



Camilla Vianna Gomes Pinheiro

**Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos
Aromáticos (HPAs) em Tecidos de Organismos
Marinhos Usando Extração Acelerada por
Solvente (ASE) com Purificação In-cell e
GC-MS**

Dissertação de Mestrado

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

Orientador: Prof. Carlos Massone

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2022



Camilla Vianna Gomes Pinheiro

**Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos
Aromáticos (HPAs) em Tecidos de Organismos
Marinhos Usando Extração Acelerada por
Solvente (ASE) com Purificação In-cell e
GC-MS**

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

Prof. Carlos Massone

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Marcus de Oliveira Godoy

PUC-Rio

Prof. Claudia Hamacher

UERJ

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

Camilla Vianna Gomes Pinheiro

Graduada em Engenharia Química pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Ficha Catalográfica

Vianna Gomes Pinheiro, Camilla

Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Tecidos de Organismos Marinhos Usando Extração Acelerada por Solvente (ASE) com Purificação In-cell e GC-MS / Camilla Vianna Gomes Pinheiro; orientador: Carlos Massone. – 2022.

70 f: il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2022.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Análise de HPA. 3. Amostras de tecido. 4. Desenvolvimento de método. 5. Extração Acelerada por Solvente. 6. Química Verde. I. Massone, Carlos. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 004

À minha família e amigos pelo apoio e encorajamento.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Carlos Massone, pelo estímulo e parceria para a realização deste trabalho.

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

Aos meus amigos por todo apoio, paciência e compreensão.

Aos meus pais, pela educação, atenção e carinho de todas as horas.

Aos meus amigos do LabMAM da PUC-Rio por todo apoio e auxílio que tive durante a pesquisa.

Aos meus colegas da PUC-Rio.

Aos professores que participaram da Comissão examinadora.

A todos os professores e funcionários do Departamento pelos ensinamentos e pela ajuda.

A todos os amigos e familiares que de uma forma ou de outra me estimularam ou me ajudaram.

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

Resumo

Vianna Gomes Pinheiro, Camilla; Massone, Carlos. **Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Tecidos de Organismos Marinhos Usando Extração Acelerada por Solvente (ASE) com Purificação In-cell e GC-MS.** Rio de Janeiro, 2022. 70p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O objetivo desta pesquisa foi a substituição de técnicas convencionais de extração de amostras para análise hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de tecido para um procedimento confiável, rápido e ambientalmente mais sustentáveis. O novo método foi desenvolvido usando um método de extração com solvente pressurizado, avaliando dois materiais de referência padrão (peixe e mexilhão) e amostras de sardinhas fortificadas (*Sardinella sp.*). Cinco procedimentos de extração diferentes foram avaliados e o melhor desempenho obtido foi pela extração de 1 g de tecido liofilizado em conjunto com 5 g de sílica desativada (5%), mistura de diclorometano: metanol (4: 1 v / v), temperatura de 80 ° C, três ciclos, 10 min de tempo estático e 90 s de tempo de purga. Este método foi ainda validado pela análise de nove réplicas do material de referência nº 2974a(Orgânicos em Tecido de Mexilhão Liofilizado) do National Institute of Standard and Technology (NIST), resultando em uma recuperação média de $85 \pm 14\%$. As médias e as incertezas obtidos para cada HPA foram equivalentes aos do material de referência, corroborando a confiabilidade do método desenvolvido. Um tempo de processamento mais curto, menos uso de solventes e reagentes e menor manipulação do extrato resultou em um método eficaz e alinhado às diretrizes da química verde.

Palavras-chave

Análise de HPA; Amostras de tecido; Desenvolvimento de método; Extração Acelerada por Solvente; Química Verde.

Abstract

Vianna Gomes Pinheiro, Camilla; Massone, Carlos (Advisor). **Poly-cyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) Analysis in Marine Organisms Tissues Using Accelerated Solvent Extraction (ASE) with In-Cell Purification and GC-MS**. Rio de Janeiro, 2022. 70p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The aim of this research was the replacement of conventional sample extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in tissue samples for a reliable, fast and environmentally more sustainable. The method was developed using a pressurized solvent extraction method and assessing two different standard reference materials (fish and mussel) and freeze-dried and fortified sardine samples (*Sardinella sp.*). Five different extraction procedures were evaluated and the best performance comprised 1 g of lyophilized tissue, 5 g of deactivated (5%) silica, a dichloromethane:methanol (4:1 v/v) mixture, a temperature of 80 °C, three cycles, 10 min of static time and 90 s of purge time. The method selected following these tests was further validated through the analysis of nine replicates of the National Institute of Standard and Technology (NIST) reference material No. 2974a (Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue), resulting in an effective recovery of $85 \pm 14\%$. The means and uncertainties attained for each PAH were equivalent to those of the reference material, corroborating the reliability of the developed method. A shorter processing time, less use of solvents and reagents and lower extract manipulation resulted in an effective method aligned with green-chemistry guidelines.

Keywords

PAH analysis; Tissue samples; Method development; Accelerated solvent extraction; Green Chemistry.

Sumário

1	Introdução	15
2	Objetivos	18
2.1	Objetivos Gerais	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica	19
3.1	Poluentes Orgânicos Persistentes	19
3.2	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	21
3.3	Metodologia Analítica para Determinação de HPAs em Biota	26
4	Materiais e Métodos	37
4.1	Vidrarias	37
4.2	Padrões, Reagentes e Solventes	37
4.3	Equipamentos e Acessórios	38
4.4	Implementação da Metodologia Analítica	38
4.5	Análise Instrumental	40
5	Resultados e Discussão	42
5.1	Verificação da Eficiência do Método	46
6	Conclusões	50
6.1	Conclusões e Trabalhos Futuros	50
7	Referências bibliográficas	52
A	Tabela de dados do teste A	65
B	Tabela de dados do teste B	66
C	Tabela de dados do teste C	67
D	Tabela de dados do teste D	68
E	Tabela de dados do teste E	69
F	Tabela de dados da validação do método	70

Lista de figuras

Figura 3.1	Uma ilustração esquemática do destino e de transporte de POPs no meio ambiente. Adaptado de Zeng(Zeng 2015)	21
Figura 3.2	Estruturas dos 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (Meire, Azeredo e Torres 2007).	22
Figura 3.3	Principais etapas para a análise de poluentes ambientais. Adaptado de (Zeng 2015).	27
Figura 3.4	Recursos operacionais do ASE 200. Fonte: (Dionex 1999)	30
Figura 3.5	A) Full Scan e (b) SIM. Adaptado de Duong-Thi et al.(Duong-Thi et al. 2013)	33
Figura 4.1	Procedimento de Extração Acelerada por Solvente (ASE 300 - Thermo Scientific) com purificação in-cell.	40
Figura 5.1	Recuperações médias (relativas e desvios padrão (% , acima das barras) de HPAs selecionados (ver Tabela 5.3 para nomes de compostos) e relativos desvios padrão (colchetes abaixo das barras) em todos os testes realizados.	45
Figura 5.2	Exemplo de um perfil obtido pela análise de monitoramento de íons selecionados por GC-MS do material de referência certificado (NIST 2974a), mostrando os padrões internos deuterados adicionados (veja o texto para detalhes).	47
Figura 5.3	Médias de recuperação de HPAs individuais (I) e globais (II) e desvios padrão de nove réplicas do MRC NIST extraídas através dos parâmetros estabelecidos pelo método D (consulte a Tabela 5.3 para nomes de compostos).	48

Lista de tabelas

Tabela 3.1	Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários (EPA). Número de anéis aromáticos; PM, peso molecular (g.mol^{-1}); S, solubilidade (mg.L^{-1}); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); H, constante de Henry ($\text{Pa m}^3.\text{mol}^{-1}$); Log Koa , coeficiente de partição (octanol/água).	23
Tabela 4.1	. Condições instrumentais para determinação de HPAs individuais.	41
Tabela 5.1	Parâmetros do método ajustados para extração acelerada por solvente de amostras de tecido de organismo marinho	42
Tabela 5.2	Comparação Entre Método Convencional e Desenvolvido	46
Tabela 5.3	Médias (x) e incertezas (u) para o material de referência padrão, método desenvolvido e erro normalizado	49

Lista de Abreviaturas

ASE – Extração Acelerada por Solvente

EI – Ionização por Elétrons

EPA – U.S. Environmental Protection Agency

FS – Full Scan

GC – Cromatografia gasosa

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

IAEA – International Atomic Energy Agency

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

ITD – Detector de Armadilha de Íons

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MRC – Material de Referência Certificado

MS – Espectrometria de Massas

NIST – National Institute of Standard and Technology

PLE – Extração com Líquido Pressurizado

POP – Poluente Orgânico Persistente

SIM – Monitoramento de Íons Seleccionados

SPE – Extração em Fase Sólida

SPLE – Extração Seletiva com Líquido Pressurizado

*"Estou entre aqueles que pensam que a
ciência tem uma grande beleza."*

Marie Curie, .

1

Introdução

A produção e disposição final de resíduos antropogênicos em sistemas aquáticos aumentaram nas últimas décadas (Panseri et al. 2019). O miríade de contaminantes contidos em efluentes é um dos principais motores da poluição do oceano, causando perdas da biodiversidade e diminuindo sua capacidade de fornecer serviços ecológicos além de outros efeitos que, em última análise, põem em perigo a saúde humana (Ruddiman 2013, Landrigan et al. 2018).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), um grupo de mais de cem compostos com pelo menos dois anéis aromáticos fundidos e termodinamicamente estáveis, são de particular preocupação ambiental, pois são tóxicos, persistentes e onipresentes em sistemas aquáticos (Ramalhosa et al. 2012). HPAs são derivados, majoritariamente, da combustão incompleta de combustíveis fósseis e outros materiais orgânicos ou de entradas diretas de petróleo (Takeuchi et al. 2009) e podem bioacumular em organismos, causando efeitos biológicos adversos (Loomis et al. 2015, Wang et al. 2019, Zelinkova e Wenzl 2015). A exposição aos HPAs é conhecida por apresentar potencial para causar tumores, problemas de fertilidade e defeitos congênitos, (ATSDR 1995, EPA 2001) dentre outras consequências.

Informações detalhadas da concentração de HPAs e outros contaminantes orgânicos em matrizes ambientais, como água, sedimentos, atmosfera e biota, são um requisito para avaliações de destino ou exposição de micropoluentes (orgânicos) em sistemas aquáticos (Schwarzenbach et al. 2006). Particularmente, análises de HPAs em tecidos animais (ou seja, carne, fígado, gordura) é um desafio devido a complexidade da matriz (por exemplo, alto teor de gordura) e os baixos limites necessários para sua detecção (Zelinkova e Wenzl 2015). Avaliações podem revelar padrões de exposição a produtos químicos e indicar potenciais de biomagnificação / bioacumulação do composto, bem como a exposição e riscos para a saúde dos seres humanos através de seu consumo (Panseri et al. 2019, Oost, Beyer e Vermeulen 2003, Storelli et al. 2013).

Apesar da ampla gama de métodos disponíveis para determinação de substâncias orgânicas em tecidos, a eficiência da remoção de lipídios continua a ser a etapa mais crítica (Zelinkova e Wenzl 2015, Lourencetti e Ricci 2020, Mashroofeh, Bakhtiari e Pourkazemi 2015). A purificação do extrato obtido a partir da amostra é aplicada a fim de remover interferências analíticas e aumentar a sensibilidade do método, enquanto também reduz a manuten-

ção do instrumento, melhorando o desempenho do sistema cromatográfico (Tölgyessy, Miháliková e Matulová 2016, Subedi et al. 2015). Procedimentos tradicionais requerem maior manipulação de extrato por conta da grande quantidade de etapas analíticas e grande quantidade de solventes, tornando-os caros e demorados. Além de ter maior custo, as várias etapas aumentam a possibilidade de perdas e contaminação, exigindo alternativas para reduzir a manipulação da amostra (Ostrander 2005).

Dentre os métodos de remoção de lipídios aplicados, os mais difundidos são a cromatografia de permeação em gel (GPC) (Wu et al. 2011, Zhao et al. 2014, Liguori et al. 2006), extração em fase sólida (SPE) (Hong et al. 2004, Sapozhnikova e Lehotay 2013, Sun et al. 2012) e cromatografia líquida de coluna aberta (Lourencetti e Ricci 2020, Zhao et al. 2014), aplicando sozinhos ou em sequência.

As desvantagens dos procedimentos de extração e purificação tradicionais estimularam o desenvolvimento de métodos simples, automatizados, mais rápidos, econômicos e protocolos ecologicamente corretos nas últimas décadas (Cioca, Heemken e Mihaiu 2017, Koning et al. 2009, Dodds et al. 2004, Nording et al. 2006).

Dentre os métodos desenvolvidos, a extração acelerada por solvente (ASE) surgiu como uma alternativa vantajosa (Cioca, Heemken e Mihaiu 2017, Richter et al. 1996, Choi et al. 2016), especialmente quando acoplada aos procedimentos de purificação dentro da célula de extração (Choi et al. 2016, Pintado-Herrera et al. 2016, Vazquez-Roig e Picó 2015, Andreu e Picó 2019, Abdallah et al. 2013).

Uma grande vantagem adicional do método de extração por líquido pressurizado aplicado a tecidos biológicos é a possibilidade de incluir um adsorvente dentro da célula de aço inoxidável utilizada para extrair a amostra, visando retenção de lipídios. Esta técnica de purificação (in-cell purification) provou ser eficiente em minimizar as etapas de purificação da amostra pós-extração, resultando em uma única etapa de extração pressurizada para compostos orgânicos, combinada com purificação in-cell (Vazquez-Roig e Picó 2015, Andreu e Picó 2019, Guo et al. 2014).

Este é um método rápido e de baixo consumo de solvente para extração de compostos orgânicos de amostras sólidas (Richter et al. 1996), e que tornou-se uma técnica de extração popular para várias classes de contaminantes de diferentes tipos de amostras (Sun et al. 2012).

Neste trabalho, é apresentado um método de análise de HPA em tecidos biológicos, com base na extração ASE e purificação in-cell, que foi otimizado usando dois materiais de referência padrão (peixe e mexilhão) e amostras de

músculo de peixe fortificado (*Sardinella sp.*). Além de atender aos requisitos básicos de química verde, ou seja, diminuição do uso de produtos químicos e produção de resíduos perigosos, este estudo visou fornecer um método eficiente e rápido para atender demandas por dados de contaminação de HPA de peixes e crustáceos em situações de rotina e de emergência após derramamentos de óleo. Esses dados são obrigatórios para a tomada de decisão em relação às interrupções de pesca e implicações para a segurança no consumo de frutos do mar em um eventual evento agudo de contaminação e sob exposição crônica à hidrocarbonetos (Farrington 2020, Gohlke et al. 2011, Yender, Michel e Lord 2002).

2

Objetivos

2.1

Objetivos Gerais

Implementar uma metodologia de extração mais simples, econômica e confiável, alinhada aos princípios da química verde para a determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em tecidos de organismos marinhos com detecção e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

2.2

Objetivos Específicos

- Otimizar o método de extração com purificação in-cell através de diferentes adsorventes e proporções amostra/adsorvente, variando condições de extração;
- Avaliar recuperações do método desenvolvido através da extração de material certificado.

3

Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica

3.1

Poluentes Orgânicos Persistentes

3.1.1

Histórico e Características

Com o fim da Segunda Guerra Mundial, surgiu um período de grandes descobertas e revelações científicas. Neste momento, houve o reconhecimento por parte dos cientistas de compostos capazes de persistir no ambiente por muito tempo, migrando no ar, na água, no solo e sedimentos, com longos alcances e que exibiam características tóxicas (Ashraf 2017). Sua acumulação já atingia níveis que poderiam prejudicar a vida selvagem e a saúde humana. Neste momento, surgiu a preocupação mundial com os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (Manahan 2017, Ashraf et al. 2015).

Existem milhares de produtos químicos POP, muitas vezes provenientes de certas séries ou "famílias" de produtos químicos. POPs apresentam longas meias-vidas em solos, sedimentos, ar ou biota. Na prática, um POP pode ter uma meia-vida de anos ou décadas no solo/sedimento e vários dias na atmosfera (Jones e Voogt 1999).

