



Livia Araujo Lorêdo

**Derrame de óleo e saúde humana-Metabólitos
de HPAs em urina como traçadores de
exposição utilizando espectrometria de
massas TANDEM**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Dr. Carlos German
Massone

Rio de Janeiro

Abril de 2023



Livia Araujo Lorêdo

**Derrame de óleo e saúde humana-Metabólitos
de HPAs em urina como traçadores de
exposição utilizando espectrometria de
massas TANDEM**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
PósGraduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Carlos German Massone

Orientador

Departamento de Química-PUC-Rio

Dr. Ricardo Queiroz Aucélio

Departamento de Química-PUC-Rio

Dra. Ana Cecília Rizzatti de Albergaria Barbosa

Instituto de Geociências - UFBA

Dra. Adriana Gioda

Departamento de Química-PUC-Rio

Rio de Janeiro, 24 de abril de 2023

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da autora, do orientador e da universidade.

Livia Araujo Lorêdo

Graduou-se como Licenciada em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro em 2021.

Ficha catalográfica

Lorêdo, Livia Araujo

Derrame de óleo e saúde humana-Metabólitos de HPAs em urina como traçadores de exposição utilizando espectrometria de massas TANDEM / Livia Araujo Lorêdo ; orientador: Carlos German Massone. – 2023.

80 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2023.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Urina humana. 4. Metabólitos de HPA. 5. HPLC-MS/MS. I. Massone, Carlos German. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Agradecimentos

Primeiro gostaria de agradecer à minha família: minhas irmãs Isabel e Beatriz, minha mãe Andréa, meu padrasto Adilson e meu marido André. Cuidaram do meu bem maior enquanto eu não podia e aguentaram tormentas temperamentais. Com certeza vocês foram os agentes principais para que eu pudesse concluir o mestrado.

Ao meu orientador, Carlos Massone que desde o início percebeu que precisava ser a calma na minha vida. Obrigada pelos ensinamentos, pelas risadas e pelos conselhos. Agradeço a compreensão da minha condição de mãe mesmo antes da sua bebê chegar, significou muito para mim.

Às amigas que fiz no início dessa jornada: Kamila, Dayanne e Carolina que deixaram tudo mais leve, mesmo que isso significasse apenas reclamar de absolutamente tudo e todos, obrigada que em diversos momentos vocês reorganizaram meus pensamentos e acolheram meus sentimentos.

Aos meus amigos de longa data: Ian e Larissa, que também estão finalizando mestrado e mesmo à distância, estavam sempre comigo na maioria das vezes reclamando tanto quanto eu. Natália pelo carinho e companhia sempre que era possível. Ao Kylder, pela amizade desde o ensino médio e por aturar minhas reclamações. Ao Jorge, que desde a graduação me ajuda a ser uma estudante melhor e me agracia com sua inteligência fora do comum.

Ao pessoal do CENPES, mas especialmente à Liliane e a Mara que com sacrifícios pessoais se desdobraram para me ajudar e desde o início me auxiliaram em tudo, construindo minha confiança em trabalhar na bancada.

Ao pessoal do LabMAM, especialmente a Franciele e Beatriz pela ajuda incondicional e risadas no almoço. Obrigada por me aturarem perguntando onde estava tudo no laboratório e nesse meio tempo ainda conseguiam me aconselhar. Sem vocês eu não teria conseguido terminar.

Um agradecimento especial à professora Rita de Cássia, coordenadora do projeto que possibilitou a realização deste trabalho e aos demais participantes que fizeram parte de todo o processo, desde a entrevista até a coleta de amostras. Agradecer também à professora Ana Cecília que não somente fez parte da banca avaliadora, mas também me disponibilizou seu tempo a me ajudar a aperfeiçoar este trabalho.

Ao pessoal da PUC: Rodrigo, Diogo e Leonny que quando eu achei eu não teria como realizar as análises, prontamente dispuseram equipamentos para que minha pesquisa fosse feita, vocês foram essenciais.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da PUC-Rio pelos ensinamentos e ajuda.

À CNPq, e PUC-Rio pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Lorêdo, Livia Araujo; Massone, Carlos German. **Derrame de óleo e saúde humana-Metabólitos de HPAs em urina como traçadores de exposição utilizando espectrometria de massas TANDEM.** Rio de Janeiro, 20023. 80p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Um grande vazamento de óleo bruto ocorreu na costa brasileira em 2019 afetando uma extensão de 4.334 km de faixa litorânea, 11 estados e várias localidades. Com isso, moradores locais entraram em contato direto com óleo cru ficando expostos à contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPA são compostos orgânicos carcinogênicos de origem petrogênica e pirogênica, que são ubíquos e persistentes. Quando seres humanos são expostos a esses contaminantes, o organismo pode metabolizar e gerar metabólitos desses HPA com prováveis efeitos negativos à saúde humana. Com isso, este trabalho visou analisar a exposição de uma comunidade de pescadores (localizada em Canavieiras, BA) aos HPA provindos de derrames de petróleo através da análise de metabólitos de HPA em urina. Para isso, as 44 amostras foram extraídas por extração em fase sólida (SPE) e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas triplo quadrupolo (HPLC-MS/MS). Este trabalho também contempla a comparação de diferentes métodos de extrações em 18 amostras de urina selecionadas. No Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) realizou-se extração em fase sólida e a extração líquido-líquido, enquanto na PUC-Rio foi realizada a extração por SPE. Os resultados referentes às 44 amostras analisada na PUC-Rio, demonstraram que 4 dos 11 metabólitos de interesse foram identificados e quantificados. Para o 1-OH-Nap a faixa de concentração foi ($<LQ - 44 \text{ ng mL}^{-1}$), ($<LQ-21 \text{ ng mL}^{-1}$) para o 2-OH-Nap, ($<LQ -5,4 \text{ ng mL}^{-1}$) para o 3,9-OH-Phe e ($<LQ- 0,76 \text{ ng mL}^{-1}$) para o 6-OH-Chr. Ao comparar os resultados obtidos com trabalhos da literatura, observou-se que os moradores da comunidade de Canavieiras apresentaram valores baixos de concentração dos metabólitos que foram quantificados. Mesmo assim, é importante a existência de trabalhos voltados para o monitoramento destes compostos já que não somente o ambiente como também apresentam-se como um risco à saúde humana.

Palavras-Chave

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; urina humana; metabólitos de HPA; HPLC-MS/MS

Abstract

Lorêdo, Livia Araujo; Massone, Carlos German (Advisor). **Oil spills and human health - PAH metabolites in urine as exposure tracers using TANDEM mass spectrometry**. Rio de Janeiro, 20023. 80p. Master's Dissertation – Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro.

A major crude oil spill occurred off the coast of Brazil in 2019 affecting a 4,334 km stretch of coastline, 11 states and several localities. As a result, residents came into direct contact with crude oil and were exposed to contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are carcinogenic organic compounds of petrogenic and pyrogenic origin, which are ubiquitous and persistent. When humans are exposed to these contaminants, the organism can metabolize and generate metabolites of these PAHs with probable negative effects on human health. Therefore, this work aimed to analyze the exposure of a fishing community (located in Canavieiras, BA) to PAHs from oil spills through the analysis of PAH metabolites in urine. For this, the 44 samples were extracted by solid phase extraction (SPE) and analyzed by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometer (HPLC-MS/MS). This work also includes the comparison of different extraction methods in 18 selected urine samples. Solid phase extraction and liquid-liquid extraction were performed at the Leopoldo Américo Miguez de Mello Research, Development and Innovation Center (CENPES), while SPE extraction was performed at PUC-Rio. The results for the 44 samples analyzed at PUC-Rio showed that 4 of the 11 metabolites of interest were identified and quantified. For 1-OH-Nap the concentration range was ($<LQ - 44 \text{ ng mL}^{-1}$), ($<LQ-21 \text{ ng mL}^{-1}$) for 2-OH-Nap, ($<LQ -5.4 \text{ ng mL}^{-1}$) for 3,9-OH-Phe and ($<LQ- 0.76 \text{ ng mL}^{-1}$) for 6-OH-Chr. When comparing the results obtained with literature works, it was observed that the residents of the community of Canavieiras had low concentration values of the metabolites that were quantified. Even so, it is important the existence of works focused on the monitoring of these compounds since not only the environment but also present themselves as a risk to human health.

Keywords

Polycyclic aromatic hydrocarbons; human urine; PAH metabolites; HPLC-MS/MS.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2.Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Revisão bibliográfica	16
3.1. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	16
3.2. Fontes de emissão de HPA.....	21
3.3. HPA e sua distribuição no meio ambiente.....	24
3.4. Metabólitos de HPA.....	25
3.4.1.Biotransformação dos HPA	25
3.4.2. Técnicas anaçíticas para identificação de metabólitos de HPA	27
4. Materias e métodos analíticos.....	31
4.1.Solventes orgânicos e reagentes	31
4.2. Padrões analíticos.....	31
4.3. Limpeza de materiais e vidrarias.....	32
4.4. Amostragem	32
4.5. Preparo e processamento de amostras	35
4.5.1. Desconjugação enzimática.....	36
4.5.2. Extração em fase sólida (solid phase extraction-SPE).....	36
4.5.3. Purificação.....	37
4.5.4. Extração líquido-líquido(liquid-liquid extraction-LLE).....	37
4.6. Análise instrumental	38
4.7. Identificação e quantificação	40
5. Desenvolvimento de método	42
5.1. Linearidade, faixa linear de trabalho	42
5.2. Sensibilidade	43
5.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	43
5.4. Precisão (Repetibilidade)	44
5.5. Recuperação	44
6. Resultados e discussão.....	45
6.1. Parâmetros de validação.....	45

6.1.1. Linearidade, faixa linear de trabalho	45
6.1.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	48
6.1.3. Precisão (Repetibilidade)	48
6.1.4. Recuperação	49
6.2. Aplicação do método cromatográfico	49
6.2.1. Análise comparativa entre métodos de extração.....	49
6.2.2. avaliação da comunidade pesqueira de canavieiras	54
7. Conclusões e perspectivas futuras.....	62
8. Referências	63
ANEXO.....	69
APÊNDICES.....	72

Lista de Figuras

Figura 1 - Fórmulas estruturais e nomenclatura dos 16 HPA prioritários segundo a US EPA	17
Figura 2- Fontes de HPA e exposição humana.....	23
Figura 3 - Caminho de ativação metabólica e desintoxicação do Benzo(a)Pireno. Adaptado de (Ewa & Danuta, 2017)	26
Figura 4 - Estrutura e nomenclatura dos metabólitos de HPA livres.	27
Figura 5 - Fluxograma de seleção dos participantes. Manual de amostragem projeto Avaliação dos impactos do derramamento do óleo na costa da Bahia: ações de saúde e proteção ambiental (2020).....	34
Figura 6 - Fluxograma de etapas envolvidas na determinação de metabólitos de HPA em urina humana.....	35
Figura 7 - Estrutura do padrão interno	41
Figura 8 - Estrutura do padrão surrogado	41
Figura 9 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 1-OH-Nap.....	47
Figura 10: Gráfico comparativo em boxplot sem e com outliers.....	51
Figura 11- :Boxplot das concentrações dos metabólitos de HPA em urina humana	56
Figura 12--Histogramas do número de observações pela concentração encontrada	58

Lista de abreviações

CENPES – Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello

GC-MS – *Gas chromatography coupled to a tandem mass spectrometer*
/Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas

HPLC-MS – *High-performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer* /Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetros de massas

HPLC-F – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

HPLC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas triplo quadrupolo

FD – Frequência de detecção

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IARC – *Internacional Agency for Research on Cancer*/ Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

inHg – Polegada de mercúrio

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de detecção

LLE – *Liquid-Liquid extraction*/ Extração líquido-líquido

LLLME – *Liquid-liquid-liquid micro-extraction*/ Micro extração líquido-líquido-líquido

LQ – Limite de quantificação

MeOH - Metanol

mg - Miligrama

mL - Mililitro

ng – Nanograma

OH-HPA- Hidroxi-Hidrocarboneto policíclico aromático

PUC-Rio – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

SPE – *Solid phase extraction*/ Extração em fase sólida

US EPA- *United States Environmental Protection Agency*/ Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos

µm - Micrometro

Lista de tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos 16 HPA prioritários (Latimer & Zheng, 2003).....	20
Tabela 2: Métodos reportados em outros trabalhos	29
Tabela 3- Transições e energia de colisão	39
Tabela 4- Limite de detecção de limite de quantificação dos metabólitos analisados.....	48
Tabela 5 -Resultados de repetibilidade	49
Tabela 6 - Estatística descritiva dos três métodos.....	52
Tabela 7- Resultados do teste de Mann-Whitney pareado	53
Tabela 8 - Resultados metabólitos de HPA em urina humana (ng mL ⁻¹)	54
Tabela 9 - Resultados metabólitos de HPA em urina humana (ng g ⁻¹)	54
Tabela 10 - Concentrações reportadas nestes e em outros trabalhos.....	61
Tabela 11 - limites de detecção reportados em outros trabalhos.....	61

1.

Introdução

Desde o século XVIII, com o início da Revolução Industrial, o uso de combustíveis fósseis, especialmente os derivados do petróleo, tem aumentado constantemente. Para transportá-los das plataformas de onde são extraídos, utilizam-se grandes navios petroleiros que percorrem rotas marítimas. Infelizmente, muitos desses navios apresentam mau estado e ainda são construídos como monocascos, o que tem contribuído para o elevado número de derramamentos acidentais que ocorreram nas últimas décadas (Aguilera et al., 2010).

No dia 30 de agosto de 2019 foi identificado, oficialmente, um grande vazamento de óleo bruto na costa brasileira, que afetou uma extensão de 4.334 km de faixa litorânea e atingiu 11 estados do Nordeste e Sudeste, além de 120 municípios e 724 localidades até o dia 22 de novembro de 2019 (Pena et al., 2020). Embora tenha sido considerado o maior desastre ambiental no país, não foi o primeiro incidente envolvendo vazamentos de petróleo ou derivados.

Nos eventos de 2019, logo após a descoberta das manchas, houve um grande envolvimento da comunidade local para iniciar a limpeza do óleo das praias afetadas. Com isso, foram reportados casos de intoxicação uma vez que os voluntários não usaram equipamentos de proteção adequados. A exposição do óleo ao sol resultou na intoxicação dos voluntários, pois os componentes mais leves do óleo cru, como hidrocarbonetos, podem evaporar rapidamente quando expostos ao sol e ao ar, deixando a fração mais pesada do petróleo para trás (Pitombo e Valadares, 2019).

A intoxicação deve-se principalmente à presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) no óleo cru. Os HPA são compostos formados por dois ou mais anéis benzênicos condensados, compostos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio, organizados linearmente, angularmente ou agrupados. A formação desses poluentes também ocorre pela combustão incompleta de matéria orgânica, com fatores como temperatura e pressão influenciando seu perfil constituinte. Assim, incêndios florestais e de campos, bem como a queima de combustíveis fósseis, também são considerados importantes fontes de HPA. (Meire et al, 2007).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - *Environmental Protection Agency*) considera 16 HPA como particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA,

1986). Esses compostos incluem: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno.

Ao entrar no organismo, a maioria dos HPA são metabolizados em compostos monohidroxilados em formas conjugadas que podem ser excretados pela urina. A caracterização da exposição aos HPA tem sido frequentemente realizada por meio da análise de metabolitos presentes na urina, com o objetivo de avaliar a associação entre essa exposição e possíveis resultados adversos para a saúde (Nguyen et al., 2022). Além disso, a utilização de amostras de urina é amplamente aplicada devido à natureza não invasiva da amostragem, a facilidade de coleta de uma grande quantidade de amostra, a rapidez e a simplicidade do processamento da matriz (Santos et al, 2019).

Em 2019, a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) com o programa Entre Mares, lançou um edital de seleção emergencial com o propósito de oferecer suporte a programas de pós-graduação *stricto sensu* que abordem em suas linhas de pesquisa assuntos relacionados ao combate, análise do impacto e proposição de soluções para o incidente de derramamento de óleo ocorrido em agosto de 2019 nas praias brasileiras, com especial enfoque na região Nordeste.

Um dos projetos contemplados pertence ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Ambiente e Trabalho (PPGSAT), da Universidade Federal da Bahia (UFBA) coordenado pela professora Rita de Cássia Franco Rêgo intitulado: “Avaliação dos impactos do derramamento do óleo na costa da Bahia: ações de saúde e proteção ambiental”. Este projeto visou analisar os possíveis impactos que moradores da comunidade pesqueira de Canavieiras na Bahia sofreram em virtude da exposição ao óleo derramado na costa brasileira. Para tal, coletou-se urina dos voluntários residentes desta comunidade pesqueira que foram utilizadas neste trabalho.

Dessa forma, os impactos do derramamento de óleo afetam não somente o meio ambiente, mas também a economia e a subsistência das comunidades que dependem deste ecossistema, como as comunidades pesqueiras. Implicando em problemas sociais que exigem soluções políticas e jurídicas (Andrade et al., 2005). Assim, o derramamento de óleo é um problema multifacetado com consequências imprevisíveis e complexas, que requerem atenção imediata e medidas estratégicas, levando em consideração as necessidades urgentes das pessoas afetadas. Por isso, é essencial estudar a contaminação e seus efeitos prejudiciais.

Nesse sentido, esta dissertação tem como objetivo principal analisar a urina de pescadores da comunidade de Canavieiras, na Bahia, afetada pelo derramamento de óleo ocorrido em 2019 para identificar e quantificar metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e com isso avaliar se os moradores da região foram atingidos por estes contaminantes.

Neste contexto, o presente estudo trata do desenvolvimento de método para a análise de metabólitos de HPA em amostras de urina coletadas de uma comunidade pesqueira (Canavieiras) localizada na Bahia por HPLC-MS/MS (tandem).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é desenvolver um método analítico que possibilite a identificação e quantificação de metabólitos de HPA em amostras de urina humana, a fim de avaliar a possível exposição de pescadores da comunidade de Canavieiras (Bahia) a hidrocarbonetos de petróleo.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método analítico para a determinação e quantificação de metabólitos de HPA em HPLC-MS/MS;
- Aplicar o método na análise em amostras de urina coletadas de uma comunidade pesqueira de Canavieiras na Bahia;
- A partir das concentrações de metabólitos reportadas avaliar a exposição humana à hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

3

Revisão bibliográfica

3.1.

Os Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos formados exclusivamente de hidrogênio e carbono tendo pelo menos dois anéis aromáticos condensados que majoritariamente apresentam-se como sólidos brancos, incolores ou amarelos pálidos (Abdel-Shafy & Mansour, 2016). Podem ser divididos em duas classes: os de baixa massa molecular e os de alta massa molecular.

