UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

# MORGANA DE SOUZA CAMARGO

EXTRAÇÃO DE HPA DE TECIDO DE PEIXE UTILIZANDO MONTMORILONITA MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO E DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE

SÓLIDA

CURITIBA

2019

## MORGANA DE SOUZA CAMARGO

# EXTRAÇÃO DE HPA DE TECIDO DE PEIXE UTILIZANDO MONTMORILONITA MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO E DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Coorientador: Dr. Rafael Garret Dolatto

CURITIBA 2019 DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

#### Camargo, Morgana de Souza Extração de HPA de tecido de peixe utilizando montmorilonita modificada com líquido iônico e dispersão da matriz em fase sólida / Morgana de Souza Camargo. – Curitiba, 2019. 1 recurso on-líne : PDF. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paranã, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Marco Tadeu Grassi Coorientador: Rafael Garret Dolatto

 Hidrocarbonetos Policícios Aromáticos. 2. Montmonionita. 3. Soluções iônicas. 4. Tecido de peixe. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pôs-Graduação em Química. III. Grassi, Marco Tadeu. IV. Dolatto, Rafael Garret. V. Titulo.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIENCIAS EXATAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -40001016026P2

#### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de MORGANA DE SOUZA CAMARGO intitulada: Extração de HPA de tecido de pelxe utilizando montmoritonita modificada com líquido iónico e Dispersão de Matriz em Fase Sólida, sob orientação do Prof. Dr. MARCO TADEU GRASSI, que após após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Julho da 2019.

nan auro

MÁRCO TADEU GRASSI Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA)

USA

Availador Externo (UNIVERSIDADE ECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ )

2600

PATRICIO GUILLERMO PERALTA ZAMORA Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

#### AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, em especial à minha mãe e minha irmã, que me apoiaram e me auxiliarem a todo momento ao longo dessa jornada na pós-graduação.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e ao meu coorientador Dr. Rafael Garrett Dolatto por me cederem a oportunidade de desenvolver essa pesquisa no âmbito do Grupo de Química Ambiental e por todos os ensinamentos ao longo desses dois anos, inclusive os provenientes das broncas, pois com isso posso afirmar que cresci muito, não só profissionalmente, mas pessoalmente também.

Agradeço aos colegas do Grupo de Química Ambiental por todo apoio durante esse período de convivência, pelos conselhos e pelas motivações dadas a mim tanto nos bons quanto nos maus momentos.

Agradeço também ao Grupo Integrado de Aquicultura da UFPR, em especial ao Giorgi dal Pont por ceder as amostras de tecido muscular de peixe utilizadas nessa pesquisa. Agradeço também ao Grupo de Pesquisa em Cromatografia e Técnicas Afins, situado na Universidade de Caldas, na Colômbia, por ceder a montmorilonita modificada com líquido iônico, utilizada como suporte sólido nessa pesquisa.

Agradeço aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES, INCTAA e PETROBRÁS pelos recursos cedidos e que foram de fundamental importância para a execução desse projeto.

E, por fim, agradeço a todas as pessoas que, indiretamente, me auxiliaram nesses dois últimos anos para que essa pesquisa pudesse ser concluída.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser mas, graças à Deus, não sou o que era antes".

(MARTHIN LUTHER KING)

#### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo aplicar a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD), utilizando a montmorilonita modificada com líquido iônico (montmorillonite-ionic liquid, MMT-IL) como suporte sólido para a extração de 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) do tecido muscular de peixes, seguida de quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (gas chromatography - mass spectrometry -GC-MS). Para o desenvolvimento do método, alguns parâmetros que envolvem a eficiência de extração por MSPD foram otimizados, como a proporção entre a massa de amostra e massa de suporte sólido, escolha do solvente ideal, volume do mesmo e necessidade ou não da etapa de *clean up*. As condições ótimas foram obtidas ao utilizar 0,3 g de massa de amostra, a mesma massa de suporte sólido, 10 mL de acetonitrila como solvente de eluição e etapa de *clean up* em coluna de vidro utilizando sílica e alumina como sorventes auxiliares. O método proposto apresentou precisão e exatidão intermediárias com valores de recuperação na faixa de 70 a 92% para a maioria dos compostos em estudo e desvios padrões relativos menores de 16%; limites de detecção e quantificação na faixa de 0,34 a 2,83 ng g<sup>-1</sup> e 1,13 a 9,33 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. O método foi aplicado em amostras de peixes da espécie Astyanax altiparanae, popularmente conhecidos como Lambari, os quais são amplamente comercializados e consumidos na região sul do país. Em todas as amostras avaliadas foi detectada a presença de criseno, o qual é considerado possivelmente carcinogênico ao homem. O método proposto pode ser considerado eficiente na extração de HPA em tecido muscular de peixe, além de propiciar extração e limpeza em uma única etapa, utilizar um baixo volume de solvente e ser de baixo custo.

Palavras-chave: MSPD. HPA. Montmorilonita modificada. Líquido iônico. Tecido de peixe.

#### ABSTRACT

The objective of this work is to apply Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) using montmorillonite modified with ionic liquid (MMT-IL) as solid support for the extraction of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) from fish muscle tissue, followed by quantification by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). For the development of the method, some parameters involving the extraction efficiency by MSPD were optimized, such as the proportion between the sample mass and solid support mass, ideal solvent and its necessary volume, and the need or not of clean up step. Optimum conditions were obtained by using 0.3 g of sample mass, the same solid support mass, 10 mL of acetonitrile as elution solvent and glass column clean up step using silica and alumina as auxiliary sorbents. The proposed method presented intermediate precision and accuracy with recovery values in the range of 70 to 92% for most compounds under study and relative standard deviations of less than 16%; detection and quantification limits in the range of 0.34 to 2.83. ng g<sup>-1</sup> and 1.13 to 9.33 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The method was applied to Astyanax altiparanae samples fish, popularly known as Lambari, which are widely marketed and consumed in the southern region of the country. Chrysene was found in all evaluated samples, which is considered possibly carcinogenic to humans. The proposed method can be considered efficient in PAH extraction from fish tissue, as well as providing one-step extraction and cleaning, low solvent volume and low cost.

Keywords: MSPD. PAH. Modified mineral. Ionic liquid. Fish tissue.