Os POPs são tipicamente 'odiadores de água' e 'amantes de gordura', isto é, hidrofóbicos e lipofílicos. Em sistemas aquáticos e solos eles se associam fortemente em sólidos, notadamente a matéria orgânica, não se associando à fase aquosa. Eles também se acumulam em lipídios nos organismos, uma vez que são armazenados no tecido adiposo. Isso dá persistência destes compostos químicos na biota, pois o metabolismo é lento e os POPs podem se acumular nas cadeias alimentares (Jones e Voogt 1999).

Devido a estas características, estes compostos podem causar efeitos biológicos prejudiciais e por isto recebem intensa atenção internacional (Zeng 2015). Em 2001, na convenção de Estocolmo, houve o início da proibição e restrição severa de substâncias classificadas como POPs (Lallas 2001, Zeng 2015).

Em 2004, o acordo atingiu mais de 150 países signatários, atualmente, mais de 20 POPs estão listados na Convenção de Estocolmo. Apesar de não listados na convenção de Estocolmo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), também são tratados como POPs devido à sua alta toxicidade e ampla distribuição ambiental (Lallas 2001, Zeng 2015, Ashraf et al. 2015). Os

HPAs também são abrangidos como Poluentes Orgânicos Persistentes pelo Protocolo da Comissão Econômica das Nações Unidas para a Convenção da Europa sobre Poluição Atmosférica Transfronteiriça de Longo Alcance (PAH 2001, Choi et al. 2009).

Algumas propriedades-chave destes produtos químicos controlam seu destino no ambiente e, portanto, pode-se prever seu destino e comportamento. Essas propriedades incluem solubilidade aquosa, pressão de vapor, coeficientes de partição entre água:sólido e ar:sólido ou líquido e meia-vida no ar, solo e água (Jones e Voogt 1999).

POPs podem volatilizar, a partir de solos, vegetação e massas de água, na atmosfera e permanecem estáveis no transporte aéreo para longas distâncias antes de serem depositados (Jones e Voogt 1999). Por este motivo, a presença de POPs é observada até mesmo em regiões onde não há registros de seu uso. O ciclo de volatilização e deposição pode ser repetido várias vezes, com o resultado de que os POPs podem se acumular em uma área muito distante de onde foram usados/emitidos. Na própria atmosfera, os POPs podem particionar entre partículas e aerossóis, dependendo da temperatura ambiente e de suas propriedades físico-químicas (Zeng 2015, Buccini 2003).

A detecção de traços destes compostos em várias matrizes ambientais é o primeiro passo para monitoramento e elucidação de sua distribuição e destino no meio ambiente (Zeng 2015).

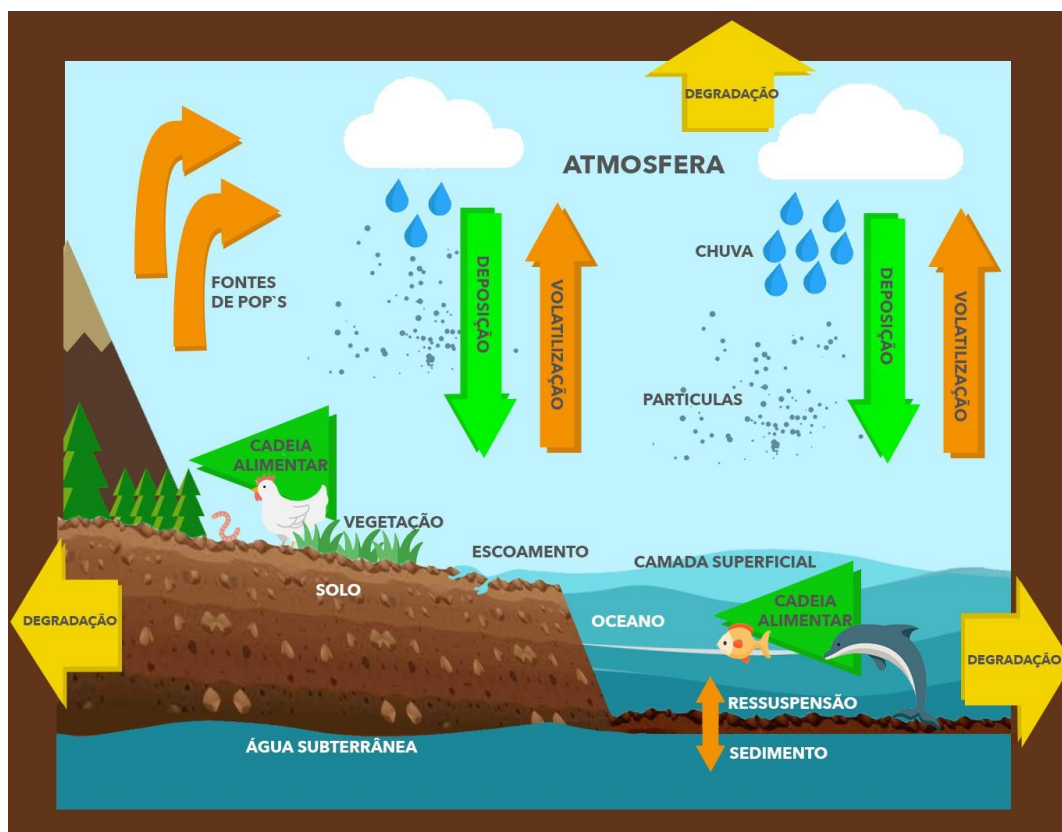


Figura 3.1: Uma ilustração esquemática do destino e de transporte de POPs no meio ambiente. Adaptado de Zeng(Zeng 2015)

3.2

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

3.2.1

Características e Propriedades Físico-Químicas dos HPAs

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são poluentes orgânicos persistentes caracterizados por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos fundidos, organizados sob as formas linear, angular ou agrupada (Figura 3.2) (Netto et al. 2000). Tais substâncias e seus derivados nitrados e oxigenados têm ampla distribuição e são encontrados como componentes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (Rey-Salgueiro et al. 2008).

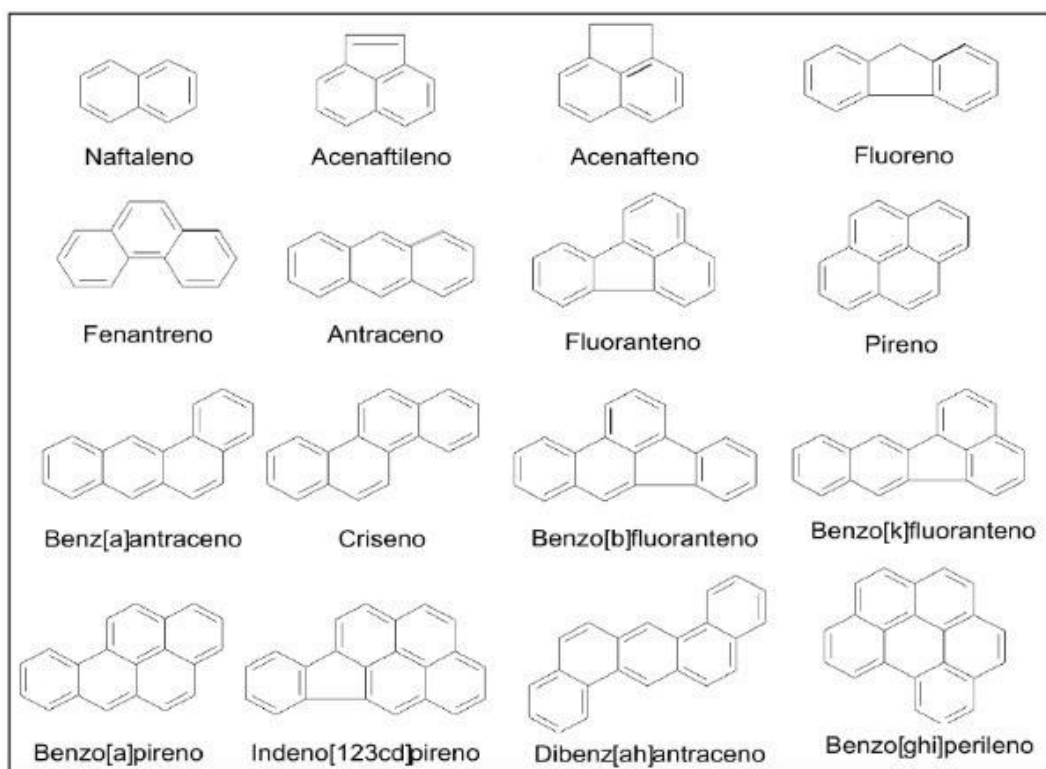


Figura 3.2: Estruturas dos 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (Meire, Azeredo e Torres 2007).

Estas substâncias são sólidas em temperatura ambiente, com altos pontos de ebulição e fusão. São pouco solúveis em água e, em geral, apresentam redução da solubilidade com o aumento do número de anéis, mas são solúveis na maioria dos solventes orgânicos e são fortemente lipofílicos (Ferrante et al. 2018). HPAs apresentam também, coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula (Netto et al. 2000)

A volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, HPAs de menor peso molecular são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry que diminui com o aumento do peso molecular (APARG 1995). O tempo de meia vida dos compostos de maior peso molecular em diversas matrizes ambientais tende a se apresentar relativamente elevado, indicativo de sua lenta degradação (Bouchez et al. 1996).

Embora os HPAs estejam sujeitos à biodegradação e outros processos como fotossensibilização e fotodegradação, suas propriedades físico-químicas os conferem persistência no meio ambiente (Winquist et al. 2014, Cristaldi et al. 2017, Ferrante et al. 2018), conforme exposto na Tabela 3.1. Mesmo com estas propriedades variando consideravelmente, a característica

semivolátil de alguns HPAs os torna altamente móveis no ambiente, passando por deposição e revolatilização, o que os distribui entre o ar, solo e corpos d'água. Uma porção de HPAs está sujeita ao transporte atmosférico de longo alcance, tornando-os um problema ambiental transfronteiriço (PAH 2001).

De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environment Protection Agency) 16 HPAs são considerados particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA 1986): 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 (Figura 3.2). Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos fundidos entre si com peso molecular (PM) variando entre 128 e 278g/mol. Suas características físico-químicas, como solubilidade (S) e pressão de vapor (PV), são fatores importantes que direcionam a distribuição desses contaminantes entre as fases solúvel e particulada em meio atmosférico, aquoso e biótico (Tabela 3.1). A solubilidade em água dos HPAs varia entre os altamente insolúveis (e.g. benzo[g,h,i]perileno: 0,0003mg/L) a pouco solúveis em água (e.g. naftaleno, 31mg/L), enquanto a pressão de vapor transita entre compostos altamente voláteis (naftaleno) e compostos relativamente pouco voláteis (dibenzo[a,h]antraceno) (Meire, Azeredo e Torres 2007, Latimer e Zheng 2003).

Tabela 3.1: Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários (EPA). Número de anéis aromáticos; PM, peso molecular (g.mol^{-1}); S, solubilidade (mg.L^{-1}); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); H, constante de Henry ($\text{Pa m}^3.\text{mol}^{-1}$); Log Koa, coeficiente de partição (octanol/água).

HPA	Nº de anéis	PM (g.mol^{-1})	S (mg.L^{-1})	PV a 25 °C (Pa)	H ($\text{Pa m}^3.\text{mol}^{-1}$)	Log Kow
Naftaleno	2	128	31	10,4	43,01	3,37
Acenaftileno	3	152	16,1	0,9	8,40	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
Antraceno	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
Benzo[a]antraceno	4	228	0,011	$2,80.10^{-5}$	0,581	5,91
Criseno	4	228	nd	$5,70.10^{-7}$	0,065	5,86
Benzo[b]fluoranteno	5	252	0,0015	nd	nd	5,80
Benzo[k]fluoranteno	5	252	0,0008	$5,20.10^{-8}$	0,016	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	$7,00.10^{-7}$	0,046	6,04
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	276	nd	nd	0,003	6,58
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	$3,70.10^{-10}$	nd	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	276	0,00026	$6,00.10^{-8}$	0,075	6,50

nd = Não determinado. (Meire, Azeredo e Torres 2007, Latimer e Zheng 2003, Joa et al. 2009)

3.2.2

Fontes de Exposição Humana e Ambiental

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são originados por fontes antropogênicas, pela combustão incompleta de compostos de carbono (queima de florestas, atividades industriais e atividades residenciais) ou liberados por atividades naturais, como atividades vulcânicas; biosíntese por algas, bactérias, fungos e plantas; por diagênese de precursores naturais e emissão natural de petróleo marinho (Law e Biscaya 1994, Trevelin 1992, Bettin e Franco 2005).

Até o começo do século XX havia um equilíbrio entre a produção e a degradação natural de HPAs sendo a sua concentração baixa e constante. Com o aumento do desenvolvimento industrial, esse balanço natural foi perturbado e a razão entre a produção e a degradação de HPAs tem aumentado constantemente (Trevelin 1992, Bettin e Franco 2005).

O mecanismo de formação de HPAs durante a combustão incompleta de material orgânico é conhecido há muito tempo. Acredita-se que estejam envolvidos dois processos distintos: a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis (pirólise). Estas e outros radicais se recombina para produzir moléculas maiores e mais estáveis de HPAs (pirossíntese). Uma vez formados, os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas com anéis altamente condensados (Trevelin 1992, Bettin e Franco 2005). Os HPAs não são obrigatoriamente fracionados em fragmentos menores antes da pirossíntese, podendo resistir à fragmentação parcial seguida pela hidrogenação dos seus radicais primários. Em geral, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio, podem servir como precursores de HPAs (Trevelin 1992, Bettin e Franco 2005).

A estrutura molecular do HPA pode informar seus níveis de degradação, sua fonte de origem predominante e seu destino no meio ambiente. HPAs com estrutura molecular até três anéis aromáticos, alquilsubstituintes e/ou de heteroátomos geralmente são oriundos do petróleo e denominados petrogênicos (Neff 1980).

Dentre os principais contaminantes orgânicos presentes no meio marinho, os HPAs têm grande representatividade. A contaminação direta de ambientes marinhos pode decorrer pelo tráfego marítimo, durante exploração, produção, transporte e consumo de petróleo e derivados, seja de forma crônica (particularmente água produzida e fluido de perfuração) ou devido a acidentes diversos, como derramamento de grandes quantidades de óleo no mar (NRC 2003, Balcioğlu et al. 2014, Tornero e Hanke 2016, Ferrante et al. 2018).

A exposição a HPAs transportados pelo ar ocorre tanto em ambientes internos quanto externos. As fontes internas de HPAs incluem fumaça de tabaco, cozinha e lareiras (PAH 2001, Choi et al. 2009). A translocação de HPAs no ambiente se dá principalmente sob via atmosférica de transporte associado ao material particulado fino, o que permite ampla distribuição desses compostos. Uma vez emitidos na atmosfera, esses poluentes podem ser depositados sob a forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada) em sistemas aquáticos e terrestres (Garban et al. 2002, Rose e Rippey 2002).

A introdução de HPAs no corpo pode se dar de diferentes formas (inalação, absorção cutânea, etc.) e a ingestão representa um caminho importante para os efeitos nos organismos vivos (Perugini et al. 2007, Conti et al. 2015, Ferrante et al. 2018). A exposição humana por ingestão se deve a dois fatores principais: concentração de poluentes no tecido comestível de frutos do mar e quantidade e frequência do produto consumido por cada indivíduo ou por um subgrupo de idade específica da população (Domingo et al. 2007).

3.2.3

Efeitos dos HPAs à Saúde dos Seres Vivos

Os HPAs, como os demais POPs, são caracterizados por sua elevada toxicidade e baixa taxa de degradação, possibilitando sua bioacumulação em seres vivos (Ferrante et al. 2018, Perugini et al. 2007).

Alguns desses contaminantes são descritos como precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos e, por este motivo, são considerados poluentes orgânicos prioritários em programas de monitoramento ambiental e saúde humana em diferentes países do mundo (Meire, Azeredo e Torres 2007, WHO 1983).

O caráter lipofílico de HPAs promove a absorção destas substâncias pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente disseminado pelo organismo (Netto et al. 2000), onde atuam como agentes de desregulação endócrina, mutagênicos (IARC 2010, Bergman et al. 2013) ou de efeito sinérgico, potencializando o efeito cancerígeno de outros HPAs (Hwang et al. 2012), pois são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA (Jacob et al. 1991, Netto et al. 2000).