Os HPA são considerados importantes contaminantes químicos, pois alguns deles demonstraram ser carcinogênicos em mamíferos (Neff, 1979). São persistentes e encontrados em diversos ecossistemas, e suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (Yin et al., 2007; Erustes et al., 2001) tornam o desenvolvimento de métodos analíticos para detectar a presença desses compostos no meio ambiente de grande interesse (Valero-Navarro et al., 2007). A figura 1 demonstra as fórmulas estruturais e nomenclatura dos 16 HPA prioritários segundo a USEPA

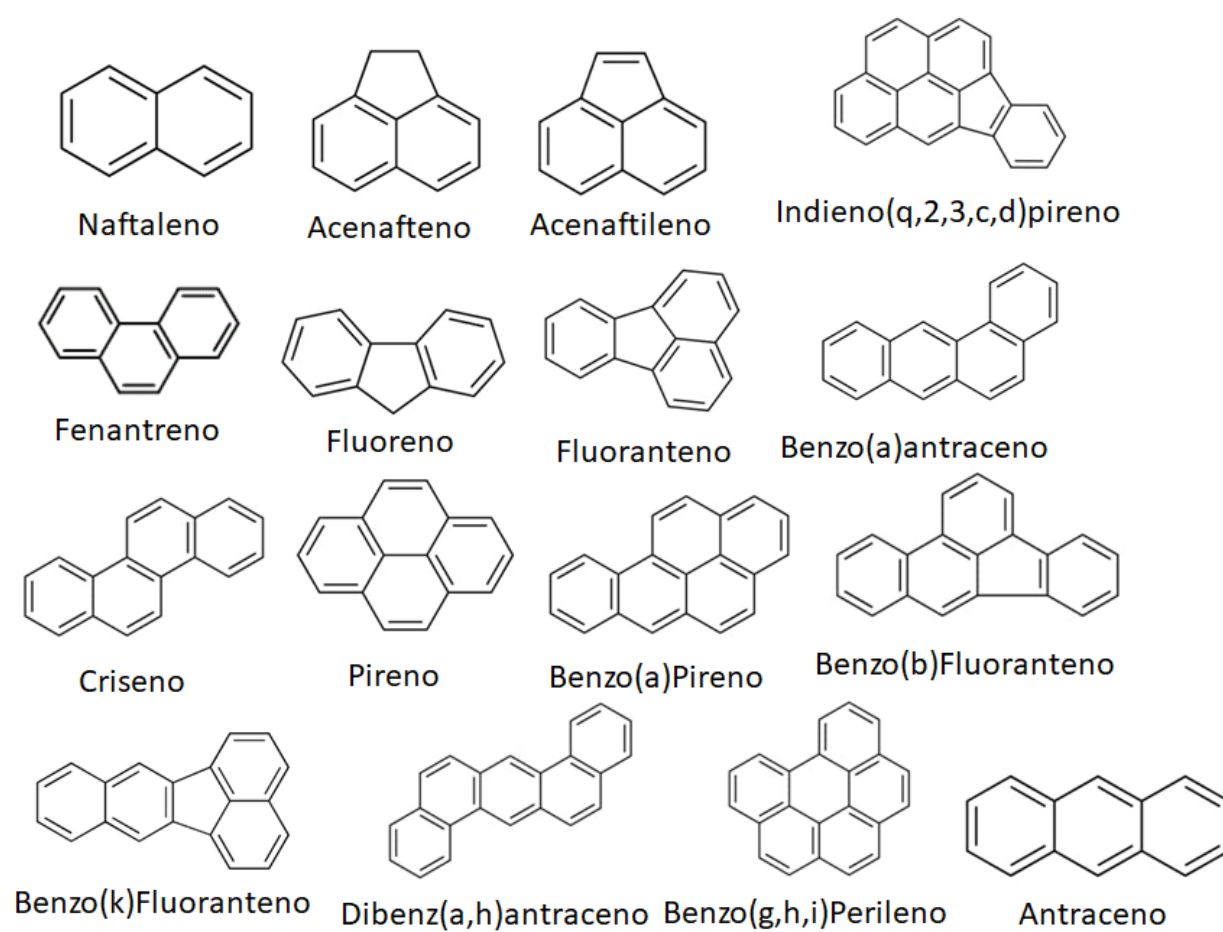


Figura 1 - Fórmulas estruturais e nomenclatura dos 16 HPA prioritários segundo a US EPA

Os HPA apresentam características físicas e químicas que são importantes para determinar sua distribuição e comportamento em diversos compartimentos ambientais, como solo, sedimento, atmosfera e água, bem como seus possíveis efeitos na saúde humana e no ambiente. Após serem liberados no ambiente, os HPA podem passar por transformações e ter suas propriedades físico-químicas modificadas através de processos naturais como evaporação, dissolução, biodegradação, foto-oxidação e sedimentação (Queiroz, 2011).

Órgãos como a Agência Internacional de pesquisa em Câncer (IARC, 2012), classificou o tipo de risco de determinados HPA quanto à sua carcinogenicidade, dividindo em quatro grupos: 1 carcinogênico para humanos, 2A provavelmente carcinogênico para humanos, 2B possivelmente carcinogênico para humanos e 3 não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos. Na Tabela 1, encontram-se as propriedades físico-químicas bem como a toxicidade de acordo com a IARC dos HPA listados como poluentes prioritários pela USEPA.

A distribuição dos HPA no ambiente é influenciada por processos de partição entre água e ar, água e sedimento, e água e biota. Estes processos são controlados por diversos parâmetros, tais como massa molecular, coeficiente de partição octanol-água, coeficiente de partição com carbono, ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade em água. As características físico-químicas dos HPA, como solubilidade e pressão de vapor, são determinantes para orientar a distribuição desses poluentes entre as fases solúveis e particuladas nos meios atmosférico, aquoso e biótico (Meire, 2006).

A solubilidade dos HPA na água é limitada, variando de altamente insolúveis, como o benzo(g,h,i)perileno, até pouco solúveis, como o naftaleno, esta propriedade diminui à medida que aumenta a massa molar, ou seja, com o aumento do número de anéis. Já a pressão de vapor dos HPA varia entre compostos altamente voláteis, como o naftaleno, e relativamente pouco voláteis, como o benzo(ghi)perileno, sendo que quanto maior a volatilidade do composto, maior será sua pressão de vapor, e menor será sua massa molecular.

Devido à baixa solubilidade dos HPA na água e sua natureza hidrofóbica (avaliada pelo coeficiente de partição octanol-água), esses compostos tendem a se associar a partículas em suspensão, como o material orgânico natural sólido, e se depositarem nos sedimentos de rios, lagos e águas marinhas. Além disso, os constituintes dos HPA são classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis devido às suas características lipofílicas, apresentando coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) entre 3,4 e 7.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos 16 HPA prioritários (Latimer & Zheng, 2003)

Nome	Propriedades físico-químicas						Toxicologia
	Peso Molar (g mol ⁻¹)	Ponto de Fusão(°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Pressão de Vapor (mmHg)	Solubilidade (mg L ⁻¹) ¹⁾	Log K _{ow}	IARC
Naftaleno	128,18	80,2	218	0,087	31,7	3,37	2B
Acenafteno	154,21	93,4	279	2,2x10 ⁻³	3,9	4,32	3
Acenaftileno	152,20	92,5	280	4,8x10 ⁻³	3,93	4,00	-
Antraceno	178,23	216	341,3	6,53x10 ⁻⁶	4,34x10 ⁻²	4,54	3
Fenantreno	178,23	99,2	340	1,21x10 ⁻⁴	1,16x59	4,57	3
Fluoreno	166,22	114,8	294	6x10 ⁻⁴	1,69	4,18	3
Fluoranteno	202,26	107,8	384	9,22x10 ⁻⁶	0,20-0,26	5,22	3
Benzo[a]antraceno	228,29	155-157	437,3	2,1x10 ⁻⁷	9.4x10 ⁻³	5,91	2B
Criseno	228,29	255	448	6.23X10 ⁻⁹	2x10 ⁻³	5,86	2B
Pireno	202,26	150,62	393-404	4,5x10 ⁻⁶	0,135	5,18	3
Benzo[a]pireno	252,32	179	495	5,49x10 ⁻⁹	1.62x10 ⁻³	6,04	1
Benzo[b]fluoranteno	252,32	168	481	5,0x10 ⁻⁷	1,5x10 ⁻³	5,80	2B
Benzo[k]fluoranteno	252,32	217	480	9,65x10 ⁻¹⁰	7,6x10 ⁻⁴	6,00	2B
Dibenz(a,h)antraceno	278,35	269	524	9,55x10 ⁻¹⁰	6,27x10 ⁻⁴	6,75	2A
Benzo(g,h,i)perileno	276,34	278	550	1,0x10 ⁻¹⁰	2,6x10 ⁻⁴	6,50	3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276,34	164	536	1,25x10 ⁻¹⁰	0,062	6,60	2B

3.2.

Fontes de Emissão de HPA

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos orgânicos que têm grande importância ambiental e toxicológica. Eles são encontrados em ambientes aquáticos e são uma mistura de compostos provenientes de diversas fontes, naturais ou antropogênicas. O transporte desses compostos pode ocorrer pelo ar, onde eles se associam ao material particulado fino, permitindo sua ampla distribuição. Uma vez na atmosfera, esses poluentes podem ser depositados em sistemas aquáticos e terrestres, tanto por via seca (partículas sólidas ou vapores) quanto por via úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada). Além disso, a poluição por HPA pode ocorrer por descarte direto, como por exemplo, através de efluentes municipais e industriais.

Os HPA de origem pirolítica são associados à combustão incompleta de matéria orgânica em condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo de formação (Abdel-Shafy & Mansour, 2016.). A distribuição desses HPA é caracterizada pela predominância de compostos parentais não substituídos e alta concentração de HPA de alto peso molecular com 4 ou 5 anéis aromáticos (Page et al., 1999).

HPA de origem pirolítica são emitidos por fontes estacionárias e móveis. As fontes estacionárias incluem atividades industriais como craqueamento catalítico de petróleo, produção de coque, produção de asfalto, fusão de alumínio, além da queima de carvão e óleo, queima de madeira, aquecimento residencial em fornos, lareiras, fornalhas (madeira e carvão), queima de gás, incineração e queimadas intencionais de florestas e agriculturas (Lopes & Andrade, 1996).

A ação humana resulta na principal fonte de HPA, mas esses compostos também são emitidos no ambiente de maneira natural. Fontes naturais de HPA pirolíticos incluem incêndios florestais espontâneos e erupções vulcânicas.

Já HPA de origem petrogênica estão associados ao petróleo, incluindo óleo cru e seus produtos refinados (Page et al., 1999). Esses compostos são gerados através de processos de aromatização a longo prazo de precursores naturais, ocorrendo em condições de baixa temperatura relativa, ao longo de escalas geológicas de tempo (Page et al., 1999)

As principais fontes de HPA de origem petrogênica no ambiente incluem derrames acidentais de óleo durante operações de abastecimento e lavagem de tanques de caminhões e navios petroleiros, produção de petróleo em terra e no mar (vazamentos de óleo produzido), drenagem de material presente nas estruturas das plataformas, água de produção, lama e cascalho resultantes da perfuração, transporte, estocagem e refino de petróleo (Stout; Uhler; McCarthy, 2001; Zakaria; Okuda; Takada, 2001; Readman et al., 2002).

A Figura 2 mostra um esquema resumido das fontes de HPA bem ocorre a exposição humana.

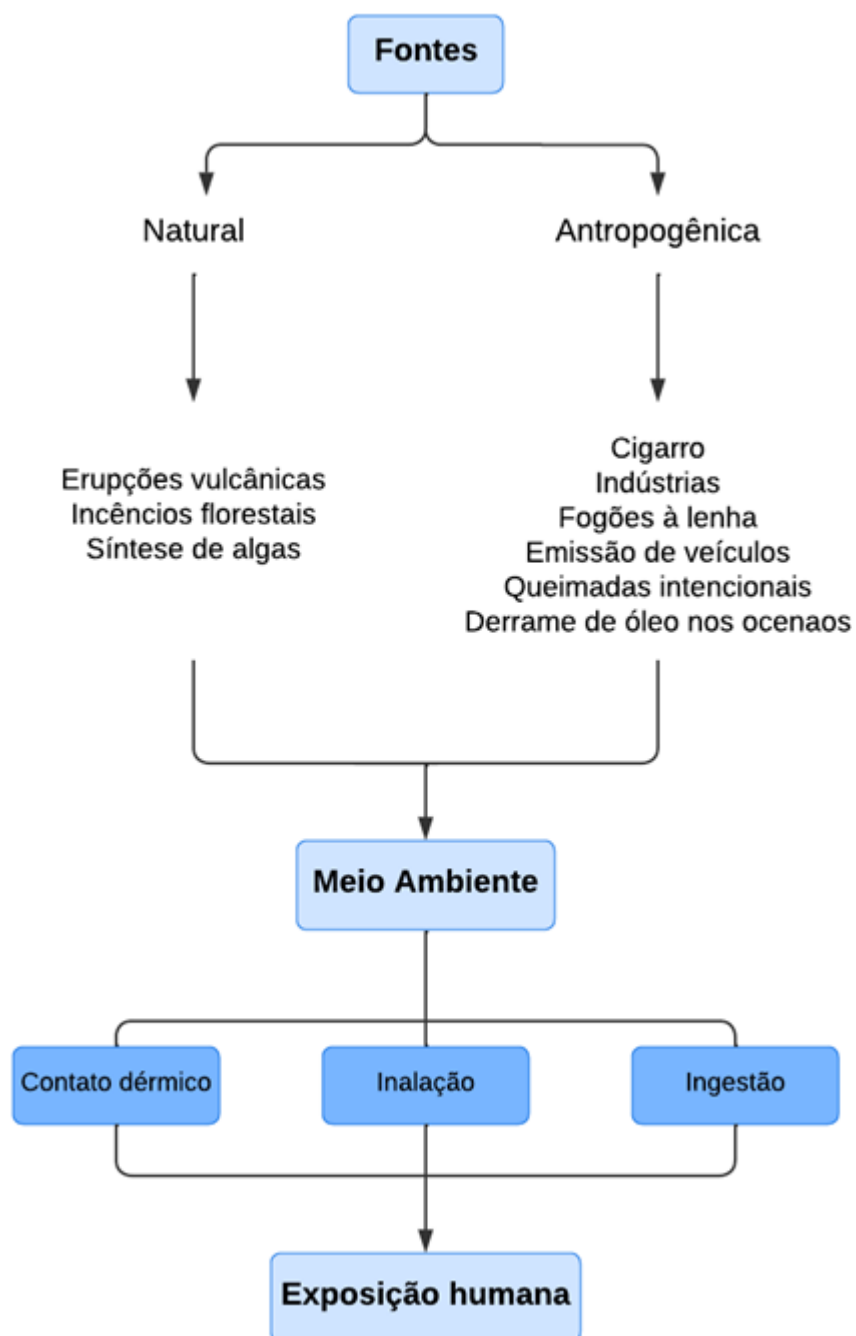


Figura 2- Fontes de HPA e exposição humana.

3.3. HPA e sua distribuição no meio ambiente

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição do ar tem sido associada à morte de quase sete milhões de pessoas em todo o mundo, e cerca de noventa por cento da população mundial está exposta a níveis elevados de poluentes atmosféricos (OMS, 2019). A qualidade do ar nas grandes cidades tem se deteriorado devido ao aumento das emissões de tráfego, à expansão urbana e ao crescimento populacional (Mukherjee e Agrawal, 2017). Além disso, o ar das áreas urbanas é contaminado por diversos poluentes orgânicos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Teixeira et al., 2011).

Estudos foram realizados para investigar a distribuição dos HPA no ar, que podem ser encontrados em fase de vapor ou em partículas de diferentes tamanhos (Liu et al., 2001; Ohura et al., 2004). Os resultados apontam que HPA particulados são mais preocupantes para a saúde humana, visto que os HPA de alta massa molecular, que são os mais carcinogênicos, estarem predominantemente presentes na fase de partículas.

Os HPA são transportados no ambiente, principalmente por via atmosférica, através do material particulado fino, permitindo ampla distribuição desses compostos no meio ambiente. Após serem emitidos na atmosfera, eles podem ser depositados em sistemas aquáticos e terrestres na forma seca (particulada ou vapor) ou úmida (por meio de precipitação dissolvida ou particulada) (Meire et al., 2007.).

Ao adentrarem sistemas aquáticos marinhos, os HPA são dispersados pelas correntes e acabam se integrando ao sedimento ao longo do tempo (EPRI (Electric Power Research Institute) 2000). Devido ao caráter hidrofóbico, esses poluentes tendem a se depositar, se adsorver em fases não aquosas, como solo ou sedimento. Depois de serem adsorvidos em partículas sólidas, os HPA tornam-se menos suscetíveis à degradação (Hussain et al., 2018). No entanto, ainda podem ser dissolvidos na água em pequenas quantidades, especialmente os HPA de baixo peso molecular, tornando-se biodisponíveis. Além disso, a presença de coloides aquáticos porosos pode aumentar os níveis de HPA acima de sua solubilidade em água, uma vez que os HPA se adsorvem nesses coloides orgânicos. Consequentemente, eles são transferidos facilmente através dos poros do sedimento, aumentando a mobilidade e biodisponibilidade dos HPA no sedimento devido à sorção aos coloides (Dong et al., 2012).

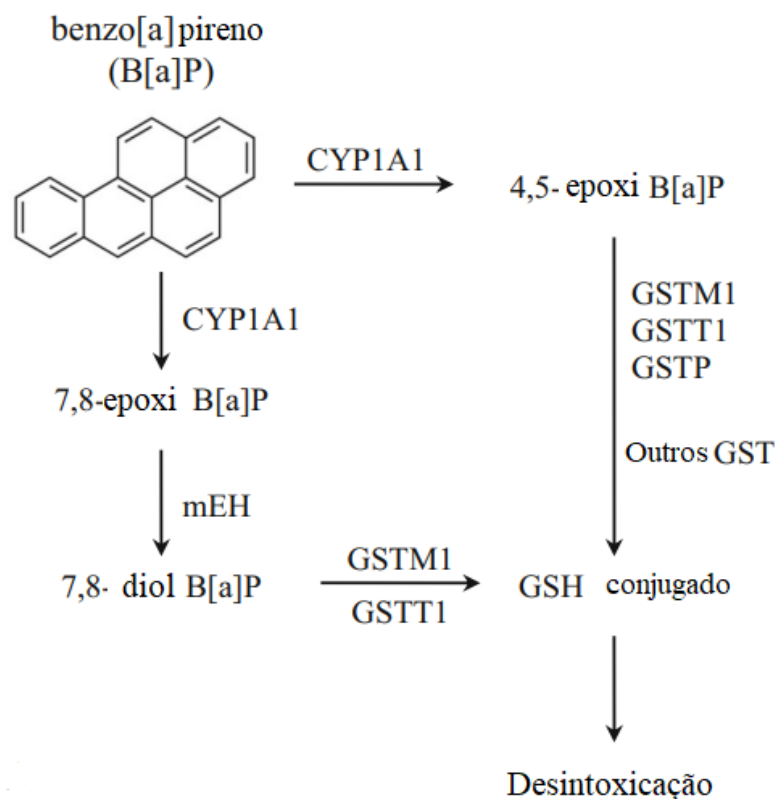
A presença desses contaminantes no ecossistema aquático acarreta impactos adversos na vida marinha, resultando em danos significativos para as espécies afetadas. Os peixes que habitam áreas poluídas acabam absorvendo esses compostos por meio das guelras, pele, ingestão de alimentos ou sedimentos contaminados (Ruddock et al., 2002).

De maneira geral, a contaminação dos tecidos de peixes por HPA ocorre durante a alimentação desses organismos, quando entram em contato com sedimentos contaminados. No entanto, a ingestão desses tecidos pelos seres humanos pode representar um risco à saúde quando apresentam altas concentrações de HPA (Araújo, 2010). Embora os peixes sejam importantes fontes de proteínas, vitaminas e outros nutrientes essenciais, como ômega 3, que trazem benefícios à saúde humana, tem surgido uma preocupação sobre o consumo frequente desses alimentos e o possível risco de exposição a contaminantes químicos por sua ingestão. Colocar referência

3.4. Metabólitos de HPA

3.4.1. Biotransformação dos HPA

Por serem lipofílicos, os HPA ligam-se às membranas lipídicas e são transportados por lipoproteínas no sangue. Após a entrada no corpo através dos pulmões, trato digestivo ou pele, os HPA podem sofrer uma ou duas fases de biotransformação (Figura 3). Na fase I do processo de metabolização dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), três vias principais de ativação podem ser identificadas: (i) formação de epóxidos de dihidrodiol por enzimas do citocromo P450 e epóxido hidrolase (via CYP/EH), (ii) formação de um cátion radicalar de HPA por oxidação metabólica através da atividade da peroxidase do citocromo P450 e (iii) formação de orto-quinonas pela oxidação de catecóis através da dihidrodiol desidrogenase (Moorthy et al, 2015). Nessa primeira fase, um grupo reativo polar é introduzido na molécula, tornando-a um substrato adequado para as enzimas da fase II. Os HPA transformam-se em compostos eletrolíticos tais como epóxidos, fenóis, dihidrodiols, quinonas, diols, triols e quatrilols através da ação de enzimas mono-oxigenases citocromo P450 (Ewa & Danuta, 2017).



CYPs - Enzimas citocromo P450
 mEH - Hidrolase de epóxido microssomal
 GSTs - Enzimas glutathiona S-transferases
 GSH - Glutathiona

Figura 3 - Caminho de ativação metabólica e desintoxicação do Benzo(a)Pireno. Adaptado de (Ewa & Danuta, 2017)

Na fase II, após a introdução de um grupo, as enzimas conjugadas adicionam geralmente substitutos endógenos, como açúcares, sulfatos ou aminoácidos, o que aumenta substancialmente a solubilidade em água, facilitando a excreção. Embora esse processo seja, geralmente, uma sequência de desintoxicação, os intermediários reativos podem ser muito mais tóxicos do que os compostos originais (Guengerich, 2008).

Durante o processo de conjugação na formação de metabólitos de HPA, ocorre a presença de glucuronídeos ou sulfatos conjugados. Portanto, para obter esses metabólitos na forma livre OH-HPA, é necessário realizar a etapa de desconjugação enzimática. A Figura 4 ilustra exemplos de metabólitos de HPA na sua forma livre.