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA) PRIORITÁRIOS EM ESTUDOS AMBIENTAIS DE ACORDO COM A AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS (USEPA, 2008)19
FIGURA 2 – PRINCÍPIO BÁSICO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO POR MSPD26 FIGURA 3 – USO DA MSPD EM DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS (ATÉ 2018). 
FIGURA 4 – ESTRUTURA DE UMA MONTMORILONITA SÓDICA
FIGURA 5 – A) ESPÉCIE <i>A. altiparanae</i> . B) TECIDO MUSCULAR RETIRADO APÓS
FIGURA 6 – ESQUEINA DA CULUNA UTILIZADA NA ETAPA DE CLEAN UP,
FIGURA / - CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS, NO MODO SIM, DOS
$\frac{1}{2}$
FIGURA $0 = A$ ASPECTO DO SOLIDO (AMOSTRATSOFORTE)
EXTRATO OBTIDO ADÓS A SECACEM DE HY C) EXTRATO
OBTIDO APÓS A SECAGEM DE HX:DCM (6:4) NA ESQUERDA E
APÓS A SECAGEM DE DCM NA DIREITA
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS NO MODO SCAN, APÓS
PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRA DE PEIXE
FORTIFICADA COM PADRÕES DE HPA (1 µg g <sup>-1</sup> ) E PADRÃO SUB-
ROGADO (0,31 µg g <sup>-1</sup> ), UTILIZANDO 10 mL DE ACN COMO
SOLVENTE EXTRATOR
FIGURA 10 – ROSA: CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS NO MODO FULL
SCAN, APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRA DE
PEIXE FORTIFICADA COM PADRÕES DE HPA (1 $\mu$ g g <sup>-1</sup> ) E
PADRÃO SUB-ROGADO (0,31 µg g⁻¹), UTILIZANDO 10 mL DE ACN
COMO SOLVENTE EXTRATOR E SEM REALIZAR A ETAPA DE
CLEAN UP. PRETO: MESMAS CONDIÇÕES, PORÉM, COM ETAPA
DE CLEAN UP, UTILIZANDO FLORISIL COMO SORVENTE51

- FIGURA 11 COLUNA UTILIZADA NA ETAPA DE CLEAN UP, EMPACOTADA COM 2, 0 g DE SÍLICA, 1,0 g DE ALUMINA, E CONTENDO O SÓLIDO HOMOGÊNEO PROVENIENTE DA ETAPA DE MSPD......52
- FIGURA 12 CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS NO MODO FULL SCAN, APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRA DE PEIXE FORTIFICADA COM PADRÕES DE HPA (1 μg g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,31 μg g<sup>-1</sup>), E CLEAN UP EM COLUNA DE VIDRO, CONTENDO SÍLICA E ALUMINA COMO SORVENTES AUXILIARES, E UTILIZANDO 10 mL DE ACN COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO. .52

- FIGURA 18 RECUPERAÇÃO MÉDIA (n=3) DOS COMPOSTOS APÓS ADIÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE HPA PRIORITÁRIOS E PADRÃO SUB-ROGADO (AMBOS A 0,21 µg g<sup>-1</sup>), UTILIZANDO 0,3 G DE MASSA

DE AMOSTRA,	0,3 G DE MA	SSA DE SUP	ORTE SÓLIDO	E 10 mL
DE ACN COMO	SOLVENTE D	E ELUIÇÃO		61

# LISTA DE QUADROS

QUADRO	1 –	-	CARCINOGENICIDADE	Е	GENOTOXICIDADE	DOS	HPA
	PF		DRITÁRIOS				20

# LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA21
TABELA 2 – APLICAÇÕES DA MSPD EM DIFERENTES MATRIZES, ANALITOS E
TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO27
TABELA 3 – INFORMAÇÕES DOS 16 PADRÕES DE HPA PRIORITÁRIOS
UTILIZADOS NO ESTUDO34
TABELA 4 – INFORMAÇÕES DOS CINCO PADRÕES INTERNOS DE HPA
UTILIZADOS NO ESTUDO35
TABELA 5 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGADOS NA
DETERMINAÇÃO DE HPA POR GC-MS
TABELA 6 – TEMPOS DE RETENÇÃO (t <sub>R</sub> ), ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (IQ) E DE
CONFIRMAÇÃO (IC) DE CADA UM DOS 16 HPA, 5 PADRÕES
INTERNOS E PADRÃO SUB-ROGADO, NAS CONCENTRAÇÕES
DE 1,0 mg L <sup>-1</sup> 45
TABELA 7 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) PARA CADA UM DOS 16 HPA
E DO PADRÃO SUB-ROGADO47
TABELA 8 – LOD E LOQ INSTRUMENTAIS PARA CADA UM DOS 16 HPA E DO
PADRÃO SUB-ROGADO, EM µg L <sup>-1</sup> 48
TABELA 9 – LOQM PARA CADA UM DOS 16 HPA E DO PADRÃO SUB-ROGADO,
EM ng g <sup>-1</sup> 58
TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE CADA UM DOS HPA (ng g-1, MASSA ÚMIDA)
ENCONTRADO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXE62
TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DE HPA (µg L-1) DETERMINADAS EM
AMOSTRAS AQUOSAS CONTENDO FRAÇÕES SOLÚVEIS DA
GASOLINA64

# LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACN -	Acetonitrila				
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária				
CAS -	Chemical American Society – Sociedade Americana de Química				
CENPES -	Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo				
Miguez de Mello					
CL -	Concentração letal				
CONAMA -	Conselho Nacional do Meio Ambiente				
C18 -	Octadecilsilano				
GC -	Gas Chromatography – cromatografia a gás				
DCM -	Diclorometano				
DCM/HX -	Diclorometano/hexano				
FAO -	Food and Agriculture Organization of the United Nations -				
Organização das N	ações Unidas para Agricultura e Alimentação				
FSA G -	Fração solúvel em água da gasolina				
FTIR -	Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Espectroscopia de				
Infravermelho com	Transformada de Fourier				
FULL SCAN -	Modo de varredura completa				
GC-MS -	Gas Chromatography Mass Spectrometry - cromatografia a gás				
acoplada a espectro	ometria de massas				
GIA -	Grupo Integrado de Aquicultura				
GICTAA -	Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines -				
Grupo de Cromatog	grafia e Técnicas Relacionadas				
GQA -	Grupo de Química Ambiental				
HPA -	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos				
HPLC -	High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia				
líquida de alta perfo	líquida de alta performance				
HX -	Hexano				
IARC -	International Agency for Research on Cancer - Agência Nacional				
para a Pesquisa do	Câncer				
IC -	Íon de confirmação				
IL -	<i>Ionic liquid</i> – líquido iônico				