Os HPAs representam uma preocupação em relação à segurança alimentar no curto e no médio prazos (Yender et al. 2002). A inalação destes compostos transportados pelo ar representa risco de câncer de pulmão em humanos e sua ingestão através de alimentos contaminados também é um risco para a saúde (PAH 2001, Choi et al. 2009).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), assim como a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) classificou dezesseis HPAs como prováveis ou possíveis carcinógenos em humanos por serem capazes de causar efeitos mutagênicos em humanos e outras espécies animais (IARC 2010, Balcioglu et al. 2014, Ferrante et al. 2018).

3.3

Metodologia Analítica para Determinação de HPAs em Biota

Os poluentes orgânicos persistentes são comumente encontrados em níveis traço, tornando iminentes os desafios para análises precisas e acuradas de poluentes orgânicos persistentes em matrizes ambientais complexas, pois requerem planejamento e execução cuidadosos (Zeng 2015). Um método confiável para a determinação de poluentes ambientais deve ser composto por várias etapas analíticas (Figura 3.3).

Os métodos mais difundidos para determinação de POPs nessas matrizes são similares e muito trabalhosos. Tais procedimentos geralmente envolvem extração do analito através de técnicas clássicas como Soxhlet (Matscheko et al. 2002) ou até mesmo sonicação (Vonderheide, Montes-Bayón e Caruso 2002), seguido de extensos processos de purificação (*clean-up*) de forma a se remover interferentes da matriz. Os procedimentos de purificação geralmente demandam tempo, por conta da manipulação do extrato, e gasto elevado de solventes (Ostrander 2005).

Extrações sólido-líquido convencionais, como Soxhlet, têm sido amplamente utilizadas em tecidos ao longo do tempo. Soxhlet é considerada como padrão ao qual novos métodos de extração são comparados (Schantz 2006). Este método demanda muitas horas em refluxo e um grande volume de solvente. A metodologia para a extração de HPAs, historicamente, tem se apresentado, salvo pequenas variações, como uma sequência de extração Soxhlet, seguida de purificação pelo pré-fracionamento por cromatografia líquida em coluna aberta e, em seguida, cromatografia de permeação em gel (GPC). Além de se caracterizar como algo dispendioso, com o grande número de etapas, se aumenta a possibilidade de perdas do analito e de contaminação da amostra. (Hoekstra et al. 2002, Schantz et al. 1995, Sloan et al. 2005).

O sohxlet (EPA 3540C - (EPA 1996)) é o melhor exemplo de um método convencional, que demanda uma série de etapas posteriores que podem ocasionar na perda de analito, com muito tempo necessário para análise e gasto de solvente. Convencionalmente, este procedimento é feito (EPA 3540C - (EPA 1996)) com duração de cerca 16 a 24 horas e consumo de 100 a 300 mL de solvente dependendo do sistema sohxlet.



Figura 3.3: Principais etapas para a análise de poluentes ambientais. Adaptado de (Zeng 2015).

Após a extração, normalmente é feita a concentração do extrato e o mesmo é submetido, salvo variações, a fracionamento por cromatografia líquida em coluna de alumina (1 ou 2x), coluna de sílica/alumina, e cromatografia de permeação em Gel (GPC), com alto consumo de solvente. Após todas estas etapas, o extrato pode ser concentrado e preparado para análise em Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).

3.3.1

Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE) tem sido uma técnica de preparação de amostras empregada em diversos trabalhos nas últimas décadas e tem se mostrado muito eficiente na extração de POPs de matrizes sólidas e semi-sólidas (Runnqvist et al. 2010, Luque-Garcia e Castro 2004).

Com o avanço da técnica nos últimos anos e a necessidade de separação de compostos interferentes do analito de interesse de forma simultânea, diversos adsorventes foram empregados na PLE, e esta passou a ser mais seletiva. Esses adsorventes promovem o clean-up durante a extração, retendo parte dos interferentes e aumentando a seletividade desta etapa. Esta técnica passou a ser denominada, numa tradução livre, Extração com Líquido Pressurizado Seletiva (SPLE) (Subedi et al. 2015).

Inúmeros métodos de extração são possíveis com PLE, para matrizes distintas, basta apenas otimizar os parâmetros de extração, como solvente, temperatura, número de ciclos e tempo estático e a massa da matriz para aumentar sua eficiência (Schantz 2006). Para a SPLE, além dos parâmetros mencionados, pode-se variar ou combinar adsorventes para melhor remoção da fração lipídica, o que proporciona maior seletividade de diferentes analitos (Subedi et al. 2015).

3.3.2

Extração Acelerada por Solvente (ASE) de HPAs e purificação in-cell

Extração acelerada por solvente (ASE) é uma técnica de extração que oferece uma série de vantagens como baixo custo de extração, menor consumo de solvente, menor tempo de procedimento e protocolos de extração simplificados (Wang et al. 1999). ASE permite o controle de condições importantes de extração, como composição do solvente, pressão aplicada, temperatura e duração do procedimento, com a finalidade de se obter uma extração mais quantitativa. Grandes vantagens desta técnica são o alto grau de automação do procedimento e a possibilidade de processar várias amostras (Wasik e Ciesielski 2004, Giergielewicz-Możajska, Dąbrowski e Namieśnik 2001).

Esta metodologia possibilita um aumento da eficiência de extração e também opera usando pequenos volumes de solventes orgânicos tradicionais para extrair compostos de amostras sólidas ou semissólidas Wang et al. (Wang et al. 1999). Por isso, tem sido empregada com sucesso para a extração de diferentes compostos orgânicos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Wasik e Ciesielski 2004).

No procedimento, a amostra é colocada em uma célula de extração feita, em geral, de aço inoxidável conforme ilustra a Figura 3.4. Após a adição do solvente, a célula é pressurizada, aquecida até a temperatura desejada e a amostra é extraída estaticamente por um período de tempo específico. Dessa forma, o solvente permanece em contato com a amostra por tempo suficiente para promover o aumento da transferência de massa e resultar em maior recuperação dos analitos. O ciclo pode ser repetido com a introdução de solvente fresco e essa renovação do solvente na célula melhora a transferência de massa, uma vez que o gradiente de concentração é maior entre o solvente fresco e a superfície da matriz da amostra (Romanik et al. 2007, Cho et al. 2008).

É uma técnica de extração confiável com muitas vantagens em relação às técnicas de extração tradicionais, por isso pode ser especialmente útil para análises de rotina. Entre essas vantagens estão boas recuperações, rapidez, precisão adequada e menor uso de solventes. Há também uma redução de perda e ou contaminação por manipulação da amostra, atribuída à automação da realização da técnica. Como desvantagem, podemos citar o elevado custo de aquisição e de manutenção do equipamento Sun et al.; Lau, Gan e Ng (Sun et al. 2012, Lau, Gan e Ng 2010).

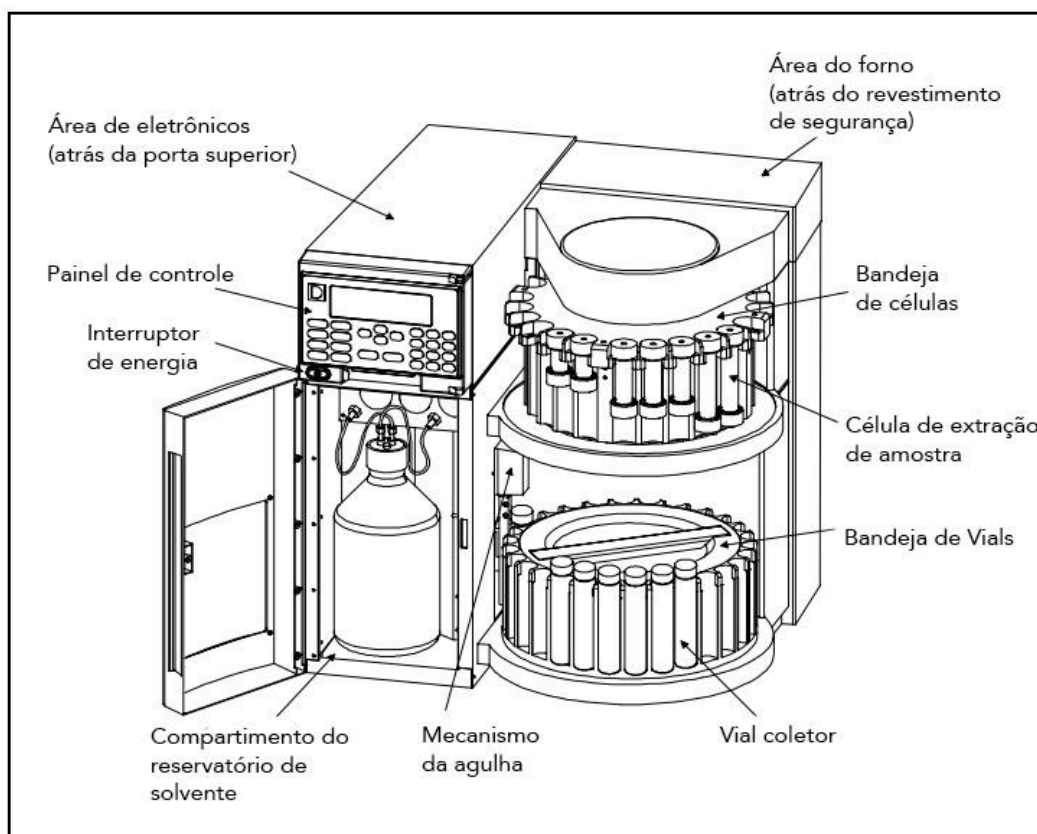


Figura 3.4: Recursos operacionais do ASE 200. Fonte: (Dionex 1999)

Uma opção alternativa para minimizar ainda mais o tempo e o consumo de solvente é realizar as etapas de extração e purificação simultaneamente, colocando adsorventes adequados dentro das células PLE (in-cell clean-up). Essa escolha reduz a necessidade de procedimentos de limpeza posteriores e permite a automação das etapas de limpeza, fator chave para evitar, em mais uma etapa, a manipulação excessiva da amostra (Pintado-Herrera et al. 2016). Tem sido aplicado para a análise de alguns contaminantes regulados e emergentes em biota, lodo e sedimento (Ghosh, Hageman e Björklund 2011, Zhang et al. 2019, Pintado-Herrera, González-Mazo e Lara-Martín 2014), usando diferentes adsorventes como sílica ativada, florisil e alumina (Pintado-Herrera, González-Mazo e Lara-Martín 2014, Rodil e Moeder 2008, Negreira et al. 2011).

Zhang et al. (Zhang et al. 2019) reportou que as recuperações de extração em lodo de esgoto obtidas usando o método PLE in-cell foram maiores do que aquelas obtidas usando PLE com dois procedimentos de purificação. Isto pode se dar porque o método PLE in-cell combinou PLE e procedimentos de limpeza on-line, as transferências múltiplas de extrato na limpeza externa foram suprimidas e, desta forma, as perdas associadas. As eficiências de análise foram promovidas dramaticamente e os resultados das análises foram mais

consistentes e reprodutíveis.

3.3.3

Materiais de Referência Certificados

A aplicação de materiais de referência certificados (MRCs) em química analítica para fins de controle de qualidade é bem reconhecida e recomendada por uma ampla gama de organizações internacionais, nacionais e profissionais (IAEA 2003).

Os MRCs possuem ampla estabilidade, frente à possível degradação causada por fenômenos como temperatura, luz, oxidação, umidade, atividade microbiológica e etc; e são suficientemente homogêneos em relação às suas especificações e propriedades (Cardoso et al. 2010) e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um aparelho, avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais (IAEA 2003). Tais materiais são a base para a verificação da exatidão de medições analíticas, com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (Cardoso 2010).

Além de valores de propriedade bem estabelecidos (robustos) — o que em química analítica normalmente seria algo como concentração, fração mássica etc. — a vantagem mais significativa do material de referência de matriz, quando disponível e corretamente selecionado, é sua matriz e nível de correspondência do mensurando (analito) em comparação com o material de teste (amostra) (IAEA 2003).

Além disso, os materiais de referência são normalmente bem caracterizados por um grande número de mensurandos (analitos), o que se mostra muito útil no desenvolvimento e validação de métodos, fornecendo uma base para estimativa de acurácia e precisão, bem como para o estudo de outros parâmetros estatísticos, como repetibilidade, reprodutibilidade, faixa linear, limite de quantificação, robustez e avaliação de eventuais interferências (IAEA 2003).

O uso de métodos analíticos validados — adequados ao propósito — é um pré-requisito para qualquer laboratório que queira reivindicar e demonstrar formalmente sua qualidade e fornecer confiança em seus resultados de medição (IAEA 2003).

3.3.4

Análise dos Extratos por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Metodologias analíticas devem ter capacidade de determinação com precisão de níveis de concentração muito baixos, como os estabelecidos pela legislação vigente, bem como o fornecimento de evidências inequívocas

para a identificação do poluente e sua quantificação (Hernández et al. 2005, Pitarch et al. 2007).

A cromatografia gasosa (GC) tem sido a técnica escolhida para a análise de amostras ambientais contendo compostos orgânicos semivoláteis e voláteis, em razão de sua combinação favorável de alta seletividade e resolução, boa precisão e exatidão, ampla faixa de concentração e alta sensibilidade (Hernández et al. 2005, Pitarch et al. 2007).

A GC é capaz de promover a separação ao longo do tempo de análise de compostos individuais a partir de uma mistura complexa. O princípio básico de operação de um cromatógrafo a gás envolve a volatilização da amostra em uma porta de entrada aquecida (injetor), separação dos componentes da mistura em coluna especialmente preparada e detecção de cada componente por um detector. Uma faceta importante do cromatógrafo a gás é o uso de um gás de arraste, como hidrogênio ou hélio, para transferir a amostra do injetor, através da coluna e no detector. A coluna, ou enchimento de coluna, contém um revestimento de uma fase estacionária. A separação de componentes é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária (Kitson, Larsen e McEwen 1996).

Atualmente, a espectrometria de massas (MS) se tornou uma das ferramentas mais poderosas para a aquisição de informações sobre composição e estrutura de compostos orgânicos, a fim de verificar a identidade do pico cromatográfico em uma variedade de matrizes ambientais e alimentares (Hernández et al. 2005). Existem inúmeras aplicações na análise de compostos orgânicos com base em GC acoplada à MS; como a determinação de HPAs, pesticidas, bifenilas policloradas, fenóis e alguns procedimentos multirresíduo para a determinação de poluentes orgânicos prioritários e persistentes (Pitarch et al. 2007).

Um espectrômetro de massas é um instrumento que provoca a ionização das moléculas dos analitos e mede a razão massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa e fornece uma medida da abundância de cada espécie iônica. A medição é calibrada com íons de m/z conhecidos (Kitson, Larsen e McEwen 1996).

Pode-se usar o modo de varredura, Full Scan (FS), ou o modo de Monitoramento de Íons Seleccionados (SIM) para análise GC/MS. A escolha depende do objetivo da análise. Para o objetivo de identificar os componentes da amostra usando um espectro de massa, o modo de varredura é indispensável. O modo SIM é adequado para análise quantitativa de componentes traço. Quando os espectros de massa dos componentes traço são conhecidos (Shimadzu 2007). A Figura 3.5 ilustra exemplos de espectros de massa destes dois métodos.

O SIM refere-se ao uso do instrumento para registrar íons em massas

selecionadas que são características do composto de interesse em uma janela de tempo de retenção esperada. Nesse modo, o espectrômetro de massa não gasta tempo varrendo toda a faixa de massa, mas muda rapidamente entre os valores de m/z para os quais os íons característicos são esperados. O método SIM permite a análise quantitativa no nível de ng g^{-1} . Com instrumentos modernos, o sistema de dados pode ser programado para examinar diferentes íons em várias janelas de tempo de retenção. A vantagem deste método é que tanto a alta sensibilidade quanto a alta especificidade são alcançadas (Kitson, Larsen e McEwen 1996).

Um exemplo típico do uso de SIM é a determinação quantitativa de certos compostos específicos em uma mistura complexa, especialmente quando os compostos estão presentes em baixos níveis (Kitson, Larsen e McEwen 1996).