Devido à complexidade das complicações decorrentes da exposição a HPA, seja por via respiratória ou pela ingestão de alimentos contaminados, a realização de estudos sobre esses compostos é de extrema importância (Moorthy et al. 2015). Até o momento, os limiares de concentração aos quais uma pessoa pode ser exposta sem causar danos à saúde ainda não são conhecidos. Portanto, é essencial identificar as principais fontes de exposição e os níveis de contaminação em cada região, a fim de avaliar adequadamente os riscos à saúde envolvidos. A determinação dos HPA é principalmente realizada por técnicas cromatográficas, em combinação com métodos de coleta e extração desses compostos nas amostras (Sun et al, 2019; LI et al, 2017).

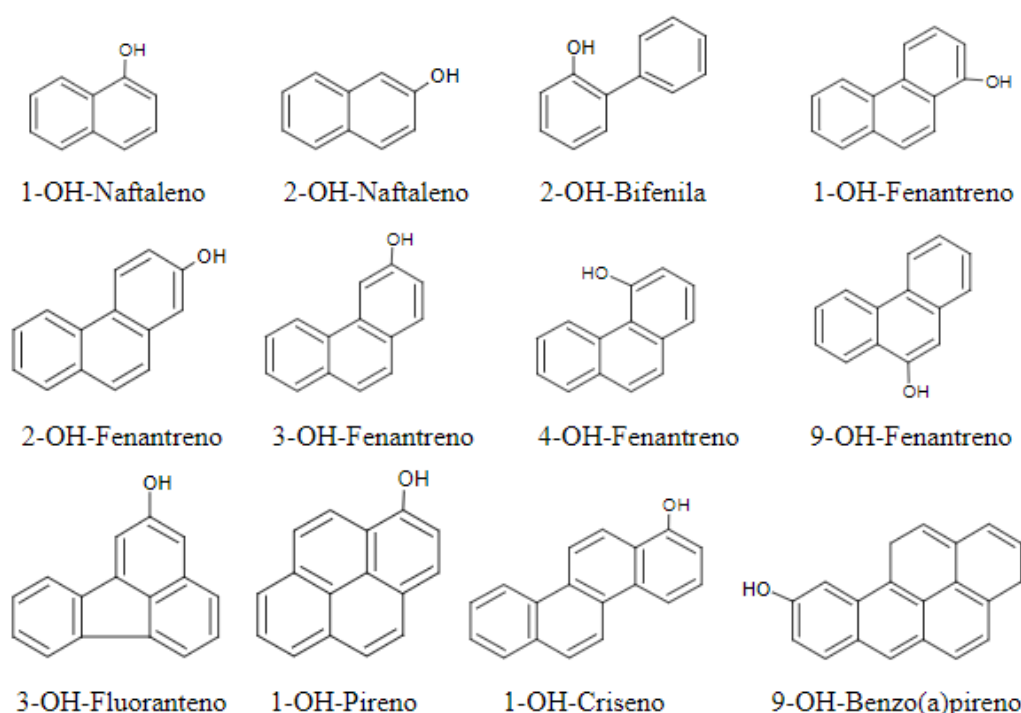


Figura 4 - Estrutura e nomenclatura dos metabólitos de HPA livres.

3.4.2.

Técnicas analíticas para identificação de metabólitos de HPA

A detecção de metabólitos de HPA na urina como biomarcadores de exposição apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas de avaliação. Esses compostos podem ser facilmente medidos de forma semiquantitativa através de técnicas de detecção direta de fluorescência, como a detecção de fluorescência fixa e a fluorescência sincronizada de varredura.

Para identificar e quantificar metabólitos individuais de HPA, são necessários métodos laboratoriais intensivos para preparação das amostras para análise. Normalmente, a preparação das amostras envolve tratamento enzimático

para produzir compostos hidroxilados livres, seguido de extração ou centrifugação e, ocasionalmente, derivatização dos grupos hidroxilados. Dentre os 14 trabalhos selecionados no levantamento, apenas Guo et. al (2013) e Marlow & Hurtubise (2004) não realizaram a etapa de desconjugação enzimática. Além disso, dentre os doze trabalhos que desconjugaram suas amostras, apenas Gupta et al (2015) não utilizou a enzima β -glucuronidase. Em todos os artigos pesquisados a temperatura de incubação foi de 37 °C e, desta forma, mantida assim no presente estudo.

Dentre as técnicas analíticas disponíveis, umas mais refinadas para identificação e quantificação de metabólitos de HPA individuais são a *High-performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer* (HPLC-MS/MS) – Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrômetro de massas *tandem* e *Gas chromatography coupled to a tandem mass spectrometer* (GC-MS/MS)-Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas *tandem* . A tabela 2 traz um levantamento sobre tratamento enzimático, método de extração e técnicas analíticas utilizadas para a determinação de metabólitos de HPA em urina.

Tabela 2: Métodos reportados em outros trabalhos

Tipo de Amostra	Preparo da amostra				Análise Instrumental	Referência
	Tratamento Enzimático	Incubação	Extração/Solvente	Padrão interno		
Urina	β -glucuronidase/ arylsulfatase	banho com agitação durante a noite at 37 °C	SPE MeOH	-	HPLC-UV	İçli. Et al. (2021)
Urina	-	-	LLLME 0.1 M NaOH ou 1-octanol	-	FL e CE	Marlow & Hurtubise (2004)
Urina	β -glucuronidase enzyme	37 °C durante a noite (~18 h)	LLE pentano	dodecano	GC/IDHRMS	Zheng Li et al (2006)
Urina	β -glucuronidase enzyme	37 °C durante a noite.	SPE Acetato de etila	1-OHNAP-d7	GC-MS ISQ single quadrupole	Souza, et al. (2022)
Urina	β glucuronidase/ arylsulfatase	37 °C durante a noite	LLE Acetato de etila SPE Acetonitrila dSPE Z-sep or Z-Sep+ sorbent	-	GC-EI-MS/MS	Marques et al. al.(2021)
Urina	β -glucuronidase/ aryl sulfatase H1 enzyme	17–18h at 37 °C	SPE optima grade MeOH	Mix 9-2-OH-FLU ¹³ C6 3-OH- PHEN ¹³ C6-1-OH-PYR ¹³ C6 1-OH-NAP ¹³ C6- 2-OH-NAP	HPLC-MS/MS	Nguyen K. et al. (2022)
Urina	β -glucuronidase/ arylsulfatase	durante a noite 37 °C, (15 h)	LLE Acetado de etila	-	HPLC-MS/MS	Fernandez, et al. (2021)

Urina	HCl	30 min at 70°C	DLLME TCE	-	Auto-IPS-GC-MS-MS	Gupta et al (2015)
Urina	β -glucuronidase (HP-2)	durante a noite 37 °C	LLE 1:4 Tolueno/n-pentano	¹³ C ₆ 1-NAP ¹³ C ₆ 3- fluoranteno ¹³ C ₆ 1-fenantreno ¹³ C ₆ 1- pireno	GC-ID-HRMS	Thai, et al. (2020)
Urina	β -glucoridinase/ sulfatase	37 °C for 17–18 h	SPE DCM	-	GC-MS/MS	Hoppe- Jones et al. (2021)
Urina	β -glucuronidase/ sulfatase	durante a noite a 37 °C	SUPRAS-based extraction	-	LC-MS/MS	Martinefski et al. (2019)
Urina	β -glucuronidase/ arylsulfatase	durante a noite (37 °C, 16–17 h)	SPE	-	GC-MS	ykin et al. (2015)
Urina	B-glucuronidase/ Arylsulfatase	37 °C for 16 h.	SPE MeOH	-	HPLC-F	Huo et al. (2019)
Urina	-	-	LLE 5 mL solução (80% pentano/ 20% tolueno, v:v)	d ₇ -1-NAP, d ₇ -2-NAP, ¹³ C ₆ -1-PYR, ¹³ C ₆ -3- PHEN, ¹³ C ₆ -3-BCP, ¹³ C ₆ -1-BAA, and ¹³ C ₆ -6-CHRY.	HPLC- MS/MS	Guo, et al (2013)

LLE- extração líquido-líquido; SPE- extração em fase sólida; MeOH – metanol; NaOH – Hidróxido de sódio; 2-OH-NAP – 2- Hidroxinaftaleno;

4

Materiais e métodos analíticos

O método utilizado foi inicialmente desenvolvido pelo Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES) para a determinação de metabólitos de HPA em bile de peixe. Neste trabalho o método foi adaptado para validar a análise de urina humana.

Foram realizadas análises adicionais a fim de validar o método empregado na presente pesquisa através de 18 amostras de urine selecionadas, extraídas em fase sólida (CENPES e PUC-Rio) e 17 amostras para a extração líquido-líquido (CENPES).

4.1.

Solventes orgânicos e reagentes

Os solventes orgânicos utilizados em algumas etapas deste trabalho – metanol (MeOH, CAS-No 67-56-1), diclorometano (DCM, CAS-No 75-09-2), acetonitrila (ACN, CAS-No 75-05-8) e ácido acético glacial (AcOH CAS-No 64-19-7).

O Acetato de sódio (CAS-No 6131-90-4) foi utilizado junto com o ácido acético glacial para obter-se uma solução tampão.

4.2.

Padrões analíticos

Os padrões de HPA, padrão interno e surrogado descritos abaixo são da marca *Toronto Research Chemicals* e foram obtidos por meio da CSM Científica do Brasil:

- 1-OH-Naftaleno
- 2-OH-Naftaleno
- 1-OH-Fenantreno
- 3-OH-Fenantreno
- 4-OH-Fenantreno
- 9-OH-Fenantreno
- 2-OH-Fluoreno

- 6-OH-Criseno
- 1-OH-Pireno

4.3.

Limpeza de materiais e vidrarias

Todo material utilizado foi lavado com água corrente, solução de Extran 10% (faixa neutra) e por fim com água ultrapura. Com exceção dos materiais volumétricos, todos os outros foram levados na mufla durante 8h a 400°C para eliminação de qualquer resíduo orgânico e devidamente armazenados para o uso. Materiais volumétricos, pinças e espátulas foram lavados três vezes com diclorometano grau HPLC antes da sua utilização.

4.4.

Amostragem

A fim de selecionar os indivíduos mais expostos ao óleo/petróleo, foi aplicado um critério de inclusão e exclusão. O processo ocorreu em três etapas distintas que estão resumidas no fluxograma na Figura 5.

Na primeira etapa, todos os residentes do município de Canavieiras foram considerados. Em seguida, dentre esses indivíduos, foram selecionados aqueles que não eram fumantes, totalizando 245 pessoas.

Na segunda etapa, dos 245 indivíduos mencionados anteriormente, foram escolhidos aqueles que responderam "Sim" à pergunta: "Você encontrou óleo/petróleo enquanto pescava/mariscava?" (Q5.10). Esse grupo totalizou 152 indivíduos. Entre esses, apenas aqueles que responderam "Sim" às duas perguntas seguintes foram considerados como os mais expostos: "Quando você encontrou óleo/petróleo, você continuou pescando na área?" (Q5.13) e "No período do derramamento, você ajudou a retirar os resíduos de óleo/petróleo?" (Q6.2). Esse processo resultou em 19 indivíduos mais expostos que foram incluídos na amostragem. Na terceira etapa, uma amostra auxiliar foi formada com os indivíduos que responderam "Não" e "Sim", respectivamente, às perguntas mencionadas acima. Essa amostra auxiliar contou com 90 indivíduos e foi utilizada para selecionar os 51 indivíduos restantes para completar a amostra final com 70 elementos.

A seleção dos elementos dentro da amostra auxiliar foi feita classificando os indivíduos em ordem decrescente com base na variável Q6.5, que avaliava por quantos dias eles ajudaram a remover manchas de óleo/petróleo. Os 51 indivíduos com o maior número de dias de exposição foram escolhidos e incluídos na amostra, juntamente com os 19 indivíduos selecionados anteriormente, resultando em uma amostra final composta por 70 elementos.

Com os indivíduos selecionados, foi fornecido um recipiente estéril com as instruções para que o participante coletasse a urina por conta própria. O participante recebeu orientações sobre o processo de coleta, incluindo a necessidade de lavar as mãos e a região genital com sabão, descartar o primeiro jato de urina e preencher o frasco coletor até a metade do tubo. Além disso, a urina coletada foi a primeira do dia. Para este trabalho utilizou-se 44 amostras.

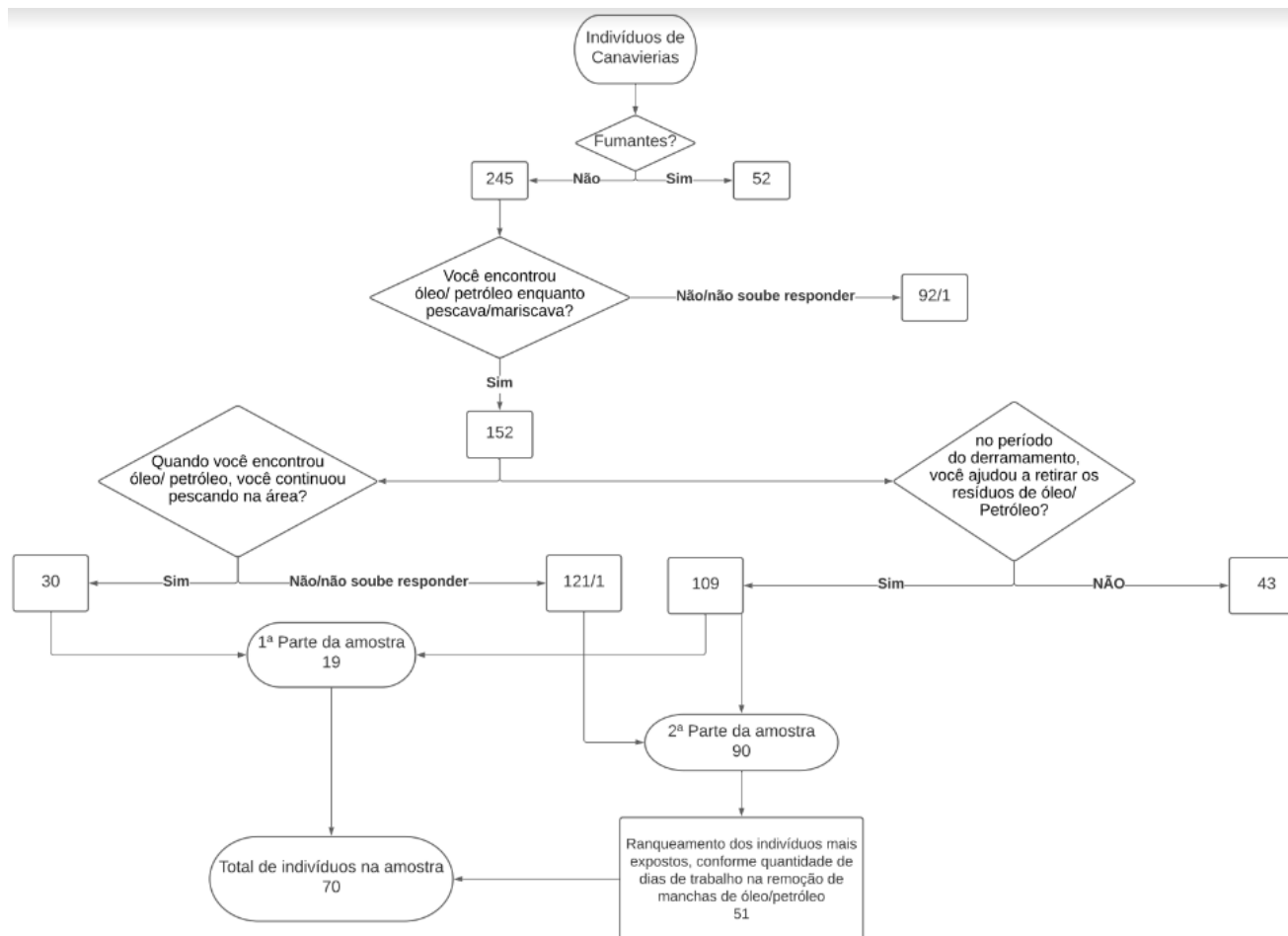


Figura 5 - Fluxograma de seleção dos participantes. Manual de amostragem projeto Avaliação dos impactos do derramamento do óleo na costa da Bahia: ações de saúde e proteção ambiental (2020)

4.5.

Preparo e processamento das amostras

As 44 amostras de urina foram preparadas para a determinação de metabólitos de HPA utilizando cromatografia líquida acoplada a um sistema de espectrometria de massa (HPLC-MS/MS).

Junto às amostras de urina, dois tipos de brancos de laboratório foram processados para cada batelada utilizando como matriz água ultrapura em tampão de acetato com pH 5. Um branco foi fortificado com uma mistura de padrões com níveis de concentrações conhecidos, enquanto o outro foi adicionado apenas o surrogado. Todas as etapas do preparo e processamento de amostras estão resumidas na Figura 6.

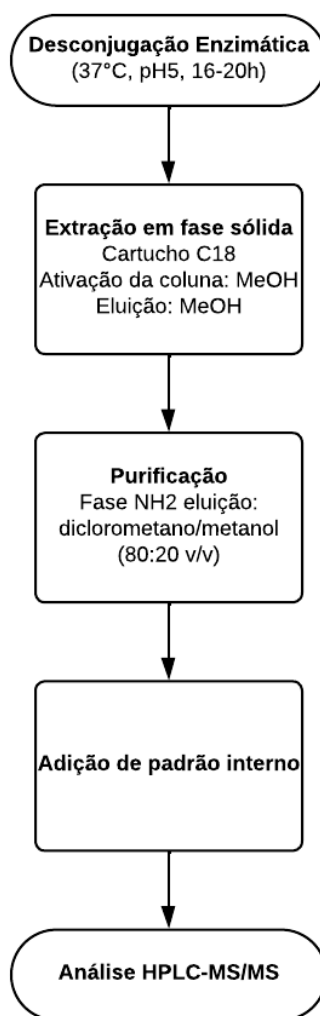


Figura 6 - Fluxograma de etapas envolvidas na determinação de metabólitos de HPA em urina humana

4.5.1. Desconjugação enzimática

Inicialmente preparou-se uma solução tampão de acetato e ajustou-se o pH 5 com ácido acético glacial. Em seguida, alíquotas de 100 µL das amostras foram tratadas com 20 µL da enzima β -glucoronidase (utilizando 2 mL tampão para manter o pH 5, que é um pH ideal para a atuação da enzima). Foram adicionados 25 µL de mistura de surrogates (3-OH-Criseno-d11, 3-OH-BaP-d11, 1-OH-Pireno-d9). A seguir, as amostras foram incubadas à 37°C durante um período de 16-20h.

4.5.2. Extração em fase sólida (*solid phase extraction* -SPE)

Inicialmente foi necessário ativar os cartuchos (Fase C18 de 500 mg e 3 mL) com a adição de 2 mL de metanol deixando-os impregnados com o solvente com eluição em vácuo moderado em frascos de descarte. Depois, realizou-se o condicionamento dos cartuchos adicionando 4 mL de tampão acetato para eliminar os traços de metanol, visto que uma pequena quantidade que permanecer no cartucho pode antecipar a eluição. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, adicionou-se as amostras previamente desconjugadas e foram adicionados mais 2 mL de tampão acetato deixando os cartuchos secarem.

Para a secagem dos cartuchos, os frascos e a estante foram removidos de dentro do *manifold* colocando um pedaço de papel absorvente no fundo deste além de cobrir os cartuchos com papel alumínio. Em seguida, o equipamento foi deixado em vácuo de 5 in Hg por 15 minutos, depois em 10 in Hg por mais 15 minutos e para finalizar em vácuo máximo por 30 minutos. No final desse processo, a parte interna do *manifold* foi limpa com etanol e a estante foi novamente montada agora com frascos receptores.

Para a eluição do analito, inicialmente foram adicionados 2,5 mL de metanol com eluição lenta sem auxílio de vácuo. Após o surgimento da primeira gota um vácuo leve foi aplicado e mais 2,5 mL de metanol foram adicionados deixando o cartucho secar completamente. Esta fração contendo os analitos foi levada à secura com fluxo de nitrogênio à 50 °C e ressuspensa em 1 mL de solução diclorometano:metanol (80:20 v/v). O mesmo processo foi realizado nas

18 amostras que foram extraídas no CENPES.

4.5.3. Purificação

A purificação foi realizada utilizando-se cartuchos com fase NH_2 de 500mg e 3 mL. Os metabólitos foram eluídos duas vezes com 2,5mL de uma solução de diclorometano:metanol (80:20). O extrato foi levado à secura sob fluxo de nitrogênio à 36°C e posteriormente ressuspensionado com 0,5 mL de uma solução de acetonitrila:água (70:30 v/v). Antes de serem injetados no HPLC-MS/MS, adicionou-se aos extratos 12,5 μL (50 ng mL^{-1}) de padrão interno (1-OH-Fenantreno-d9). Para as extrações realizadas no CENPES, não houve etapa de purificação.