INCTAA -	Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas						
Avançadas							
IQ -	Íon de quantificação						
LC -	<i>Liquid chromatography</i> – cromatografia líquida						
LC/FLD -	Liquid chromatography						
LC-MS/MS -	Liquid chromatography - tandem mass spectrometry -						
cromatografia a líqu	uido acoplada à espectrometria de massas em tandem						
LC-UV -	Liquid chromatography						
Log Kow -	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água						
MM -	Massa molar						
MMT-HDMIM-Br -	Montmorilonita modificada com brometo de hexadecil-3-						
metilimidazol							
MMT-IL -	Montmorilonita modificada com líquido iônico						
MS -	Mass Spectrometer - espectrômetro de massas						
MSPD-	Matrix Solid Phase Dispersion – Dispersão da Matriz em Fase						
Sólida							
m/z -	Razão massa/carga						
NIST -	National Institute of Standards and Techonology						
OD -	Oxigênio dissolvido						
OSPAR -	Oleoduto Santa Catarina – Paraná						
PIELAB -	Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos						
PR -	Paraná						
PV -	Pressão de vapor						
PVDF -	Polyvinylidene Difluoride - fluoreto de polivinilideno						
QuEChERS -	Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe						
S -	Solubilidade						
SP -	São Paulo						
SIM -	Selected ion monitoring - monitoramento de íon selecionado						
SPE -	Extração em fase sólida						
TGA -	Termogravimetria						
t <sub>R</sub> -	Tempo de Retenção						
UFPR -	Universidade Federal do Paraná						

UHPLC – MS/MS - *Ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer* – cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas em tandem

USEPA - United States Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

VA-MSPD - Vortex-assisted Matrix Solid Phase Dispersion - Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por vórtex

XRD - X-ray diffraction – Difração de raio-X

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	18
2.1.1 HPA no meio aquático	21
2.1.2 HPA em peixes	22
2.2 EXTRAÇÃO DE HPA DE TECIDO BIOLÓGICO	24
2.3 DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA	25
2.3.1 Suportes sólidos utilizados em MSPD	29
2.3.2 Argilominerais	30
2.3.3 Modificação da montmorilonita	32
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HPA	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E LIMPEZA DE VIDRARIAS	34
3.2 MANUTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS	36
3.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DA GASOLINA	36
3.4 AMOSTRAGEM DO TECIDO DE PEIXE	37
3.5 PREPARO DA MMT-HDMIM-BR	38
3.6 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA	39
3.7 PREPARO DA MSPD	40
3.8 EXTRAÇÃO POR VA-MSPD	40
3.9 EXTRAÇÃO POR VA-MSPD COM ETAPA DE <i>CLEAN-UP</i>	41
3.10 ETAPA DE <i>CLEAN UP</i> EM COLUNA DE VIDRO UTILIZANDO SÍLICA E	
ALUMINA COMO FASE ESTACIONÁRIA	41
3.11 AVALIAÇÃO DO USO DA MMT NÃO MODIFICADA COMO SUPORTE	
SÓLIDO	42
3.12 ESTIMATIVA DA EXATIDÃO DO MÉTODO PROPOSTO	43
3.13 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	43
3.14 DETERMINAÇÃO DOS HPA PRESENTES NA ÁGUA UTILIZADA NO	
EXPERIMENTO ENVOLVENDO AMOSTRAS REAIS	43
3.14.1 Construção das curvas analíticas	44

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS4	45
4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	45
4.2 CURVA ANALÍTICA INSTRUMENTAL	46
4.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO MSPD4	48
4.3.1 Extração de HPA por VA-MSPD	48
4.3.2 Extração de HPA por VA-MSPD com etapa de <i>clean up</i>	50
4.3.3 Extração de HPA com etapa de <i>clean up</i> em coluna de vidro, utilizando sílica	е
alumina como fases estacionárias	51
4.3.4 Avaliação de parâmetros do método	53
4.4 AVALIAÇÃO DO USO DA MONTMORILONITA NÃO MODIFICADA COMO	
SUPORTE SÓLIDO	58
4.5 ESTIMATIVA DA PRECISÃO E EXATIDÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA.	30
4.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA EM AMOSTRAS REAIS6	62
4.7 AVALIAÇÃO DA ÁGUA UTILIZADA NO EXPERIMENTO ENVOLVENDO	
AMOSTRAS REAIS	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMA PARCIAL DE CADA UM DOS 16 HPA	73

### 1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos entre si e oriundos de fontes naturais e antropogênicas, tais como síntese por organismos vegetais e animais, combustões de biomassa e combustíveis fósseis, incinerações industriais, derrames ou vazamentos de óleo cru e seus derivados, entre outros (Xu et al., 2011; Zhao et al., 2019). Dentre os HPA existentes, dezesseis são considerados poluentes prioritários de monitoramento pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e apresentam características carcinogênicas e mutagênicas (Behera et al., 2018).

Ao entrar em contato com o meio aquático, os HPA podem se acumular nos sedimentos e/ou partículas suspensas devido à sua natureza hidrofóbica, e serem remobilizados na coluna d'água, tornando-se biodisponíveis e podendo ser bioacumulados pela biota. Além disso, os HPA podem ser metabolizados pelos organismos, como os peixes, produzindo compostos carcinogênicos ativos e potentes. Devido à sua importância em ecossistemas aquáticos e em fontes alimentares humanas, os peixes são frequentemente usados para analisar a bioacumulação de contaminantes ambientais em organismos vivos, avaliando o risco para a saúde humana e monitorando a magnitude da poluição nesses ambientes (Xu et al., 2011).

Amostras de tecido biológico são consideradas matrizes complexas devido à grande quantidade de espécies endógenas como, por exemplo, os lipídios. Devido aos valores de concentração de HPA serem frequentemente muito baixos nessas matrizes, surge a necessidade de desenvolvimento de estratégias que permitam efetuar sua extração, promovendo a concentração dos analitos e a remoção desses interferentes, visando maior confiabilidade na etapa de quantificação (Ziarrusta et al., 2015).

A Dispersão da Matriz em Fase sólida (do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion* – MSPD) foi introduzida por Barker, em 1989, para o isolamento de drogas em tecido bovino e apresenta características atraentes na extração de contaminantes ambientais de amostras complexas. A técnica envolve a mistura de uma amostra com um suporte sólido, com o auxílio de almofariz e pistilo até a

obtenção de uma mistura homogênea. Essa mistura é inserida em um cartucho de SPE que, eventualmente, pode ser substituído por uma seringa de polipropileno ou coluna de vidro, podendo ou não conter um material auxiliar como etapa de *clean up*. A eluição com o solvente apropriado pode ser feita com o auxílio de uma pequena pressão e o extrato obtido pode ser concentrado ou analisado diretamente através da técnica adequada (Capriotti et al., 2015; Primel, Rombaldi, Caldas, Soares, & Cerqueira, 2014).

Suportes sólidos de ocorrência natural vêm sendo amplamente utilizados na MSPD devido à redução do impacto causado ao meio ambiente, além de apresentarem menor custo. A montmorilonita (MMT) é um argilomineral organofóbico amplamente utilizado como sorvente na remoção de poluentes ambientais em diferentes matrizes. A estrutura da MMT permite que uma modificação possa ser realizada para que esse argilomineral adquira propriedades organofílicas. Nesse contexto, líquidos iônicos têm sido explorados devido às suas propriedades vantajosas como baixa pressão de vapor, alta condutividade e alta estabilidade química/térmica (Reinert et al., 2012; Wu et al., 2014).