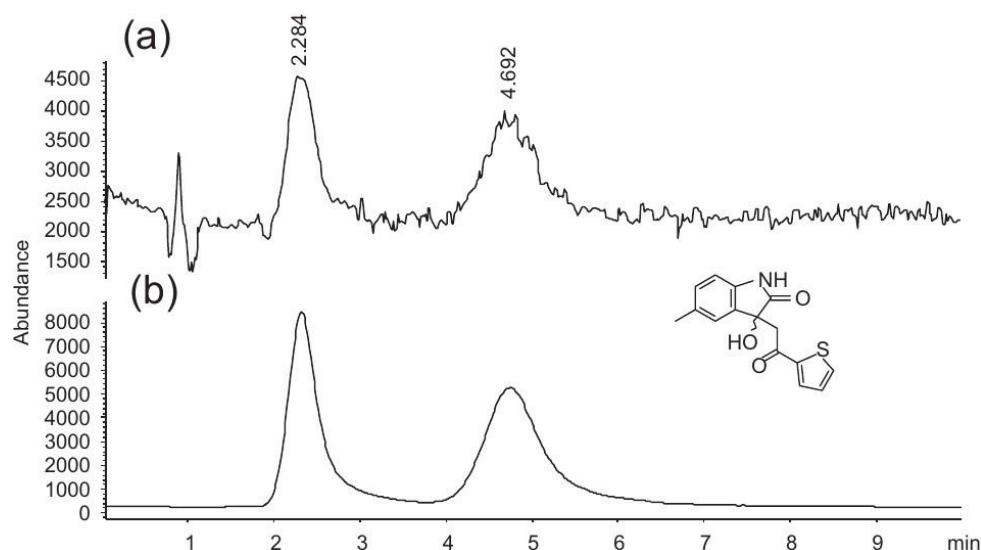


Figura 3.5: A) Full Scan e (b) SIM. Adaptado de Duong-Thi et al. (Duong-Thi et al. 2013)

3.3.5

Parâmetros que Podem ser Otimizados na Extração por ASE

3.3.5.1

Pressão

A pressão, por exemplo, é um parâmetro que pode influenciar a recuperação dos compostos em ASE. Alta pressão é aplicada para manter o solvente em um estado líquido muito acima do ponto de ebulição, sendo, associado à temperatura, um dos parâmetros mais importantes do ASE (Pintado-Herrera et al. 2016), uma vez que aumenta as taxas de difusão e capacidade de solubilização. Pressões mais elevadas também forçam a passagem

do solvente pelos poros do material extraído, tornando os analitos acessíveis e aumentando a eficiência de extração.

Apesar disso, não é relatada relação entre pressão e recuperação, em extrações de HPAs na faixa de trabalho de 1000–2000 psi (Sun et al. 2012). Ao mesmo tempo, pressões acima de 2.000 psi resultam em extratos mais escuros com amplos picos de cromatograma devido à coextração com outros componentes da matriz (Sun et al. 2012, Reindl e Hoefler 1994). A literatura já destaca, para extração de amostras biológicas, que maiores pressões e temperaturas de extração resultam em extratos carregados com compostos de alta massa molecular (lipídios, proteínas) que interferem nas etapas subsequentes de análise (Sun et al. 2012). Ao mesmo tempo a operação em baixa pressão, próxima a 500 psi, torna-se instável, devido às dificuldades em manter a pressão ajustada (Wasik e Ciesielski 2004).

3.3.5.2

Temperatura

Altas temperaturas afetam as propriedades do solvente, sendo a temperatura considerada, portanto, um dos mais importantes parâmetros para ASE. Extrações em altas temperaturas aumentam as taxas de difusão e a capacidade de solubilizar analitos, enfraquecem as interações entre a matriz do analito e componentes da matriz e promovem um decréscimo na viscosidade e tensão superficial (Sun et al. 2012). Temperaturas iguais ou superiores ao ponto de ebulição, associadas à alta pressão no processo de extração, promovem a manutenção do solvente no estado líquido, o que também favorece a eficiência de extração, forçando o solvente em áreas que normalmente não seriam contatadas usando as condições atmosféricas (Sun et al. 2012, Richter et al. 1996). O aumento da solubilidade e da transferência de massa também estão associados às altas temperaturas, que, em contrapartida, diminuem a seletividade. Além disso, temperaturas elevadas podem afetar os compostos termolábeis que estão sujeitos à desintegração e degradação hidrolítica (Sun et al. 2012, Moreno, Reza e Trejo 2007).

A redução da eficiência de extração pode ocorrer quando empregadas temperaturas superiores, por diversos motivos, dentre eles a co-extração dos componentes da matriz e a decomposição do analito (Sun et al. 2012). Além disso, fornecer muita energia (temperatura, pressão) para liberar analitos da matriz pode, eventualmente, induzir sua decomposição, ou perda como resultado de reações entre analitos e matriz (Wasik e Ciesielski 2004, Pereiro, Wasik e Łobiński 1999).

3.3.5.3

Solvente

Propriedades de solventes na temperatura e a pressão de extração devem corresponder às dos compostos alvo, a fim de alcançar a eficiência. A seleção do solvente foi o primeiro passo crucial para o desenvolvimento dos protocolos ASE (Chen et al. 2020). Alguns autores (Björklund, Nilsson e Bøwadt 2000, Saim et al. 1998) relataram o uso de solventes de alta polaridade, e que solventes apolares, aplicados em extrações de HPAs e POPs, podem levar a eficiências mais baixas.

3.3.5.4

Ciclos de Extração

O número de ciclos de extração é outro importante parâmetro e vários autores (Gomez-Ariza et al. 2002, Rodrigues et al. 2016, Zhang et al. 2019) relataram que a maioria dos contaminantes são extraídos durante a primeira extração. O rendimento de ciclos sequenciais é muito menor, mas, muitas vezes, não insignificante, e pode aumentar a recuperação final de cada analito (Subedi e Usenko 2012, Pinto et al. 2014).

A extração em menor número de ciclos pode não ser muito vantajosa. Apesar de se utilizar menor volume de solvente para uma extração em menos ciclos, esta pode reduzir a eficiência da análise pela maior manipulação da amostra.

3.3.5.5

Tempo Estático

O estabelecimento de um tempo de extração estática aumenta a eficiência de extração (Morales-Munoz, Luque-Garcia e Castro 2002). O tempo é ajustado pelo analista (tipicamente 5-10 min) (Vazquez-Roig e Picó 2015) e, muitas vezes, remoções de HPAs de várias matrizes requerem um tempo de extração estático de 5 a 50 min ao realizar vários ciclos de extração (Hageman et al. 1996, Morales-Munoz, Luque-Garcia e Castro 2002).

3.3.5.6

Volume de Rinsagem

O volume de rinsagem pode ter um efeito significativo na recuperação, especialmente durante extrações onde as células ASE são empacotadas com um fase estacionária, pois isso pode aumentar a retenção dos analitos (Lund et al. 2009). Efeitos de volumes de rinsagem entre 70 e 130% demonstraram que as recuperações de HPAs com 2-4 anéis aromáticos não foram

afetadas pelo volume de rinsagem. Por outro lado, aumentar o volume de rinsagem de 70 para 100% aumenta significativamente as recuperações de HPAs de 5 e 6 anéis (Lund et al. 2009).

4

Materiais e Métodos

4.1

Vidrarias

As vidrarias utilizadas no presente estudo foram: proveta graduada; Bécher; bastão de vidro; pipetas; balões volumétricos.

A descontaminação da vidraria não volumétrica foi feita em mufla a 400 °C após lavagem com detergente neutro e água destilada e a vidraria volumétrica foi descontaminada com diclorometano após lavagem com detergente neutro e água destilada;

4.2

Padrões, Reagentes e Solventes

Solventes grau gradiente para cromatografia, fornecidos por Merck (Darmstadt, Alemanha):

Metanol CAS-No 67-56-1

Diclorometano CAS-No 75-09-2

N-hexano CAS-No 110-54-3

Padrões fornecidos por Accustandard® (New Haven, USA):

Padrão de HPAs H-QME-01 PAH mix (Quebec Ministry of Environmental)

Padrão sub-rogado M-8270-SS surrogate

Padrão interno Z-014J Internal Standard

Materiais adsorventes usados para extração in-cell:

Silica gel 60 (0,063-0,200 mm) para coluna cromatográfica, CAS-No 112926-00-8; Supelco, Saint Louis, USA), fornecidos por Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Óxido de alumínio 90 neutro para coluna cromatográfica, CAS-No 1344-28-1; Supelco, Saint Louis, USA), fornecido por Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Sulfato de sódio CAS-No 7757-82-6, Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), fornecido por Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

4.3

Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados no presente estudo foram:

- Cromatógrafo a gás Thermo Trace-GC (Thermo Scientific; Bremen, Germany) acoplado a um espectrômetro de massas Thermo ISQ (Thermo Scientific; Bremen, Germany), Software: XCalibur;
- Equipamento de extração acelerada por solvente – Modelo: ASE™ 300
– Marca: Dionex™;
- Liofilizador – Modelo: ModulyoD – Marca: Thermo Scientific;
- Balança analítica- Modelo: AS200S- Marca: OHAUS;
- Balança analítica – Modelo: AT 261 DeltaRange- Marca: Mettler Toledo;
- Evaporador de Amostras – Modelo: TurboVap® LV – Marca: Caliper;
- Evaporador de Amostras – Modelo: Rotavapor® R-215 – Marca: Buchi;
- Purificador de água Milli-Q – Modelo: Integral 5 – Marca: Merck Millipore;
- Microseringas Hamilton.

4.4

Implementação da Metodologia Analítica

4.4.1

Extração e Manipulação do Extrato

Alíquotas de tecido (0,5; 1,0 e 3,0 g) foram extraídas por extração com líquido pressurizado utilizando o equipamento ASE 300 (Thermo Scientific, Bremen, Germany). A pressão de extração foi 1500 psi e temperaturas de 80 a 125 °C. Os parâmetros número de ciclos de extração, tempo estático, tempo de purga e volume de rinsagem também variaram a cada teste.

Diferentes misturas de solventes n-hexano, diclorometano e metanol foram usadas. O tipo e quantidade de adsorventes também foram testados, sendo estes sílica desativada (5% m/m) e alumina (2% m/m). A montagem das células de volume 60 ml foi feita com material adsorvente na base, amostra de tecido e preenchida com terra diatomácea, intercalando cada camada com filtros de celulose. Brancos foram analisados a cada bloco de seis amostras para demonstrar que nenhuma contaminação que afetaria o padrão ou a análise das amostras estiveram presentes. Um resumo do procedimento de extração está apresentado na Figura 4.1.

As recuperações de extração de HPAs de tecidos de organismos marinhos foram avaliadas através do uso de dois diferentes materiais de referência certificados (MRCs), National Institute of Standard and Technology (NIST) No. 2974a (Compostos orgânicos em tecido de mexilhão liofilizado - *Mytilus edulis*) e International Atomic Energy Agency (IAEA) No. 435 (compostos organoclorados e hidrocarbonetos de petróleo em homogenato de atum), e amostras liofilizadas de músculo de sardinha fortificadas (*Sardinella* sp.). As amostras de sardinha foram secas para concordar com o material padrão de referência, disponível como amostras livres de umidade. A fortificação foi feita com 10 ng/g e 100 ng/g de padrão com mistura dos 16 HPAs prioritários (PAH Mix, AccuStandard). Para adequação e posterior avaliação de recuperações variou-se a massa extraída, material extraído, material adsorvente e polaridade do solvente, como exposto na Tabela 5.1.

Antes de iniciar a extração, foi adicionado à amostra o padrão subrogado (p-terfenil-D₁₄ - AccuStandard): para controle da fração de hidrocarbonetos aromáticos (100 ng). Os solventes utilizados foram diclorometano LiChrosolv® e metanol LiChrosolv®, do fabricante Merck.

Após extração, os extratos de cada teste foram concentrados e submetidos a fracionamento por cromatografia líquida em coluna de vidro (1,3 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura) empacotada com Na₂SO₄ anidro, 7 g de alumina desativada a 2% e 10 g de sílica desativada a 5%. A coluna foi eluída com 50 mL de hexano para a retirada dos hidrocarbonetos alifáticos e, posteriormente, foi obtida a fração de aromáticos pela eluição de 75 mL de

mistura diclorometano:hexano (1:1).

O extrato aromático foi concentrado a 1 mL em evaporador de amostras e fluxo de N₂. Foi adicionado como padrão interno (100 ng) a mistura de HPA deuterados, contendo: (i) naftaleno-d₈, (ii) acenafteno-d₁₀, (iii) fenantreno-d₁₀, (iv) criseno-d₁₂ e; (v) perileno-d₁₂ (Internal Standard, AccuStandard).

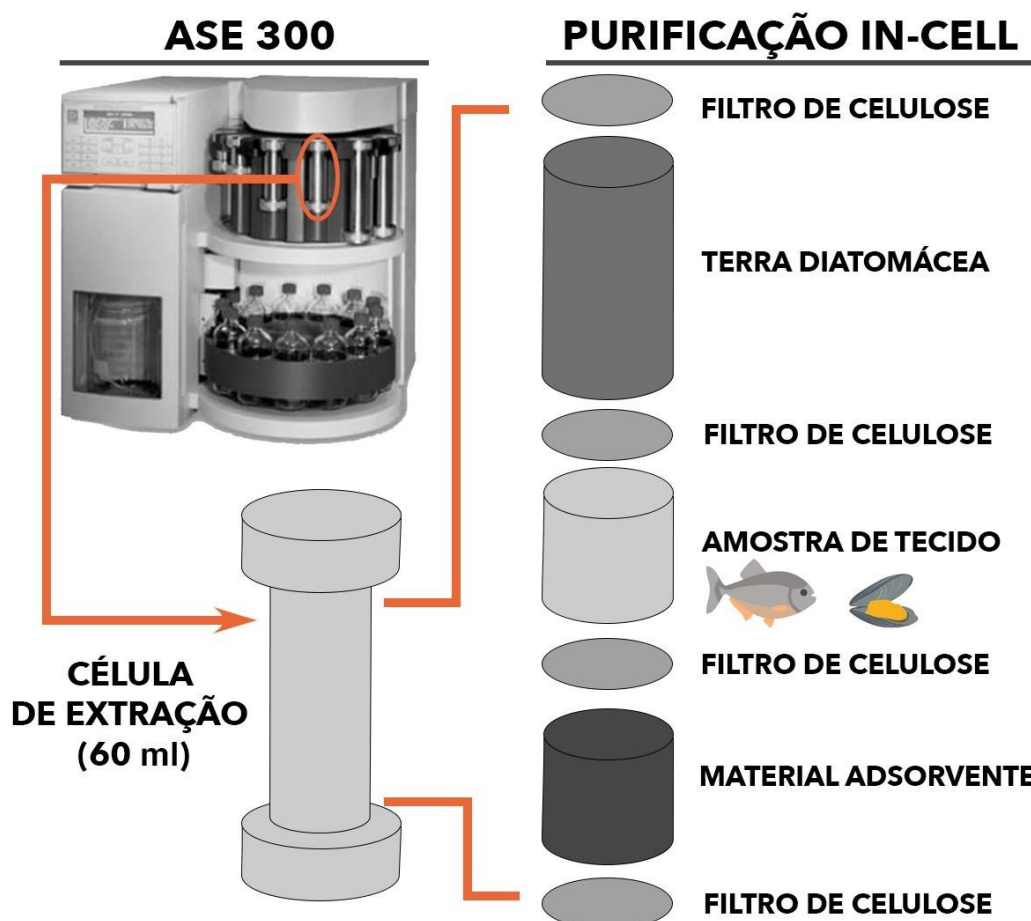


Figura 4.1: Procedimento de Extração Acelerada por Solvente (ASE 300 - Thermo Scientific) com purificação in-cell.

4.5

Análise Instrumental

A quantificação de HPAs foi realizada por cromatografia a gás (Thermo Trace-GC) acoplado a espectrômetro de massas (Thermo ISQ), baseada no método da US-EPA 8270 (EPA 2018) e com o uso do Software Xcalibur (Thermo Fischer).

A Tabela 4.1 resume as condições instrumentais utilizadas na determinação dos HPAs individuais. O sistema do espectrômetro de massas com armadilha de íons operou em modo de Monitoramento de Íons Seleccionados (SIM).

Uma curva de calibração com base na adição de padrão interno (100 ng) e 10 níveis de concentração (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 and 1000 ng mL⁻¹) dos 16 HPAs prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), como estabelecido pela US-EPA mais dibenzotiofeno, benzo[e]pireno e perileno, foi preparada.

Todas as curvas com um coeficiente de correlação de Pearson (R^2) > 0,99 ou superiores foram aceitas e a homocedasticidade dos resíduos do método dos mínimos quadrados usados no modelo linear de calibração foi confirmado pelo teste estatístico Cochran.