4.5.4. Extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid extraction-LLE*)

A extração líquido-líquido foi realizada adicionando-se à amostra 1,5 mL de uma solução 1:1 de acetato de etila e ciclohexano. Em seguida, a amostra foi levada ao banho de ultra-som por 2 minutos sucedido por centrifugação a 2000 RPM por 3 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante da amostra (figura 13) foi removido com auxílio de pipeta pasteur e transferido para um frasco de 15 mL previamente descontaminado. Este processo foi realizado quatro vezes para cada amostra.

Depois de realizada todas as etapas da extração, o extrato foi avolumado para 10 mL e acrescido de sulfato de sódio anidro suficiente para a remoção de qualquer resíduo de água que tenha sido carregado junto com a fração de solvente. Os extratos contendo sulfato de sódio foram filtrados com filtro de seringa de PTFE e 0,2 μm e transferidos para frascos de vidro de 10 mL.

As amostras foram levadas à secura em um concentrador turbovap, ressuspensionado em 1 mL de uma solução 70/30 (v/v) de acetonitrila/água. Ao extrato ressuspensionado, foram acrescentados 25 μL (100 ng mL^{-1}) da solução de PI, seguido pela homogeneização em vórtex, transferência para vial âmbar de 2 mL e posterior injeção no sistema HPLC-MS/MS.

4.6

Análise instrumental

Injetou-se 10 μL de cada extrato no sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *TANDEM* com ionização por eletrospray (ESI) coluna Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (2,1mm x 50mm, 1,5 μm), com vazão constante de 0,500 mL min^{-1} mantendo a temperatura da coluna em 50 $^{\circ}\text{C}$. Utilizando água e acetonitrila como fase móvel variando o gradiente entre as fases. O espectrômetro de massas operou no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Os dados foram obtidos com o *software mass hunter*. As condições cromatográficas são apresentadas no quadro 1 e as condições espectrométricas no quadro 2. Além disso, a tabela 3 mostra as transições bem como as energias de colisões

Quadro 1- Condições cromatográficas para a análise de metabólitos de HPA em urina humana por HPLC-MS/MS

Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD, 2,1 x 50 mm x 1,8 μm		
Temperatura da coluna	50 $^{\circ}\text{C}$		
Volume de injeção	10 μL		
Temperatura do auto-amostrador	10 $^{\circ}\text{C}$		
Lavagem da agulha	15 segundos na porta de lavagem (1:1:1:1 água: metanol:acetonitrila:isopropanol)		
Fase móvel	A: água B: acetonitrila		
Vazão	0,500 mL min^{-1}		
Gradiente	Tempo (min)	% água	% acetonitrila
	3,30	50	50
	3,35	35	65
	9,00	35	65
	11,00	10	90
Tempo de corrida	12,0 min		
Post time	2,0 min		

Quadro 2- Condições do espectrômetro de massas Agilent 6495A triplo quadrupolo para a análise de metabólitos de HPA em urina humana.

Modo de ionização	AJS ESI, negativo	
Temperatura do gás de secagem	250 °C	
Vazão do gás de secagem	19 L min ⁻¹	
Pressão do nebulizador	30 psi	
Temperatura do gás de bainha	350 °C	
Fluxo do gás de bainha	12 L min ⁻¹	
Voltagem do capilar	2500 V	
Nozzle voltage	2000 V	
Scan Type	MRM	
	Tempo (min) 0 5,1	Divert Valve MS Waste

Tabela 3- Transições e energia de colisão

Composto	Íon Precursor	Íon Produto	Energia de Colisão (V)
1-OH-naftaleno	143,05	115	29
2-OH-naftaleno	143,05	115,1	29
2-OH-Fluoreno	181,06	152,2	37
1-OH-fenantreno	193,06	165	37
3,9-OH-fenantreno	193,06	165,1	37
4-OH-fenantreno	193,06	165	37
1-OH-pireno	217,06	189,1	41
6-OH-criseno	243,08	215,1	37
3-OH-criseno-d11	254,15	226,1	41
3,9-OH-benzo(a)pireno	267,08	239	41
3-OH-benzo(a)pireno-d11	278,15	250,1	45

Uma curva analítica foi feita. Inicialmente os padrões de metabólitos, 1-OH-Naftaleno, 2-OH-Naftaleno, 1-OH-Fenantreno, 3-OH-Fenantreno, 4-OH-Fenantreno, 9-OH-Fenantreno, 2-OH-Fluoreno, 9-OH-Fluoreno, 1-OH-Pireno, 6-

OH-Criseno, 3-OH-Benzo(a)Pireno, 9-OH-Benzo(a)Pireno, 3-OH-Criseno-d11, 3-OH-Benzo(a)Pireno-d11, 1-OH-Pireno-d9 foram pesados e diluídos em 2 mL de metanol (grau HPLC) formando soluções individuais estoque com concentrações que variaram de $495 \mu\text{g mL}^{-1}$ até $1380 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir destas soluções, uma mistura de padrões de metabólitos foi feita em acetonitrila com volume final de 10 mL e concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, duas soluções intermediárias foram preparadas, a solução intermediária 1, de concentração final 25 ng mL^{-1} preparada partindo do mix de metabólitos, e a solução intermediária 2 de concentração final $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ preparada a partir da solução intermediária 1.

Nove soluções com concentrações de 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 250 e 500 ng mL^{-1} foram feitas partindo do mix de metabólitos e das soluções intermediárias 1 e 2 e armazenadas em vials âmbar para evitar degradação e mantidas a 4°C . Todas as soluções foram fortificadas com $50 \mu\text{L}$ (100 ng mL^{-1}) de padrão interno.

4.7. **Identificação e Quantificação**

Foi utilizado o método de padronização interna para quantificar os compostos de interesse. Nesse método, adiciona-se uma substância chamada padrão interno em uma quantidade constante a todas as amostras, brancos analíticos e padrões de calibração durante a análise. Posteriormente, realizou-se a calibração, que envolve a relação entre o sinal do analito e o sinal do padrão interno em função da concentração do analito nos padrões. Essa abordagem permite que a proporção entre os sinais do analito e do padrão interno seja independente de flutuações aleatórias instrumentais e/ou de método, além de compensar os efeitos da matriz, desde que os dois sinais sejam influenciados da mesma maneira por esses efeitos. Para que o padrão interno seja efetivo, é recomendado que ele possua propriedades físico-químicas similares aos analitos de interesse, tempo de retenção próximo aos analitos, não esteja presente originalmente nas amostras e não reaja com nenhum componente da matriz (Ingle; Crouch, 1988).

O padrão interno (PI) utilizado foi o 1-Fenantrol-d9. Além do padrão interno, adicionou-se às amostras padrão surrogado (PS) com a finalidade de monitorar perdas de analito ao longo do processo de preparação da amostra. Como

surrogate utilizou-se o composto 3-OH-Criseno-d11. As Figuras 7 e 8 mostram as estruturas moleculares dos padrões citados acima

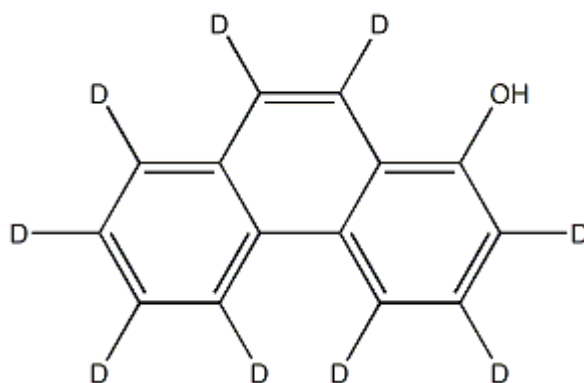


Figura 7 - Estrutura do padrão interno

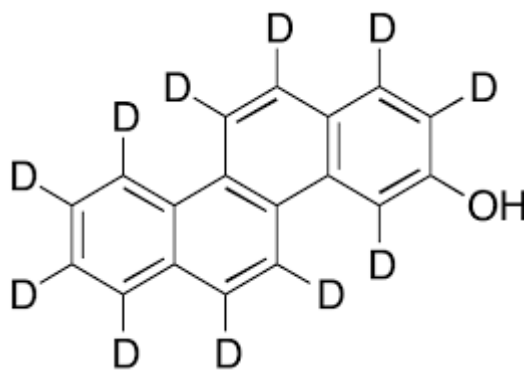


Figura 8 - Estrutura do padrão surrogado

5 Desenvolvimento de método

5.1. Linearidade, Faixa Linear de Trabalho

A capacidade dos métodos analíticos quantitativos de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo na amostra, dentro de um intervalo específico, é conhecida como linearidade. É importante destacar que a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, é válida somente em uma determinada faixa de concentração ou massa da espécie medida, a qual é denominada de faixa linear dinâmica. Essa faixa é determinada para cada técnica instrumental utilizada na análise quantitativa.

Para estimar os coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais, é comum utilizar o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados, o que resulta na equação da regressão linear, desde que o sistema seja homocedástico. Para verificar se há homogeneidade da variância dos resíduos, é realizado o teste de Cochran. Além dos coeficientes de regressão (a e b), é possível calcular o coeficiente de correlação (r) a partir dos pontos experimentais. Esse parâmetro fornece uma estimativa da qualidade da curva, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão dos dados experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Como mencionado anteriormente, embora o coeficiente de correlação linear (r) forneça uma indicação razoável da adequação da reta como modelo matemático, ele não é suficiente para uma conclusão definitiva. Por isso, é importante avaliar os resíduos, que são a diferença entre a variável resposta observada e a variável resposta estimada. Para verificar a adequação da reta, é necessário representar graficamente os resíduos e observar se há comportamento aleatório. Se houver alguma tendência no gráfico de resíduos, isso pode indicar que o modelo linear não é adequado. Além disso, a linearidade também deve ser avaliada por meio do teste F (também conhecido como F-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão, de acordo com as orientações do INMETRO (2016).

5.2. Sensibilidade

De acordo com as diretrizes do INMETRO, a sensibilidade é geralmente apresentada juntamente com o parâmetro de linearidade, que pode ser estimado a partir da equação linear da curva analítica. Em outras palavras, a sensibilidade do método pode ser inferida a partir da inclinação da reta. Portanto, se o método for mais sensível, a inclinação da reta será maior, o que indica que pequenas variações na concentração terão um efeito mais significativo na resposta (NETO; BARROS, 2005; INMETRO, 2020).

5.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, embora não necessariamente quantificada, por meio de um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). A determinação do limite de detecção em um procedimento analítico pode ser influenciada pelo tipo de amostra em questão. Por esse motivo, é crucial que todas as etapas do processo analítico sejam levadas em consideração na determinação desse limite, inclusive em ensaios qualitativos (INMETRO, 2020).

Uma das maneiras de se obter o limite de detecção é pela relação sinal/ruído. A relação sinal/ruído é uma medida que compara os sinais obtidos das amostras contendo baixas concentrações do analito com os ruídos dos brancos das amostras. A partir dessa comparação, é possível determinar a menor concentração do analito que pode ser detectada com confiança. Para a estimativa do limite de detecção, considera-se uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 como aceitável. É importante salientar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido para se obter resultados precisos e confiáveis.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis por um procedimento analítico individual (ICH, 2005). Em geral, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. Para garantir a precisão e exatidão do LQ, é necessário testá-lo com amostras independentes no mesmo nível de concentração ou propriedade. O LQ é uma medida essencial para métodos quantitativos, pois estabelece o menor nível de concentração que pode ser quantificado com confiança pelo método (INMETRO, 2020)

5.4. Precisão (Repetibilidade) e Reprodutibilidade

A precisão é uma medida da concordância entre os resultados experimentais, indicando a magnitude dos erros entre eles. Quanto menor a variabilidade entre os resultados, maior será a precisão do ensaio (Albano; Raya-Rodriguez, 2015). Tanto o INMETRO quanto a ANVISA utilizam o desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV), como medida de precisão. O DPR é obtido pela razão entre o desvio padrão (DP) e a concentração média determinada (CMD), conforme a equação apresentada abaixo (Brasil, 2003; Inmetro, 2016).

$$CV(\%) = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

A repetibilidade é um parâmetro que se relaciona com a precisão e pode ser definida como a concordância entre os resultados obtidos em medições sucessivas do mesmo método, realizadas nas mesmas condições de medição, como mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (Inmetro, 2016). Por isso, a repetibilidade envolve diversas medições da mesma amostra, em diferentes preparações, sob as mesmas condições, sendo às vezes chamada de precisão intra-ensaio ou intracorrida. A repetibilidade pode ser avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo, DPR, como descrito por Ribani et al. (2004).

5.5. Exatidão (recuperação)

Nos ensaios de recuperação, a porcentagem da quantidade da substância de interesse que pode ser extraída e quantificada é definida como recuperação, R. Essa recuperação pode ser calculada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de um padrão do composto, também conhecido como *spike* (Inmetro, 2016). Em outras palavras, a recuperação do analito é determinada através da comparação da quantidade de substância adicionada à amostra com a quantidade recuperada após a análise. Amostras que apresentaram recuperação entre 45-120% foram aceitas.

6 Resultados e discussão

6.1. Parâmetros de validação

6.1.1. Linearidade, Faixa Linear de Trabalho

Foram avaliadas as 9 curvas analíticas das 11 substâncias estudadas para verificar sua linearidade. É importante notar que os metabólitos 3-OH-Fenantreno e 9-OH-Fenantreno, bem como 3-OH-Benzo(a)Pireno e 9-OH-Benzo(a)Pireno foram quantificados juntos em uma única curva cada, já que coeluíram no mesmo pico cromatográfico. Essas substâncias são isômeros constitucionais com estruturas muito similares, o que reduz a capacidade de discriminação da fase estacionária.

O coeficiente de determinação (R-quadrado ou R^2) é uma medida que indica a proporção da variação total da variável dependente y que pode ser explicada pela variação da variável independente x. Para as 9 curvas analíticas utilizadas na quantificação dos 11 OH-HPA aqui estudados, todas apresentaram um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. Isso sugere que a reta é uma boa representação do modelo matemático.

Durante uma análise residual, é comum criar um gráfico conhecido como "gráfico de resíduos versus ajustes". Esse gráfico é construído a partir de um diagrama de dispersão, com os resíduos no eixo vertical (y) e os valores ajustados (respostas estimadas) no eixo horizontal (x). O objetivo desse gráfico é identificar possíveis padrões de não linearidade, heterogeneidade nas variâncias dos erros e valores atípicos que possam estar presentes nos dados analisados.

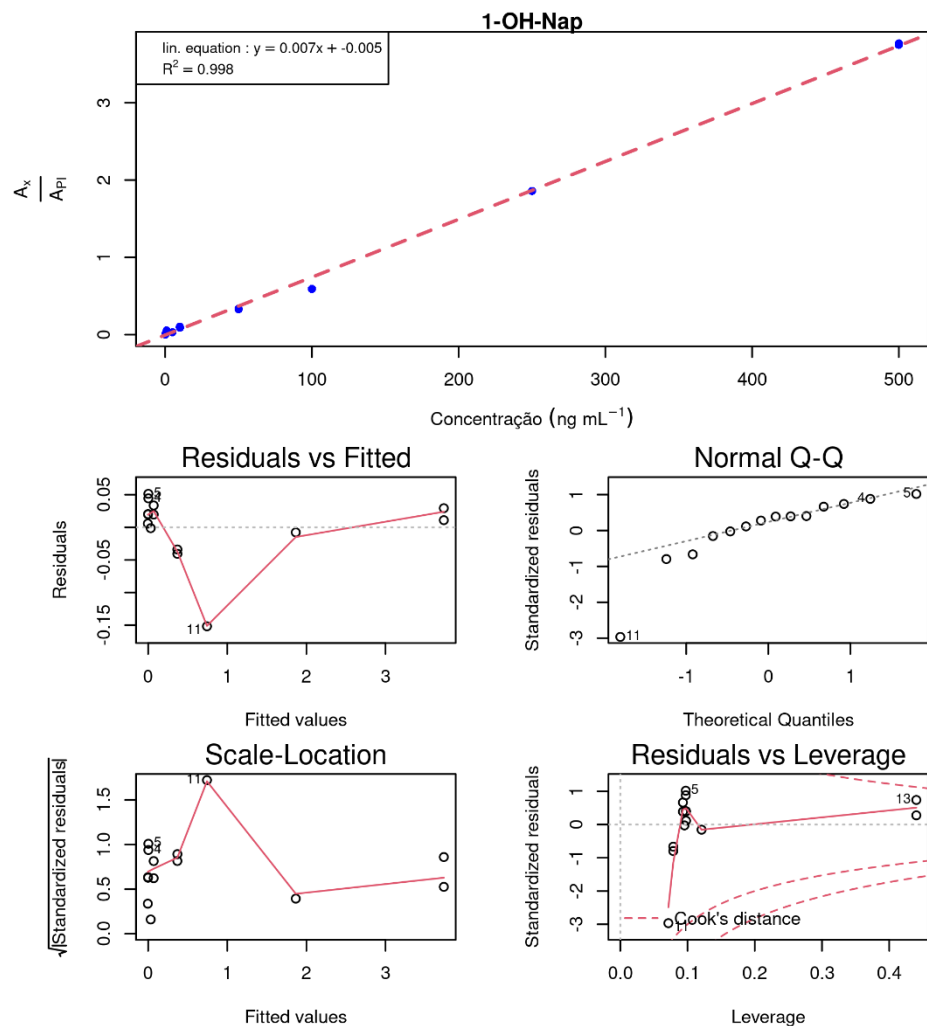
Para Ford (2015), o gráfico QQ, ou gráfico de quantis-quantis, é uma ferramenta gráfica usada para avaliar se um conjunto de dados se ajusta a uma distribuição teórica, como a normal ou exponencial. É uma forma visual de verificar se os resíduos de um modelo estatístico seguem uma distribuição esperada. Embora seja uma avaliação subjetiva e não uma prova definitiva, o gráfico QQ permite identificar rapidamente desvios do pressuposto e identificar quais pontos de dados estão contribuindo para esses desvios. Analisando gráfico QQ (figura 9), pode-se considerar que trata-se de uma distribuição normal.

Um gráfico de escala e localização é um tipo de gráfico que exibe os valores ajustados de um modelo de regressão ao longo do eixo x e a raiz quadrada

dos resíduos padronizados ao longo do eixo y. Se a linha vermelha é horizontal no gráfico. Se for, isso indica que o pressuposto de homocedasticidade é provavelmente atendido para o modelo de regressão em questão. Isso significa que a dispersão dos resíduos é aproximadamente a mesma em todos os valores ajustados (Zack, 2015).

Ademais, para Singer (2011) se não há um padrão claro nos resíduos. Em outras palavras, os resíduos devem ser dispersos aleatoriamente ao redor da linha vermelha, com uma variabilidade aproximadamente igual em todos os valores ajustados.

A figura 9, traz o gráfico da curva analítica bem como gráficos auxiliares além dos dados da regressão linear para o metabólito 1-OH-Nap. As mesmas informações para os demais metabólitos encontram-se no Apêndice



Estatística de Regressão	
R^2	0.9986
R^2 ajustado	0.9985
Erro Padrão	0.05309
Observações	12

Anova

	Regressão	Resíduo
gl	1	12
SQ	23.621	0,034
MQ	23.621	0,03
F	8379	
Pr(>F)	2×10^{-16}	

	Interseção	Variável
Coefficientes	-5.026×10^{-3}	0.016547
Erro Padrão	1.661×10^{-2}	0.000454
Valor t	-0.303	91.539
Pr(> t)	0.767	2×10^{-16}

Figura 9 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 1-OH-Nap

6.1.2.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção apresentados na Tabela 4, foram calculados a partir das menores concentrações significativamente diferentes do branco, que apresentaram uma razão sinal/ruído maior que 3. Já o limite de quantificação foi estabelecido como sendo a menor concentração na curva de calibração

Tabela 4- Limite de detecção de limite de quantificação dos metabólitos analisados

Composto	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
1-OH-naftaleno	0,025	0,50
2-OH-naftaleno	0,025	0,50
2-OH-fluoreno	0,075	5,00
1-OH-fenantreno	0,025	0,50
3+9-OH-fenantreno	0,025	0,50
4-OH-fenantreno	0,025	0,10
1-OH-pireno-d9	0,025	0,50
1-OH-pireno	0,075	0,50
3-OH-criseno-d11	0,025	0,50
6-OH-criseno	0,025	0,10
3+9-OH-benzo(a)pireno	0,025	0,50

6.1.3.

