma vez que todos os compostos avaliados apresentaram intensidades intermediárias de sinal cromatográfico.

Figura 14 - Avaliação da variação do sinal cromatográfico em relação aos diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão testados.



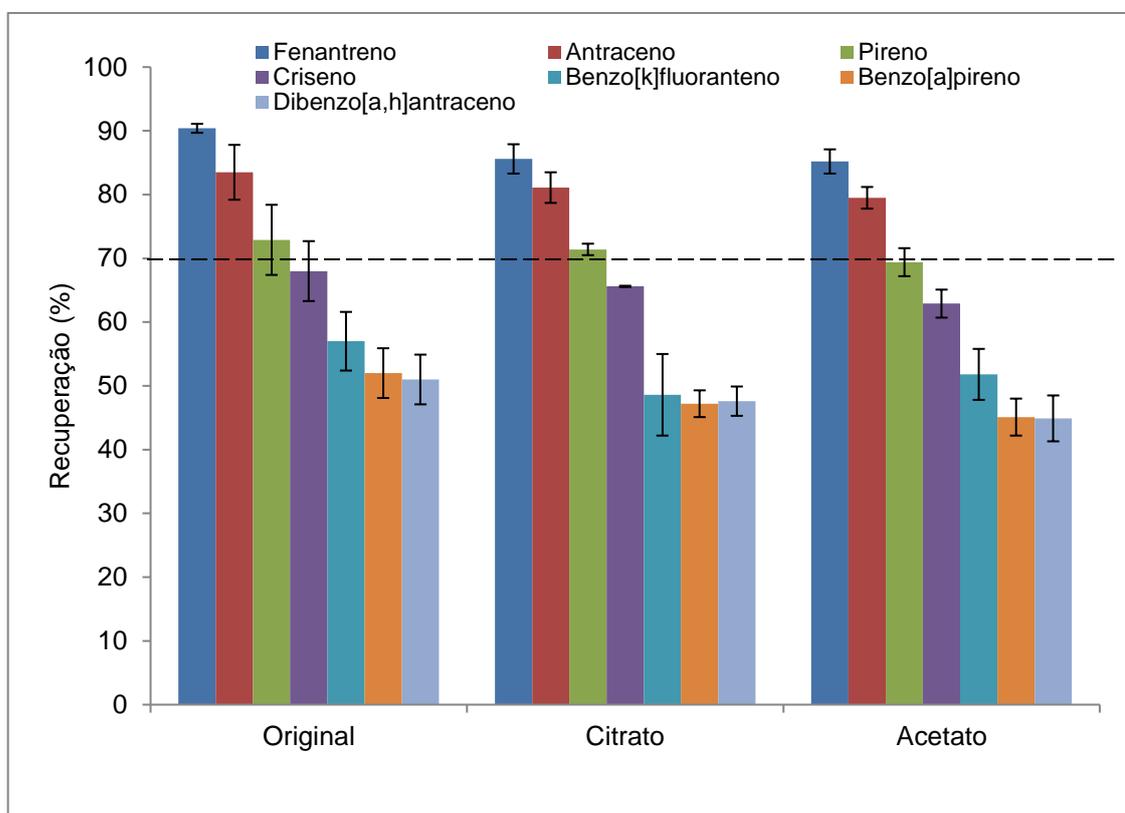
## 5.2 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM MEXILHÃO POR HPLC-FD

### 4.7.1 Procedimento de extração

Inicialmente três versões do método QuEChERS foram avaliadas a fim de verificar qual o procedimento era o mais adequado em termos de recuperação e RSD satisfatórias (70 e 120%, RSD  $\leq$  20%) para os compostos avaliados neste estudo.

Como pode ser visto na Figura 15, ao comparar as três versões do método QuEChERS, observou-se que os resultados das recuperações foram similares entre eles. No entanto, os valores diferem estatisticamente segundo o teste de significância ( $\alpha = 0,05$ ) gerados pela análise de variância (ANOVA), uma vez que o valor de  $p$  foi menor que 0,05.

Figura 15 - Resultados dos percentuais de recuperação e RSD para os 3 métodos QuEChERS (original, acetato e citrato) avaliados durante a etapa de preparo de amostra da determinação de HPAs por HPLC-FD.



Os valores de recuperação nos 3 testes não foram satisfatórios, pois somente os compostos fenantreno e antraceno apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120% com  $RSD \leq 20\%$  para as três modificações do método QuEChERS empregado. O pireno somente foi recuperado quando foram utilizados os métodos QuEChERS original e citrato. Os demais compostos apresentaram valores de recuperação insatisfatórios (abaixo de 70%). Embora, o método QuEChERS original não tenha apresentado valores satisfatórios de recuperação para os compostos (criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno) foi o que apresentou o maior percentual de recuperação (51 a 90%) para todos os compostos, sendo assim este foi o teste escolhido para as etapas subsequentes. Por outro lado os métodos citrato e acetato apresentaram percentuais de recuperação de 48 a 86% e 45 a 85%, respectivamente.

Perdas de analitos podem ter sido ocasionadas por adsorção destes pelo sorvente utilizado na etapa de limpeza do extrato, fornecendo assim baixos teores

de recuperação para a maioria dos compostos (WONGMANEEPRATIP & VANGNAI, 2017).

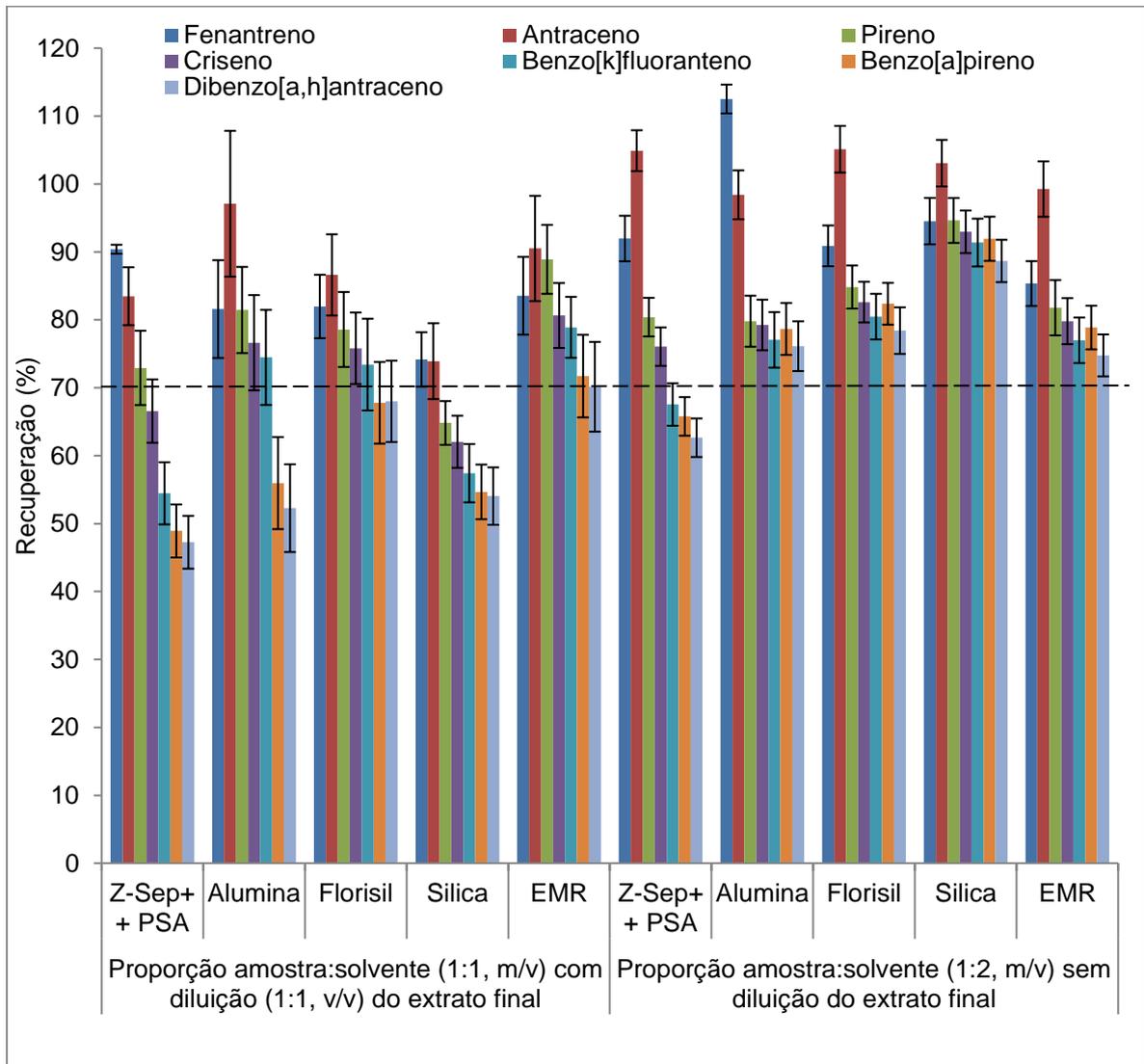
### **5.7.2 Influência da diluição da amostra ou extrato diante de diferentes sorventes**

Os sorventes testados inicialmente, Z-Sep<sup>+</sup> + PSA, não apresentaram valores de recuperação satisfatórios para a maioria dos compostos. Com isso, optou-se por avaliar de forma simultânea diferentes sorventes (sílica, alumina, florisil e EMR-lipid<sup>®</sup>). Além disso, foram realizados ensaios para verificar a influência da diluição da amostra durante a etapa de extração (proporção amostra:solvente) 1:2 e também após as etapas de extração/limpeza ao final do preparo de amostra.

Para o uso do sorvente EMR-lipid<sup>®</sup> é recomendado uma etapa de ativação com água, e posteriormente uma etapa de partição (termo conhecido comercialmente como *polish*). Estas etapas não foram realizadas neste trabalho, uma vez que aumentam o tempo de preparo de amostra. Quanto aos demais sorventes (sílica, alumina e florisil) não foram utilizados tratamentos de ativação. Um estudo também utilizou os mesmos sorventes sem ativação prévia, relatando que quando utilizaram o florisil ativado, não obtiveram recuperações satisfatórias para alguns compostos de massa molecular elevada, especialmente o benzo[a]pireno, uma vez que este sorvente na forma ativada adsorve de forma irreversível estes compostos menos polares (BUCZYŃSKA et al., 2015)

Os valores das recuperações obtidas para a comparação entre os testes de diluição do extrato final em acetonitrila (1:1, v/v) e diluição na etapa de extração (1:2, m/v) empregando em ambos os mesmos sorventes está mostrado na Figura 16.