Baseando-se nas potencialidades da MSPD e do uso de ecomateriais, o intuito desse trabalho é propor um método analítico voltado à extração, limpeza e pré-concentração de HPA obtidos de amostras de tecidos de peixes, para posterior aplicação em amostras de peixes contaminadas com a fração solúvel da gasolina, para determinação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

#### **1.1 OBJETIVOS**

Desenvolver um método miniaturizado de extração de HPA em amostras de tecido de peixe, baseando-se na Dispersão da Matriz em Fase Sólida e utilizando a montmorilonita modificada com líquido iônico como suporte sólido.

#### 1.2.1 Objetivos específicos

 Avaliar a capacidade sortiva da montmorilonita modificada com líquido iônico, em conjunto com a MSPD, na extração de HPA em amostras de tecido de peixe;

 Investigar as melhores condições experimentais de extração para implantação de uma metodologia analítica para a determinação de HPA por MSPD em tecido de peixe;

- Avaliar a eficiência do método analítico para a determinação de HPA em tecido de peixe;

- Aplicar o método analítico em amostras de tecido de peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, conhecido popularmente como lambari.

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são poluentes onipresentes no ambiente, formados por átomos de carbono e hidrogênio, dispostos em dois ou mais anéis benzênicos fundidos entre si e organizados sob forma linear, angular ou agrupada. Podem ser encontrados em amostras aquosas, no ar e em amostras sólidas como sedimentos, corais e produtos alimentícios (Behera et al., 2018; Santos et al., 2019a). Embora os HPA ocorram por processos naturais, como fontes biogênicas (síntese por organismos vegetais e animais), a maior contribuição para sua emissão no meio ambiente ocorre por processos antropogênicos, como as fontes petrogênicas e pirogênicas (combustão incompleta de combustíveis fósseis e biomassa, incinerações industriais, derrames ou vazamentos de óleo cru e seus derivados, entre outros) (Zhao et al., 2014; Gao et al., 2018).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) caracteriza 16 HPA como poluentes prioritários de monitoramento, sendo eles (nome e abreviação): naftaleno (Naf), acenaftileno (Aci), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), fluoranteno (Fla), pireno (Pir), benzo[a]antraceno (BaA), criseno (Cris), benzo[k]fluoranteno (B*k*F), benzo[b]fluoranteno (B*b*F), benzo[a]pireno (B*a*P),

indeno[1,2,3-cd]pireno (IP), dibenzo[a,h]antraceno (D*ah*A) e benzo[g,h,i]perileno (B*ghi*P), apresentados na Figura 1.

FIGURA 1 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA) PRIORITÁRIOS EM ESTUDOS AMBIENTAIS DE ACORDO COM A AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS (USEPA, 2008).



Segundo a Agência Nacional para a Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), oito dos HPA prioritários apresentam características carcinogênicas e potencialmente mutagênicas, além de propriedades genotóxicas, podendo afetar a saúde em geral (Quadro 1). A exposição humana aos HPA pode causar diversos efeitos à saúde como diabetes, infertilidade, doenças

cardiovasculares, estresse oxidativo, má formação fetal, mutações genéticas e câncer (Gao et al., 2018; Santos et al., 2019a).

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade
Naf	Possivelmente carcinogênico	Positivo
Aci	Ainda não avaliado	Questionável
Ace	Não classificado	Questionável
Ant	Não classificado	Negativo
Flu	Não classificado	Negativo
Fen	Não classificado	Questionável
Fla	Não classificado	Positivo
Pir	Não classificado	Questionável
BaA	Possivelmente carcinogênico	Positivo
Cris	Possivelmente carcinogênico	Positivo
B <i>b</i> F	Possivelmente carcinogênico	Positivo
BkF	Possivelmente carcinogênico	Positivo
DahA	Provavelmente carcinogênico	Positivo
BaP	Carcinogênico	Positivo
IP	Possivelmente carcinogênico	Positivo
BghiP	Não classificado	Positivo

QUADRO 1 – CARCINOGENICIDADE E GENOTOXICIDADE DOS HPA PRIORITÁRIOS.

FONTE: IARC (2013)

A compreensão das características físico-químicas dos HPA prioritários é importante para avaliar seu comportamento e distribuição no meio ambiente. Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos fundidos entre si, com massa molar (MM) variando entre 128 g mol<sup>-1</sup> a 278 g mol<sup>-1</sup>. São quimicamente inertes, sólidos à temperatura ambiente e apresentam pontos de fusão (80 °C a 262 °C) e ebulição (218 °C a 496 °C) elevados. Em geral, os HPA são hidrofóbicos e a solubilidade em água diminui com o aumento da massa molar, variando entre os altamente insolúveis, como o B*ghi*P, a pouco solúveis, como o Naf. Além disso, apresentam coeficientes de partição octanol/água (Log Kow) superiores a 1, mostrando suas altas capacidades lipofílicas, que aumentam com o aumento do número de anéis. Já a volatilidade diminui com o aumento do número de anéis e transita entre compostos altamente voláteis, como o Naf, e aqueles relativamente pouco voláteis como o D*ah*A. Consequentemente, os HPA de menor massa molar possuem maior pressão de vapor (Behera et al., 2018) (Tabela 1).

HPA	nº de anéis	MM (g mol <sup>-1</sup> )	S (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow	PV (Pa)
Naf	2	128	32	3,37	10,4
Aci	3	152	16	4,07	0,89
Ace	3	154	3,9	3,92	0,29
Flu	3	166	2,0	4,18	9,0 × 10 <sup>-2</sup>
Fen	3	178	1,3	4,57	1,6 × 10 <sup>-2</sup>
Ant	3	178	7,3 × 10 <sup>-2</sup>	4,54	8,0 × 10 <sup>-2</sup>
Fla	4	202	2,6 × 10 <sup>-1</sup>	5,22	1,2 × 10 <sup>-3</sup>
Pir	4	202	1,3 × 10 <sup>-1</sup>	5,18	6,0 × 10 <sup>-4</sup>
BaA	4	228	1,4 × 10 <sup>-2</sup>	5,61	2,8 × 10 <sup>-5</sup>
Cris	4	228	2,0 × 10 <sup>-3</sup>	5,91	8,4 × 10 <sup>-5*</sup>
B <i>b</i> F	5	255	1,2 × 10 <sup>-3*</sup>	6,12	6,7 × 10 <sup>-5*</sup>
B <i>k</i> F	5	252	7,6 × 10 <sup>-4</sup>	6,84	1,3 × 10 <sup>-8*</sup>
BaP	5	252	3,8 × 10 <sup>-3</sup>	6,50	7,3 × 10 <sup>-7</sup>
IP	6	276	6,2 × 10 <sup>-2</sup>	6,58	1,3 × 10 <sup>-8*</sup>
DahA	5	278	2,6 × 10 <sup>-4</sup>	6,50	1,3 × 10 <sup>-8*</sup>
B <i>ghi</i> P	6	276	2,6 × 10 <sup>-4</sup>	7,10	1,4 × 10 <sup>-8</sup>

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA.