Precisão (Repetibilidade)

O estudo da repetibilidade foi realizado em 8 réplicas como mostra os dados da tabela 5. O critério de aceitação estabelecido para o coeficiente de variação (CV), seguindo as recomendações do INMETRO (2020), é de até 20 %.

Tabela 5 -Resultados de repetibilidade

	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	Média	DP ng mL ⁻¹	CV(%)
1-OH-Nap	105,4	95,9	78,8	79,8	86,4	81,2	86,0	79,4	86,6	9,5	10,9
2-OH-Nap	114,4	99,9	84,0	79,9	85,3	78,4	84,1	87,1	89,1	12,1	13,6
2-OH-Flu	121,5	107,4	93,8	90,9	103,7	96,6	102,4	117,7	104,2	11,0	10,5
1-OH-Phe	119,9	97,9	113,8	112,4	114,7	109,0	112,2	112,7	111,6	6,3	5,7
3+9-OH-Phe	95,9	105,0	104,6	103,0	105,0	103,3	106,8	98,4	102,7	3,7	3,6
4-OH-Phe	118,0	102,7	103,5	103,4	106,4	104,8	107,7	101,0	105,9	5,3	5,0
1-OH-Pyr	112,9	100,1	93,5	99,1	99,9	101,6	103,8	96,7	101,0	5,7	5,7
6-OH-Chr	118,9	99,3	96,1	97,8	108,8	108,5	105,9	96,5	104,0	8,0	7,7
3+9-OH-BaP	131,5	98,7	94,8	95,4	108,4	108,3	104,7	98,7	105,1	11,9	11,4

6.1.4. Recuperação

Para avaliar a perda durante todo processamento das amostras, um padrão surrogado foi utilizado. Obteve-se uma recuperação média de $(78 \pm 42)\%$. O EPA 8270E recomenda recuperações entre 40 e 120 %, critério também atendido no presente estudo. Considerando os parâmetros descritos acima, o método analítico foi considerado válido para a matriz em questão.

6.2. Aplicação do método cromatográfico

6.2.1. Análise comparativa entre métodos de extração

Para a análise de metabólitos de HPA em urina humana realizou-se dois tipos de extrações com a finalidade de comparar os ensaios. Para as mesmas amostras, realizou-se extração em fase sólida na PUC-Rio (SPE-PUC), extração líquido-líquido no CENPES (LLE – CENPES) e extração em fase sólida no CENPES (SPE-CENPES), utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem para identificar e quantificar os metabólitos. Para este estudo comparativo, os resultados das concentrações foram expressos em ng g⁻¹. Foram analisadas 18 amostras para extração em fase sólida e 17 para extração líquido-líquido.

É importante destacar que os experimentos foram conduzidos com as mesmas amostras em todos os três casos, com variação nos métodos de extração e nos locais em que foram realizados. Após aplicar o teste de normalidade de Shapiro-Wilk nos dados, verificou-se uma distribuição não paramétrica, uma vez que o valor de p foi inferior a 0,05.

Todos os 11 metabólitos foram analisados: 1-OH-Nap: 1-Hidroxi-naftaleno; 2-OH-Nap: 2-Hidroxi-Naftaleno; 2-OH-Flu: 2-Hidroxi-Fluoreno; 1-OH-Phe: 1-Hidroxi-Fenantreno; 3-OH-Phe: 3-Hidroxi-Fenantreno; 4-OH-Phe: 4-Hidroxi-Fenantreno; 9-OH-Phe: 9-Hidroxi-Fenantreno; 1-OH-Pyr: 1-Hidroxi-Pireno; 6-OH-Chr: 6-Hidroxi-Criseno; 3-OH-BaP: 3-Hidroxi-Benzo(a)Pireno; 9-OH-BaP: 9-Hidroxi-Benzo(a)Pireno. Como já supracitado os compostos 3-OH-Phe e 9-OH-Phe não conseguiram ser quantificados separadamente bem como o 3-OH-BaP e 9-OH-BaP.

Dentre os metabólitos quantificados, o 1-OH-Nap; 2-OH-Nap; 3/9-OH-Phe e 6-OH-Chr apareceram nos três tipos de extração. Na SPE sem purificação, o 1-OH-Nap obteve a maior mediana em relação aos demais. Enquanto a SPE com purificação não obteve mediana, de concentração mensurada, pois em 56% das amostras a concentração ficou abaixo do LQ. Para o 2-OH-Nap a SPE-CENPES também alcançou a maior mediana dentre os três. Já para 3/9-OH-Phe e 6-OH-Chr, SPE-PUC obteve a maior mediana e o 6-OH-Chr teve a menor porcentagem de concentrações abaixo do limite de detecção em relação aos demais.

Comparando-se as medianas aliadas as demais informações contidas na tabela 6, foi possível construir gráficos comparativos em *boxplot* para as extrações. A extração sem purificação demonstra maior dispersão de dados para o 2-OH-Nap. O 1-OH-Nap teve melhor distribuição, mas possui *outliers* mais acentuados e, como já mencionado acima, mais da metade dos dados não possui distribuição visto que ficaram abaixo do LQ. Já o 3/9-OH-Phe a SPE-PUC obteve maior eficácia. A figura 10 traz os gráficos em *boxplot* e a tabela 8 os resultados de cada método.

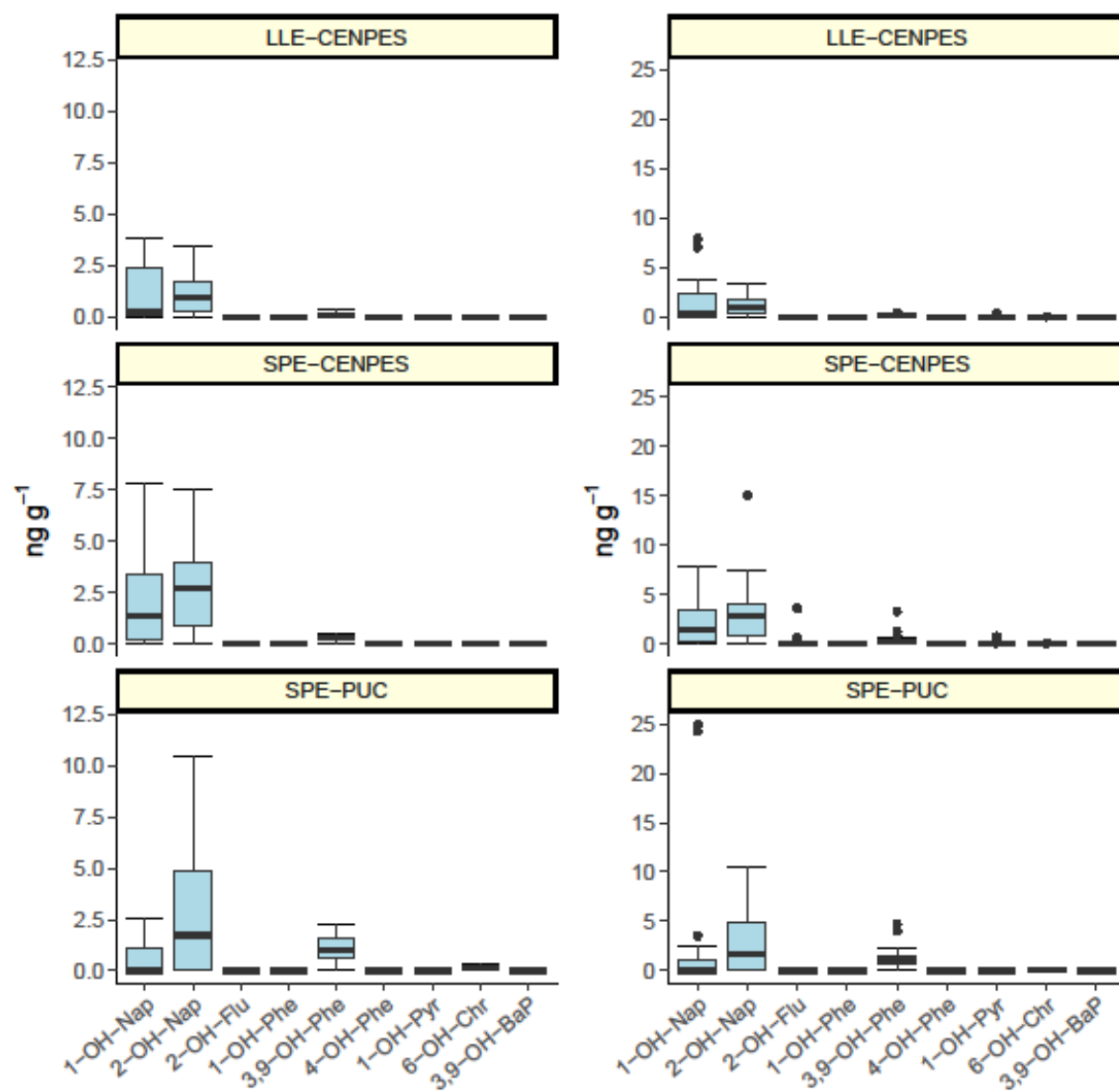


Figura 10: Gráfico comparativo em boxplot sem e com *outliers*

Tabela 6 - Estatística descritiva dos três métodos

[illegible]

Para avaliar a semelhança entre os dados obtidos a partir da SPE-PUC, SPE-CENPES e LLE-CENPES, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney pareado, comparando LLE-CENPES X SPE-PUC; SPE-CENPES X SPE-PUC; SPE-CENPES X LLE-CENPES.

Na coluna SPE-CENPES X SPE-PUC, observa-se que a diferença entre as medianas do 3,9-OH-Phe e do 6-OH-Chr são estatisticamente significativas rejeitando a hipótese nula. Em teoria não deveria haver diferença visto que as amostras são as mesmas. Entretanto, as diferenças entre as extrações em fase sólida realizadas na PUC e no CENPES, demonstram ter contribuído para algumas diferenças nos resultados. No CENPES, a massa de urina utilizada foi maior além de não ter realizado a etapa de purificação. Diferenças também foram encontradas nas extrações líquido-líquido visto que são métodos distintos. Cabe ressaltar que o teste foi realizado com amostras reais, de concentração próxima ao limite de detecção do método. Provavelmente se o estudo fosse realizado com amostras fortificadas em outro nível de concentração os resultados não indicariam diferença, principalmente entre o SPE realizado no CENPES e na PUC-Rio.

Observando a tabela 7, verifica-se que para o 6-OH-Chr, a SPE-PUC obteve uma eficiência melhor em relação a SPE-CENPES, onde 89% das amostras ficaram abaixo do limite de detecção. Dessa forma, essa diferença constatada pelo teste de Mann-Whitney pareada é explicada. O mesmo acontece com o 3,9-OH-Phe.

Tabela 7- Resultados do teste de Mann-Whitney pareado

	LLE – CENPES X SPE- PUC	SPE – CENPES X SPE – PUC	SPE-CENPES X LLE – CENPES
1-OH-Nap	0,6247	0,1842	0,3152
2-OH-Nap	0,0287	0,57	0,00294
2-OH-Flu	-	0,371	1
1-OH-Phe	-	-	-
3,9-OH-Phe	7,629x10⁻⁵	0,004	0,015
4-OH-Phe	-	-	-
1-OH-Pyr	0,1814	0,1814	0,5839
6-OH-Chr	0,001332	0,001662	0,7874
3,9-OH-BaP	-	-	-

Analisando os dados estatísticos descritivos para as três extrações, é possível observar das extrações em fase sólida, a SPE-PUC foi mais eficiente em extrair o metabólito 6-OH-Chr, enquanto a extração realizada no CENPES conseguiu mediana melhores nos metabólitos de naftaleno bem como uma porcentagem menor de amostras abaixo do LQ. As

extrações líquido-líquido feitas no CENPES apresentou maior mediana para a concentração de 3,9-OH-Phe

6.2.2.

Avaliação da comunidade Pesqueira de Canavieiras

Todas as amostras (44) de urina provenientes de uma comunidade pesqueira localizada em Canavieiras na Bahia foram analisadas com a finalidade de identificar e quantificar metabólitos de HPA. Os resultados das análises tanto em ng mL^{-1} como por ng g^{-1} são apresentados nas tabelas 8 e 9 respectivamente.

Tabela 8 - Resultados metabólitos de HPA em urina humana (ng mL^{-1})

	1-OH-Nap	2-OH-Nap	2-OH-Flu	1-OH-Phe	3,9-OH-Phe	4-OH-Phe	1-OH-Pyr	6-OH-Chr	3,9-OH-BaP
N	44	44	44	44	44	44	44	44	44
Média	3,5	2,7	5,9	<LQ	1,2	<LQ	<LQ	0,22	<LQ
Dp	9,0	4,8	39	<LQ	1,3	<LQ	<LQ	0,17	<LQ
Min	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Q1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,12	<LQ	<LQ	0,14	<LQ
Mediana	<LQ	0,51	<LQ	<LQ	0,74	<LQ	<LQ	0,17	<LQ
Q3	1,1	3,4	<LQ	<LQ	2,0	<LQ	<LQ	0,22	<LQ
Max	44	21	261	<LQ	5,4	<LQ	<LQ	0,76	<LQ
Percentual de zero	64	48	98	100	23	100	100	2,3	100

Tabela 9 - Resultados metabólitos de HPA em urina humana (ng g^{-1})

	1-OH-Nap	2-OH-Nap	2-OH-Flu	1-OH-Phe	3,9-OH-Phe	4-OH-Phe	1-OH-Pyr	6-OH-Chr	3,9-OH-BaP
N	44	44	44	44	44	44	44	44	44
Média	3,4	2,7	6,1	<LQ	1,2	<LQ	<LQ	0,22	<LQ
Dp	8,7	4,7	40	<LQ	1,3	<LQ	<LQ	0,17	<LQ
Min	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Q1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,12	<LQ	<LQ	0,13	<LQ
Mediana	<LQ	0,50	<LQ	<LQ	0,74	<LQ	<LQ	0,17	<LQ
Q3	1,1	3,4	<LQ	<LQ	1,9	<LQ	<LQ	0,21	<LQ
Max	43	21	266	<LQ	5,2	<LQ	<LQ	0,75	<LQ
Percentual de zero	64	48	98	100	23	100	100	2,3	100

É possível observar que para alguns compostos, como o 1-OH-Nap e o 2-OH-Nap, foram obtidas médias e desvios padrão significativos, enquanto para outros, como o 1-OH-Pyr e o 3,9-OH-BaP, a quantidade encontrada foi menor do que o limite de quantificação (LQ) do método utilizado. É interessante notar que para alguns compostos, como o 4-OH-Phe, a média não pôde ser calculada porque a concentração em algumas amostras foi menor do que o LQ.

O 2-OH-Flu apresentou a maior média entre os compostos analisados, com 5,9 ng mL⁻¹, entretanto, vale ressaltar que 98%, ou seja, em 43 amostras as concentrações ficaram abaixo do LQ para este metabólito. Além disso, analisando o valor máximo encontrado na tabela 8 aliado ao gráfico na imagem 11, nota-se que trata-se de um *outlier* responsável por aumentar a média que é mais sensível a valores extremos. Isto ocorre porque os dados não possuem distribuição normal. Dessa forma, a média não representa a população.

Ao analisar os valores mínimos e máximos, juntamente com as medianas, é possível obter uma visão mais completa da distribuição dos dados. Os valores mínimos representam os menores números encontrados para cada metabólito, enquanto os valores máximos indicam os maiores valores observados. Comparando-os com as medianas, podemos ter uma ideia da dispersão dos dados em torno desses pontos centrais.

Ao analisar as medianas dos metabólitos 1-OH-Nap, 2-OH-Flu, 1-OH-Phe, 4-OH-Phe, 1-OH-Pyr e 3,9-OH-BaP, percebe-se que seus valores são inferiores ao LQ. Essa constatação indica que a maioria dos valores encontrados está abaixo desse limite. Essa tendência é reforçada ao verificar o percentual de zero para os mesmos metabólitos, revelando que, com exceção do 1-OH-Nap que possui 64%, todos os demais têm 100% dos valores abaixo do LQ.

Os metabólitos 2-OH-Nap, 3,9-OH-Phe e tiveram medianas de 0,50 e 0,74 respectivamente. Avaliando os valores mínimos e máximos para estes metabólitos, nota-se que em todos os casos os valores mínimos ficaram abaixo de LQ. Os valores máximos foram 21; 5,2. Essa diferença indica uma dispersão considerável dos dados em torno da mediana, sugerindo a presença de valores mais elevados no conjunto de dados. Já o 6-OH-Chr obteve um valor mínimo abaixo do LQ, a mediana de 0,17 e valor máximo de 0,75. A discrepância entre esses valores indica uma menor dispersão dos dados em relação à mediana em comparação com os outros metabólitos discutidos anteriormente. Isso pode sugerir uma maior consistência nas concentrações encontradas para esse metabólito.

A Figura 11 apresenta um gráfico *boxplot* que mostra as concentrações encontradas, sendo uma representação visual dos dados da Tabela 8. O gráfico da esquerda não leva em consideração valores discrepantes (*outliers*), enquanto o gráfico da direita considera esses valores. É possível observar que, para os metabólitos quantificados, os valores mínimos estão abaixo do LQ. A linha dentro da caixa representa a mediana, que divide o conjunto em duas partes: 50% dos valores são iguais ou inferiores a ela, enquanto os outros 50% são iguais ou superiores.

Quando analisamos o 6-OH-Chr em relação aos demais metabólitos, é perceptível que sua visualização ficou menor devido às baixas concentrações encontradas. Essa menor variação nos valores sugere que as concentrações desse metabólito são mais uniformes em relação aos outros. Comparando os gráficos da esquerda e da direita, é possível notar que a consideração de *outliers* pode influenciar na amplitude da dispersão dos dados, afetando as informações sobre a variabilidade das concentrações.

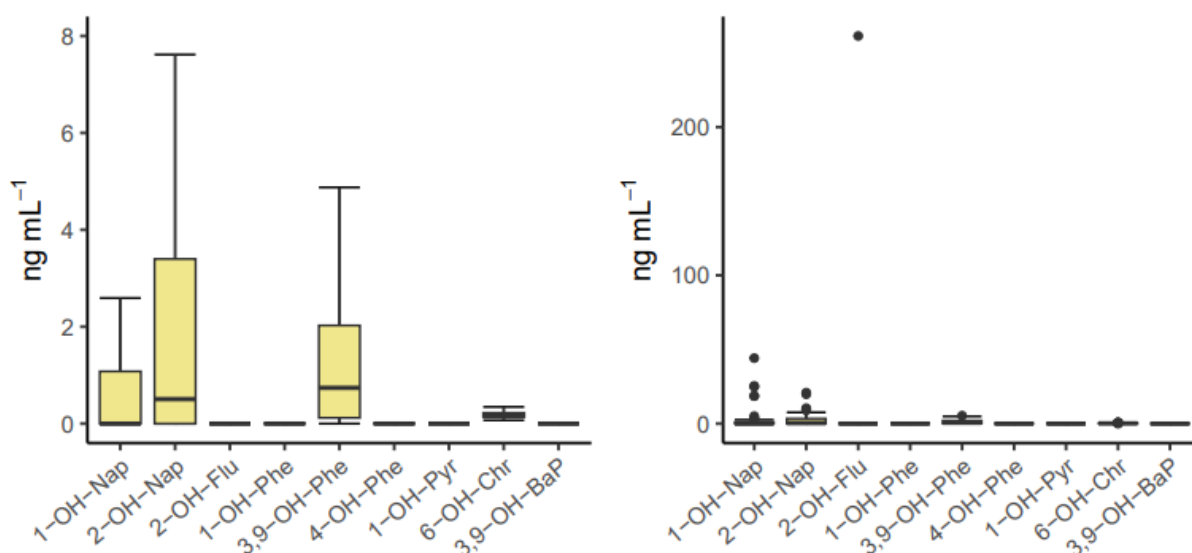


Figura 11- :Boxplot das concentrações dos metabólitos de HPA em urina humana

Outra forma de visualizar os resultados é por meio do gráfico de histograma, que relaciona o número de observações pela concentração encontrada. Dentre os onze metabólitos investigados foi possível quantificar apenas quatro: 1-OH-Nap; 2-OH-Nap; 3/9-OH-Phe (coeluíram) e 6-OH-Chr.

Observando os gráficos figura 12, verifica-se que o 2-OH-Flu teve 43 amostras com valores abaixo do limite de quantificação. Apenas uma amostra apresentou este metabólito

numa concentração bem discrepante em relação as demais. Os metabólitos os compostos 1-OH-Phe, 4-OH-Phe, 1-OH-Pyr e 3/9-OH-BaP apresentaram Limites de Quantificação (LQ) de 0,50, 0,10, 0,50 e 0,50, respectivamente. Ao analisar o gráfico de concentrações no eixo x e o número de observações no eixo y, podemos observar que todas as amostras apresentaram concentrações inferiores aos respectivos LQs, em 100% dos casos.