Figura 16 - Comparação dos percentuais de recuperação e RSD obtidos empregando o método QuEChERS original, diferentes sorventes na etapa de limpeza e diluições diferentes.



De maneira geral, o gráfico apresenta similaridade em todos os testes, em relação percentual de recuperação dos compostos de acordo com a sua polaridade. Pode ser observado uma diminuição no percentual das recuperações de acordo com a diminuição da polaridade dos compostos, exceto para o fenantreno e o antraceno. Portanto, pode-se inferir que quanto mais apolar a característica do composto menor será o seu percentual de recuperação. Este fenômeno também foi observado por MARR, KIRCHSTETTER & HARLEY (1999) em seus experimentos.

RAJSKI et al. (2013) também verificaram a relação entre as propriedades físico-químicas dos seus analitos com os valores de recuperação obtidos, sendo que

aqueles compostos que apresentavam um  $\text{Log } K_{ow} > 4$  apresentaram os menores valores de recuperação.

Ainda, no trabalho de MORRISON et al. (2016), na análise de HPAs em amostras de peixe utilizando o método de extração QuEChERS, é relatado que esta influência pode estar associada à maior interação dos compostos menos polares com a camada adiposa dos indivíduos, sendo que dependendo do solvente utilizado não se obtém uma extração total dos compostos presentes na matriz. No entanto, apesar das recuperações serem menores em tais situações, é possível se obter uma quantificação adequada para a maioria das aplicações de triagem ambiental.

Conforme apresentado na Figura 16, as recuperações utilizando Z-Sep<sup>+</sup> + PSA como sorventes de limpeza do extrato foram consideradas as mais baixas (47 a 90%) em comparação aos demais sorventes, exceto para a sílica no teste com diluição do extrato final (1:1, v/v). A provável explicação para esse fenômeno é que o sorvente Z-Sep<sup>+</sup> retém os analitos de interesse, uma vez que os analitos possuem características apolares e podem ficar retidos no sorvente. RAJSKI et al. (2013) relataram que o uso de PSA e C18 estão relacionados com a diminuição nos percentuais das recuperações dos analitos apolares (pesticidas) quando comparado com os analitos de maior polaridade. C18 e Z-Sep<sup>+</sup> são sorventes utilizados para remoção de coextrativos apolares. Assim, estes podem reter os compostos de interesse. Quando compara-se os percentuais de recuperação nos testes de diluição observa-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando utiliza-se 5 g de amostra e 10 mL de solvente na etapa de extração. Neste teste, obteve-se recuperações satisfatórias (76 a 105%) para 4 compostos (fenantreno, antraceno, criseno e benzo[k]fluoranteno). Já no teste empregando 10 g de amostra e 10 mL de solvente com diluição 1:1 (v/v) do extrato final, obteve-se recuperações aceitáveis (73 a 90%) para 3 compostos (fenantreno, antraceno e criseno). No entanto, a utilização da mistura (Z-Sep<sup>+</sup> + PSA) não é satisfatória em termos de recuperação para os HPAs avaliados nesse estudo. PURCARO et al. (2013) testaram a utilização de Z-Sep<sup>+</sup> em seus experimentos, e também não obtiveram resultados de recuperações satisfatórias (>70%).

Segundo o teste de variância ANOVA, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os valores de recuperação obtidos nos testes utilizando diferentes sorventes e diluição do extrato final (1:1, v/v). No entanto, somente o sorvente EMR-lipid<sup>®</sup> apresentou para todos os compostos percentuais de recuperação na faixa

aceitável (70 a 91%). O sorvente florasil apresentou variação nos percentuais de recuperação de 68 a 87%, com valores satisfatórios para 5 compostos (fenantreno, antraceno, pireno, criseno e benzo[k]fluoranteno). O sorvente alumina também apresentou percentuais de recuperação satisfatórios (52 a 97%) para 5 compostos (pireno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno). Para a combinação Z-Sep<sup>+</sup> + PSA, as variações de recuperação foram de 47 a 90%, sendo que apenas 3 compostos (fenantreno, antraceno e pireno) apresentaram percentuais de recuperações aceitáveis. Quando sílica foi empregada como sorvente obteve-se os percentuais de recuperação mais baixos variando de 54 a 74%. Para este sorvente obteve-se recuperações satisfatórias somente para 2 compostos (fenantreno e antraceno).

Segundo o teste estatístico ANOVA, há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os valores de recuperação obtidos nos testes utilizando diferentes sorventes e diluição na etapa de extração (1:2, m/v). Todos os compostos apresentaram recuperações entre 70 e 120%, exceto a combinação de Z-Sep<sup>+</sup> + PSA que apresentou resultados de recuperação variando de 63 a 105%. Nesta avaliação, 3 compostos (benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno) não apresentaram percentuais de recuperação aceitáveis. Os melhores resultados foram obtidos utilizando sílica como sorvente, uma vez, obteve-se valores de recuperação entre 89 a 103%. Os sorventes florasil, alumina e EMR-lipid<sup>®</sup> também apresentaram boas recuperações, de 78 a 105%, 76 a 113% e 75 a 99%, respectivamente.

Em termos de percentual médio de recuperação, no teste com diluição do extrato final (1:1, v/v) a utilização dos sorventes EMR-lipid<sup>®</sup> (81%), florasil (76%) e alumina (74%), mostraram-se mais eficientes quando comparadas com os valores obtidos para Z-Sep<sup>+</sup> + PSA (66%), e sílica (63%). Para o teste com diluição da amostra na etapa de extração (1:2, m/v) com a utilização de Z-Sep<sup>+</sup> + PSA (78%) obteve-se os menores percentuais de recuperação quando comparado com sílica (94%), florasil (86%), alumina (86%) e EMR-lipid<sup>®</sup> (82%), respectivamente, os quais foram os sorventes que apresentaram os melhores percentuais de recuperação. Em todos os testes os valores de RSD foram  $\leq 11\%$ .

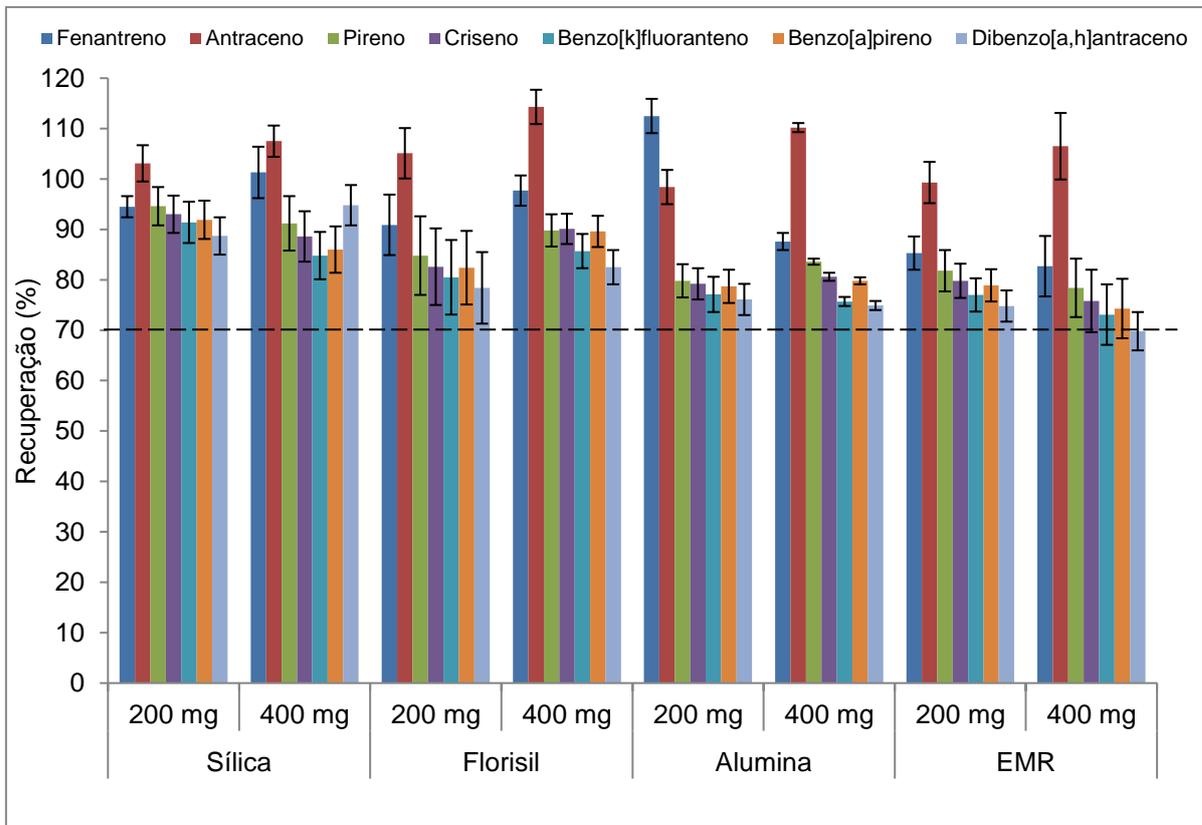
Portanto, os maiores percentuais de recuperações foram obtidos nos testes empregando diluição da amostra na etapa de extração (1:2, m/v). Os sorventes que apresentaram melhores resultados foram sílica, florasil, alumina e EMR-lipid<sup>®</sup>. Diante

disso, os testes seguintes foram realizados com diluição da amostra na etapa de extração (1:2, m/v) e avaliação dos 4 melhores sorventes.