FONTE: Adaptado de Behera et al., 2018.

LEGENDA: MM, massa molar (g mol<sup>-1</sup>); S, solubilidade em água a 25 °C (mg L<sup>-1</sup>); Log Kow, coeficiente de partição octanol/água; PV, pressão de vapor a 25 °C (Pa); \*, dados obtidos a 20 °C.

#### 2.1.1 HPA no meio aquático

A contaminação do meio aquático por HPA ocorre, principalmente, por contaminação do solo, descarga de resíduos industriais e domésticos e derramamento de óleo cru e seus derivados (Meng et al., 2019; Rengarajan et al., 2015).

Acidentes ambientais envolvendo derramamento de óleo cru e seus derivados tornaram-se uma preocupação mundial devido ao impacto causado à biota e à população em geral, que pode permanecer no ambiente por anos. Comparado ao petróleo bruto, os combustíveis refinados, como a gasolina e o diesel, apresentam maiores concentrações de HPA e, consequentemente, são considerados mais tóxicos aos organismos aquáticos (Barron et al., 1999; Rodrigues et al., 2010). Em julho de 2000, por exemplo, houve o maior episódio de desastre ambiental envolvendo derramamento de óleo no estado do Paraná. Quatro milhões de litros de óleo diesel vazaram de um duto do OSPAR (Oleoduto Santa Catarina – Paraná), percorrendo uma distância de 120 km, contaminando a Bacia do Arroio Saldanha e os rios Barigui e Iguaçu, devastando a fauna e a flora local (CUT Paraná, 2015), sem falar nos prejuízos à saúde pública. Acidentes de menor proporção envolvendo tanques de armazenamento, como os de postos de

combustíveis, ocorrem com maior frequência e também contribuem para o aporte de HPA no meio aquático. Em julho de 2018, em Santos (SP), cerca de 8 mil litros de gasolina vazaram de um caminhão-tanque durante uma manobra para abastecer um posto de combustíveis. Três quarteirões próximos ao local do acidente precisaram ser evacuados devido ao risco de explosão e o combustível vazou pelas galerias da cidade, oferecendo risco de contaminação aos estuários da região e, novamente, colocando em risco a saúde pública (G1 Santos, 2018).

Ao entrar em contato com a água, os HPA tendem a se solubilizar (associam-se à matéria orgânica dissolvida), o que ocorre numa menor magnitude devido à sua solubilidade limitada e natureza hidrofóbica, ou serem adsorvidos no material orgânico sólido disponível e, consequentemente, depositados nos sedimentos, que podem ser remobilizados na coluna d'água. O maior caráter lipofílico desses compostos facilita sua absorção por organismos aquáticos e, consequentemente, sua biodisponibilidade ao longo da cadeia trófica (Meng et al., 2019; Xu et al., 2011). Como a água é o meio de exposição de HPA aos organismos ali presentes, em especial aos peixes, há uma grande preocupação no que diz respeito aos efeitos tóxicos desses compostos não só à biota, mas também à população que consome animais marinhos provenientes de ambientes contaminados (Richardson et al., 2014).

Deste modo, pesquisas contínuas sobre a ocorrência e o risco de HPA no ambiente aquático de água doce são necessárias para entender melhor o destino desses compostos e desenvolver melhores medidas para proteger a saúde humana e os ambientes ecológicos.

#### 2.1.2 HPA em peixes

As exposições aguda e crônica de peixes aos constituintes do óleo cru e seus derivados em ambientes contaminados pode se dar por via direta - por meio da contaminação via brânquias, ou via trófica - pela ingestão de alimentos contaminados presentes no meio. Isso leva à possibilidade de bioacumulação, isto é, a absorção em tecidos gordurosos, o que pode gerar lesões hepáticas e tumores em alguns peixes, mesmo em baixas concentrações (Zhao et al., 2014). Além de acumularem os resíduos presentes no meio, os peixes apresentam característica de

biomagnificação, representada pela transferência dos compostos bioacumulados ao longo da cadeia trófica (Behera et al., 2018; Meng et al., 2019).

Devido as propriedades lipofílicas dos HPA, esses compostos tendem a se acumular nos tecidos com elevado conteúdo lipídico como cérebro, vísceras, fígado e músculo (Xu et al., 2011; Zhao et al., 2014). A concentração de HPA presente nesses tecidos varia não somente conforme as propriedades físico-químicas de cada HPA, mas também conforme o teor lipídico presente em cada um dos tecidos, o metabolismo, cadeia trófica de cada espécie de peixe, além do grau de poluição por HPA no ambiente onde essas espécies se encontram (Yu et al., 2019). Portanto, a concentração do somatório dos HPA ( $\Sigma$ HPA) encontrada em cada tipo de tecido avaliado pode variar de ng g<sup>-1</sup> a µg g<sup>-1</sup>. Outro fator a ser considerado é a biotransformação enzimática que ocorre com uma parcela dos HPA absorvidos, produzindo metabólitos, alguns dos quais são mais tóxicos que os compostos parentais (Franco & Lavado, 2019).

Os peixes permanecem entre os alimentos mais consumidos no mundo e são considerados uma importante fonte proteica para a população. Conforme o relatório da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), publicado em 2016, os peixes são responsáveis por, aproximadamente, 17% da ingestão global de proteína animal e, aproximadamente, 7% das fontes de proteínas existentes. A ingestão de peixes, assim como outros alimentos contaminados, torna-se uma fonte preocupante da exposição humana aos HPA, fazendo com que haja a necessidade de monitoramentos nessa matriz pois, além disso, os peixes atuam como bioindicadores da contaminação por HPA no ambiente aquático (Behera et al., 2018).

Peixes da espécie *Astyanax altiparanae*, conhecido popularmente como Lambari, são nativos da região sul brasileira e comum em ambientes lóticos continentais (água doce). São onívoros, ou seja, exploram alimentos tanto de origem animal como vegetal e possuem, em média, 10 cm de comprimento quando adultos. Apesar do seu tamanho reduzido, essa espécie serve como alimento para espécies carnívoras, além de ser amplamente comercializada e consumida pela população (Dal Pont, 2018; Pereira et al., 2017).