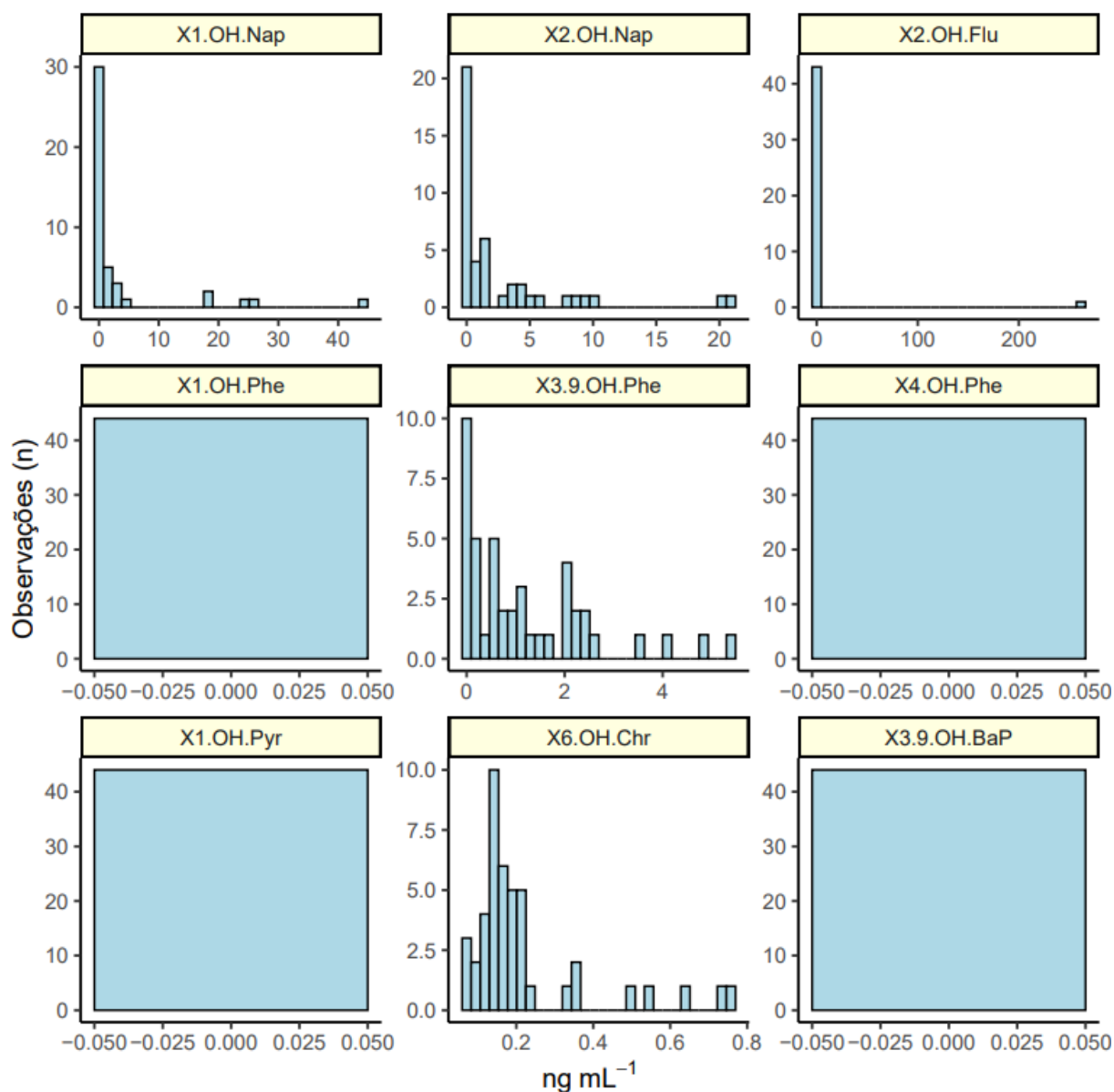


Figura 12--Histogramas do número de observações pela concentração encontrada

Para efetuar a comparação dos resultados obtidos neste estudo foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos selecionados cuja análise instrumental baseou-se em HPLC-MS/MS e extração em fase sólida. Os limites de detecção e quantificação para os mesmos metabólitos estabelecidos neste trabalho também foram comparados (Tabela 11). Seis trabalhos, foram selecionados: (Huang et al., 2022; Ramsauer et al., 2011; Nguyen et al., 2022; Raponi, et. al 2016; Fernández et al., 2021; Onyemauwa et al., 2009).

Resultados obtidos por Huang et al. (2022) e Nguyen et al. (2022), Raponi, et al. (2016), demonstram que o hábito de fumar dos participantes e o excesso de veículos em áreas urbanas, são fatores determinantes para a predominância de metabólitos de naftaleno. Ramsauer et al., (2011) aponta que mulheres que consumiam mais óleos e gorduras tinham níveis de OH-NAPs mais elevados na urina, e que os níveis de OH-NAPs e 1-OH-PYR estavam positivamente relacionados com o consumo de peixe defumado. Os trabalhos citados anteriormente e apresentados na Tabela 10 levam em consideração alguns dos seguintes aspectos referentes aos participantes: idade, gênero, peso, hábitos de fumo, região onde reside, consumo de álcool e ocupação, uma vez que são fatores que influenciam a exposição humana aos HPA.

Como mencionado no item 4.4, os participantes desta pesquisa não fumam e são provenientes de uma comunidade pesqueira o que pode indicar uma menor incidência de tráfego urbano. Entretanto, os moradores possuem o hábito de utilizarem fogões à lenha para cozinhar no dia a dia.

O estudo de Huang et al. (2022) registrou concentrações mais elevadas dos metabólitos 1-OH-Nap e 2-OH-Nap em comparação com o presente trabalho. Essa diferença foi atribuída à presença de participantes que fumavam, além do impacto adicional do tráfego veicular. Já o estudo de Ramsauer et al. (2011) apresentou resultados que incluíram tanto participantes fumantes quanto não fumantes (Anexo I). Os valores apresentados na tabela 10 referem-se especificamente aos participantes não fumantes.

É interessante observar que os metabólitos de naftaleno também apresentaram concentrações mais elevadas, mesmo entre os participantes não fumantes comparando-se com os demais metabólitos. No entanto, as concentrações foram significativamente maiores nos participantes fumantes, alcançando $4,26 \text{ ng mL}^{-1}$ para o 1-OH-Nap e $8,47 \text{ ng mL}^{-1}$ para o 2-OH-Nap. Comparando esses valores com as concentrações de não fumantes relatadas por Ramsauer et al. (2011) e com os resultados deste trabalho, é possível concluir que há uma baixa concentração desses metabólitos entre os moradores da comunidade de Canavieiras.

Os resultados apresentados por Ramsauer et al. (2011) para os fenantrenos, especificamente para o 4-OH-Phe, mostram que os níveis foram semelhantes tanto nos fumantes quanto para os não fumantes, além de apresentarem a concentração mais baixa entre todos os OH-PAH medidos. Para este trabalho o 3,9-OH-Phe apresentou uma concentração maior o que pode ser advinda tanto do contato do óleo cru como por exposição durante o preparo de alimento em forno a lenha.

Raponi et al. (2016) também obteve resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. Em sua pesquisa, eles investigaram os efeitos do tabagismo em três grupos distintos: fumantes, ex-fumantes e não fumantes. Os resultados revelaram que o tabagismo foi um fator determinante nas concentrações mais elevadas dos metabólitos 1-OH-Nap, 2-OH-Nap e 1-OH-Pyr, como indicado na tabela presente no Anexo II.

Ao compararmos os resultados específicos dos participantes não fumantes (tabela 10), observamos que o presente estudo apresentou uma concentração mais elevada para o metabólito 1-OH-Nap, enquanto Raponi et al. (2016) encontrou um valor superior para o metabólito 2-OH-Nap.

Apesar dos valores encontrados neste trabalho estarem alinhados com os da literatura, no que se refere a qual metabólito foi encontrado em maior concentração, uma diferença fica evidente: neste trabalho o 6-OH-Chr obteve uma frequência de detecção (FD) de 98% enquanto no único trabalho em que é possível comparar, Huang et al. (2022), a FD foi de 47%. É interessante visto que esse metabólito é considerado de alta massa molecular, sua rota de excreção geralmente ocorre por meio das fezes (Ramesh et al., 2004). O que pode ser justificado uma vez que os moradores da região utilizam fogão à lenha para cozinhar e o 6-OH-Chr é um metabólito de alto peso molecular sendo o seu precursor, o criseno, mais abundante na combustão incompleta da matéria orgânica do que em fontes petrogênicas. Isto aponta sobreposição de exposição ao óleo proveniente do derrame.

Tabela 10 - Concentrações reportadas nestes e em outros trabalhos

Referência	Concentração de OH-HPA (ng mL ⁻¹)									Extração
	1-OH-Nap	2-OH-Nap	2-OH-Flu	1-OH-Phe	3+9-OH-Phe	4-OH-Phe	1-OH-Pyr	6-OH-Chr	3+9-OH-BaP	
Este trabalho ^a	3,5	2,7	5,9	<LQ	1,2	<LQ	<LQ	0,22	<LQ	SPE
(Huang et al., 2022) ^a	4.67	9.19	1.39	0.27	0.70	0.39	0.53	0.31	0.16	SPE
(Ramsauer et al., 2011) ^a	0.42	2.15	0.212	0.187	0.073	0.033	0.0639	-	-	SPE
(Nguyen et al., 2022) ^b	0.769	3.78	0.318	0.205	0.180	0.032	0.484	-	-	SPE
Raponi, F. et. al (2016) ^a	1.058	6.14	-	-	-	-	0.12	-	0.009	SPE
(F. Fernández et al., 2021) ^b	0.8	7.1	7.1	0.14	0,09/0,08	0,04	0.12	-	N/D	SPE
(Onyemauwa et al., 2009) ^b	2.18	3.08	0.60	0.07	0.985	N/D	N/D	N/D	N/D	SPE

a Concentração média; b Média geométrica. N/D- não detectado

Tabela 11 - limites de detecção reportados em outros trabalhos

Referência	Limites de Detecção (ng mL ⁻¹)									
	1-OH-Nap	2-OH-Nap	2-OH-Flu	1-OH-Phe	3-OH-Phe	4-OH-Phe	9-OH-Phe	1-OH-Pyr	3-OH-BaP	6-OH-Chr
Este trabalho	0,025	0,025	0,075	0,025	0,025	0,025	0,025	0,075	0,025	0,025
S. Huang et. Al	0,05	0,01	0,003	0,011	0,005	0,007	0,011	0,002	0,002	0,006
B. Ramsauer et al. (2011)	0,03	0,01	0,02	0,01	0,002	0,001	0,01	0,007	-	-
K. Nguyen et al. (2022)	0,018	0,013	0,00764	0,020	0,011	0,012	-	0,018	-	-
Raponi, F. et. al (2016)	0,0066	0,029	-	-	-	-	-	0,00079	0,00013	-

7.

Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, foi possível identificar e quantificar quatro metabólitos de HPA em urina humana de voluntários de uma comunidade pesqueira em Canavieiras na Bahia atingida pelo derrame de óleo em 2019. Os metabólitos foram identificados e quantificados para fim de análise das concentrações em virtude da possibilidade de efeitos toxicológicos sobre os voluntários.

A metodologia analítica implementada neste trabalho com a determinação simultânea de quatro HPA através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS) forneceu informação analítica confiável para a identificação e quantificação destes compostos.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura é possível averiguar que os participantes da comunidade de Canavieiras não apresentam valores de concentrações altas de metabólitos de HPA.

Considerando os malefícios que HPA podem causar não somente à saúde humana como ao ambiente, este trabalho reforça a importância de continuar os estudos neste escopo. Os dados deste trabalho servirão como base para estudos futuros para que tenha-se uma maior compreensão sobre o impacto do derrame de óleo cru acontecido em 2019 que afetou o nordeste Brasileiro.

8 Referências

- AGUILERA, F.; MÉNDEZ, J.; PÁSAROA, E.; LAFFONA, B. **Review on the effects of exposure to spilled oils on human health.** *Journal of Applied Toxicology*, 30(4), 291–301, 2010. <https://doi.org/10.1002/jat.1521>.
- ALOMIRAH, H.; AL-ZENKI, S.; ZAGHLOUL, S.; SAWAYA, W.; AHMED, N. **Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods.** *Food Control*. 22. 2028-2035, 2011. 10.1016/j.foodcont.2011.05.024.
- ANDRADE, F. M.; FARIAS, C. R.; LOPES, G. A. A. P.; SILVA, V. B. M. **Derrame de óleo em águas brasileiras: impactos, legislação e mitigação.** Disponível em: [Pantheon: Derrame de óleo em águas brasileiras: impactos, legislação e mitigação \(ufri.br\)](http://Pantheon: Derrame de óleo em águas brasileiras: impactos, legislação e mitigação (ufri.br)), 2005. Acesso em: 25 jun. 2022.
- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. **A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation.** In *Egyptian Journal of Petroleum* (Vol. 25, Issue 1, pp. 107–123). Egyptian Petroleum Research Institute 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- BANSAL, V., KUMAR, P., KWON, E. E., & KIM, K. H. **Review of the quantification techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food products.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3297–3312, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1116970>.
- DEARNLEY, J. M., KILLEEN, C., DAVIS, R. L., PALACE, V. P., & TOMY, G. T. **Monitoring polycyclic aromatic compounds exposure in fish using biliary metabolites.** In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 475–519), 2022. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1825895>.
- EWA, B., & DANUTA, M. Š. **Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts.** In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 58, Issue 3, pp.

321–330). Springer Verlag, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>.

FERNÁNDEZ, F. S. et al. **Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine of lactating mothers: Urinary levels, association with lifestyle factors, and risk assessment.** *Environmental Pollution*, 268, 20251. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115646>.

FORD, C. **Understanding Q-Q Plots | University of Virginia Library Research Data Services + Sciences**, 2015. Disponível em: <<https://data.library.virginia.edu/understanding-q-q-plots/>>. Acesso em: 25 ju, 2022.

GUENGERICH, F. P. **Cytochrome P450 and chemical toxicology.** In *Chemical Research in Toxicology*, 2008. (Vol. 21, Issue 1, pp. 70–83). <https://doi.org/10.1021/tx700079z>.

GUO. Y, et al. Concentrations and profiles of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAHs) in several Asian countries. *Environ Sci Technol*, 2013. 2013;47(6):2932-2938. doi:10.1021/es3052262

GUPTA, M. K. et al. **Determination of Urinary PAH Metabolites Using DLLME Hyphenated to Injector Port Silylation and GC-MS-MS**, 2015. *Journal of analytical toxicology*, 39(5), 365–373. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv023>.

HOPPE-JONES, C. et al. **“Evaluation of fireground exposures using urinary PAH metabolites.”** *Journal of exposure science & environmental epidemiology* vol. 31,5 (2021): 913-922. doi:10.1038/s41370-021-00311-x

HOSEINI, M. et al. **Environmental and lifestyle factors affecting exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the general population in a Middle Eastern area**, *Environ. Pollut.* 240, 781–792. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.077>. 2018.

HUANG, S. et al. **Urinary monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in the general population from 26 provincial capital cities in China: Levels, influencing factors, and health risks.** *Environment International*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107074>. 2022.

HUO. X, et al. **Maternal urinary metabolites of PAHs and its association with adverse birth outcomes in an intensive e-waste recycling**

area. *Environ Pollut.* 2019;245:453-461. doi:10.1016/j.envpol. 2018. 10.098.

İÇLİ, N., KAYAALTI, Z., & SÖYLEMEZOĞLU, T. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine of coke oven workers in Turkey and exposure assessment**, 2021. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 103(2), 219-235.

HUSSAIN, K. et al. **Monitoring and Risk Analysis of PAHs in the Environment.** In *Handbook of Environmental Materials Management* (pp. 1–35). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_29-2. 2018.

IARC (International Agency Research on Cancer). **Agents classified by the IARC monographs** (2012). <http://Monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Index.Php>, 1–104.

LI, C. et al. **An Integrated Ultrasonic Extraction and Cleanup Procedure for Determining PAHs and NPAHs in Ambient Air Particulates.** *Chromatographia*, [s. l.], v. 80, n. 9, p. 1433–1445, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3360-9>.

LOPES, W. A. & ANDRADE, J. B., 1996. **Fonte, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera.** *Química Nova*, 19:497-516.

LIU, Y., ZHU, L., & SHEN, X. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, China.** *Environmental Science and Technology*, 35(5), 840–844. <https://doi.org/10.1021/es001354t>. 2001.

MARLOW, M., & HURTUBISE, R.J. **Liquid-liquid-liquid microextraction for the enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites investigated with fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis**, 2004. *Analytica Chimica Acta*, 526, 41-49.

MARQUES, M. ET AL. **Simultaneous analysis of PAH urinary mono- and dihydroxylated metabolites by GC-MS-MS following SPE and two-stage derivatization.** *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413(27):6823-6835. doi:10.1007/s00216-021-03638-4.

MARTINEFSKI, M. et al. **Supramolecular solvent-based high-throughput sample treatment platform for the biomonitoring of PAH metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Chemosphere.* 2019 Dec;237:124525. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124525. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31549648.

MEIRE, R. O. et al. **Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. Oecologia Brasiliensis. 2007. ISSN 1981-9366, Vol. 11, Nº. 2, 2007, pags. 188-201. 11. 10.4257/oeco.2007.1102.03.

MOORTHY, B.; CHU, C.; CARLIN, D. J. **Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer**. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, [s. l.], v. 145, v. 2015/04/23, n. 1, p. 5–15, 2015. Disponível em: [Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25711102/). Acesso em: 20 jun. 2022.

MOTORYKIN, O. et al. **Metabolism and excretion rates of parent and hydroxy-PAHs in urine collected after consumption of traditionally smoked salmon for Native American volunteers**. *Sci Total Environ*. 2015 ;514:170-177. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.01.083.

NGUYEN, K. et al. (2022). **Improvement on recovery and reproducibility for quantifying urinary mono-hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs)**. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1192. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123113>. 2022.

OHURA, T. et al. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor Environments and Factors Affecting Their Concentrations**. *Environmental Science and Technology*, 38(1), 77–83. <https://doi.org/10.1021/es030512o>. 2004.

ONYEMAUWA, F. et al. **Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine**. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009. 877(11–12), 1117–1125. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.067>.

PAGE, D.S. et al. **Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska**. *Marine Pollution Bulletin*, 1999. v. 38, p. 247-266, 1999.

PATEL, A. B. et al. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches**. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>. 2011.

PENA, P. G. L. et al. **Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão**. *Cadernos de*

saude publica, 36(2), e00231019, 2020. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019> .

PITOMBO, J. P.; VALADARES, J. **Voluntários relatam intoxicação após manuseio de óleo nas praias**. Folha de S. Paulo, 2019. Disponível em: <https://t.co/mX2FeK0S0b> . Acesso em: 01 fev. 2023.

QUEIROZ, M. S. M. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Sedimentos de Fundo do Estuário do Rio Potengi, Região da Grande Natal (RN): Implicações Ambientais**. Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Petróleo – Ppgcep, 114. 2011.

RAMESH, A. et al. **Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. *International Journal of Toxicology*, 23(5), 301–333, 2004. doi:10.1080/10915810490517063. 2004.

RAMSAUER, B. et al. **A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 399(2), 877–889. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4355-7>.

RUDDOCK, P. J., BIRD, D. J., & MCCALLEY, D. V. **Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the severn estuary.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51(2), 2002. 97–105. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2131>.

SANTOS, P. M. et al. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples: A critical review**. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2019 (Vol. 113, pp. 194–209). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.010>.

SINGER, J. **Residual analysis for linear mixed models**. [s.l: 20--?]. Disponível em: <<https://www.ime.usp.br/~jmsinger/MAE0610/Mixedmodelresiduals.pdf>>.

Acesso em : 30 nov. 2023.

SOUZA, M. C. O. et al. **Potential health risk to brazilian infants by polybrominated diphenyl ethers exposure via breast milk intake**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19 (17), 2022. 1-11. doi:10.3390/ijerph191711138

SUN, Y.; WU, S.; GONG, G. **Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A 20-year perspective from 1997 to 2017.** TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, v. 83, p. 86–98, 2019.

TEIXEIRA, E. C. et al. **Study of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in fine and coarse atmospheric particles.** *Atmospheric Research* 101(3), 631–639, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2011.04.010>.