### **5.7.3 Avaliação da quantidade de sorvente empregada na etapa de limpeza por d-SPE**

O critério de escolha da massa de sorvente para as próximas etapas, foi baseado nos percentuais de recuperações do teste utilizando 200 ou 400 mg. Este teste foi realizado a fim de se obter um cromatograma mais limpo visualmente, uma vez que com uma maior quantidade de sorvente se espera uma maior remoção de coextrativos. Na Figura 17 pode ser observado que todos os sorventes apresentaram recuperações na faixa de 73,1 e 114,3% e  $RSD \leq 7,8\%$  para todos os compostos, exeto para o composto bibenzo[a,h]antraceno quando utilizado 400 mg do sorvente EMR (69,8%).

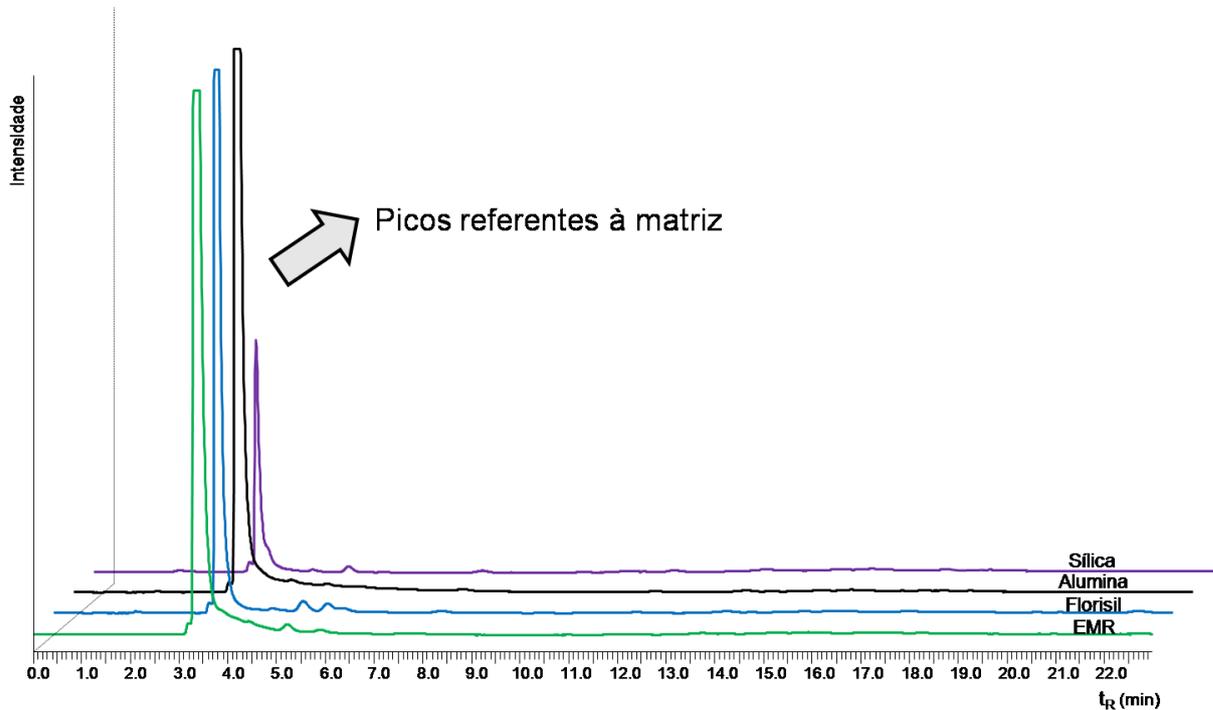
Figura 17 - Recuperação dos testes usando 200 mg ou 400 mg de cada sorvente.



A sílica quando empregada como sorvente não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores de recuperação média para ambos os testes, ou seja, os valores de recuperações são equivalentes utilizando as quantidades de 200 ou 400 mg de sorvente. Logo, a quantidade de 200 mg de sorvente foi escolhida, a fim de minimizar custos desnecessários.

Observou-se também, que a sílica apresentou maior capacidade na retenção de compostos da matriz com características mais polares (como as proteínas) (PURCARO et al., 2013). Visto que o mexilhão apresenta teor de proteínas em torno de 20% (PARISENTI et al., 2008) este sorvente foi eficiente na remoção destes, fornecendo um cromatograma melhor resolvido, com menor intensidade para os picos de coextrativos provenientes da matriz. A Figura 18 mostra a a comparação dos cromatogramas de extrato branco de mexilhão após realização da etapa de limpeza.

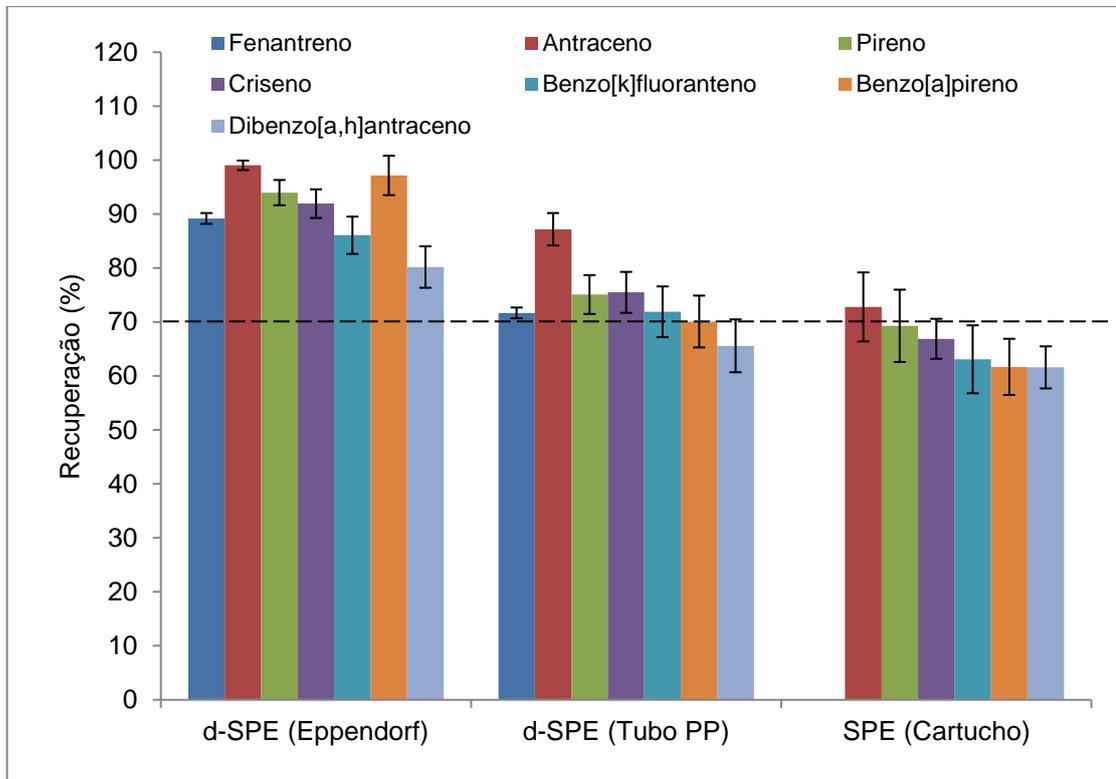
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por HPLC-FD referente a extrato branco de mexilhão após a realização da etapa de d-SPE utilizando 200 mg de cada sorvente e 150 mg de  $MgSO_4$  para 1 mL de extrato.



#### 5.7.4 Comparação entre as técnicas de limpeza d-SPE e SPE

Analisando a Figura 19, observou-se que para a técnica d-SPE realizada em tubos de PP o composto dibenzo[a,h]antraceno não é recuperado de maneira satisfatória (<70%). Os valores de recuperação obtidos para este teste variaram de 65,6 a 89,2%, valores estes inferiores aos obtidos quando se utiliza os tubos de eppendorf (80,2 a 103,1%). Constatou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de recuperação obtidos nestes testes e esta pode ser atribuída à grande diferença na velocidade centrifugação do extrato, sendo que para os tubos de PP utiliza-se centrifuga com rotação de 3500 rpm e para de tubos de eppendorf uma rotação de 10000 rpm. Acredita-se que este fato deve estar ligado a uma maior precipitação de coextrativos. Também, pode-se perceber que uma maior velocidade de centrifugação facilita a retirada do sobrenadante sem a presença de resíduos sólidos no extrato (ODUNTAN et al, 2016).

Figura 19 - Comparação entre as técnicas de limpeza de SPE (cartucho) e d-SPE (com tubos de PP de 15 mL - usando rotação de 3500 rpm e tubos eppendorf de 2 mL - com centrifugação com rotação de 10000 rpm).



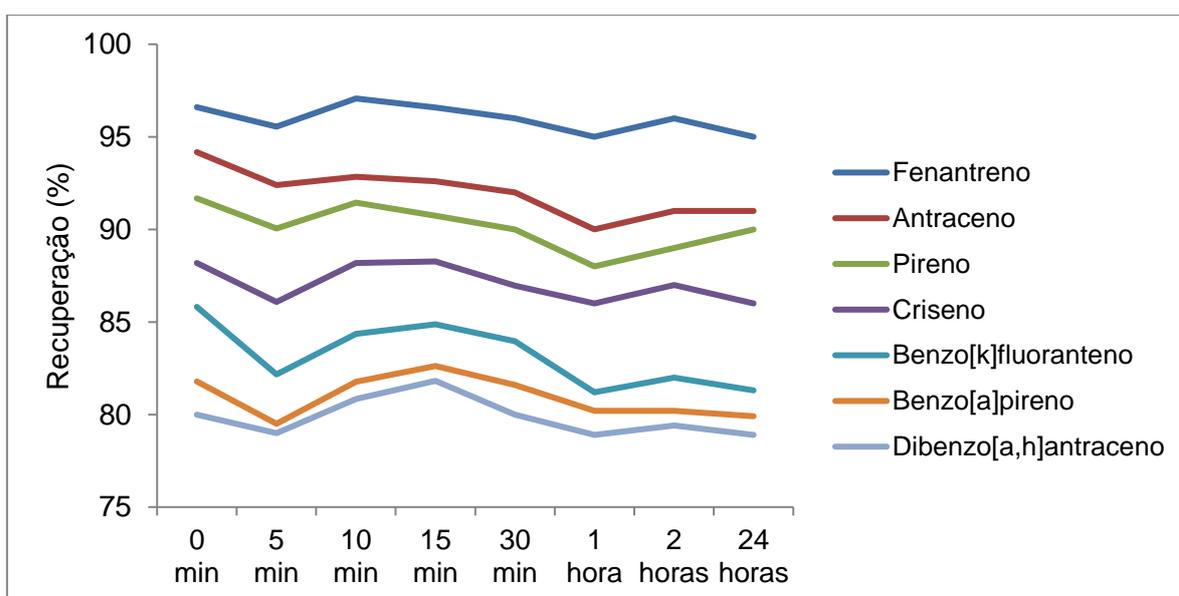
A técnica de SPE, empregando cartuchos com sílica para a limpeza do extrato não apresentou valores de recuperação satisfatórios, uma vez que para esta técnica somente o fenantreno obteve valores de recuperação acima de 70%. WONGMANEEPRATIP & VANGNAI (2017) também obtiveram baixos níveis de recuperação para alguns HPAs, fato este que pode estar ocasionado à perda parcial destes compostos durante o método de extração e procedimento de limpeza usando o cartucho.