Além disso, o limite de detecção (LOD) foi calculado com base no desvio padrão da resposta (S_y) da curva e inclinação da curva de calibração (S) em níveis que se aproximam do LOD, de acordo com a fórmula: $LOD = 3,3(S_y/S)$, enquanto o limite de quantificação (LOQ) foi determinado de forma conservadora com base na massa média da amostra extraída (para as condições do teste que apresentou melhor resultado) e na concentração do ponto mais baixo da curva analítica.

Tabela 4.1: . Condições instrumentais para determinação de HPAs individuais.

Equipamento	EM - Finnigan modelo ISQ
Coluna	GC – Finnigan modelo TraceGC J&W DB-5ms (30 m, 0,25 mm de DI e 0,25 µm de filme)
Programa de temperatura	50°C durante 5 min 50°C min ⁻¹ até 80°C , 6°C min ⁻¹ até 280°C durante 20 min, 12°C min ⁻¹ até 305°C durante 10 min
Gás de arraste	hélio a 1,2 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	1µL

5

Resultados e Discussão

No desenvolvimento do método existiram, conforme mencionado, diversos parâmetros a serem otimizados. Obviamente, esta tarefa não é iniciada do zero, existindo uma ampla bibliografia de suporte para orientar os passos iniciais e caminhos a serem seguidos. Com base nos dados obtidos da seção 3.3.5.1, a pressão intermediária 1500 psi foi mantida ao longo dos testes. Para garantir a melhor recuperação, dois e três ciclos foram testados.

A tabela 5.1 resume as condições testadas, com as variações de temperaturas de extração, solventes, adsorventes para retenção da fração de gorduras e demais parâmetros.

Tabela 5.1: Parâmetros do método ajustados para extração acelerada por solvente de amostras de tecido de organismo marinho

Teste	Massa (g)	Adsorvente	Solvente	Temperatura (°C)	Ciclos	Tempo estático (min)	Tempo de purga (s)	Vol. rinsagem (%)
A	0,50	alumina 20 g	DCM	125	3	6	300	60
B	3,00	alumina 12 g	DCM	125	2	6	300	60
C	0,50	alumina 5 g	DCM	125	2	5	60	60
D	1,00	sílica 5 g	DCM:M (4:1)	80	3	10	90	75
E	0,50	sílica 5 g	DCM:M (4:1)	80	3	10	90	75

DCM: diclorometano; M: metanol.

Os testes iniciais (A-C) visavam avaliar a escolha de solvente diclorometano (DCM) de acordo com as recuperações obtidas. Foi conduzido o teste A, com amostras de Material certificado IAEA 435A - Tuna Homogenate (n=1) e Tecido de Sardinha (n=1) e branco (n=1). Com as recuperações de padrão sub-rogado atingindo de 73 a 100%, deu-se continuidade aos testes utilizando este solvente. As médias de recuperações de HPAs deste teste variaram de 12 a 62%, consideradas insatisfatórias.

Em SPLE, a quantidade de adsorvente deve ser cuidadosamente selecionada para evitar a retenção dos analitos de interesse (Suranová et al. 2015, Vazquez-Roig e Picó 2015). Para eliminar a possibilidade de interferência do excesso de alumina, foi feito o teste B com uma proporção de 1:4 de amostra:adsorvente e também foi reduzido o número de ciclos de 3 para 2. As demais condições foram mantidas.

O teste B foi conduzido com Tecido de Sardinha fortificado a 10 ng/g (n=4) e 100 ng/g (n=4) e material certificado IAEA 435A - Tuna Homogenate (n=2). Neste teste B foi possível observar, a olho nu, que a fração lipídica das duas réplicas do material certificado IAEA 435A - Tuna Homogenate

(IAEA 2005) testadas não havia sido suficientemente removida na extração, o que motivou a redução para 0,5 g de amostra no teste C, com também redução de alumina para 5 g, estabelecendo-se, assim, uma proporção 1:10 de amostra:adsorvente.

O teste C foi conduzido com material certificado NIST SRM 2974a - Organics in Freeze-Dried in Mussel Tissue (n=5). Nesse teste C, o tempo de purga foi reduzido de 300 s para 60 s (Pintado-Herrera et al. 2016, Rodrigues et al. 2016, Lund et al. 2009), pois tempos superiores podem levar a uma perda de componentes facilmente voláteis durante o processo de purga (Wianowska 2014).

Para este teste, as médias de recuperação de HPAs variaram de $18,97 \pm 9,04\%$ (Naftaleno) a $106 \pm 41\%$ (Benzo(b)fluoranteno), tendo uma média geral de recuperações de $56,78 \pm 30,71\%$ e, no geral, também não apresentou boa recuperação de padrão sub-rogado (2,84 % a 63,53 %), com uma média destas recuperações de $52,37 \pm 18,80\%$. Devido aos resultados do teste anterior, não foi alterado o solvente para o próximo teste. Foi alterados também no teste C o tempo estático, de 6 min para 5 min. Para o teste C, também foi utilizado um novo padrão, NIST SRM 2974a - Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)(NIST 2016).

As recuperações de padrão sub-rogado foram muito boas para este teste, 70% a 93% porém, não foi satisfatória a detecção de analitos referenciados ou certificados. As médias destas últimas variaram de $41,47 \pm 10,39\%$ (Benzo[ghi]perileno) a $109,71 \pm 27,34\%$ (Benzo[k]fluoranteno).

Apesar da alta temperatura ser um fator relevante para eficiência de extração(Brockmeyer, Kraus e Theobald 2015) valores elevados ($125\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram ineficientes na recuperação de HPAs de baixo peso molecular. Nos testes iniciais a recuperação de naftaleno no spike de HPAs (teste B, considerando as duas concentrações testadas) foi de $18,97 \pm 9,04\%$, assim como $19,01 \pm 13,79\%$ para o acenaftileno e $24,58 \pm 16,41\%$ para o acenafteno . Nestes testes iniciais apenas a partir do Fluoreno, cuja pressão de vapor é 0,09 Pa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a recuperação começou a apresentar resultados satisfatórios ($58,84 \pm 26,25\%$). Uma vez que o método proposto abrange HPAs de 2 a 6 anéis com pressões de vapor entre 10,4 Pa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (naftaleno) e $6,00 \times 10^{-8}$ Pa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Benzo[ghi]perileno), este parâmetro foi testado novamente em uma temperatura inferior ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Com o objetivo de se reduzir possíveis interferentes da gordura da amostra , uma mudança de adsorventes, de alumina para sílica (Subedi et al. 2011, Clark et al. 2015) foi aplicada ao teste D. A sílica é mais eficiente que a alumina na remoção de gordura (Lund et al. 2009). Como desvantagem, é menos

seletiva (Rodrigues et al. 2016). Também foi modificado o solvente. Uma combinação de solventes DCM:MeOH (4:1) (Clark et al. 2015) foi testada. Para este teste também foi aumentada a massa de amostra para um valor intermediário entre as massas de padrão dos testes anteriores (B e C).

Além disso, o número de ciclos foi aumentado, assim como o tempo estático e de purga e volume de rinsagem. Com base nessas informações da seção 3.3.5.6, foi escolhido um volume de rinsagem intermediário, de 75%. Foram priorizados 3 ciclos de extração para os testes finais.

O teste D foi conduzido com material certificado NIST SRM 2974a - Organics in Freeze-Dried in Mussel Tissue (n=3). Os resultados para o teste D foram satisfatórios, com médias de recuperações de HPAs variando de $66,94 \pm 2,93\%$ (Naftaleno) a $100,17 \pm 4,49\%$ (Benzo[e]pireno). A média de recuperação para todos os HPAs deste teste foi $83,28 \pm 14,34\%$. Se observou também que as condições ajustadas favoreceram melhores valores de desvio padrão amostral, evidenciando uma menor dispersão nos resultados.

O teste E foi conduzido com material certificado NIST SRM 2974a - Organics in Freeze-Dried in Mussel Tissue (n=3). Para o teste E, foram testadas as mesmas condições do teste D, com massa de amostra reduzida para 0,5 g, tendo uma proporção novamente de 1:10 de amostra:adsorvente. Este teste teve médias de recuperações de HPAs variando de $74,19 \pm 5,27\%$ (Naftaleno) a $104,60 \pm 20,70\%$ (Benzo[e]pireno). A média de recuperação para todos os HPAs deste teste foi $85,92 \pm 17,95\%$.

5.0.0.1

Avaliação Geral

Os resultados foram avaliados com base nos compostos presentes em todas as matrizes testadas, em todos os testes (Figura 5.1).

Os testes A, B e C não atingiram a meta mínima de recuperação dos compostos de interesse (65%) sugerida por Pfannkoch, et al, 2015 (Pfannkoch et al. 2015). Menores recuperações de compostos de baixo peso molecular foram observadas em temperaturas acima de 80 °C. As médias de recuperações de HPAs de baixo peso molecular (2-3 anéis) variaram de 12 a 31% no teste A, 19 a 58% no teste B e 55-59% no teste C. Por outro lado, recuperações de HPAs de baixo peso molecular nos testes D e E variaram de 60 a 76% e de 57 a 77%, respectivamente, diretamente relacionadas à temperatura de extração.

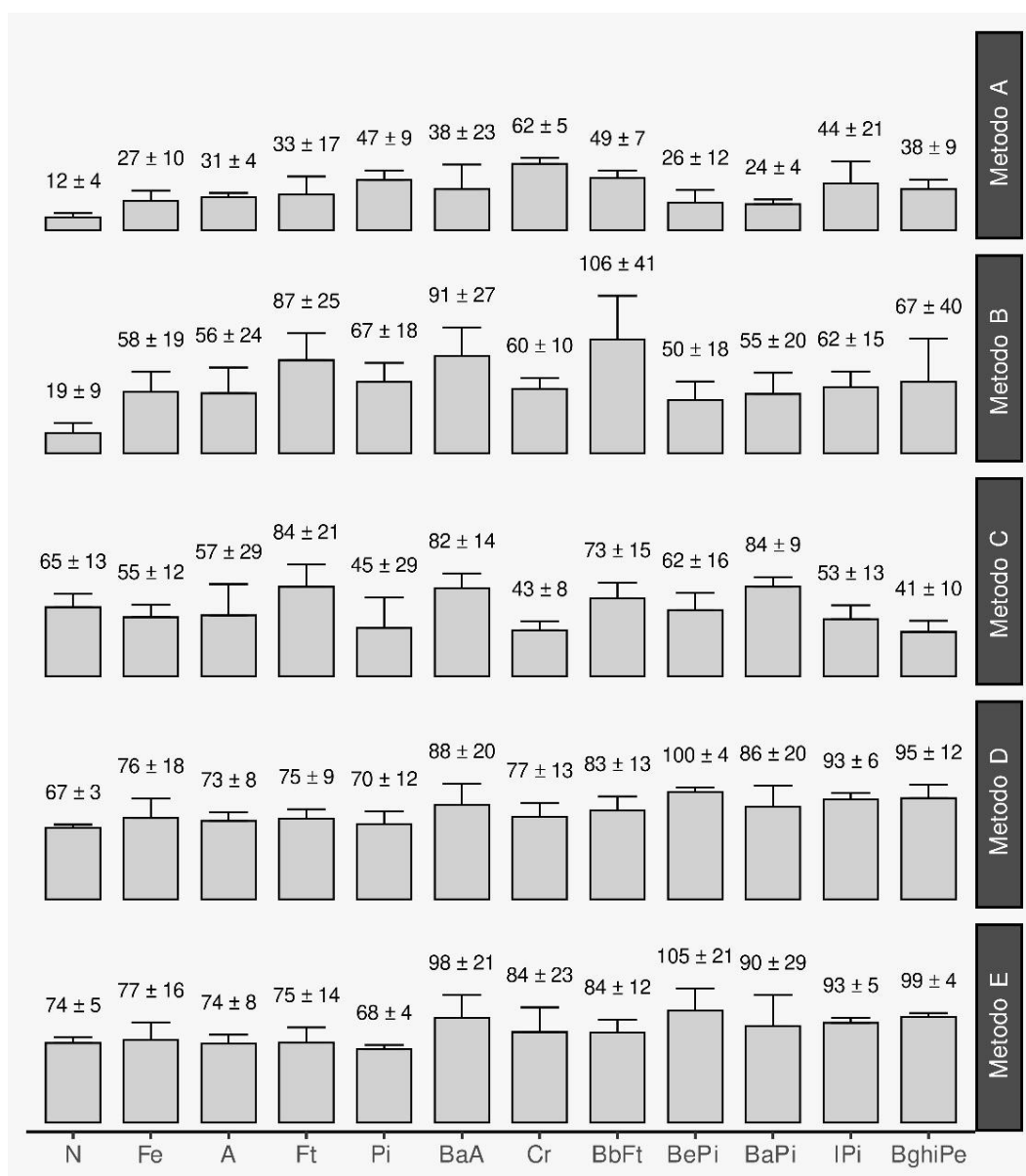


Figura 5.1: Recuperações médias (relativas e desvios padrão (%), acima das barras) de HPAs selecionados (ver Tabela 5.3 para nomes de compostos) e relativos desvios padrão (colchetes abaixo das barras) em todos os testes realizados.

Os testes D e E exibiram recuperação média de alta performance para compostos de baixo e alto peso molecular. Eles também apresentaram menores desvios padrão entre as repetições, conforme evidenciado pelo desvio padrão relativo calculado. Os resultados dos testes preliminares relatados aqui indicam que o quarto teste (D) foi o mais promissor. Os resultados dos testes D e E foram semelhantes, com altas recuperações e purificação do extrato. A escolha do teste D é devida a maiores massas extraídas e, portanto, menos viés analítico devido ao tamanho da amostra, bem como o potencial para limites inferiores de quantificação.

Este método foi desenvolvido usando amostras isentas de água, para garantir a repetibilidade, uma vez que o teor de água nas amostras varia amplamente e, conseqüentemente, o mesmo acontece com a massa de tecido extraída. Riscos para a saúde humana devido à ingestão de alimentos contaminados consideram muitas variáveis, dentre elas as taxas de consumo de peixe (EPA 2001, Rodrigues et al. 2016). Uma vez que essas taxas são calculadas em relação a como o item alimentar é consumido, úmido, peso úmido deve ser determinado antes ou após o processo de liofilização ou após tratamento da amostra com de sulfato de sódio antes da extração.

5.0.0.2

Comparação Entre Método Convencional e Desenvolvido

O método convencional para extração de HPAs em tecidos marinhos é composto por Extração de Soxhlet acoplada à purificação por GPC. A comparação entre método convencional e desenvolvido, levando em consideração valores médios de volume gasto de solvente e tempo médio de execução encontra-se na Tabela 5.2. Nela pode-se também observar a economia de solvente e tempo de execução quando comparados ambos métodos.

Tabela 5.2: Comparação Entre Método Convencional e Desenvolvido

	Convencional	Desenvolvido	Economia
Volume de Solvente (ml)	260	55	78,8 %
Tempo (h)	18	0,8	95,6 %

5.1

Verificação da Eficiência do Método

Com base nos resultados obtidos apresentados na Tabela 5.1, nove Amostras do MRC NIST 2974a foram extraídas através dos parâmetros do teste D para verificação da eficiência do método. A Figura 5.2 mostra um típico Perfil GC-MS de monitoramento de íons selecionados, obtido na análise NIST. Este material de referência padrão foi escolhido porque tem o maior teor de lipídios, e é a matriz mais complexa disponível.

Outra importante questão para escolher material certificado em vez de amostras fortificadas é a reprodutibilidade da extração de amostra real. Nos testes incrementais (spike), os HPAs são adicionados às amostras de tecido e extraídos da matriz testada, em vez de serem incorporados à matriz, como em materiais de referência.

Compostos fortificados e ambientalmente envelhecidos podem não estar situados nos mesmos sítios de ligação ou expostos às mesmas interações físicas e químicas. Além disso, uma vez que o processo de fortificação geralmente envolve o uso de um solvente para adicionar o analito à matriz sólida, este pode afetar a integridade química da amostra, gerando, assim, uma amostra que não é comparável com a amostra que contém os compostos envelhecidos ambientalmente (Moreno, Reza e Trejo 2007, Hawthorne, Yang e Miller 1994, Burford, Hawthorne e Miller 1993).