THAI, P. K. et al. **Analysis of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and cotinine in pooled urine samples to determine the exposure to PAHs in an Australian population,** 2020. *Environmental research*, 182, 109048.

ZACH. **How to Interpret a Scale-Location Plot (With Examples).** 2015

Disponível em: <<https://www.statology.org/scale-location-plot/>>. Acesso em: 08 dez 2022

ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. **The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review.** *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(2–4), 248–284 2015. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918550>.

ZHENG, J.H. et al. 2018. **Heavy exposure of waste collectors to polycyclic aromatic hydrocarbons in a poor rural area of middle China.** *Environ. Sci. Technol.* 52 (15), 8866–8875, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02024>.

Anexo

Anexo I – Níveis de excreção de metabólitos de HPA reportados por Ramsauer et al. (2011)

		Non-smokers	Smokers
<i>N</i>		50	100
Age (years)		46.1±15.8, 42 (22–77)	37.8±11.5***, 35 (22–68)
Gender (% males/females)		48/52	48/52
24-h urine volume (mL/24 h)		1923±1184, 1715.5 (559–7404)	1956±1015, 1748 (412–5853)
Cigarettes/d		–	17.5±6.0, 17 (5–32), (<i>N</i> =99)
1-OH-Nap	(ng/mL)	0.42±0.45, 0.26 (0.08–2.75)	4.26±2.55***, 3.51 (0.48–15.48)
	(µg/24 h)	0.71±0.80, 0.43 (0.08–5.28)	7.02±4.10***, 6.56 (0.74–23.27)
2-OH-Nap	(ng/mL)	2.15±2.58, 1.335 (0.25–12.84)	8.47±5.25***, 6.84 (1.57–26.19)
	(µg/24 h)	3.32±3.65, 2.12 (0.51–20.63)	13.92±7.46***, 12.73 (3.33–40.18)
2-OH-Flu	(ng/mL)	0.212±0.128, 0.18 (0.06–0.63)	1.555±1.044***, 1.233 (0.27–5.68)
	(µg/24 h)	0.344±0.179, 0.30 (0.09–0.89)	2.527±1.358***, 2.490 (0.48–6.86)
1-/9-OH-Phe	(ng/mL)	0.1877±0.1828, 0.1495 (0.030–1.195)	0.3330±0.1846***, 0.296 (0.072–1.192)
	(µg/24 h)	0.2759±0.1371, 0.2596 (0.059–0.828)	0.5609±0.2534***, 0.554 (0.074–1.333)
2-OH-Phe	(ng/mL)	0.0495±0.0361, 0.0425 (0.013–0.210)	0.0681±0.0402**, 0.0585 (0.014–0.295)
	(µg/24 h)	0.0765±0.0325, 0.0736 (0.022–0.171)	0.1154±0.0588***, 0.1105 (0.016–0.342)
3-OH-Phe	(ng/mL)	0.0731±0.0670, 0.058 (0.015–0.445)	0.1267±0.0679***, 0.112 (0.029–0.427)
	(µg/24 h)	0.1115±0.0534, 0.107 (0.030–0.261)	0.2136±0.1012***, 0.204 (0.047–0.638)
4-OH-Phe	(ng/mL)	0.0327±0.0330, 0.021 (0.001–0.172)	0.0329±0.0212, 0.028 (0.008–0.131)
	(µg/24 h)	0.0527±0.0496, 0.035 (0.002–0.211)	0.0548±0.0257, 0.0539 (0.003–0.131)
1-OH-Pyr	(ng/mL)	0.0639±0.0588, 0.0505 (0.017–0.380)	0.1602±0.0919***, 0.1455 (0.032–0.584)
	(µg/24 h)	0.1016±0.0781, 0.0870 (0.021–0.520)	0.2692±0.1379***, 0.2525 (0.047–0.642)

Statistically significant difference between smokers and non-smokers: ***p*<0.01, ****p*<0.001

Anexo II – Níveis de excreção de metabólitos de HPA reportados por Raponi et al. (2016)

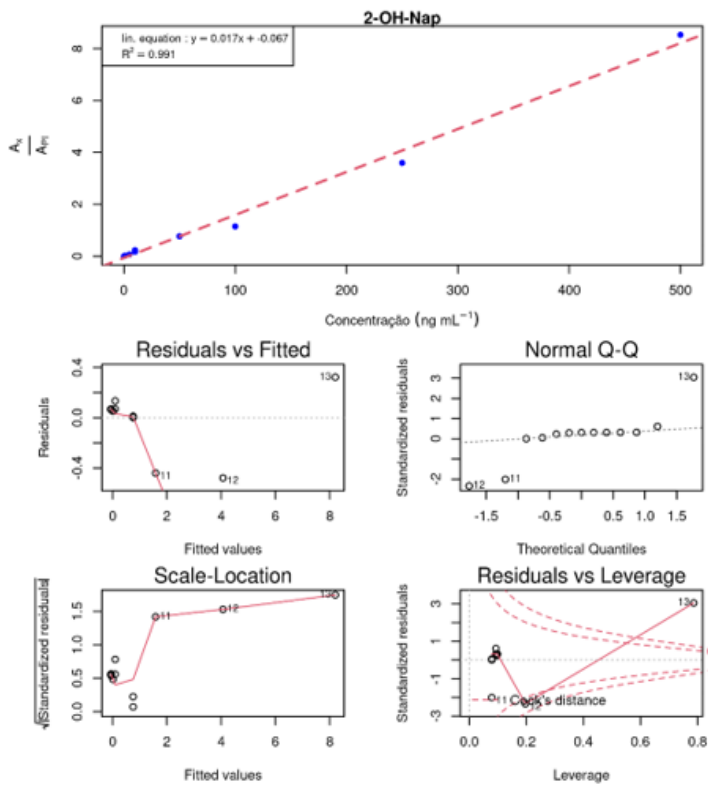
Todos os participantes n=200					
nmol/L	1-OH-NAP	2-OH-NAP	1-OHPYR	6-OH-NPY	3-OH-BaP
Média(dp)	10.34(20.14)	29.20 (48.31)	0.43 (0.49)	0.06 (0.10)	0.03 (0.05)
Mediana	2.27	15.52	0.28	0.04	0.01
Min-Max	<LOQ-148.9	<LOQ-491.08	<LOQ-4.95	<LOQ-0.91	<LOQ-0.39
Fumantes n=39					
nmol/L	1-OH-NAP	2-OH-NAP	1-OHPYR	6-OH-NPY	3-OH-BaP
Média(dp)	31.92(29.98)	60.04 (58.24)	0.71 (0.55)	0.05 (0.07)	0.04 (0.07)
Mediana	23.62	48.67	0.56	0.06	0.01
Min-Max	1.62-148.9	5.54-278.83	0.15-2.53	<LOQ-0.37	<LOQ-0.39
Não-fumantes n=97					
nmol/L	1-OH-NAP	2-OH-NAP	1-OHPYR	6-OH-NPY	3-OH-BaP
Média(dp)	3.37(5.17)	19.58 (21.34)	0.39 (0.55)	0.07 (0.11)	0.03 (0.04)
Mediana	1.74	11.35	0.25	0.06	0.01
Min-Max	<LOQ-37.29	<LOQ-98.26	0.07-4.95	<LOQ-0.91	<LOQ-0.96
Ex-fumantes n= 64					
nmol/L	1-OH-NAP	2-OH-NAP	1-OHPYR	6-OH-NPY	3-OH-BaP
Média(dp)	7.75(18.15)	25(62.31)	0.31 (0.25)	0.05 (0.09)	0.03 (0.04)
Mediana	2.10	13.38	0.26	0.04	0.01
Min-Max	<LOQ-116.53	<LOQ-491.08	<LOQ-1.65	<LOQ-0.67	<LOQ-0.19

Anexo III – Níveis de excreção de metabólitos de HPA reportados por Onyemauwa et al (2009)

Analyte	Controls (<i>n</i> = 27)	Steel workers ^b (<i>n</i> = 57)
1-OHNAP	2.18 ± 4.38	7.39 ± 2.51
2-OHNAP	3.08 ± 4.27	7.12 ± 2.73
2-OHFLU	0.600 ± 3.94	4.11 ± 2.85
1-OHPHE	0.068 ± 5.25	0.397 ± 2.84
(2 + 3)-OHPHE ^c	0.249 ± 2.79	0.980 ± 2.36
4-OHPHE	0.029 ± 4.09	0.138 ± 3.17
9-OHPHE	0.095 ± 4.26	0.437 ± 2.87
1-OHPYR	0.104 ± 4.81	0.586 ± 3.04

Apêndices

Apêndice 1 - Resultados obtidos no *Software R* para análise de dados por regressão para o 2-OH-Nap

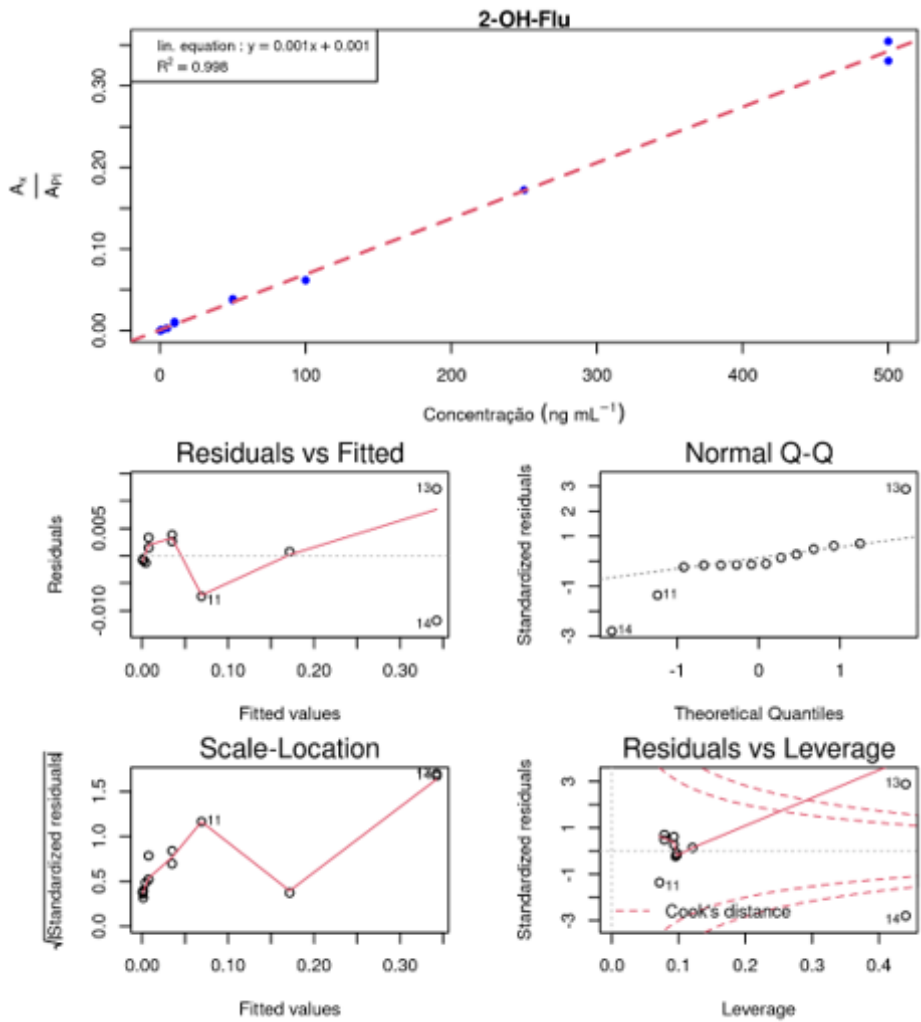


Estatística de Regressão	
R ²	0,9918
R ² ajustado	0,991
Erro Padrão	0,2289
Observações	12

Anova		
	Regressão	Resíduo
gl	1	12
SQ	23,621	0,034
MQ	23,621	0,03
F	8379	
Pr(>F)	2x10 ⁻¹⁶	

	Interseção	Variável
Coefficientes	-0,067419	0,016547
Erro Padrão	0,072090	0,000454
Valor t	-0,935	36.445
Pr(> t)	0,37	8x10 ⁻¹³

Apêndice 2 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 2-OH-Flu



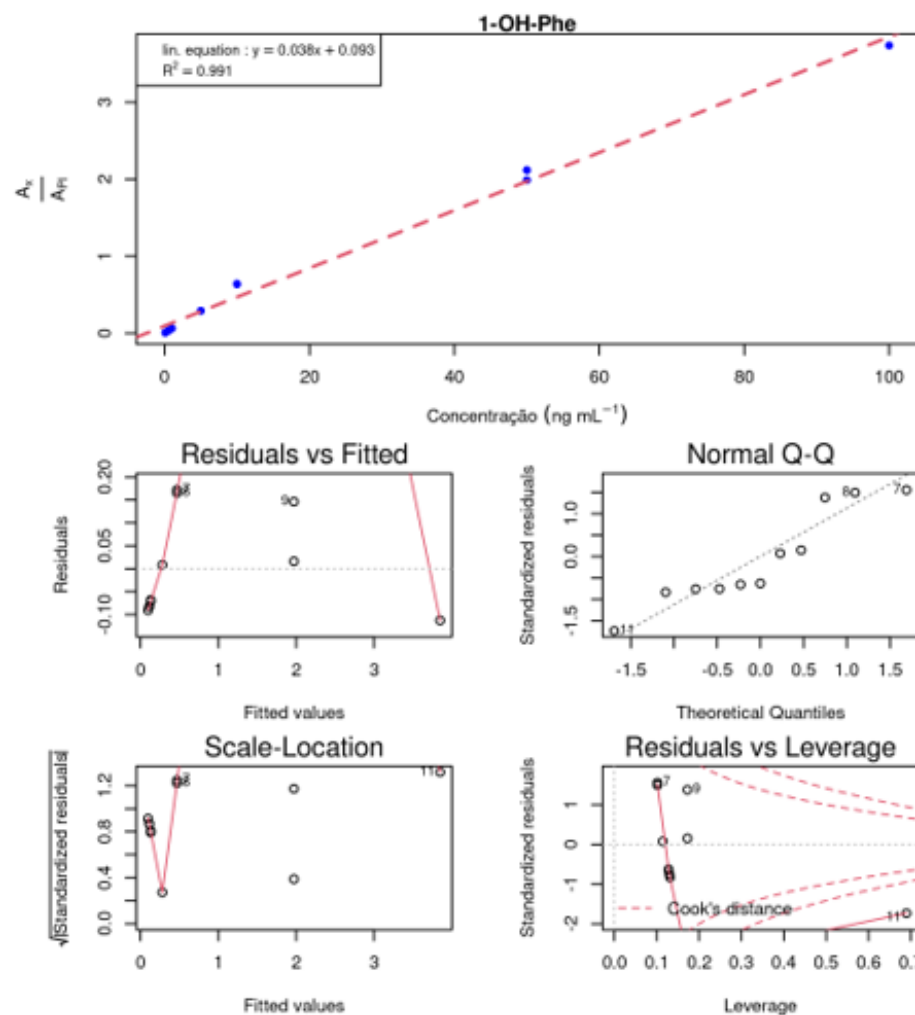
Estatística de Regressão	
R ²	0,9981
R ² ajustado	0,9979
Erro Padrão	0,0065
Observações	12

Anova

	Regressão	Resíduo
gl	1	12
SQ	23.621	0,034
MQ	23.621	0,03
F	8379	
Pr(>F)	2x10 ⁻¹⁶	

	Interseção	Variável
Coefficientes	7,862x10 ⁻⁴	6,837x10 ⁻⁴
Erro Padrão	1,768x10 ⁻³	8,702x10 ⁻⁶
Valor t	0,445	78.573
Pr(> t)	0,664	2x10 ⁻¹⁶

Apêndice 3 - Resultados obtidos no *Software R* para análise de dados por regressão para o 1-OH-Phe

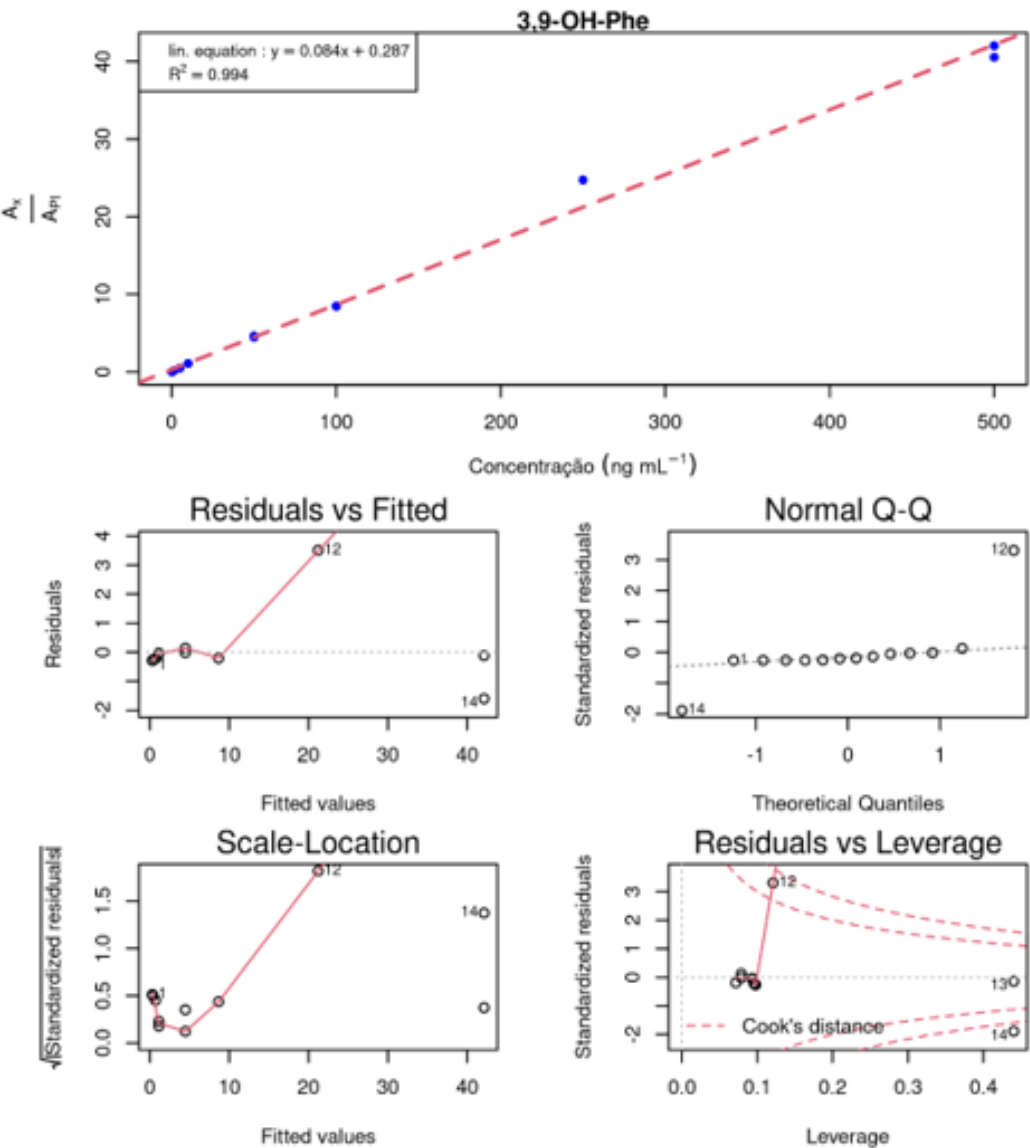


Estatística de Regressão	
R^2	0,9918
R^2 ajustado	0,9909
Erro Padrão	0,1169
Observações	9

Anova	Regressão	Resíduo
gl	1	9
SQ	14,804	0,123
MQ	14,804	0,014
F	1084	
Pr(>F)	$1,08 \times 10^{-10}$	

	Interseção	Variável
Coefficientes	0,093393	0,037554
Erro Padrão	0,042438	0,001141
Valor t	2,201	32,924
Pr(> t)	0,0553	$1,08 \times 10^{-10}$