Sendo assim, comprovada a influência da velocidade de centrifugação na técnica por d-SPE, optou-se por utilizar na etapa de limpeza tubos de eppendorf contendo 150 mg de  $MgSO_4$  e 200 mg de sílica para 1 mL de extrato.

### 5.7.5 Avaliação do tempo de interação dos compostos com a amostra nos ensaios de fortificação

Como pode ser visto na Figura 20, os resultados de recuperação mantiveram-se constantes, não havendo diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ) e foram satisfatórios para todos os compostos avaliados em todos os tempos de interação estudados. Os valores de recuperação variaram de 79 a 96% e  $RSD \leq 5\%$ . De acordo com os resultados, embora, não seja necessária a interação dos analitos com a amostra por um longo período, optou-se por um tempo de contato de 30 min para assegurar a interação destes com a amostra. Esse tempo não afeta a duração da análise quando comparado a outros trabalhos que utilizam tempo de contato de 24 h (REY-SALGUEIRO et al., 2009). Também, os autores CERQUEIRA, CALDAS & PRIMEL (2014) testaram tempos de interação do padrão com a amostra de 30 min, 48 h e 164 dias. Relataram que os valores de recuperação não apresentaram diferença significativa entre os testes, portanto utilizaram 30 min de interação.

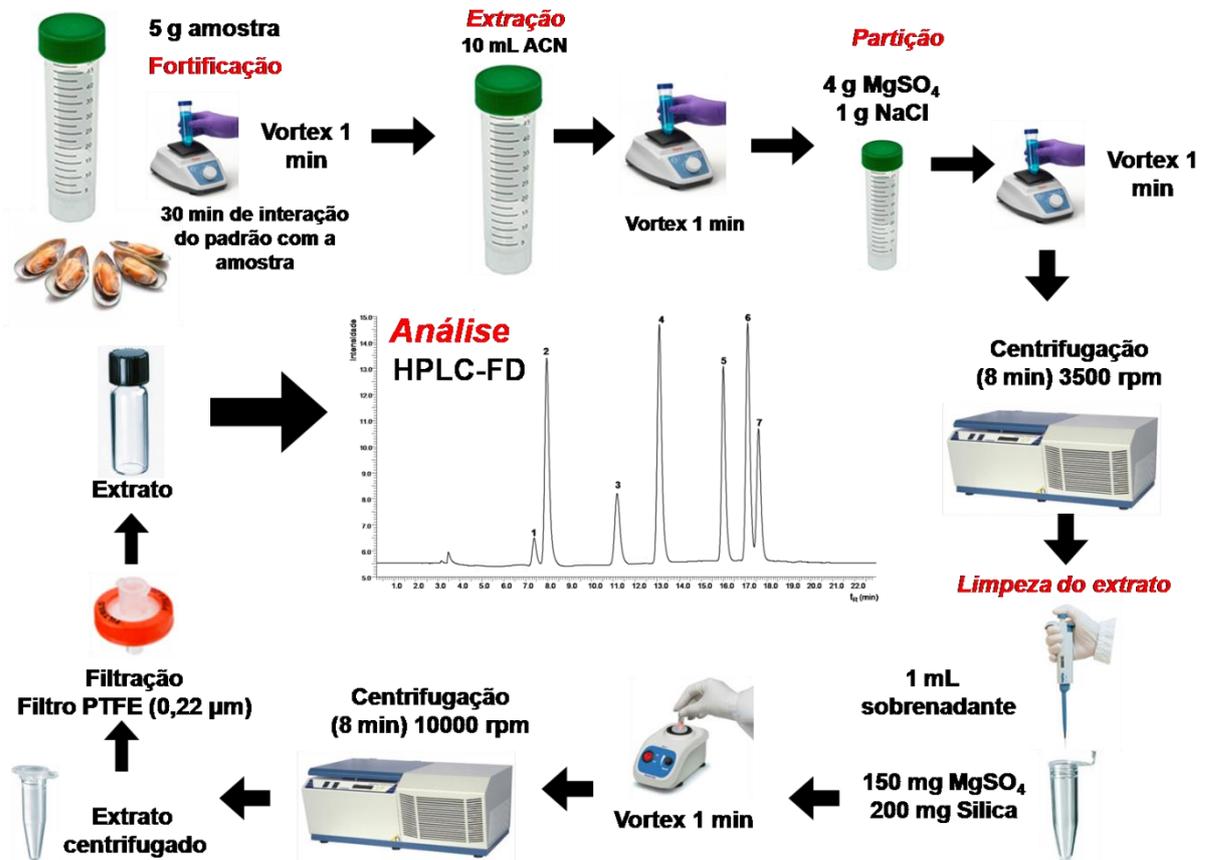
Figura 20 - Resultados de recuperação para os diferentes tempos de interação do padrão com a amostra antes da etapa de extração.



#### 4.7.6 Método validado

O método proposto para a validação consistiu na modificação do método QuEChERS original. Pesou-se 5 g de amostra em tubo de PP de 50 mL. Para os testes de avaliação do percentual de recuperação, a amostra foi fortificada em diferentes níveis de concentração (2, 10 e 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) com uma solução padrão ( $\mu\text{L}$ ) contendo os HPAs avaliados neste estudo e deixou-se interagir com a amostra por 30 min. A etapa de extração foi realizada após a adição de 10 mL de acetonitrila com posterior agitação em vortex por 1 min. Em seguida, para a etapa de partição foram adicionados 4 g de  $\text{MgSO}_4$  e 1 g de  $\text{NaCl}$ . Os tubos foram agitados por 1 min e centrifugados à 3500 rpm por 8 min. Para a etapa de limpeza do extrato, transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de eppendorf contendo 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  e 200 mg de sílica. Este tubo foi agitado por 1 min e centrifugado a 10000 rpm por 8 min. Então, o sobrenadante foi filtrado com um filtro de PTFE (0,22  $\mu\text{m}$ ) e o extrato analisado por HPLC-FD. Este procedimento pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 21 - Fluxograma do procedimento de preparo de amostra realizado para determinação de HPAs em mexilhão.

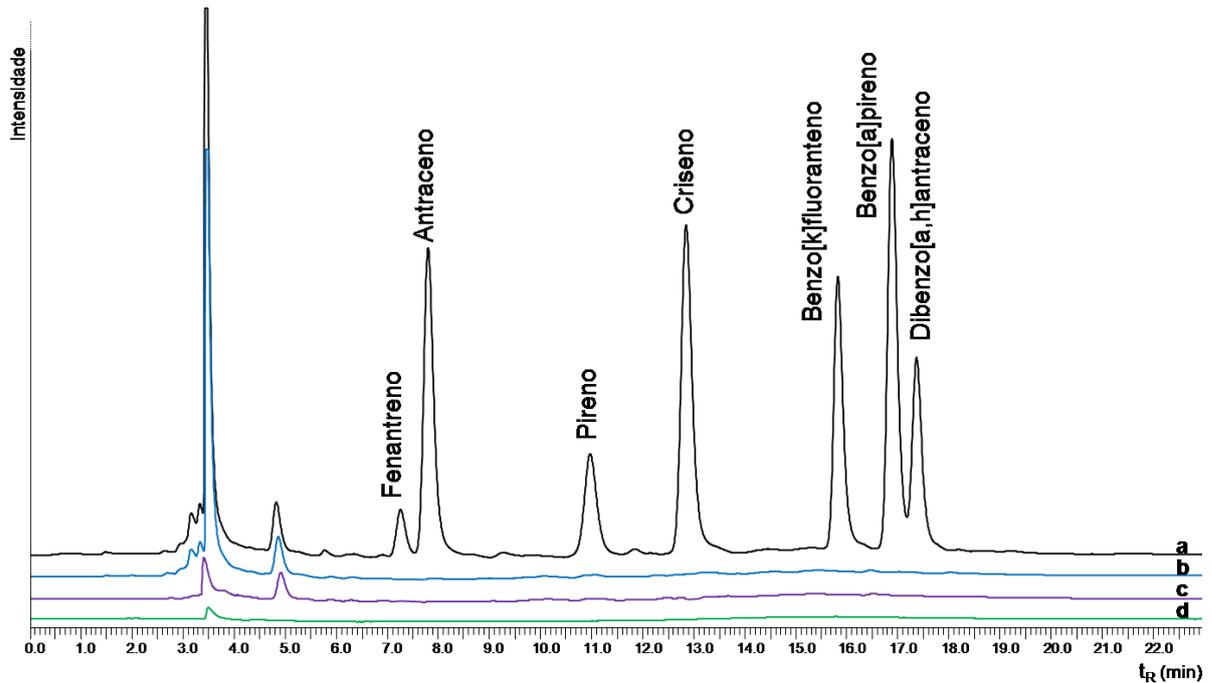


## 5.3 VALIDAÇÃO

### 5.3.1 Seletividade

O método foi considerado seletivo, uma vez que a injeção do extrato proveniente de amostra “branco” não apresentou picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse. Desta forma, a amostra “branco” avaliada foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de exatidão e precisão. Os solventes e reagentes empregados no preparo de amostra também foram avaliados através da realização do procedimento de extração sem a amostra (“branco” reagente). Assim, foi assegurado que os mesmos estavam isentos de contaminantes que poderiam interferir na análise, como pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos por HPLC-FD para amostra branco fortificada no nível  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  (a), amostra branco de mexilhão (b), branco reagente (c) e acetoneitrila (d).