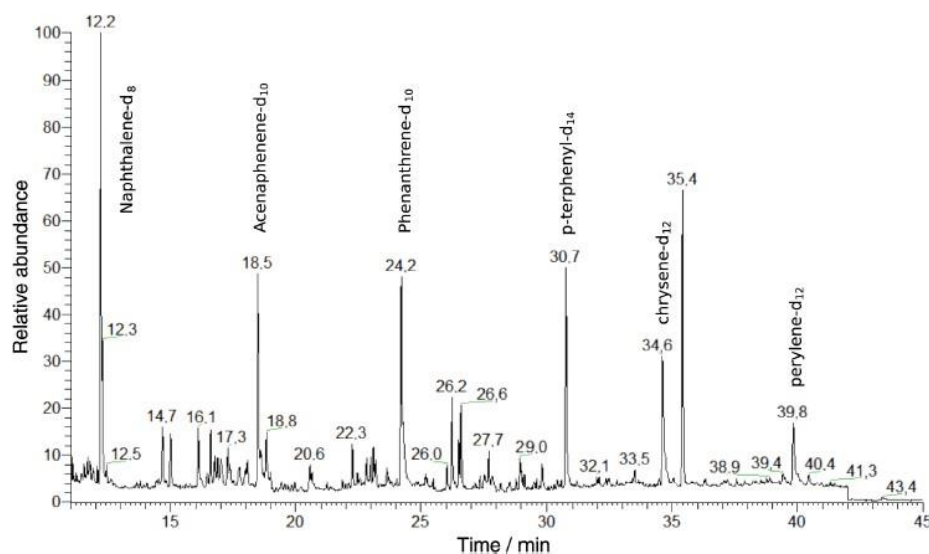


Figura 5.2: Exemplo de um perfil obtido pela análise de monitoramento de íons selecionados por GC-MS do material de referência certificado (NIST 2974a), mostrando os padrões internos deuterados adicionados (veja o texto para detalhes).

O procedimento proposto extraiu com precisão os HPAs de uma ampla faixa de concentração de HPA (1,9-225 ng g⁻¹) e as recuperações, aplicadas para avaliar o desempenho do método quando investigando um determinado material (IAEA 2003), apresentaram excelentes valores (Figura 5.3). O intervalo de recuperações médias do MRC extraído pelo método desenvolvido variou de $69 \pm 17\%$ (naftaleno) a $102 \pm 16\%$ (benzo [e] pireno), comprovando sua eficiência. A média e o desvio padrão considerando todos os HPAs foi de $83 \pm 14\%$. A menor recuperação e alto desvio relativo para naftaleno em comparação com o outros determinados HPAs pode ser atribuída à sua pressão de vapor (10,4 Pa a 25 °C) e consequentes perdas por evaporação. No entanto, apesar das perdas durante o processo analítico, naftaleno ainda obteve boa recuperação, dentro da faixa de outras avaliações de HPAs e ASE, por exemplo, 66-101% relatado por Brockmeyer, Kraus e Theobald (Brockmeyer, Kraus e Theobald 2015), e 53-93% por Wang et al. (Wang et al. 1999).

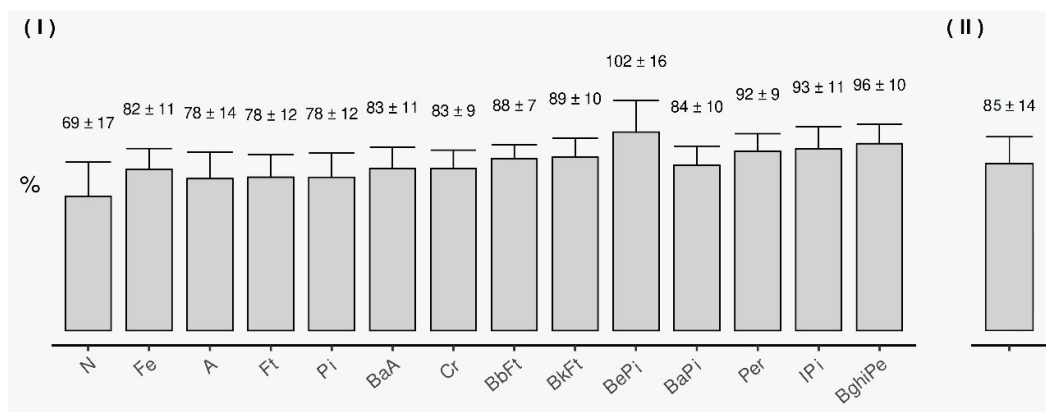


Figura 5.3: Médias de recuperação de HPAs individuais (I) e globais (II) e desvios padrão de nove réplicas do MRC NIST extraídas através dos parâmetros estabelecidos pelo método D (consulte a Tabela 5.3 para nomes de compostos).

Além de bons valores de recuperação, média e valores de incerteza também foram comparados às incertezas do material de referência. O valor do NIST certificado é um valor de média não ponderada dos resultados de dois ou três métodos analíticos e a incerteza listada é uma incerteza expandida da média (Taylor e Kuyatt 1994). Os valores de referência listados para NIST são as médias de resultados aplicando uma técnica analítica, e a incerteza expandida (U) é calculada como $U = ku_c$, onde u_c é um desvio padrão da média do analito, e k é um fator de cobertura. A incerteza padrão estimada da média, u_{xi} , é calculada dividindo o desvio padrão (s) pela raiz quadrada do número de observações (Stant, Aaen e Ridler 2016, JCGM 2008), aqui expandida ainda mais pelo valor t em um nível de confiança de 95%.

Tabela 5.3: Médias ($\bar{x}$) e incertezas (u) para o material de referência padrão, método desenvolvido e erro normalizado

Composto	Média / (ng g ⁻¹)		Erro normalizado $\frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\sqrt{u_1^2 + u_2^2}}$	LOD/LOQ / (ng g ⁻¹)
	NIST 2974a $\bar{x}_1 \pm u_1$	Método desenvolvido $\bar{x}_2 \pm u_2$		
Naftaleno (N)	9,68 ± 0,61 ^a	6,66 ± 3,01	0,98	0,02/0,40
Fenantreno (Fe)	74,4 ± 4,7 ^b	61,3 ± 14,3	0,87	0,04/0,40
Antraceno (A)	2,46 ± 0,10 ^a	1,94 ± 0,59	0,87	0,02/0,40
Fluoranteno (Ft)	287 ± 34 ^b	225 ± 60	0,90	0,02/0,40
Pireno (Pi)	166 ± 21 ^b	130 ± 37	0,85	0,04/0,40
Benzo[a]antraceno(BaA)	31,1 ± 3,9 ^b	25,8 ± 6,1	0,73	0,06/0,40
Criseno (Cr)	123,6 ± 2,9 ^b	106 ± 21	0,81	0,06/0,40
Benzo[b]fluoranteno (BbFt)	41,5 ± 2,6 ^b	36,5 ± 5,24	0,85	0,04/0,40
Benzo[k]fluoranteno(BkFt)	18,95 ± 0,54 ^b	16,8 ± 3,3	0,62	0,04/0,40
Benzo[e]pireno (BePi)	28,9 ± 2,9 ^b	29,4 ± 8,3	0,01	0,02/0,40
Benzo[a]pireno (BaPi)	9,73 ± 0,43 ^b	8,22 ± 1,71	0,86	0,04/0,40
Perileno (Per)	6,80 ± 0,34 ^b	6,23 ± 1,09	0,50	0,04/0,40
Indeno[1,2,3-cd]pireno (IPi)	14,9 ± 4,5 ^a	13,9 ± 3,0	0,20	0,04/0,40
Benzo[ghi]perileno (BguiP)	23,7 ± 2,2 ^b	22,7 ± 4,2	0,23	0,04/0,40

^a Fração mássica de referência; ^b fração mássica certificada. LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

Avaliações de média e incerteza foram realizadas por meio de erros normalizados (Tabela 5.3), onde os valores de erro inferior a 1 são considerados conformes ou aprovados, e fora desse valor (≥ 1), não conforme ou com falha. Todos os valores de erros normalizados nessa pesquisa estavam dentro de intervalos aceitáveis. Além disso, os limites de detecção (LOD) calculados e de quantificação (LOQ) obtidos pelo método proposto, respectivamente 0,02-0,04 ng g⁻¹ e 0,40 ng g⁻¹ para os compostos de HPA incluídos na Tabela 5.3, estão bem abaixo dos limites de contaminação da biota e, portanto, adequado para avaliação de carga corporal de HPAs.

6

Conclusões

6.1

Conclusões e Trabalhos Futuros

Uma vez que os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são consideradas poluentes orgânicos altamente persistentes e cuja toxicidade aos seres vivos é motivo de atenção, torna-se urgente o desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos, mais rápidos e de menor custo, que sejam capazes de monitorar esses compostos em matrizes ambientais.

Um método SPLE para extrair HPAs prioritários em tecidos de organismos marinhos foi otimizado com base nas recuperações de compostos de interesse com concentrações conhecidas em material certificado.

Quando aplicado a tecidos marinhos, o método SPLE apresentou altas recuperações, tão desejáveis quanto as de um método PLE convencional com limpeza externa ou um soxhlet clássico. No entanto, o tempo de preparação da amostra foi reduzido em mais de 50% ao incorporar as etapas de limpeza no recipiente de extração. Durante a otimização, o consumo de solvente foi muito reduzido, métodos tradicionais, como a extração de soxhlet acoplada à purificação por GPC, sem perda na eficiência de extração dos HPAs, enfatizando a importância deste estudo de uma perspectiva de química verde.

O método desenvolvido mostrou-se confiável para a determinação de HPAs. Os parâmetros de extração do método proposto garantem grande eficiência de extração, pouca manipulação do extrato e eliminando procedimentos de purificação como, por exemplo, cromatografia de permeação em gel (GPC). Foi possível alcançar número reduzido de etapas analíticas, tendo extração e purificação condensadas na mesma etapa.

No entanto, para a reprodução deste método, é aconselhável a determinação do teor de gordura da amostra a ser analisada em outra extração, uma vez que a purificação na célula retém parte dos lipídios.

O material certificado utilizado para a validação deste método, tecido de mexilhão, apresenta cerca de 4% de teor de gordura (amostra úmida) (Medeiros et al. 2001). Maiores teores podem demandar maiores quantidades de adsorvente na célula e até mesmo diferentes parâmetros de análise. Em estudos futuros, a determinação destes parâmetros em função do teor lipídico do tecido de análise pode estabelecer uma proporção de gordura para retentor de gordura (FFR).

Os parâmetros do método de extração definidos ao longo desta pesquisa são os seguintes: 1 g de tecido liofilizado, 5 g de sílica desativada (5%), solução de diclorometano: metanol (4:1 v/v), temperatura de 80 ° C, três ciclos, 10 min de tempo estático e 90 s de tempo de purga.

Referências bibliográficas

Abdallah et al. 2013 ABDALLAH, M. et al. A one-step extraction/clean-up method for determination of pcbs, pbdes and hbcds in environmental solid matrices. **Environmental Science: Processes & Impacts**, Royal Society of Chemistry, v. 15, n. 12, p. 2279–2287, 2013. Citado na página 16.

Andreu e Picó 2019 ANDREU, V.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 118, p. 709–721, 2019. Citado na página 16.

APARG 1995 APARG. **Report on the Abatement of Toxic Organic Micropollutants from Stationary Sources**. [S.l.]: Air Pollution Abatement Review Group, 1995. Citado na página 22.

Ashraf 2017 ASHRAF, M. A. **Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge**. [S.l.]: Springer, 2017. Citado na página 19.

Ashraf et al. 2015 ASHRAF, M. A. et al. **Environmental impacts of metallic elements: speciation, bioavailability and remediation**. [S.l.]: Springer, 2015. Citado na página 19.

ATSDR 1995 ATSDR. **Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. 1995. <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>>. Accessed: 2021-08-31. Citado na página 15.

Balcioğlu et al. 2014 BALCIOĞLU, E. B. et al. T-pah contamination in mediterranean mussels (*mytilus galloprovincialis*, lamarck, 1819) at various stations of the turkish straits system. **Marine pollution bulletin**, Elsevier, v. 88, n. 1-2, p. 344–346, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 26.

Bergman et al. 2013 BERGMAN, Å. et al. State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012. united nations environment programme and the world health organization. **Inter-organization Programme for the Sound Management of Chemicals**, 2013. Citado na página 25.

Bettin e Franco 2005 BETTIN, S.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) em aguardentes. **Food Science and Technology**, SciELO Brasil, v. 25, p. 234–238, 2005. Citado na página 24.

Björklund, Nilsson e Bøwadt 2000 BJÖRKLUND, E.; NILSSON, T.; BØWADT, S. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 19, n. 7, p. 434–445, 2000. Citado na página 35.

Bouchez et al. 1996 BOUCHEZ, M. et al. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. première partie. propriété, origines, devenir. **Revue de L'institut Francais du Pétrole**, EDP Sciences, v. 51, n. 3, p. 407–419, 1996. Citado na página 22.

Brockmeyer, Kraus e Theobald 2015 BROCKMEYER, B.; KRAUS, U. R.; THEOBALD, N. Accelerated solvent extraction (ase) for purification and extraction of silicone passive samplers used for the monitoring of organic pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, Springer, v. 22, n. 24, p. 19887–19895, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 47.

Buccini 2003 BUCCINI, J. The development of a global treaty on persistent organic pollutants (pops). In: **Persistent organic pollutants**. [S.l.]: Springer, 2003. p. 13–30. Citado na página 20.

Burford, Hawthorne e Miller 1993 BURFORD, M. D.; HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. Extraction rates of spiked versus native pahs from heterogeneous environmental samples using supercritical fluid extraction and sonication in methylene chloride. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 65, n. 11, p. 1497–1505, 1993. Citado na página 47.

Cardoso et al. 2010 CARDOSO, M. H. W. M. et al. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. **Food Science and Technology**, SciELO Brasil, v. 30, p. 429–438, 2010. Citado na página 31.

Chen et al. 2020 CHEN, W. et al. Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. **Algal Research**, Elsevier, v. 51, p. 102080, 2020. Citado na página 35.

Cho et al. 2008 CHO, S.-K. et al. Effectiveness of pressurized liquid extraction and solvent extraction for the simultaneous quantification of 14 pesticide residues in green tea using gc. **Journal of separation science**, Wiley Online Library, v. 31, n. 10, p. 1750–1760, 2008. Citado na página 29.

Choi et al. 2009 CHOI, M. et al. Stockholm convention organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in hong kong air. **Chemosphere**, Elsevier, v. 77, n. 6, p. 714–719, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 25.

Choi et al. 2016 CHOI, M. et al. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 205, p. 1–8, 2016. Citado na página 16.

Cioca, Heemken e Mihaiu 2017 CIOCA, A.-A.; HEEMKEN, O.; MIHAIU, M. The rate of success of the accelerated solvent extraction (ase) of fat and organochlorine pesticides from dried fish meat samples. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine**, v. 74, n. 1, 2017. Citado na página 16.

Clark et al. 2015 CLARK, A. E. et al. Pressurized liquid extraction technique for the analysis of pesticides, pcbs, pbdes, opes, pahs, alkanes, hopanes, and steranes in atmospheric particulate matter. **Chemosphere**, Elsevier, v. 137, p. 33–44, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.

Conti et al. 2015 CONTI, G. O. et al. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: an elisa study. **Food Control**, Elsevier, v. 50, p. 937–941, 2015. Citado na página 25.

Cristaldi et al. 2017 CRISTALDI, A. et al. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and pahs. a brief review. **Environmental Technology & Innovation**, Elsevier, v. 8, p. 309–326, 2017. Citado na página 22.

Dionex 1999 DIONEX. **ASE® 200 ACCELERATED SOLVENT EXTRACTOR OPERATOR'S MANUAL**. [S.l.]: Dionex Corporation, 1999. <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/57733-31149-04.pdf>>. Accessed: 2021-12-11. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 30.

Dodds et al. 2004 DODDS, E. D. et al. Microscale recovery of total lipids from fish tissue by accelerated solvent extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Springer, v. 81, n. 9, p. 835–840, 2004. Citado na página 16.

Domingo et al. 2007 DOMINGO, J. L. et al. Benefits and risks of fish consumption: Part i. a quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, Elsevier, v. 230, n. 2-3, p. 219–226, 2007. Citado na página 25.