Apêndice 4 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 3,9-OH-Phe

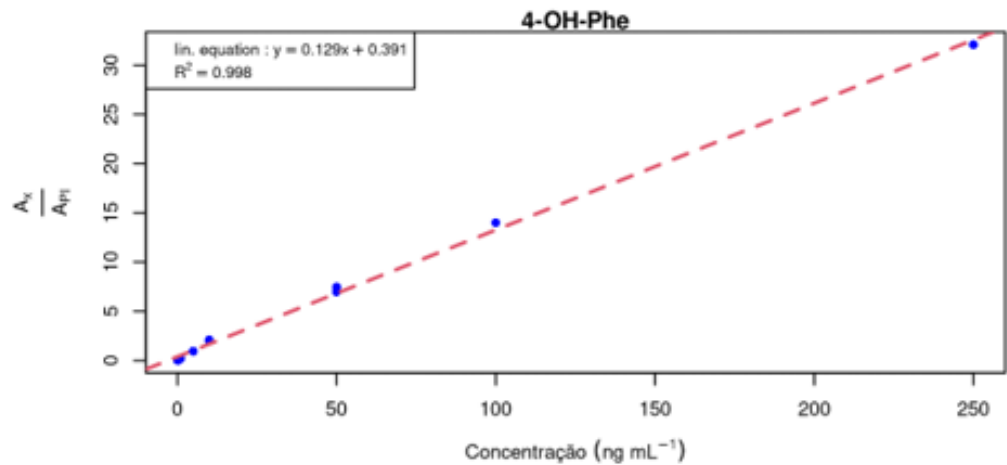


Estatística de regressão	
R ²	0,9948
R ² ajustado	0,9944
Erro padrão	1,133
Observações	12

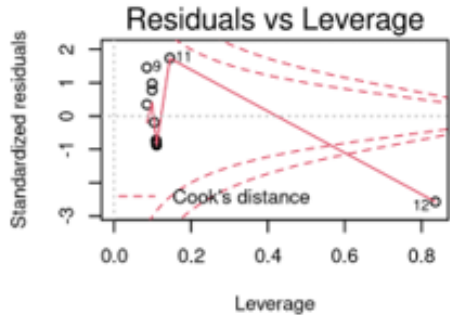
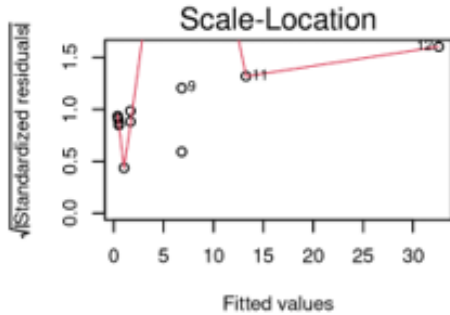
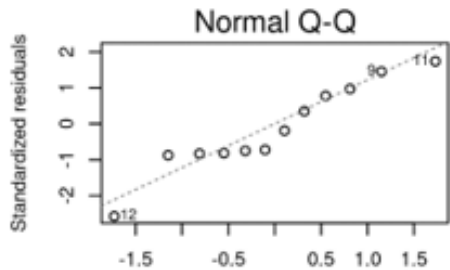
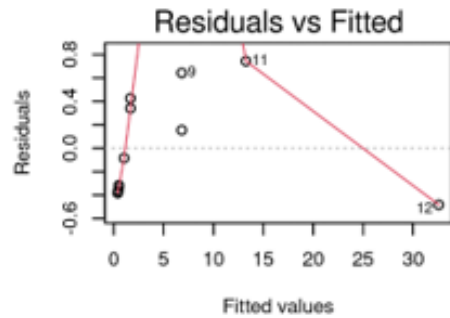
Anova	Regressão	Resíduo
gl	1	12
SQ	2954,5	15,4
MQ	2954,5	1,3
F	2302	
Pr(>F)	4,393x10 ⁻¹⁵	

	Interseção	Variável
Coefficientes	0,286598	0,083706
Erro Padrão	0,354380	0,001745
Valor t	0,809	47,983
Pr(> t)	0,434	4,39x10 ⁻¹⁵

Apêndice 5 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 4-OH-Phe



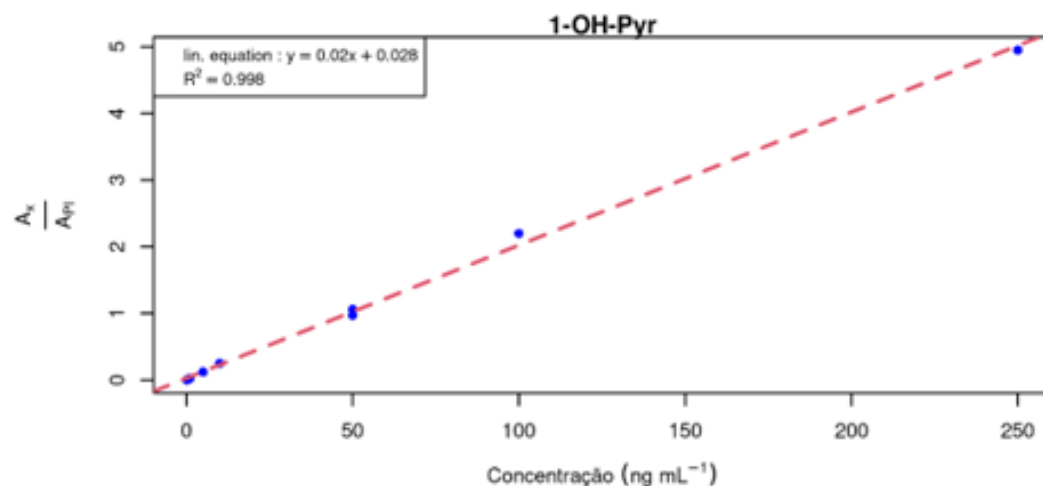
Estatística de regressão	
R^2	0,9978
R^2 ajustado	0,9976
Erro padrão	0,4632
Observações	10



Anova		
	Regressão	Resíduo
gl	1	10
SQ	972,7	2,1
MQ	972,7	0,2
F	4533	
Pr(>F)	$1,27 \times 10^{-14}$	

	Interseção	Variável
Coefficientes	0,390573	0,128750
Erro Padrão	0,153903	0,001912
Valor t	2,538	67,328
Pr(> t)	0,0295	$1,27 \times 10^{-14}$

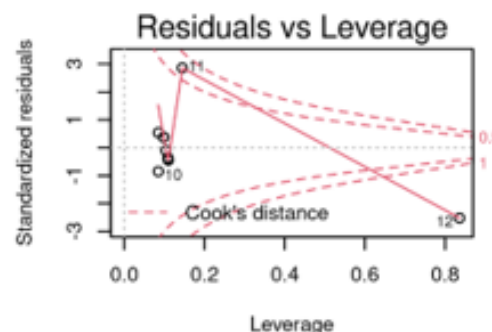
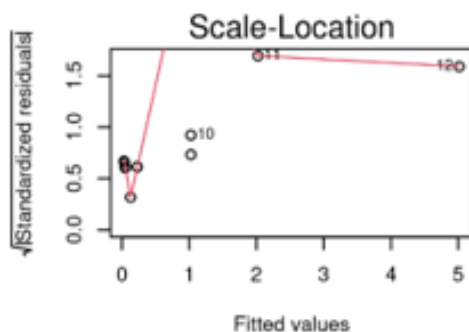
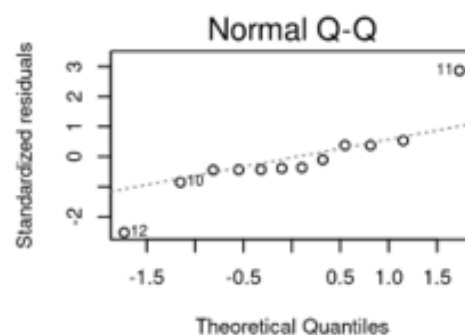
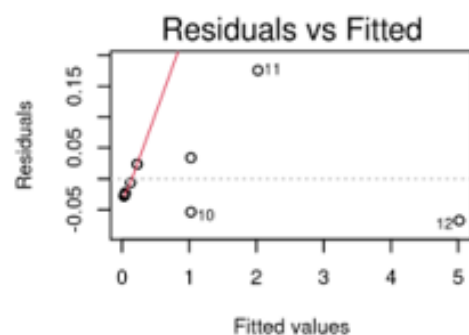
Apêndice 6 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 1-OH-Pyr



Estatística de regressão	
R^2	0,9981
R^2 ajustado	0,9979
Erro padrão	0,06629
Observações	10

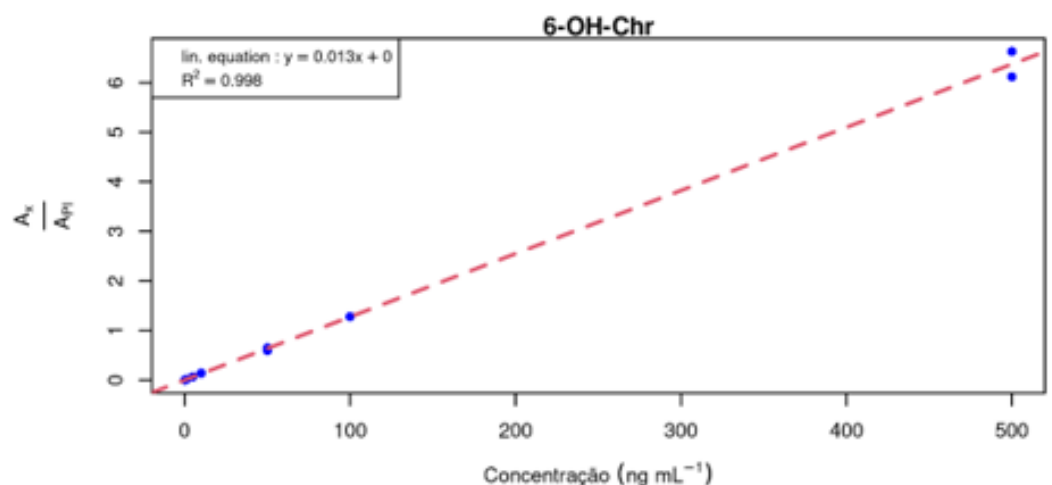
Anova

	Regressão	Resíduo
gl	1	10
SQ	23,36	0,044
MQ	23,360	0,004
F	5316	
Pr(>F)	$5,75 \times 10^{-15}$	

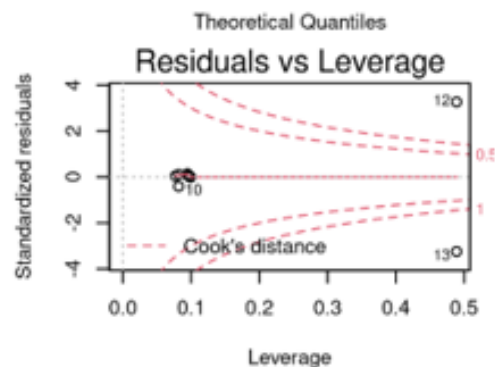
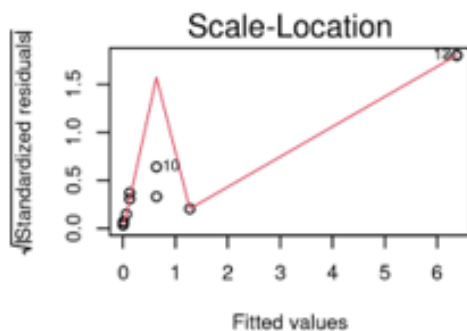
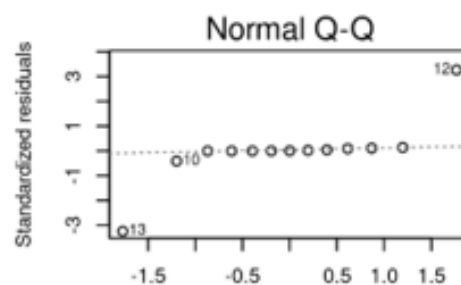
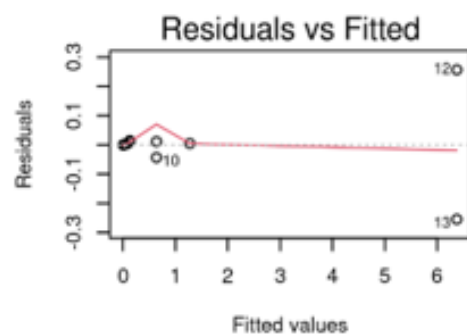


	Interseção	Variável
Coefficientes	0,0277404	0,0199525
Erro Padrão	0,0220247	0,0002737
Valor t	1,26	72,91
Pr(> t)	0,236	$5,75 \times 10^{-15}$

Apêndice 7 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 3,9-OH-Phe



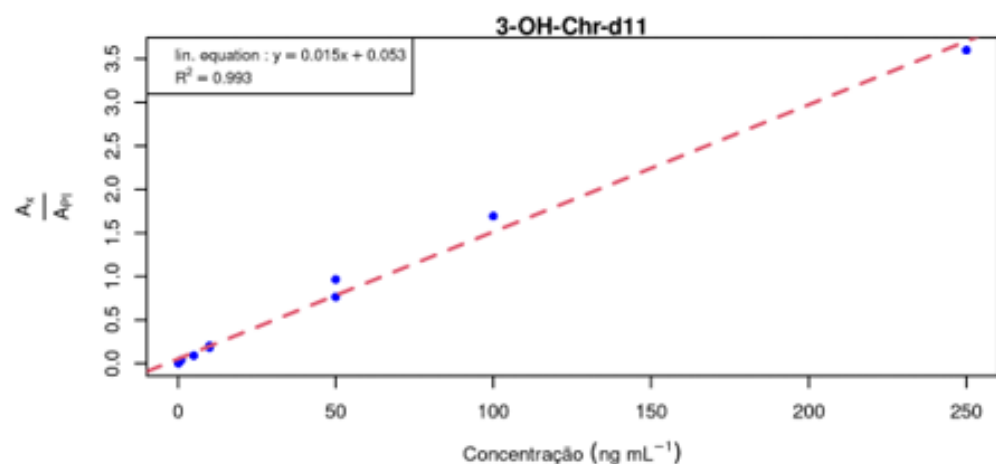
Estatística de regressão	
R^2	0,998
R^2 ajustado	0,9978
Erro padrão	0,1099
Observações	11



Anova	Regressão	Resíduo
gl	1	11
SQ	64,9	0,13
MQ	64,89	0,01
F	5369	
Pr(>F)	$3,8 \times 10^{-16}$	

	Interseção	Variável
Coefficientes	-0,000438	0,0127494
Erro Padrão	0,0346379	0,0001740
Valor t	-0,003	73,277
Pr(> t)	0,998	$3,8 \times 10^{-16}$

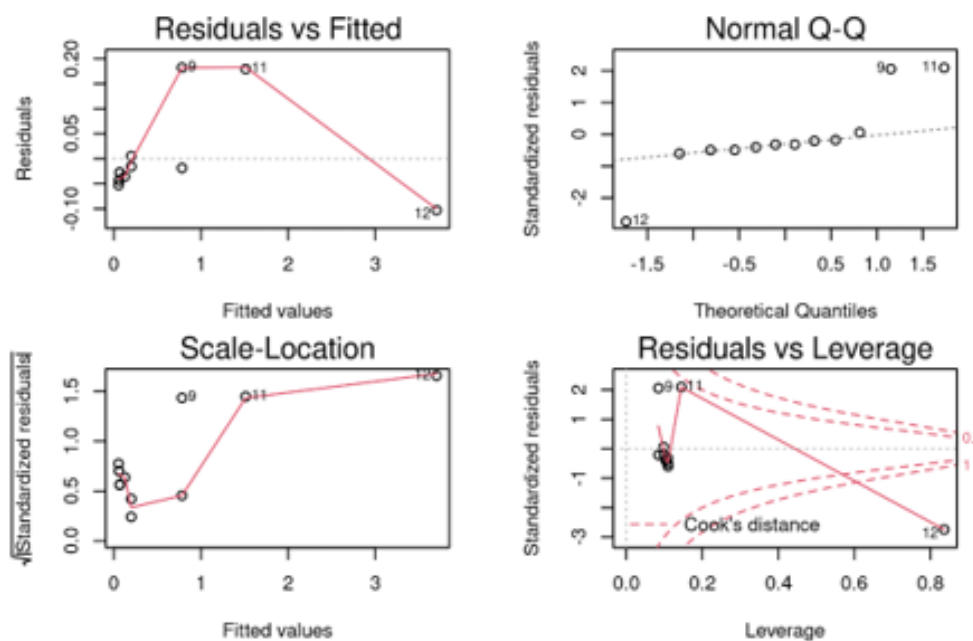
Apêndice 8 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 3-OH-Chr-d11



Estatística de regressão	
R^2	0,9981
R^2 ajustado	0,9979
Erro padrão	0,00565
Observações	12

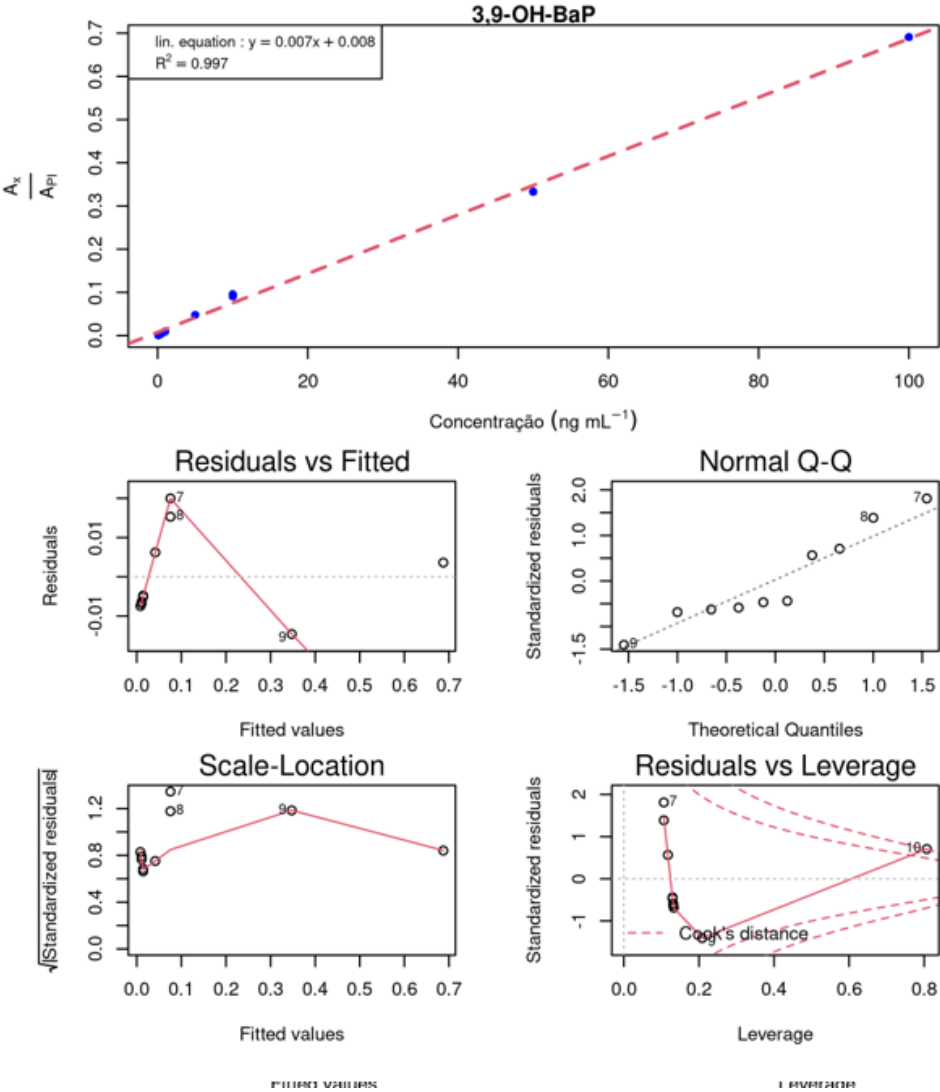
Anova

	Regressão	Resíduo
GL	1	10
SQ	12,505	0,086
MQ	12,505	0,009
F	1461	
Pr(>F)	$3,58 \times 10^{-12}$	



	Interseção	Variável
Coefficientes	$7,862 \times 10^{-4}$	$6,837 \times 10^{-4}$
Erro Padrão	$1,768 \times 10^{-3}$	$8,702 \times 10^{-6}$
Valor t	0,445	78,573
Pr(> t)	0,664	2×10^{-16}

Apêndice 9 - Resultados obtidos no Software R para análise de dados por regressão para o 3,9-OH-BaP



Estatística de regressão	
R^2	0.9975
R^2 ajustado	0.9972
Erro padrão	0.01167
Observações	8

Anova

	Regressão	Resíduo
gl	1	8
SQ	0.4415	0.0011
MQ	0.4415	0.0001
F	3241	
Pr(>F)	1.01×10^{-11}	

	Interseção	Variável
Coefficientes	0.0075524	0.0067970
Erro Padrão	0.0042591	0.0001194
Valor t	1.77	56.934
Pr(> t)	0.114	1.01×10^{-11}