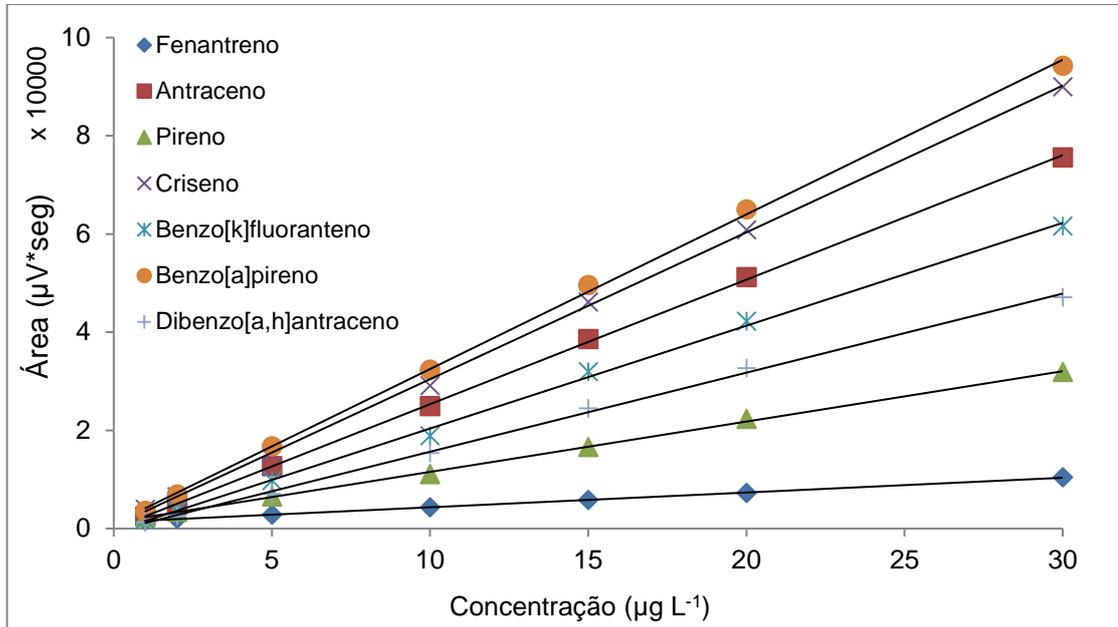


### 5.3.2 Curva analítica, faixa de linear e efeito matriz

A linearidade do método foi assegurada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica nos níveis de concentração de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e  $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , preparada no extrato branco da matriz de mexilhão.

A Figura 23 representa a curva analítica para os 7 HPAs analisados, indicando que o composto benzo[a]pireno é o mais sensível de todos seguido do criseno que apresenta uma resposta similar; antraceno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno e pireno apresentam ordens decrescentes de sensibilidade; sendo que o fenantreno apresenta a menor sensibilidade de todos.

Figura 23 - Curva analítica (1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada no extrato branco de mexilhão obtida por HPLC-FD para os compostos avaliados neste estudo.



Todos os HPAs avaliados apresentaram resposta linear na faixa de 1,0 a 30,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A Tabela 8 apresenta os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das equações das curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz branco de mexilhão, bem como a faixa linear de trabalho, as equações da reta e ainda o efeito matriz para cada composto.

Tabela 8 - Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato branco da matriz, valores de faixa linear, equação do modelo para cada HPA estudado e efeito matriz.

Compostos	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$		Equação da reta Matriz	Efeito matriz (%)
		Solvente	Matriz		
Fenantreno	1,0 - 30,0	0,9992	0,9997	$y = 300,8x + 1319,2$	-8,9
Antraceno	1,0 - 30,0	0,9998	0,9998	$y = 2535,6x - 26,977$	-0,2
Pireno	1,0 - 30,0	0,9997	0,9992	$y = 1025,3x + 1284,6$	-0,7
Criseno	1,0 - 30,0	0,9998	0,9995	$y = 2989,2x + 529,2$	3,7
Benzo[k]fluoranteno	1,0 - 30,0	0,9999	0,9984	$y = 2094x - 569,3$	1,6
Benzo[a]pireno	1,0 - 30,0	0,9995	0,9993	$y = 3149,1x + 993,6$	17,3
Dibenzo[a,h]antraceno	1,0 - 30,0	0,9997	0,9986	$y = 1610,3x - 461,3$	6,4

Através dos dados obtidos pelo modelo de regressão linear, avaliou-se que o modelo é adequado para as determinações analíticas em estudo. Todos os

compostos analisados apresentaram coeficientes de determinação ( $r^2$ ) maiores de 0,9984, portanto este parâmetro enquadra-se nos critérios de aceitação.

Os valores de efeito matriz variaram de -8,9 a 17,3%. Observou-se que para 4 compostos o efeito matriz foi positivo, ou seja, a curva preparada na matriz apresenta uma maior área do que a preparada no solvente, já pra outros 3 compostos o efeito matriz foi negativo, apresentando uma diminuição da área do pico quando preparada no extrato da matriz.

Através deste parâmetro, verifica-se a relação do efeito dos coextrativos da matriz sobre o sinal analítico, podendo aumentar o sinal (efeito positivo) ou diminuir o sinal (efeito negativo). Considera-se que resultados com efeito de matriz superiores a 20% sofram influência da matriz, sendo necessário realizar a construção da curva analítica no extrato da matriz para minimizar o efeito (SANTE, 2015). O composto benzo[a]pireno apresentou um valor de efeito matriz de 17,3%. Desta forma, optou-se em realizar a determinação em uma curva preparada mesmas condições em que a amostra se encontra para apresentar uma maior exatidão.

### **5.3.3 Avaliação da exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)**

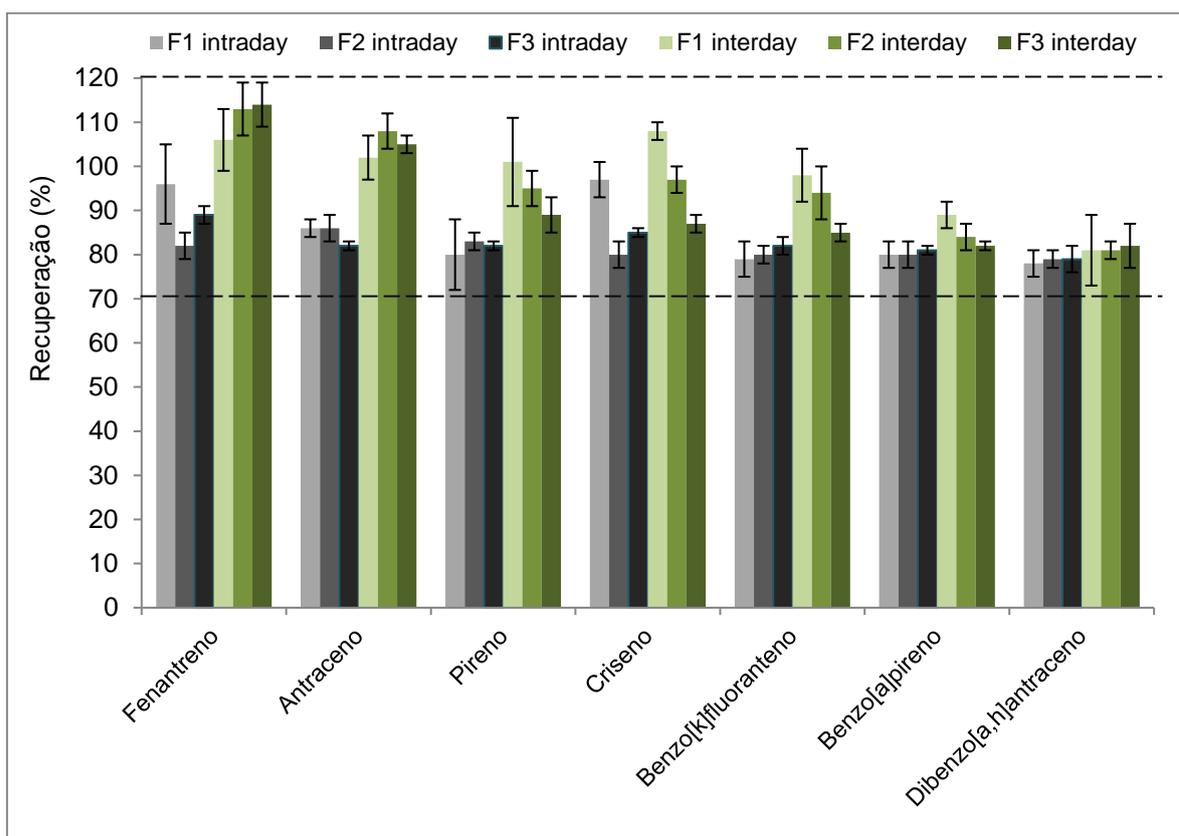
Na Tabela 9 e Figura 24 estão apresentados os valores dos percentuais médios de recuperação ( $n=7$ ) e RSD *intraday* (em termos de repetibilidade) e os valores dos percentuais médios de recuperação ( $n=7$ ) e RSD *interday* (em termos de precisão intermediária). Foram realizados três níveis de fortificação: 2, 10 e 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em mexilhão seguidos de extração empregando o método QuEChERS, sendo que a repetibilidade foi obtida pelo percentual das recuperações dos testes realizados no mesmo dia, e a precisão intermediária em dias diferentes.

O percentual de recuperação foi calculado a partir da curva analítica preparada no extrato da matriz, segundo os critérios de aceitação de recuperação entre 70 - 120% e RSD  $\leq 20\%$ , estabelecidos na SANTE (2015).