Amostras de tecido biológico são consideradas matrizes complexas devido ao grande número de espécies endógenas como, por exemplo, os lipídios. Devido aos valores de concentração de HPA serem frequentemente muito baixos nessas matrizes, surge a necessidade de desenvolvimento de estratégias que permitam efetuar sua extração, promovendo a concentração dos analitos e a remoção desses interferentes, visando maior confiabilidade na etapa de quantificação (Ziarrusta et al., 2015). Tendo em vista que o tecido de peixe utilizado para fins alimentares é o músculo, o tecido muscular do Lambari é o objeto de estudo deste trabalho.

#### 2.2 EXTRAÇÃO DE HPA DE TECIDO BIOLÓGICO

A extração dos analitos em amostras sólidas de alto teor lipídico continua sendo uma etapa crítica na determinação de contaminantes em diferentes matrizes. Para escolher a técnica de extração mais adequada, alguns aspectos devem ser avaliados como, por exemplo, a seletividade para os compostos de interesse, recuperação dos analitos, volume do solvente orgânico necessário, toxicidade do solvente e compatibilidade com o método de análise, tempo de extração e necessidade de etapa de limpeza para remoção de possíveis interferentes. Cada técnica tem seu próprio mérito e a escolha depende, ainda, de outros fatores tais como custo, simplicidade de operação e existência de um método padrão ou validado (Chatterjee et al., 2016; Ziarrusta et al., 2015).

Diversas técnicas são empregadas na extração de HPA em tecido biológico. As mais tradicionais são a extração com Soxhlet, por ultrassom, e digestão alcalina seguida de extração líquido-líquido (Dong et al., 2018; Li et al., 2019; Recabarrenvillalón et al., 2019; Richardson et al., 2014). Contudo, essas técnicas demandam grande quantidade de solventes, tempo e/ou etapas no preparo de amostra. Para favorecer o melhor controle das variáveis de extração, reduzir consumo de solventes orgânicos, gasto energético e minimizar o contato do analista com solventes, esses procedimentos vêm sendo substituídos por estratégias modernas voltadas à miniaturização dos procedimentos de extração como, por exemplo, a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (Caldas et al., 2014; Capriotti et al., 2015).

#### 2.3 DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA

Introduzida por Barker et al., em 1989, para o isolamento de drogas em tecido bovino, a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion,* MSPD), surgiu como uma alternativa mais simples à Extração em Fase Sólida (*Solid-Phase Extraction,* SPE), uma vez que na SPE a amostra precisa ser homogênea e estar no estado líquido antes da eluição pelo cartucho (Caldas et al., 2014; Wianowska & Gil, 2019). A MSPD apresenta características atraentes na extração de contaminantes de amostras sólidas, semissólidas e viscosas e, dentre essas amostras, podem se destacar materiais biológicos complexos, tais como tecidos animais e amostras vegetais. Isso se deve ao fato dessa técnica permitir a extração e limpeza (*clean up*) em uma única etapa, reduzindo assim o tempo de preparo da amostra. Além disso, não requer o uso de equipamentos sofisticados, usa pequenas quantidades de amostra e um baixo volume de solvente quando comparada às técnicas clássicas, como extração por Soxhlet, o que reflete em vantagens como simplicidade e baixo custo (Caldas et al., 2014; Wianowska & Gil, 2019).

O princípio da MSPD, apresentado na Figura 2, envolve a mistura de uma amostra com um material chamado de suporte sólido, com o auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de uma mistura homogênea e pulverulenta. Essa mistura é transferida para um cartucho de SPE que, eventualmente, pode ser substituído por uma seringa de polipropileno ou coluna de vidro, podendo ou não conter um material auxiliar como etapa de *clean up*. A eluição pode ser feita com o auxílio de uma pequena pressão e o extrato obtido pode ser concentrado ou analisado diretamente através da técnica apropriada (Capriotti et al., 2015; Wianowska & Gil, 2019).



FIGURA 2 – PRINCÍPIO BÁSICO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO POR MSPD.

FONTE: Adaptado de Capriotti et al., 2015.

Dependendo da complexidade da matriz, uma etapa de *clean up* torna-se necessária para remoção de espécies interferentes, proporcionando uma maior seletividade durante as análises. O *clean up* pode ser realizado adicionando-se um sorvente auxiliar no cartucho de SPE antes do empacotamento da amostra e eluição com o solvente apropriado, promovendo extração e limpeza em uma única etapa (Hoff & Pizzolato, 2018).

Como toda técnica de extração, alguns fatores devem ser considerados para melhorar a eficiência de extração, como a natureza do suporte sólido e do solvente de eluição, a proporção empregada de massa de amostra e massa de suporte sólido, volume necessário do solvente e necessidade do uso de um sorvente auxiliar como etapa de *clean up* (Wianowska & Gil, 2019).

O suporte sólido pode atuar como um agente abrasivo, rompendo a estrutura física da amostra e facilitando o processo de extração devido ao aumento da área superficial, e/ou como um sorvente, facilitando a transferência de compostos presentes na amostra para este tipo de material, além de auxiliar na limpeza do extrato, removendo possíveis interferentes e aumentando a seletividade da técnica (Wianowska & Gil, 2019). A seleção do suporte sólido depende das características do analito e da natureza da matriz, e a proporção adequada de amostra e suporte sólido é uma variável determinante na eficiência da extração por MSPD. As proporções mais empregadas em diferentes aplicações da MSPD variam entre 1:1 a 1:4 de massa de amostra e massa de suporte sólido (Capriotti et al., 2015).

A escolha do solvente de eluição depende das forças de interação entre o analito e o suporte sólido, e um único solvente ou uma mistura de solventes de diferentes polaridades podem ser utilizados. O uso sequencial de solventes de diferentes polaridades também pode ser feito com o intuito de isolar analitos de diferentes polaridades em uma mesma amostra. Além disso, o solvente escolhido deve ser compatível com a técnica analítica instrumental escolhida (Caldas et al., 2014; Taverna, 2011).

Nos últimos anos, o princípio básico da MSPD passou por algumas adaptações utilizando ultrassom, micro-ondas, campo magnético ou vórtex. Essas adaptações visam diminuir ainda mais o tempo de análise e o volume de solventes orgânicos utilizados (Wianowska & Gil, 2019). A MSPD assistida por Vórtex (*Vortex-assisted MSPD*, VA-MSPD), por exemplo, é uma adaptação que visa diminuir o tempo de extração e possíveis complicações decorrentes do processo de empacotamento da amostra no cartucho de SPE. O procedimento envolve, basicamente, a agitação por vórtex da amostra com o suporte sólido, seguido de centrifugação, o que substitui a etapa de eluição da amostra em um cartucho de SPE (Capriotti et al., 2015).