Duong-Thi et al. 2013 DUONG-THI, M.-D. et al. Weak affinity chromatography for evaluation of stereoisomers in early drug discovery. **Journal of biomolecular screening**, Sage Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 18, n. 6, p. 748–755, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 33.

EPA 1996 EPA. **EPA Method METHOD 3540C - SOXHLET EXTRACTION**. [S.l.]: U.S. EPA: Washington DC, 1996. <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3540c.pdf>>. Accessed: 2021-07-21. Citado na página 26.

EPA 2001 EPA. **Emergency Planning and Community Right-to-Know Act-Section 313; Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category**. 2001. <<https://www.epa.gov/sites/default/files/documents/2001pacs.pdf>>. Accessed: 2021-08-31. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 46.

EPA 2018 EPA. **Method 8270E: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)**. [S.l.]: U.S. EPA: Washington DC, 2018. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-10/documents/method_8270e_update_vi_06-2018_0.pdf>. Accessed: 2021-07-21. Citado na página 40.

Farrington 2020 FARRINGTON, J. W. Need to update human health risk assessment protocols for polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood after oil spills. **Marine pollution bulletin**, Elsevier, v. 150, p. 110744, 2020. Citado na página 17.

Ferrante et al. 2018 FERRANTE, M. et al. Pahs in seafood from the mediterranean sea: an exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier, v. 115, p. 385–390, 2018. Citado 4 vezes nas páginas 22, 24, 25 e 26.

Garban et al. 2002 GARBAN, B. et al. Atmospheric bulk deposition of pahs onto france: trends from urban to remote sites. **Atmospheric environment**, Elsevier, v. 36, n. 34, p. 5395–5403, 2002. Citado na página 25.

Ghosh, Hageman e Björklund 2011 GHOSH, R.; HAGEMAN, K. J.; BJÖRKLUND, E. Selective pressurized liquid extraction of three classes of halogenated contaminants in fish. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1218, n. 41, p. 7242–7247, 2011. Citado na página 30.

Giergielewicz-Możajska, Dąbrowski e Namieśnik 2001 GIERGIELEWICZ-MOŻAJSKA, H.; DĄBROWSKI, Ł.; NAMIEŚNIK, J. Accelerated solvent extraction (ase) in the analysis of environmental solid samples—some aspects of theory and practice. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Taylor & Francis, v. 31, n. 3, p. 149–165, 2001. Citado na página 28.

Gohlke et al. 2011 GOHLKE, J. M. et al. A review of seafood safety after the deepwater horizon blowout. **Environmental health perspectives**, National Institute of Environmental Health Sciences, v. 119, n. 8, p. 1062–1069, 2011. Citado na página 17.

Gomez-Ariza et al. 2002 GOMEZ-ARIZA, J. et al. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 946, n. 1-2, p. 209–219, 2002. Citado na página 35.

Guo et al. 2014 GUO, J. et al. Method development for simultaneous analyses of multiple legacy and emerging organic chemicals in sediments. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1370, p. 1–8, 2014. Citado na página 16.

Hageman et al. 1996 HAGEMAN, K. J. et al. Coupled subcritical water extraction with solid-phase microextraction for determining semivolatile organics in environmental solids. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 68, n. 22, p. 3892–3898, 1996. Citado na página 35.

Hawthorne, Yang e Miller 1994 HAWTHORNE, S. B.; YANG, Y.; MILLER, D. J. Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 66, n. 18, p. 2912–2920, 1994. Citado na página 47.

Hernández et al. 2005 HERNÁNDEZ, F. et al. Potential of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for quantification and confirmation of organohalogen xenoestrogen compounds in human breast tissues. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 77, n. 23, p. 7662–7672, 2005. Citado na página 32.

Hoekstra et al. 2002 HOEKSTRA, P. et al. Bioaccumulation of organochlorine contaminants in bowhead whales (*balaena mysticetus*) from barrow, alaska. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Springer, v. 42, n. 4, p. 497–507, 2002. Citado na página 26.

Hong et al. 2004 HONG, J. et al. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1038, n. 1-2, p. 27–35, 2004. Citado na página 16.

Hwang et al. 2012 HWANG, K. et al. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine products in korea using gc/ms. **Food Additives and Contaminants: Part B**, Taylor & Francis, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2012. Citado na página 25.

IAEA 2003 IAEA. **Development and Use of Reference Materials and Quality Control Materials**. [S.l.]: International Atomic Energy Agency (IAEA), 2003. <https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1350_web.pdf>. Accessed: 2021-07-21. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 47.

IAEA 2005 IAEA. **IAEA-435A - Tuna Homogenate**. [S.l.]: International Atomic Energy Agency, 2005. <<https://nucleus.iaea.org/sites/ReferenceMaterials/Pages/IAEA-435A.aspx>>. Accessed: 2021-01-11. Citado na página 43.

IARC 2010 IARC, w. g. o. t. e. o. c. r. t. h. o. Air pollution, part 1, some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related industrial exposure. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 92, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26.

Jacob et al. 1991 JACOB, J. et al. Polycyclic aromatic compounds of environmental and occupational importance—their occurrence, toxicity and the development of high-purity certified reference materials. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, Springer, v. 340, n. 12, p. 755–767, 1991. Citado na página 25.

JCGM 2008 JCGM. **Evaluation of Measurement Data Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement**. [S.l.]: Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), 2008. <https://ncc.nesdis.noaa.gov/documents/documentation/JCGM_100_2008_E.pdf>. Accessed: 2021-07-18. Citado na página 48.

Joa et al. 2009 JOA, K. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in oil shale processing wastes: Current practice and new trends. **Oil Shale**, v. 26, n. 1, 2009. Citado na página 23.

Jones e Voogt 1999 JONES, K. C.; VOOGT, P. D. Persistent organic pollutants (pops): state of the science. **Environmental pollution**, Elsevier, v. 100, n. 1-3, p. 209–221, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.

Kitson, Larsen e McEwen 1996 KITSON, F.; LARSEN, B.; MCEWEN, C. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry**. San Diego: Academic Press, 1996. 3-23 p. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 33.

Koning et al. 2009 KONING, S. de et al. Modern methods of sample preparation for gc analysis. **Chromatographia**, Springer, v. 69, n. 1, p. 33–78, 2009. Citado na página 16.

Lallas 2001 LALLAS, P. L. The stockholm convention on persistent organic pollutants. **American Journal of International Law**, Cambridge University Press, v. 95, n. 3, p. 692–708, 2001. Citado na página 19.

Landrigan et al. 2018 LANDRIGAN, P. J. et al. The lancet commission on pollution and health. **The lancet**, Elsevier, v. 391, n. 10119, p. 462–512, 2018. Citado na página 15.

Latimer e Zheng 2003 LATIMER, J. S.; ZHENG, J. and fate of pahs in the marine environment. **PAHs: an ecotoxicological perspective**, John Wiley & Sons, p. 9, 2003. Citado na página 23.

Lau, Gan e Ng 2010 LAU, E.; GAN, S.; NG, H. Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **International journal of analytical chemistry**, Hindawi, v. 2010, 2010. Citado na página 29.

Law e Biscaya 1994 LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (pah)—problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, Elsevier, v. 29, n. 4-5, p. 235–241, 1994. Citado na página 24.

Liguori et al. 2006 LIGUORI, L. et al. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (pahs) from various marine matrixes. **Analytica chimica acta**, Elsevier, v. 573, p. 181–188, 2006. Citado na página 16.

Loomis et al. 2015 LOOMIS, D. et al. Carcinogenicity of lindane, ddt, and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 8, p. 891–892, 2015. Citado na página 15.

Lourencetti e Ricci 2020 LOURENCETTI, C.; RICCI, M. Determination of organochlorine priority substances in fish tissue: Optimisation of the clean-up step balancing removal of lipids with analytes' recovery. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1619, p. 460944, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.

Lund et al. 2009 LUND, M. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. **Talanta**, Elsevier, v. 79, n. 1, p. 10–15, 2009. Citado 3 vezes nas páginas 35, 36 e 43.

Luque-Garcia e Castro 2004 LUQUE-GARCIA, J.; CASTRO, M. L. de. Coupling of pressurized liquid extraction to other steps in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 23, n. 2, p. 102–108, 2004. Citado na página 28.

Manahan 2017 MANAHAN, S. **Environmental chemistry**. [S.l.]: CRC press, 2017. Citado na página 19.

Mashroofeh, Bakhtiari e Pourkazemi 2015 MASHROOFEH, A.; BAKHTIARI, A. R.; POURKAZEMI, M. Distribution and composition pattern of polycyclic aromatic hydrocarbons in different tissues of sturgeons collected from iranian coastline of the caspian sea. **Chemosphere**, Elsevier, v. 120, p. 575–583, 2015. Citado na página 15.

Matscheko et al. 2002 MATSCHEKO, N. et al. Accumulation and elimination of 16 polycyclic aromatic compounds in the earthworm (*eisenia fetida*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, Wiley Online Library, v. 21, n. 8, p. 1724–1729, 2002. Citado na página 26.

Medeiros et al. 2001 MEDEIROS, K. J. et al. Avaliação dos efeitos de um dieta à base de mexilhões perna perna (linné, 1758) em relação aos teores de colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas em cobaias (*cavia porcellus*). Florianópolis, SC, 2001. Citado na página 50.

Meire, Azeredo e Torres 2007 MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia brasiliensis**, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), v. 11, n. 2, p. 188–201, 2007. Citado 4 vezes nas páginas 9, 22, 23 e 25.

Morales-Munoz, Luque-Garcia e Castro 2002 MORALES-MUNOZ, S.; LUQUE-GARCIA, J.; CASTRO, M. L. D. Static extraction with modified pressurized liquid and on-line fluorescence monitoring: Independent matrix approach for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 978, n. 1-2, p. 49–57, 2002. Citado na página 35.

Moreno, Reza e Trejo 2007 MORENO, E.; REZA, J.; TREJO, A. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. **Polycyclic Aromatic Compounds**, Taylor & Francis, v. 27, n. 4, p. 239–260, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 47.

Neff 1980 NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. **Biol. Conserv.:(United Kingdom)**, v. 18, n. 1, 1980. Citado na página 24.

Negreira et al. 2011 NEGREIRA, N. et al. Optimization of pressurized liquid extraction and purification conditions for gas chromatography–mass spectrometry determination of uv filters in sludge. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1218, n. 2, p. 211–217, 2011. Citado na página 30.

Netto et al. 2000 NETTO, A. D. P. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. **Química nova**, SciELO Brasil, v. 23, p. 765–773, 2000. Citado 3 vezes nas páginas 21, 22 e 25.

NIST 2016 NIST. **SRM 2974a - Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)**. [S.l.]: National Institute of Standards and Technology, 2016. <https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=2974A>. Accessed: 2021-01-11. Citado na página 43.

Nording et al. 2006 NORDING, M. et al. Rapid screening of dioxin-contaminated soil by accelerated solvent extraction/purification followed by immunochemical detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 385, n. 2, p. 357–366, 2006. Citado na página 16.

NRC 2003 NRC. **Oil in the Sea - inputs, fates and effects, 2 ed.** [S.l.]: National Academy Press, 2003. Citado na página 24.

Oost, Beyer e Vermeulen 2003 OOST, R. Van der; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, Elsevier, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003. Citado na página 15.

Ostrander 2005 OSTRANDER, G. K. **Techniques in Aquatic Toxicology, Volume 2**. [S.l.]: CRC Press, 2005. v. 2. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 26.

PAH 2001 PAH, E. **Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Position Paper**. [S.l.]: European Union Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, EU . . . , 2001. Citado 3 vezes nas páginas 20, 23 e 25.

Panseri et al. 2019 PANSERI, S. et al. Persistent organic pollutants in fish: biomonitoring and cocktail effect with implications for food safety. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Taylor & Francis, v. 36, n. 4, p. 601–611, 2019. Citado na página 15.

Pereiro, Wasik e Łobiński 1999 PEREIRO, I. R.; WASIK, A.; ŁOBIŃSKI, R. Speciation of organotin in sediments by multicapillary gas chromatography with atomic emission detection after microwave-assisted leaching and solvent extraction-derivatization. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, Springer, v. 363, n. 5, p. 460–465, 1999. Citado na página 34.

Perugini et al. 2007 PERUGINI, M. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the gulf of naples, tyrrhenian sea. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 55, n. 5, p. 2049–2054, 2007. Citado na página 25.

Pfannkoch et al. 2015 PFANNKOCH, E. A. et al. A high throughput method for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood using quechers extraction and sbse. **International journal of analytical chemistry**, Hindawi, v. 2015, 2015. Citado na página 44.

Pintado-Herrera, González-Mazo e Lara-Martín 2014 PINTADO-HERRERA, M. G.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; LARA-MARTÍN, P. A. Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. **Chemosphere**, Elsevier, v. 95, p. 478–485, 2014. Citado na página 30.

Pintado-Herrera et al. 2016 PINTADO-HERRERA, M. G. et al. In-cell clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry determination of hydrophobic persistent and emerging organic pollutants in coastal sediments. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1429, p. 107–118, 2016. Citado 4 vezes nas páginas 16, 30, 33 e 43.

Pinto et al. 2014 PINTO, M. et al. Screening of priority pesticides in ulva sp. seaweeds by selective pressurized solvent extraction before gas chromatography with electron capture detector analysis. **Archives of environmental contamination and toxicology**, Springer, v. 67, n. 4, p. 547–556, 2014. Citado na página 35.

Pitarch et al. 2007 PITARCH, E. et al. Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, Elsevier, v. 583, n. 2, p. 246–258, 2007. Citado na página 32.

Ramalhosa et al. 2012 RAMALHOSA, M. J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from atlantic ocean: inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks. **Food**

and chemical toxicology, Elsevier, v. 50, n. 2, p. 162–167, 2012. Citado na página 15.

Reindl e Hoefler 1994 REINDL, S.; HOEFLER, F. Optimization of the parameters in supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil samples. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 66, n. 11, p. 1808–1816, 1994. Citado na página 34.

Rey-Salgueiro et al. 2008 REY-SALGUEIRO, L. et al. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 108, n. 2, p. 607–615, 2008. Citado na página 21.

Richter et al. 1996 RICHTER, B. E. et al. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 34.

Rodil e Moeder 2008 RODIL, R.; MOEDER, M. Development of a simultaneous pressurised-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of uv filters in sediments. **Analytica chimica acta**, Elsevier, v. 612, n. 2, p. 152–159, 2008. Citado na página 30.

Rodrigues et al. 2016 RODRIGUES, E. T. et al. A single-step pesticide extraction and clean-up multi-residue analytical method by selective pressurized liquid extraction followed by on-line solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for complex matrices. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1452, p. 10–17, 2016. Citado 4 vezes nas páginas 35, 43, 44 e 46.

Romanik et al. 2007 ROMANIK, G. et al. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of biochemical and biophysical methods**, Elsevier, v. 70, n. 2, p. 253–261, 2007. Citado na página 29.

Rose e Rippey 2002 ROSE, N. L.; RIPPEY, B. The historical record of pah, pcb, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west scotland. **Environmental pollution**, Elsevier, v. 117, n. 1, p. 121–132, 2002. Citado na página 25.

Ruddiman 2013 RUDDIMAN, W. F. The anthropocene. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, Annual Reviews, v. 41, p. 45–68, 2013. Citado na página 15.

Runnqvist et al. 2010 RUNNQVIST, H. et al. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—are we developing sound extraction methods? **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1217, n. 16, p. 2447–2470, 2010. Citado na página 28.

Saim et al. 1998 SAIM, N. et al. An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 70, n. 2, p. 420–424, 1998. Citado na página 35.

Sapozhnikova e Lehotay 2013 SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, Elsevier, v. 758, p. 80–92, 2013. Citado na página 16.

Schantz 2006 SCHANTZ, M. M. Pressurized liquid extraction in environmental analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 386, n. 4, p. 1043–1047, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 28.

Schantz et al. 1995 SCHANTZ, M. M. et al. Certification of polychlorinated biphenyl congeners and chlorinated pesticides in a whale blubber standard reference material. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 67, n. 5, p. 901–910, 1995. Citado na página 26.

Schwarzenbach et al. 2006 SCHWARZENBACH, R. P. et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 313, n. 5790, p. 1072–1077, 2006. Citado na página 15.

Shimadzu 2007 SHIMADZU. **Scan mode and SIM mode**. [S.l.]: Shimadzu, 2007. Citado na página 32.