Tabela 9 - Resultados de recuperação e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária realizados em níveis de concentração entre 2 e 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Compostos	Repetibilidade			Precisão intermediária		
	Rec. (RSD)% ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )			Rec. (RSD)% ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
	2	10	30	2	10	30
Fenantreno	96 (9)	82 (3)	89 (2)	106 (7)	113 (6)	114 (5)
Antraceno	86 (2)	86 (3)	92 (1)	102 (5)	108 (4)	105 (2)
Pireno	80 (8)	83 (2)	82 (1)	101 (10)	95 (4)	89 (4)
Criseno	97 (4)	80 (3)	85 (1)	108 (2)	97 (3)	87 (2)
Benzo[k]fluoranteno	79 (4)	80 (2)	82 (2)	98 (6)	94 (6)	85 (2)
Benzo[a]pireno	80 (3)	80 (3)	81 (1)	89 (3)	84 (3)	82 (1)
Dibenzo[a,h]antraceno	78 (3)	79 (2)	79 (3)	81 (8)	81 (2)	82 (5)

Figura 24 - Resultados de recuperação e RSD para os ensaios *intraday* (repetibilidade) e *interday* (precisão intermediária) nos níveis de fortificação F1 (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), F2 (10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e F3 (30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).



O método validado forneceu resultados satisfatórios de recuperação e precisão para todos os compostos estudados em todos os níveis de fortificação, com valores de recuperação variando de 78 a 114% e RSD  $\leq 10\%$ .

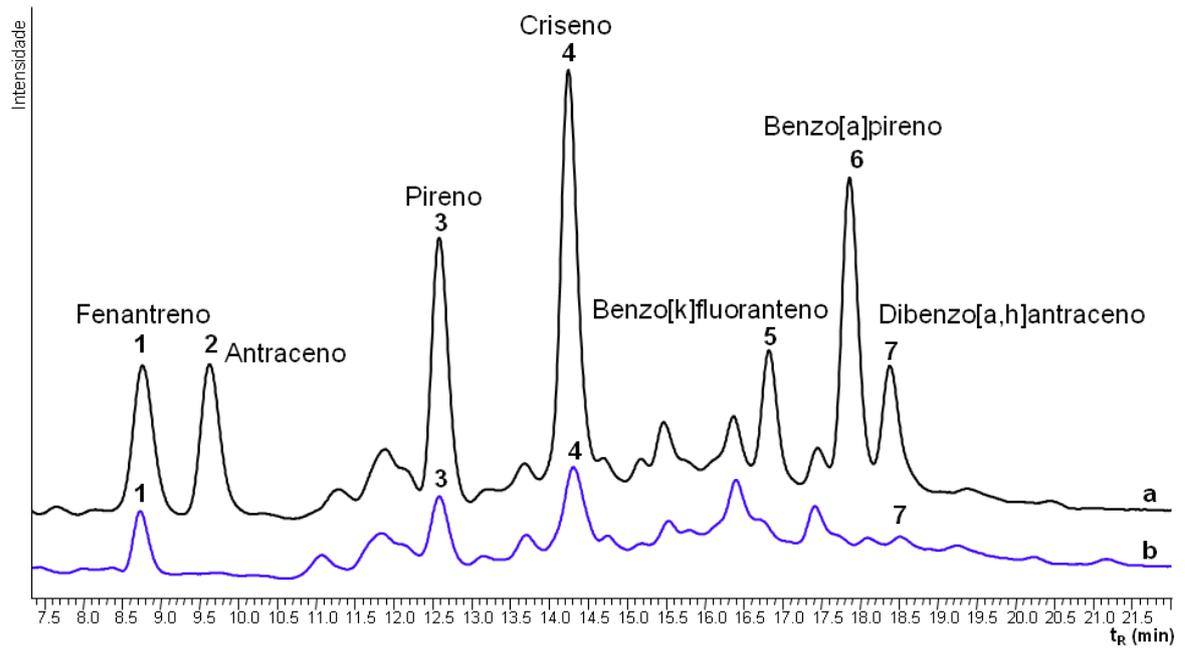
### 5.3.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOQ do método foi  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  e o LOD foi  $0,60 \mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os compostos. Em seu estudo REY-SALGUEIRO et al. (2009) também obtiveram um LOQ de  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  para pireno. Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios para o método desenvolvido e validado, uma vez que o limite máximo para o marcador de HPA (benzo[a]pireno) estabelecido na legislação EC n°835/2011, é de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMOSTRAS DE MEXILHÃO POR HPLC-FD

No total foram analisadas 20 amostras de mexilhão extraídas conforme o procedimento validado. Na Figura 25 está apresentado um cromatograma característico referente a amostra A9 a qual foi positiva para fenantreno, pireno, criseno e dibenzo[a,h]antraceno. Para uma maior confiabilidade da análise, foi realizada uma fortificação no extrato final da amostra no nível de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  com o mix contendo os 7 HPAs, e pôde-se observar o aumento e/ou aparecimento das áreas referentes aos compostos adicionados.

Figura 25 - Cromatograma referente a amostra A9 (a) e amostra A9 com extrato fortificado no nível de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (b).



Os resultados das análises das 20 amostras de mexilhão, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados das análises de HPAs para as 20 amostras de mexilhão analisadas pelo método QuEChERS e HPLC-FD.

<b>Composto/Amostra</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>A9</b>	<b>A10</b>
Fenantreno	15,5	17,3	16,7	17,0	17,5	18,6	16,1	17,8	18,2	16,7
Pireno	3,9	5,4	5,1	5,5	5,5	5,7	4,5	5,1	6,0	5,0
Criseno	6,3	11,0	10,4	10,9	7,9	10,4	10,0	10,4	12,4	9,2
Dibenzo[a,h]antraceno	<LOQ	2,0	<LOQ							
<b>Σ HPAs</b>	<b>25,6</b>	<b>33,7</b>	<b>32,2</b>	<b>33,4</b>	<b>30,9</b>	<b>34,8</b>	<b>30,6</b>	<b>33,3</b>	<b>38,5</b>	<b>30,9</b>
<b>Composto/Amostra</b>	<b>A11</b>	<b>A12</b>	<b>A13</b>	<b>A14</b>	<b>A15</b>	<b>A16</b>	<b>A17</b>	<b>A18</b>	<b>A19</b>	<b>A20</b>
Fenantreno	16,6	17,3	17,5	16,3	16,8	15,4	17,4	16,8	16,3	17,0
Pireno	5,0	5,0	5,0	4,6	5,1	5,1	5,4	5,4	5,0	5,3
Criseno	11,3	10,8	11,0	9,7	11,0	9,4	12,0	11,4	10,1	10,3
Dibenzo[a,h]antraceno	<LOQ									
<b>Σ HPAs</b>	<b>32,9</b>	<b>33,1</b>	<b>33,5</b>	<b>30,6</b>	<b>32,9</b>	<b>29,8</b>	<b>34,9</b>	<b>33,6</b>	<b>31,4</b>	<b>32,7</b>

Legenda: n.d: não detectado; <LOQ: abaixo do LOQ (2,0 µg kg<sup>-1</sup>).

Em todas as 20 amostras de mexilhão analisadas, foram encontrados valores positivos para fenantreno, pireno e criseno, e valores abaixo do LOQ para dibenzo[a,h]antraceno, com exceção da amostra A9 (2,0 µg kg<sup>-1</sup>). Em nenhuma amostra foi detectado antraceno, benzo[k]fluoranteno e benzo[a]pireno.

No geral, a média do somatório da concentração de todos os HPAs encontrados nas amostras foi de 32,4 ± 2,5 µg kg<sup>-1</sup>. Todas as amostras apresentaram resultados com valores similares entre elas, isto pode ser devido à todas pertencerem ao mesmo local, estando sob as mesmas condições ambientais e de poluição local.

Em relação à composição dos HPAs, de acordo com RUIZ et al. (2011) as espécies que possuem 4 anéis aromáticos em sua estrutura são mais abundantes do que as de 6 anéis aromáticos enquanto que as famílias de 3 e 5 anéis aromáticos apresentam valores médios e são as que mais variam em relação ao período de amostragem. O resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com este estudo, pois a maior abundância encontrada foi para 2 compostos com 4 anéis aromáticos (pireno e criseno) e para 1 composto com 3 anéis aromáticos (fenantreno) e 1 composto com 5 anéis aromáticos (benzo[k]fluoranteno). RAMOS et al. (2017), encontraram em amostras de mexilhão, a predominância dos HPAs com 2 a 3 anéis aromáticos em comparação com os de 4 a 6 anéis. Esta é uma indicação de que os organismos assimilam preferencialmente os compostos mais leves ou que houve uma recente contaminação da área por petróleo e/ou seus derivados.

A maioria dos HPAs em ambientes marinhos é originária de fontes pirogênicas ou petrogênicas. Os HPAs pirogênicos são produzidos durante a combustão incompleta de carbono, madeira e combustíveis fósseis. Eles são caracterizados por compostos com quatro ou mais anéis aromáticos. No entanto, HPAs petrogênicos contêm apenas dois ou três anéis aromáticos, que estão associados a derramamentos de óleo bruto e refinado (ZHANG et al., 2016).

Em relação ao somatório de todos os HPAs analisados e encontrados nas amostras, os valores variaram de 25,6 a 38,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Com base em estudos sobre mexilhões selvagens de diferentes áreas da costa atlântica europeia pré e pós-derramamento de petróleo, foi estabelecido que as concentrações de HPAs abaixo de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (peso seco) podem ser consideradas como uma poluição de fundo na região. Por outro lado, valores acima de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  podem estar associados a proximidade de fontes de hidrocarbonetos urbanos ou industriais e acima de 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ser atribuído a um derramamento de óleo nas proximidades (RUIZ et al, 2011).

Para conversão dos resultados de peso integral para peso seco utilizou-se um fator de conversão de 7,4 (YOSHIMINEA & CARREIRA, 2012). Em relação ao somatório de todos os HPAs analisados e encontrados nas amostras avaliadas neste estudo, os valores variaram de 25,6 a 38,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (peso integral), o aplicando o fator de conversão, obtêm-se valores variando de 189,4 a 284,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (peso seco). Todas as amostras apresentaram concentrações acima de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com exceção da amostra A1 que apresentou valor próximo (189,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), ou seja, pode se inferir que as amostras estão contaminadas com HPAs de fontes provenientes de poluição urbana ou industrial local.