Conforme Wianowska & Gil (2019), uma pesquisa no bando de dados Scopus revelou que, de 1990 a 2018, quase 700 artigos foram publicados com o termo MSPD no título, resumo ou palavra-chave, o que mostra seu grande potencial de aplicação. Os analitos normalmente determinados são drogas, agrotóxicos, constituintes de ocorrência natural, entre outros compostos, em uma ampla variedade de matrizes, como mostrado na Tabela 2. No que se refere aos HPA, a MSPD tem sido utilizada em matrizes como sedimentos marinhos, tecido animal e vegetal e solos (Valencia & Llasera, 2017; Vilela Júnior; 2017; Tan et al., 2017).

TABELA 2 – APLICAÇÕES DA MSPD EM DIFERENTES MATRIZES, A	ANALITOS E TÉCNICAS DE
QUANTIFICAÇÃO.	

Matriz	Analito	Amostra / suporte sólido	Solvente de eluição (mL)	Quantificação	Referência
Lodo	Drogas antimicóticas	Amostra (0,5 g) / C18 (2,0 g)	Metanol contendo 0,5% (v/v) NH₃ (10,0 mL)	LC-MS/MS	CASADO et al., 2015

Placenta Humana	Parabenos e benzofenonas	Amostra (0,25 g) / C18 (1 g)	Acetato de etila (20,0 mL)	UHPLC- MS/MS	VELA-SORIA et al., 2015
Peixes	Produtos farmacêuticos	Amostra (0,5 g) / terra diatomácea (0,5 g)	Metanol (5 mL)	LC-MS/MS	HERTZOG et al., 2015
Cosméticos	Corantes	Amostra (0,1 g) / Florisil (0,4 g)	Metanol (2 mL)	LC-MS/MS	GUERRA et al., 2015
Mexilhão	Parabenos	Amostra (0,5 g) / sílica gel (1,2 g)	Acetonitrila (10,0 mL)	LC-MS/MS	VILLAVERDE- DE-SÁA et al., 2016
Leite materno	Parabenos	Amostra (0,2 mL) / nanosorvente magnético modificado (MGO@PIT) (0,05 g)	Metanol (1 mL)	LC-UV	FOTOUHI et al., 2017
Vegetais	Contaminantes Emergentes	Amostra (2,0 g) / Florisil (4,0 g)	Acetato de etila- metanol 90:1 (v/v) (8 mL)	GC-MS/MS	ALBERO et al., 2017
Arroz	Inseticidas	Amostra (2,0 g) / Alumina básica (4 0 g)	Acetonitrila (10,0 mL)	LC-MS/MS	ZHANG et al., 2017

LEGENDA: LC, cromatografia líquida (do inglês, liquid chromatography);

MS, espectrometria de massas (do inglês, mass spectrometry)

UHPLC, cromatografia líquida de ultra performance (do inglês, *ultra high performance liquid chromatography*);

GC, cromatografia gasosa (do inglês, gas chromatography)

Além das vantagens já citadas, segundo Capriotti et al. (2015), a MSPD apresenta outras vantagens como boas recuperações em análise de amostras com teor lipídico elevado, como tecidos animais e alimentos. Conforme pesquisa realizada por Wianowska & Gil (2019), amostras de tecido animal tiveram seu uso, até 2018, atingido 27,7% das publicações, perdendo apenas para amostras de alimentos (Figura 3). Dentre as amostras de tecido animal, os compostos mais estudados são drogas e pesticidas.



FIGURA 3 – USO DA MSPD EM DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS (ATÉ 2018).

Valencia & Llasera (2017), aplicaram a MSPD para a determinação de quatro HPA prioritários em tecido bovino por LC/FLD e obtiveram recuperações na faixa de 96 a 99%. Vela-Soria e colaboradores (2015) aplicaram a MSPD na extração de desreguladores endócrinos em tecido de placenta humana, com determinação por UHPLC-MS/MS, e obtiveram recuperações que variaram entre 96% a 105%. Ainda no mesmo ano, Ziarrusta e colaboradores aplicaram a MSPD para a extração de poluentes orgânicos em amostras de moluscos, com determinação por GC-MS e obtiveram recuperações na faixa de 69 a 117%. Porém, mesmo com as diversas publicações presentes na literatura envolvendo a MSPD, a extração de HPA de matrizes complexas, como o tecido animal, ainda é pouco explorada (Wianowska & Gil, 2019).

Devido às diversas vantagens que a MSPD oferece, a técnica mostra-se promissora na extração de HPA prioritários em tecido de peixe.

#### 2.3.1 Suportes sólidos utilizados em MSPD

Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte sólido na etapa de dispersão da matriz. O isolamento de analitos mais polares é realizado com sorventes de natureza mais hidrofílica e o de analitos menos polares com sorventes mais hidrofóbicos. Os materiais de fontes comerciais e sintéticas mais frequentemente utilizados são octadecilsiloxano (C18), florisil, alumina, sílica (SiO<sub>2</sub>),

nanopartículas metálicas e polímeros molecularmente impressos (Capriotti et al., 2015; Hoff & Pizzolato, 2018; Wianowska & Gil, 2019).

Entretanto, materiais alternativos, provenientes de fontes renováveis, vêm sendo cada vez mais explorados pois, além de minimizar os impactos causados ao meio ambiente, têm custos reduzidos. O uso de areia, terra diatomácea e conchas de mexilhão dourado, foram recentemente relatados na literatura. Santos e colaboradores (2019b) utilizaram areia como suporte sólido em VA-MSPD para a extração de diferentes classes de pesticidas de frutas e vegetais e obtiveram recuperações na faixa de 55 a 140% para todos os compostos. León-González & Rosales-Conrado (2017) empregaram a VA-MSPD para a extração de enantiômeros de ibuprofeno do leite materno, utilizando terra diatomácea como suporte sólido e obtiveram recuperações satisfatórias para os compostos analisados. Cerqueira e colaboradores (2019) utilizaram conchas de mexilhão dourado como suporte sólido na VA-MSPD para a determinação de ácido acetilisalicílico e ácido salicílico em lodo de esgoto e obtiveram recuperações na faixa de 68% a 120% os compostos em estudo.

Entre os ecomateriais disponíveis, destacam-se os argilominerais, que desempenham um papel importante na mobilidade e retenção de espécies químicas no solo (Anjos et al., 2014).