Sloan et al. 2005 SLOAN, C. et al. Determining aromatic hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons in sediments and tissues using accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Techniques in aquatic toxicology**, v. 2, p. 631–651, 2005. Citado na página 26.

Stant, Aaen e Ridler 2016 STANT, L.; AAEN, P.; RIDLER, N. Comparing methods for evaluating measurement uncertainty given in the jcgmm 'evaluation of measurement data' documents. **Measurement**, Elsevier, v. 94, p. 847–851, 2016. Citado na página 48.

Storelli et al. 2013 STORELLI, M. M. et al. Risk characterization for polycyclic aromatic hydrocarbons and toxic metals associated with fish consumption. **Journal of food composition and analysis**, Elsevier, v. 31, n. 1, p. 115–119, 2013. Citado na página 15.

Subedi et al. 2015 SUBEDI, B. et al. Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 68, p. 119–132, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 28.

Subedi et al. 2011 SUBEDI, B. et al. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1218, n. 37, p. 6278–6284, 2011. Citado na página 43.

Subedi e Usenko 2012 SUBEDI, B.; USENKO, S. Enhanced pressurized liquid extraction technique capable of analyzing polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans, and polychlorobiphenyls in fish tissue. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1238, p. 30–37, 2012. Citado na página 35.

Sun et al. 2012 SUN, H. et al. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1237, p. 1–23, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 16, 29 e 34.

Suranová et al. 2015 SURANOVÁ, M. et al. Application of accelerated solvent extraction for simultaneous isolation and pre-cleaning up procedure during determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. **Food Analytical Methods**, Springer, v. 8, n. 4, p. 1014–1020, 2015. Citado na página 42.

Takeuchi et al. 2009 TAKEUCHI, I. et al. Biomagnification profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols and polychlorinated biphenyls in Tokyo Bay elucidated by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope ratios as guides to trophic web structure. **Marine Pollution Bulletin**, Elsevier, v. 58, n. 5, p. 663–671, 2009. Citado na página 15.

Taylor e Kuyatt 1994 TAYLOR, B. N.; KUYATT, C. E. **NIST Technical Note 1297 Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results**. [S.l.]: National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, 1994. <<https://emtoolbox.nist.gov/Publications/NISTTechnicalNote1297s.pdf>>. Accessed: 2021-07-20. Citado na página 48.

Tölgyessy, Miháliková e Matulová 2016 TÖLGYESSY, P.; MIHÁLIKOVÁ, Z.; MATULOVÁ, M. Determination of selected chlorinated priority substances in fish using quechers method with dual dspe clean-up and gas chromatography. **Chromatographia**, Springer, v. 79, n. 21, p. 1561–1568, 2016. Citado na página 16.

Tornero e Hanke 2016 TORNERO, V.; HANKE, G. Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: A review with a focus on European seas. **Marine Pollution Bulletin**, Elsevier, v. 112, n. 1-2, p. 17–38, 2016. Citado na página 24.

Trevelin 1992 TREVELIN, W. Otimização da análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sistemas aquosos. **São Carlos**, p. 83, 1992. Citado na página 24.

Vazquez-Roig e Picó 2015 VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 71, p. 55–64, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 16, 35 e 42.

Vonderheide, Montes-Bayón e Caruso 2002 VONDERHEIDE, A. P.; MONTES-BAYÓN, M.; CARUSO, J. A. Development and application of a method for the analysis of brominated flame retardants by fast gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Royal Society of Chemistry, v. 17, n. 11, p. 1480–1485, 2002. Citado na página 26.

Wang et al. 1999 WANG, G. et al. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 47, n. 3, p. 1062–1066, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 47.

Wang et al. 2019 WANG, X. et al. Pahs and pcbs residues and consumption risk assessment in farmed yellow croaker (*larimichthys crocea*) from the east china sea, china. **Marine pollution bulletin**, Elsevier, v. 140, p. 294–300, 2019. Citado na página 15.

Wasik e Ciesielski 2004 WASIK, A.; CIESIELSKI, T. Determination of organotin compounds in biological samples using accelerated solvent extraction, sodium tetraethylborate ethylation, and multicapillary gas chromatography–flame photometric detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 378, n. 5, p. 1357–1363, 2004. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 34.

WHO 1983 WHO. **Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, part 1, chemical environmental and experimental data, 32**. [S.l.]: World Health Organization US, 1983. 477 p. Citado na página 25.

Wianowska 2014 WIANOWSKA, D. The influence of purge times on the yields of essential oil components extracted from plants by pressurized liquid extraction. **Journal of AOAC International**, Oxford University Press, v. 97, n. 5, p. 1310–1316, 2014. Citado na página 43.

Winqvist et al. 2014 WINQUIST, E. et al. Bioremediation of pah-contaminated soil with fungi—from laboratory to field scale. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Elsevier, v. 86, p. 238–247, 2014. Citado na página 22.

Wu et al. 2011 WU, J. J. et al. Validation of an accelerated solvent extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for pacific ciguatoxin-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 400, n. 9, p. 3165–3175, 2011. Citado na página 16.

Yender, Michel e Lord 2002 YENDER, R.; MICHEL, J. M.; LORD, C. **Managing Seafood Safety after an Oil Spill**. [S.l.]: Hazardous Materials Response Division, Office of Response and Restoration, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2002. <<https://www.irrd.org/wp-content/uploads/2019/10/NOAA-2002Nov-managing-seafood-safety-oil-spill.pdf>>. Accessed: 2021-07-20. Citado na página 17.

Yender et al. 2002 YENDER, R. et al. **Managing seafood safety after an oil spill**. [S.l.]: US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration ..., 2002. Citado na página 25.

Zelinkova e Wenzl 2015 ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. The occurrence of 16 epa pahs in food—a review. **Polycyclic aromatic compounds**, Taylor & Francis, v. 35, n. 2-4, p. 248–284, 2015. Citado na página 15.

Zeng 2015 ZENG, E. Y. **Persistent organic pollutants (POPs): analytical techniques, environmental fate and biological effects**. [S.l.]: Elsevier, 2015. Citado 6 vezes nas páginas 9, 19, 20, 21, 26 e 27.

Zhang et al. 2019 ZHANG, Q. et al. In-cell clean-up pressurized liquid extraction for the analysis of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gc-nci-ms. **Analytical Methods**, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 11, p. 1483–1490, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 35.

Zhao et al. 2014 ZHAO, Z. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon (pah) residues in several tissues of edible fishes from the largest freshwater lake in china, poyang lake, and associated human health risk assessment. **Ecotoxicology and environmental safety**, Elsevier, v. 104, p. 323–331, 2014. Citado na página 16.

A

Tabela de dados do teste A

	Recuperações (%)			Média de Recuperações (%)	Desvio Padrão
	IAEA435	Sardinha	branco		
N	16,03	11,22	7,75	11,66	4,16
C1n	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	NA	NA	NA	NA	NA
Ace	NA	NA	NA	NA	NA
Flu	7,81	3,91	10,94	7,55	3,52
Fe	38,46	23,08	20,51	27,35	9,71
A	31,65	26,58	34,18	30,80	3,87
Ft	50,00	16,03	33,53	33,18	16,99
Pi	56,82	44,55	39,09	46,82	9,08
BaA	64,71	22,21	27,87	38,26	23,08
Cr	66,70	56,16	63,30	62,05	5,38
BbFt	55,56	41,67	48,61	48,61	6,94
BkFt	NA	NA	NA	NA	NA
BePi	38,26	14,78	23,57	25,54	11,86
BaPi	24,68	19,70	28,46	24,28	4,39
Per	NA	NA	NA	NA	NA
Ipi	62,50	21,59	46,93	43,67	20,65
DBahA	57,96	47,33	57,39	54,22	5,98
BghiPe	28,65	46,91	39,04	38,20	9,16
Recuperação sub-rogado (%)	101,00	73,00	81,00		
Média Geral de Recuperações (%)		35,16			
Desvio Padrão		17,78			

NA = Não avaliado.

B

Tabela de dados do teste B

	Recuperações (%)								Média de Recuperações (%)	Desvio Padrão
	Fortificação 10 ng				Fortificação 100 ng					
	1	2	3	4	5	6	7	8		
N	12,58	12,36	36,47	25,00	25,67	13,00	12,67	14,00	18,97	9,04
C1n	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	10,38	35,40	38,52	13,01	2,53	27,06	21,34	3,83	19,01	13,79
Ace	21,43	43,13	48,30	18,32	3,04	33,11	24,53	4,79	24,58	16,41
Flu	14,10	76,35	81,98	68,66	25,24	50,32	73,86	80,18	58,84	26,25
Fe	28,06	75,51	71,81	64,06	32,50	50,60	73,91	63,76	57,53	18,59
A	17,92	82,35	81,67	74,00	26,90	48,90	62,08	54,83	56,08	24,09
Ft	32,76	110,51	99,64	88,21	73,79	86,84	110,81	93,85	87,05	25,20
Pi	47,35	92,54	72,02	64,77	43,80	58,82	90,57	62,74	66,58	17,91
BaA	30,55	103,32	101,53	94,78	96,73	83,14	122,34	94,89	90,91	26,79
Cr	47,50	60,54	57,21	53,50	64,33	53,50	81,82	63,06	60,18	10,37
BbFt	11,65	119,94	115,84	100,70	130,87	101,00	141,04	130,40	106,43	40,86
BkFt	16,67	57,06	53,29	45,36	50,43	35,10	56,33	44,64	44,86	13,48
BePi	10,53	55,41	53,86	47,68	55,92	46,07	71,99	54,88	49,54	17,58
BaPi	14,29	72,53	75,20	65,57	56,28	45,80	66,14	46,82	55,33	19,86
Per	70,00	35,00	42,00	35,00	35,70	48,64	27,90	67,50	45,22	15,73
Ipi	35,24	72,09	67,58	61,25	66,54	51,37	84,00	56,67	61,84	14,62
DBahA	11,85	58,83	56,30	53,88	61,75	46,47	78,95	51,92	52,49	19,01
BghiPe	164,20	54,46	49,75	46,19	56,69	41,12	71,93	48,98	66,67	40,46
Recuperação sub-rogado (%)	2,84	54,58	50,16	46,16	46,96	44,89	44,19			
Média Geral de Recuperações (%)	56,78									
Desvio Padrão	30,71									

NA = Não avaliado.

C

Tabela de dados do teste C

	Recuperações (%)					Média de Recuperações	Desvio Padrão
	NIST 1	NIST 2	NIST 3	NIST 4	NIST 5		
N	53,04	56,67	62,04	66,28	85,14	64,63	12,53
C1n	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flu	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fe	68,76	52,74	43,32	45,02	66,29	55,23	11,81
A	103,69	43,77	41,39	66,12	30,00	57,00	29,20
Ft	98,96	94,10	53,24	70,80	101,33	83,69	20,89
Pi	35,88	36,73	24,81	32,16	95,65	45,05	28,67
BaA	92,38	84,40	60,62	78,14	95,94	82,30	13,96
Cr	47,24	42,40	32,49	38,63	54,26	43,00	8,29
BbFt	85,86	72,51	52,77	65,91	88,21	73,05	14,63
BkFt	156,90	98,68	90,14	93,67	109,15	109,71	27,34
BePi	63,36	62,56	41,64	56,39	86,00	61,99	16,00
BaPi	99,22	81,17	75,35	80,40	82,85	83,80	9,06
Per	65,84	57,34	49,23	56,75	56,69	57,17	5,89
Ipi	71,87	48,01	37,05	51,41	58,91	53,45	12,96
DBahA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BghiPe	31,48	36,59	35,11	47,50	56,67	41,47	10,39
Recuperação sub-rogado (%)	93,13	76,45	53,17	77,41	69,60		
Média Geral de Recuperações (%)	65,11						
Desvio Padrão	24,51						

NA = Não avaliado.

D**Tabela de dados do teste D**

	Recuperações (%)			Média de Recuperações (%)	Desvio Padrão
	NIST 1	NIST 2	NIST 3		
N	63,61	69,14	68,08	66,94	2,93
C1n	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	NA	NA	NA	NA	NA
Ace	NA	NA	NA	NA	NA
Flu	NA	NA	NA	NA	NA
Fe	74,33	95,31	58,59	76,08	18,42
A	81,34	65,12	73,54	73,33	8,11
Ft	67,46	73,95	85,01	75,47	8,87
Pi	80,13	73,75	56,94	70,27	11,98
BaA	65,91	96,01	103,45	88,46	19,88
Cr	90,02	63,99	77,70	77,24	13,02
BbFt	97,58	71,66	80,26	83,17	13,20
BkFt	85,09	105,12	75,36	88,52	15,18
BePi	98,47	96,77	105,26	100,17	4,49
BaPi	64,14	101,51	93,75	86,47	19,72
Per	93,52	92,54	88,82	91,63	2,48
Ipi	96,84	86,71	96,84	93,46	5,85
DBahA	NA	NA	NA	NA	NA
BghiPe	108,78	85,11	90,04	94,64	12,49
Média Geral de Recuperações (%)			83,28		
Desvio Padrão			14,34		

NA = Não avaliado.

E

Tabela de dados do teste E

	Recuperações (%)			Média de Recuperações (%)	Desvio Padrão
	NIST 1	NIST 2	NIST 3		
N	73,79	69,14	79,65	74,19	5,27
C1n	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	NA	NA	NA	NA	NA
Ace	NA	NA	NA	NA	NA
Flu	NA	NA	NA	NA	NA
Fe	78,79	92,45	60,35	77,20	16,11
A	82,15	65,77	73,54	73,82	8,19
Ft	62,74	71,73	90,11	74,86	13,95
Pi	69,72	71,54	63,77	68,34	4,06
BaA	75,14	99,85	117,94	97,64	21,48
Cr	107,13	60,79	85,47	84,46	23,18
BbFt	97,58	80,26	74,64	84,16	11,96
BkFt	79,13	121,94	61,79	87,62	30,96
BePi	80,75	115,16	117,89	104,60	20,70
BaPi	57,09	109,63	104,06	90,26	28,86
Per	111,28	78,66	92,37	94,11	16,38
Ipi	94,90	87,57	96,84	93,11	4,89
DBahA	NA	NA	NA	NA	NA
BghiPe	102,25	98,72	94,54	98,51	3,86
Média Geral de Recuperações (%)			85,92		
Desvio Padrão			17,95		

NA = Não avaliado.

F

Tabela de dados da validação do método

	Recuperações (%)									Média de	Desvio
	NIST 1	NIST 2	NIST 3	NIST 4	NIST 5	NIST 6	NIST 7	NIST 8	NIST 9	Recuperações (%)	Padrão
N	77,43	54,44	75,61	39,92	75,61	85,90	79,24	45,37	85,29	68,76	17,43
C1n	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aceft	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flu	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fe	62,07	71,38	88,44	91,55	92,32	82,24	88,44	73,70	90,77	82,32	10,82
A	71,48	69,25	91,59	81,91	87,86	61,80	86,38	55,85	93,08	77,69	13,54
Ft	63,57	89,62	88,08	91,91	76,60	68,17	78,13	62,04	88,08	78,47	11,68
Pi	83,40	86,23	60,78	88,35	77,04	87,64	88,35	79,16	55,13	78,45	12,37
BaA	83,59	67,04	89,38	67,86	84,41	73,66	93,52	91,04	96,00	82,94	10,95
Cr	89,08	79,36	78,56	76,94	66,41	91,51	79,36	97,18	88,27	82,96	9,33
BbFt	101,43	90,25	83,38	88,54	96,27	79,08	85,96	83,38	83,38	87,96	7,09
BkFt	94,11	89,71	70,36	89,71	75,64	88,83	101,14	97,62	90,59	88,63	9,85
BePi	120,09	121,11	99,74	117,04	111,95	87,53	84,47	89,56	82,44	101,55	16,11
BaPi	77,79	81,17	71,03	88,78	94,70	94,70	87,09	94,70	70,18	84,46	9,87
Per	100,38	94,86	83,81	89,33	74,60	100,38	85,65	100,38	95,78	91,69	9,01
IPi	92,89	91,01	107,90	100,40	75,06	96,64	76,00	92,89	104,15	92,99	11,34
DBahA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BghiPe	100,37	82,03	100,37	92,65	86,86	87,82	91,68	108,09	110,98	95,65	9,89
Média Geral de Recuperações (%)			85,32								
Desvio Padrão			13,77								

NA = Não avaliado.