A relação entre as concentrações de fenantreno/antraceno pode fornecer informações úteis para distinguir as origens dos HPAs. Estes, são dois isômeros estruturais, sendo o fenantreno o isômero mais estável termodinamicamente. Portanto, resultados da razão fenantreno/antraceno  $> 10$  caracterizam uma poluição petrogênica. Por outro lado, resultados  $< 10$  indicam contaminação por fontes pirolíticas (ZHANG et al., 2016). De acordo com YUNKER et al. (2002), esses índices são possíveis devido às características termodinâmicas dos HPAs e às diferenças no calor de formação desses compostos, distinguindo o isômero mais estável do menos estável, possibilitando assim a diferenciação das fontes.

Em nenhuma das 20 amostras de mexilhão foi detectado o composto antraceno. Sendo o LOD 0,60  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , dividindo os valores de fenantreno

encontrados nas 20 amostras por no mínimo o valor do LOD, esta razão será maior que 10 para todas as amostras. Isto indica que a fonte de HPAs nas amostras de mexilhão pode estar associada às fontes petrogênicas, contaminação esta, que pode ser influenciada por fontes locais de poluição, como por exemplo, refinaria de petróleo, derramamento de óleo, atividades portuárias, e manutenção e tráfego de barcos pesados (BARHOUMI et al, 2016).

Em relação às propriedades físico-químicas dos HPAs, sua solubilidade em água diminui com o aumento de suas massas moleculares. De fato, as maiores concentrações relativas aos HPAs com menores  $K_{ow}$  (<5,0), como o fenantreno, naftaleno, antraceno, fluoranteno e pireno (SANTOS et al, 2017) são resultados da maior solubilidade em água e maior biodisponibilidade em comparação com os HPAs com maior massa molecular e maior  $K_{ow}$  (>5,0) (BARHOUMI et al, 2016). Sabe-se que a biodisponibilidade dos HPAs também pode depender da origem do composto, por exemplo, a baixa disponibilidade de HPAs pirolíticos em águas de superfície e subterrâneas (SANTOS et al, 2017), pode estar associada à sua forte ligação às partículas, especialmente em partículas de fuligem formadas durante a pirólise da matéria orgânica e também por adsorção destes compostos em sedimentos marinhos (ZHANG et al, 2016). Assim, os hidrocarbonetos petrogênicos tendem a ser acumulados em níveis mais elevados pelos organismos vivos do que os hidrocarbonetos pirolíticos (BAUMARD, BUDZINSKI & GARRIGUES, 1998).

A concentração total dos HPAs encontrados nestas amostras, pode ser intangível quanto à possibilidade de causar efeitos negativos ao consumidor. No entanto, para fins de confirmação desta afirmação deve-se levar em consideração uma avaliação da toxicidade destes compostos no organismo e é de suma importância a realização de monitoramento desses compostos para garantir a segurança dos alimentos e a saúde da população.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se o desempenho de três versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) e efeito de diferentes sorventes (PSA, Z-Sep<sup>+</sup>, sílica, alumina, florisil e EMR-lipid<sup>®</sup>) na determinação de sete HPAs em amostras de mexilhão por HPLC-FD. O procedimento de extração proposto está baseado no método QuEChERS original e empregou sílica na etapa de limpeza por d-SPE. Os resultados da etapa de validação apresentam limites de detecção e de quantificação do método entre 0,6 e 2,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , destaca-se a alta seletividade e detectabilidade do método, quando realizadas as determinações por HPLC-FD. Salienta-se que estes limites estão abaixo daqueles adotados internacionalmente no controle de HPAs em mexilhão (5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para benzo[a]pireno). As curvas analíticas preparadas no extrato branco da matriz apresentaram linearidade entre 1,0 a 2 e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com valores de  $r^2$  maiores que 0,9984 para todos os compostos. O método apresentou exatidão e precisão adequada, com recuperações entre 78 e 117% e com valores de  $\text{RSD} \leq 10\%$ , bem como boa robustez quando aplicado, na extração e determinação de HPAs em amostras mexilhão. Foi possível a identificação e quantificação de fenantreno, pireno e criseno (em todas 20 amostras avaliadas) e dibenzo[a,h]antraceno (em 1 amostra) em concentrações  $\geq \text{LOQ}$  (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). O somatório da concentração média dos HPAs presentes em cada uma das 20 amostras analisadas foi de  $32,4 \pm 2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O método desenvolvido pode ser utilizado para o monitoramento de HPAs em amostras de mexilhão gerando dados que possam contribuir para que as agências reguladoras desenvolvam uma legislação específica para estes compostos no Brasil. Sendo assim, o método proposto mostrou-se adequado para a determinação de HPAs em mexilhão, uma vez que os objetivos traçados foram alcançados. Ainda, podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos critérios exigidos para o desenvolvimento de métodos cromatográficos.

## **7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Todos os resíduos de líquidos (resíduos halogenados e não-halogenados) e sólidos gerados durante a realização desse trabalho foram devidamente identificados, separados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. A partir daí estes são encaminhados para uma empresa terceirizada especializada na coleta e destinação final de resíduos químicos.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aumento do número de HPAs a serem analisados em mexilhão por HPLC-FD;
- Comparação dos resultados deste trabalho com outra técnica cromatográfica, como por exemplo GC-MS/MS;
- Expandir o escopo para aplicação em outras matrizes, como por exemplo, ostras, peixes, carnes.

## REFERÊNCIAS

- ALBINET, A.; TOMAZ, S.; LESTREMAU, F. A really quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) extraction procedure for the analysis of particle-bound PAHs in ambient air and emission samples. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 31–38, 2013.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELENB.; STAJNBAHER D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 439, 2007.
- ANGIONI, A.; PORCU, L.; SECCI, M.; ADDIS, P. QuEChERS method for the determination of PAH compounds in Sardinia Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*) Roe, using gas chromatography ITMS-MS analysis. **Food Anal. Methods**, v. 5, p. 1131– 1136, 2012.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.
- AVAGYAN, R.; WESTERHOLM, R. Target and suspect screening of OH-PAHs in air particulates using liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 165, p. 702–708, 2017.
- BALCIOĞLU, E. B. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) of Prince Islands, Marmara Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, p. 640–642, 2016.
- BARHOUMI, B.; EL MEGDICHE, Y.; CLÉRANDEAU, C.; BEN AMEURA, W.; MEKNI, S.; BOUABDALLAH, S.; DEROUICHE, A.; TOUIL, S.; CACHOT, J.; RIDHA DRISS, M. R. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and eel (*Anguilla anguilla*) from Bizerte lagoon, Tunisia, and associated human health risk assessment. **Continental Shelf Research**, v. 124, p. 104-116, 2016.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P. PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. **Mar. Pollut. Bull.** 36, 577–586, 1998.
- BERG, B. E.; LUND, H. S.; KRINGSTAD, A.; KVERNHEIM, A. L. Routine analysis of hydrocarbons, PCB and PAH in marine sediments using supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **Chemosphere**, v. 38, n. 3, p. 587-599, 1999.

BIACHEA, B. C.; LORGEOUX, C.; SAADAD, A.; COLOMBANOD, S.; FAUREA, P. Fast method to quantify PAHs in contaminated soils by direct thermodesorption using analytical pyrolysis. **Talanta**, v. 166, p. 241–248, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria MS n.º 518/2004, de 25 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005.

BUCZYŃSKA, A. J.; GEYPENS, B.; GRIEKEN, R. V.; DEWAEEL, K. Optimization of sample clean-up for the GC–C-IRMS and GC–IT-MS analyses of PAHs from air particulate matter. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 83–92, 2015.

CAI, S. S.; STEVENS, J.; SYAGE, J. A. Ultra high performance liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters. **J. Chromatogr. A**, v. 1227, p. 138–144, 2012.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 67, n.1, p. 1-27, 2008. ISSN 0073-9855.

CASTRO, D. N. B. **Estudo em modelo físico 1D e 3D de remediação eletrocinética com uso de surfactante em solo argiloso contaminado com óleo cru**. 2010. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CEE - COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPEIA. Regulamento (CEE) nº 315/93 do Conselho, de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial* nº L 037 de 13/02/1993 p. 0001 - 0003.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 10–22, 2014.

CLOUTIER, P.; FORTIN, F.; GROLEAU, P. E.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; DESROSIERS, M. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDE and PCDD/Fs in biological samples. **Talanta**, v. 165, p. 332–338, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.  
CORDEIRO, D.; LOPES, T.G.G.; OETTERER, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J.A. Qualidade do mexilhão Perna perna submetido ao processo de cocção, congelamento e armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25(1), p. 165-179, 2007.

DANYI, S.; BROSE, F.; BRASSEUR, C.; SCHNEIDER, Y.; LARONDELLE, Y.; PUSSEMIER, L.; ROBBENS, J.; DE SAEGER, S.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; SCIPPO, M. Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 293–299, 2009.

EC - EUROPEAN COMMISSION REGULATION 208/2005 amending regulation (EC) n. 466/2001 As regards PAHs. Off J Eur Union, 4 de fevereiro 2005. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L>:

EC - EUROPEAN COMMISSION REGULATION 835/2011 de 19 / AUG/ 2011. Amending Regulation (EC) n.1881/2006 as regards maximum levels for PAHs in food stuffs. Jornal Oficial da União Europeia, de 19 de Agosto de 2011. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0835&from=PT>

EC - EUROPEAN COMMISSION. SCF - Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 4 December 2002.

EFSA - European Food Safety Authority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2007-136) Adopted on 9 June 2008. The EFSA Journal 724, 1-114, 2008.  
FALCIGLIA, P. P., DE GUIDI, G., CATALFO, A., VAGLIASINDI, F. G. A. Remediation of soils contaminated with PAHs and nitro-PAHs using microwave irradiation. **Chemical Engineering Journal**, v. 296, p.162–172, 2016.

Emaze. Disponível em: <https://www.emaze.com/@AFCCCLL/UPLC>. Acessado em 25/06/17.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CX/CF 08/2/9) (2008). Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on contaminants in foods, second session. disponível em: [http://www.slv.se/upload/livstecknet/dokument/faktabank/livsmedelsteknik/CA\\_CodeOfPractice\\_PAH.pdf](http://www.slv.se/upload/livstecknet/dokument/faktabank/livsmedelsteknik/CA_CodeOfPractice_PAH.pdf). Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

FARRINGTON, J. W. Bivalves as sentinels of coastal chemical pollution: The Mussel (and Oyster) **Watch**. **Oceanus**, v. 26, n. 2, p. 18-29, 1983.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; JUNIOR, C. A. C.; NEPOMUCENO, A.; JÚNIOR, M.; MANO, S. B.; SÃO CLEMENTE, S. C. Trace metal contamination in mussel *Perna perna* from Brazilian coast. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 6, p. 1012-1020, 2013.

FONTES, K. T. **Estudo sobre a concentração e tipologia de HPAs em esponja marinha (*Hymeniacidon heliophila*) e comparação com a acumulação em *Perna perna***. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 165 f., 2011.

FURLAN, E. F.; GALVÃO, J. A.; SALÁN, E. O.; OETTERER, M. Composição centesimal e valor calórico de mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 37(1), p. 85 – 93, 2011.

GUTIÉRREZ-VALENCIA, T. M., DE LLASERA, M. P. G. On-line MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues. **Food Chemistry**, v. 223, p. 82–88, 2017.

HANA, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17–29, 2016.

HUANG, Y., SONG, J. W. J., CHEN, M., LUO, Y. Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors. **Chemosphere**, v. 92, p. 1010–1016, 2013.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, v.35. Lyon, France. 1985.

IARC (International Agency for Research on Cancer), 2002. Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification. 3 May 2002 .

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, ver. 4, 2011.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, 29 (1): 7 - 24, 2007.

KAO, T. H.; CHEN, S.; HUANG, C. W.; CHEN, C. J.; CHEN, B. H. Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan, **Food Chem. Toxicol.** v. 71, p. 149–158, 2014.

LAI, J. F.; FRANKE, A. A. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. **Journal of Chromatography B**, 931, p. 23–41, 2013.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, Ed. RiMa, 4ª Ed, 2004.

LATIMER, J. S.; ZHENG, J., 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: PAHs: An ecotoxicological perspective. **John Wiley & Sons**, Ltd. ISBN: 0-471-56024-3. P 9-33 389.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, J. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LIAUD, C., MILLET, M., LE CALVÉ, S. An analytical method coupling accelerated solvent extraction and HPLC-fluorescence for the quantification of particle-bound PAHs in indoor air sampled with a 3-stages cascade impactor. **Talanta**, v. 131, p. 386–394, 2015.

LIGUORI, L.; HEGGSTAD, K.; HOVE, H. H.; JULSHAMN, K. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 181-188, 2006.

LONDOÑO, V. A. G., REYNOSO, C. M., RESNIK, S. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. **Food Control**, v. 50, p. 31-37, 2015.

LOURENÇO, D. S. F. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HPLC-FD para determinação dos metabolitos de PAHS em cefalópodes**. Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2013.

MADUREIRA, T. V.; VELHOTE, S.; SANTOS, C.; CRUZEIRO, C.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. A step forward using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry – levels of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and commercial mussels, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* v. 21, p. 6089–6098, 2014.

MARR, L.C.; KIRCHSTETTER, T.W.; HARLEY, R.A. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions, **Environ. Sci. Technol**, v. 33, p. 3091–3099, 1999.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, n. 11, v. 2, p. 188-201, 2007.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. **Talanta**, v. 128, p. 299–304, 2014.

MORRISON, S. A.; SIEVE, K. K.; RATAJCZAK, R. E.; BRINGOLF, R. B.; BELDEN, J. B. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 16–22, 2016.

NEFF, J.M. Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water. Coastal Resources and Environmental Management Duxbury, Massachusetts USA. 2001.

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

NWAICHIA, E. O.; NTORGBO, S.A. Assessment of PAHs levels in some fish and seafood from different coastal waters in the Niger Delta. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 167-172, 2016.

ODUNTAN, A. O. O.; TAVENGWA, N. T.; CUKROWSKA, E.; MHLANGA, S. D.; CHIMUKA, L. QuEChERS method development for bio-monitoring of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in south african carp fish using HPLC-fluorescence: an initial assessment. **S. Afr. J. Chem.**, v. 69, p 98-104, 2016.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V.L.C.G.; FACCIN, G.L. Composição centesimal de mexilhões Perna perna, crus e cozidos, coletados em diferentes estações do ano na cidade de Florianópolis/SC. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22(159), p. 84-88, 2008.

Pharma, 2009. Disponível em: <http://pfarma.com.br/farmacutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia.html>. Acessado em: 06/05/17.

PENSADO, L.; CASAIS, M.C.; MEJUTO, M.C.; CELA, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 103-109, 2005.

PERUGINI, M.; VISCIANO, P.; MANERA, M.; TURNO, G.; LUCISANO, A.; AMORENA, M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Organisms from the Gulf of Naples, Tyrrhenian Sea. **J. Agric. Food Chem**, v. 55, p. 2049–2054, 2007.

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

PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6303-6326, 2010.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science*, v. 81, p. 275–280, 2009.

PURCARO, G.; PICARDO, M.; BARP, L.; MORET, S.; CONTE, L. S. Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 166–171, 2013.

RAJSKI, Ł.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBAA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chromatogr. A**, v. 1304, p. 109–120, 2013.

RAMALHOSA, M. J.; PAÍGA, P.; MORAIS, S.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3529–3538, 2009.

RAMOS, A. B. A.; FARIAS, C. O.; HAMACHER, C.; ARAÚJO, M. Assessment of PAHs occurrence and distribution in brown mussels (*Perna perna* Linnaeus 1758) subject to different levels of contamination in Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rsma.2017.05.005>

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO<sub>2</sub>-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 217, p. 225–233, 2017.

REY-SALGUEIRO, L.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; CID, A.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of kinetic bioconcentration in mussels after short term exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Heliyon* 3 (2017) e00231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00231>

REY-SALGUEIRO, L.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J.; Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. **Food Research International**, v. 45, p. 983–988, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RUIZ, Y.; SUAREZ, P.; ALONSO, A.; LONGO, VILLAVARDE, A.; SAN JUAN, F. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 250–265, 2011.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document n° sante/11945/2015**, 30 de novembro de 2015.

SANTIAGO, I. U.; MOLISANI, M. M.; NUDI, A. H.; SCOFIELD, A. L.; WAGENER, A. L. R.; FILHO, A. M. L. Hydrocarbons and trace metals in mussels in the Macaé coast:

Preliminary assessment for a coastal zone under influence of offshore oil field exploration in southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 103, p. 349–353, 2016.

SANTOS, L. O.; ANJOS, J. P.; FERREIRA S. L. C.; ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of PAHS, nitro-PAHS and quinones in surface and groundwater samples using SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v.133 p. 431–440, 2017.

SANTOS, M. M.; BREHM, T. A.; FILIPPE, T. C.; REICHERT, G.; AZEVEDO, J. C. R. PAHs diagnostic ratios for the distinction of petrogenic and pirogenic sources: applicability in the Upper Iguassu Watershed - Parana, Brazil. **Brazilian Journal of Water Resources**, v. 22, e9, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/2318-0331.011716084>

Segundo Ano Biologia, 2013. Disponível em: <http://segundoanobiologia.blogspot.com.br/2013/09/>. Acessado em 06/06/17.

SERPE, F. P.; ESPOSITO, M.; GALLO, P.; SERPE, L. Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. **Food Chemistry**, v.122, p. 920–925, 2010.

SILVA, C. G. A. **Desenvolvimento de fases estacionárias C18 termicamente imobilizadas sobre sílica e sílicas metalizadas e suas caracterizações química, físicas e cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia com fluido supercrítico (CFS)**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2013.

SU, P.; LV, B.; TOMY, G. T.; XU, J.; TIAN, W.; HOU, C.; YIN, F.; LI, Y.; FENG, D. Occurrences, composition profiles and source identifications of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in ship ballast sediments. **Chemosphere**, v. 168, p. 1422-1429, 2017.

SUESS, M.J. The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. **The Science of Total Environment**, v. 6, p. 239-250, 1976.

PubChem - Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em 13 de maio de 2017.

USEPA - United States Environmental Protection Agency – Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum. Washington, DC, EPA/630/P-03/001F, 2005.

VIEIRA, R. Y. **Avaliação regional da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na região costeira do sudeste do Brasil usando mexilhões (*Perna perna* Linneaus 1758) como biomonitorios**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de oceanografia, 2012.

WENZL, T.; SIMON, R.; KLEINER, J.; ANKLAM, E. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 7, 2006.

WONGMANEEPRA TIP, W.; VANGNAI, K. Effects of oil types and pH on carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled chicken. **Food Control**, v. 79, p. 119-125, 2017.

YOO, M.; LEE, S.; KIM, S.; KIM, S.; SEO, H.; SHIN, D. A comparative study of the analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, **Int. J. Food Sci. Technol.** v. 49, p. 1480–1489, 2014.

YOSHIMINE, R. V.; CARREIRA, R. S.; SCOFIELD, A. L.; WAGENER, A. L. R. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels (*Perna perna* Linnaeus 1758). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2581–2587, 2012.

YOSHIMINEA, R. V.; CARREIRA, R. S. PAHs in Cultured Mussels *Perna perna* from a Southeastern Brazilian Bay. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 8, p.1429-1436, 2012.

YUNKER, M. B.; MACDONALD, R. W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, R. H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 4, p. 489-515, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00002-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)

ZHANG, A.; ZHAO, S.; WANG, L.; YANG, X.; ZHAO, Q.; FAN, J.; YUAN, X. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater and sediments from the northern Liaodong Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, p. 592–599, 2016.

ZHAO, X.; WU, S.; GONG, G.; LI, G.; ZHUANG, L. TBHQ and peanut skin inhibit accumulation of PAHs and oxygenated PAHs in peanuts during frying. **Food Control**, v. 75, p. 99-107, 2017.

ZHOU, Q.; LIU, B.; CHEN, Y.; HAN, X.; WE, X.; ZHU, Y.; ZHOU, X.; CHEN, J. Characterization of PAHs in size-fractionated submicron atmospheric particles and their association with the intracellular oxidative stress. **Chemosphere**, v. 182, p. 1-7, 2017.