#### 2.3.2 Argilominerais

Os argilominerais fazem parte da composição mineralógica dos solos e são classificados conforme sua estrutura básica. Argilominerais do tipo 2:1 apresentam estrutura lamelar composta por duas folhas tetraédricas de sílica intercaladas com uma folha central octaédrica de alumina, as quais contêm cargas negativas que são compensadas por cargas positivas como cátions inorgânicos Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>2+</sup> (Anjos et al., 2014). Essas lamelas podem apresentar capacidade de expansão, aumentando o espaçamento interlamelar desse tipo de material o que, consequentemente, aumenta sua reatividade. Dois dos três constituintes dessa classe de argilomineral apresentam capacidade de expansão lamelar, sendo eles a esmectita, na qual se inclui a montmorilonita (MMT) cuja estrutura é mostrada na Figura 4, e a vermiculita

(Fiscal-Ladino et al., 2017). O terceiro constituinte, as micas, tem uma estrutura lamelar não expansível e, portanto, não foi objeto de estudo desta pesquisa.

A montmorilonita vem chamando atenção no que diz respeito à utilização de ecomateriais devido à sua elevada área superficial e interação com diversas substâncias, capacidade de troca iônica, plasticidade e propriedades tixotrópicas (BRASIL. Serviço Geológico do, 2014). Essas propriedades garantem a este material diferentes aplicações em catálise, processos industriais, tratamento de efluentes, proteção contra incêndios, isolante acústico e térmico, aditivos em concreto e preparação de produtos de alto valor agregado, como cosméticos e medicamentos (Anjos et al., 2014; Gus et al, 2014; Mendonça et al., 2019).



FIGURA 4 – ESTRUTURA DE UMA MONTMORILONITA SÓDICA

FONTE: http://www.ufjf.br/gfqsi/linhas-de-pesquisa/materiais-lamelares/montmorillonitas/

Em geral, os argilominerais são hidrofílicos e possuem características organofóbicas, o que torna necessária uma modificação em sua estrutura para serem capazes de sorver compostos orgânicos. Essa modificação consiste, basicamente, em aumentar o espaçamento basal, facilitando a introdução de cátions orgânicos no lugar dos cátions inorgânicos presentes, tornando-os organofílicos. Esse processo, conhecido como organofilização, tem sido estudado e aplicado em

diversas áreas como, por exemplo, no combate à poluição ambiental causada por petróleo e seus derivados (Açışlı et al., 2017; He et al., 2018; Shah et al., 2018)

#### 2.3.3 Modificação da montmorilonita

A força de ligação entre os cátions inorgânicos e a região interlamelar carregada negativamente da MMT é relativamente fraca, o que possibilita a substituição dessas espécies inorgânicas por espécies orgânicas. As espécies orgânicas recentemente estudadas na literatura compreendem os surfactantes nãoiônicos e aniônicos e os líquidos iônicos (*ionic liquids*, IL) baseados em sais de fosfônio e imidazólio (Fiscal-Ladino et al., 2017).

Os IL são sais fundidos à temperatura ambiente e têm recebido atenção na modificação da MMT para a sorção de poluentes orgânicos ambientais devido às suas propriedades físicas vantajosas como baixa pressão de vapor, alta condutividade e alta estabilidade química/térmica (Fontana et al., 2013; Zhao et al., 2019). Quando inseridos entre as lamelas da MMT, os cátions orgânicos, como os íons de imidazólio, substituem os cátions inorgânicos presentes e se acumulam nas superfícies externas das partículas de argila (Wu et al., 2014). Essa substituição promove um aumento no espaçamento basal do argilomineral, o qual é proporcional ao tamanho da cadeia carbônica do IL utilizado. A presença de cátions orgânicos nas superfícies externas das partículas de argila aumenta a hidrofobicidade das argilas organofílicas, o que as tornam capazes de absorver substâncias orgânicas não polares (Reinert et al., 2012; Wu et al., 2014).

No campo das técnicas de microextração, Aftafa et al. (2014) avaliaram, pela primeira vez, a MMT modificada com IL (MMT-IL) de diferentes comprimentos de cadeia como sorvente na extração de hormônios estrogênicos em águas superficiais, por microextração em fase sólida, e obtiveram recuperações na faixa de 86,9 a 97,7%. Fiscal-Ladino e colaboradores (2017) avaliaram a eficiência da MMT-IL de diferentes comprimentos de cadeia como sorvente na extração de bifenilas policloradas por extração sortiva em disco rotativo. O estudo mostra que uma cadeia de carbono mais longa intercalada nas lamelas do argilomineral proporcionou uma grande capacidade de extração, que foi comparável ao sorvente C18 comercial, e recuperações na faixa de 80 a 86% foram obtidas para os compostos em estudo.

Baseando-se nos estudos de Fiscal-Ladino (2017), o sorvente utilizado nessa pesquisa foi a MMT modificada com brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol (MMT-HDMIM-Br), o qual ainda é pouco explorado na microextração em fase sólida no preparo de amostras em aplicações analíticas.

#### 2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HPA

Para a determinação de HPA são utilizados métodos cromatográficos com diferentes detectores, como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, ultravioleta ou por espectrometria de massas e a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama ou por espectrometria de massas (Santos et al, 2019a).

Entretanto, alguns desses métodos apresentam limitações. A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, por exemplo, é mais sensível quando comparada à ultravioleta, porém, nem todos os HPA são fluorescentes (Plaza-Bolaños et al., 2010). A detecção por ionização em chama em cromatografia gasosa apresenta desvantagens comuns a um detector não específico e, além do mais, sua sensibilidade analítica está superada pela espectrometria de massas (Rascón et al., 2019).

Já a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas são vantajosas em relação às outras técnicas aqui mencionadas, como alto poder de resolução e seletividade. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas está aqui destacada por ser de interesse particular neste trabalho (Plaza-Bolañoset al., 2010; Caldas et al., 2013)

#### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Esta dissertação de mestrado fez parte de um projeto de pesquisa mais amplo, denominado "Marcadores moleculares aplicados a incidentes em ambientes aquáticos continentais", financiado pelo Centro de Pesquisas da Petrobrás (CENPES), do qual são participantes o Grupo de Integrado de Aquicultura (GIA), o
Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos (PIELAB) e o Grupo de Química Ambiental (GQA), todos da Universidade Federal do Paraná (UFPR). De uma forma mais ampla, o estudo tem como objetivo principal testar protocolos de ecologia molecular e de ecotoxicologia, estabelecendo subsídios aos estudos de biomonitoramento, que permitirão identificar de forma mais precisa a interferência aguda e crônica de incidentes com óleo cru e seus derivados, em especial em ambientes aquáticos continentais. O projeto conta, ainda, com uma parceria internacional entre o GQA-UFPR e o Grupo de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (GICTA), da Universidade de Caldas, situada na Colômbia.

#### 3.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E LIMPEZA DE VIDRARIAS

Para este estudo foi utilizada uma solução contendo os 16 padrões de HPA prioritários (marca: Sigma-Aldrich) mostrados na Tabela 3, uma solução de padrão sub-rogado p-terfenil-d14 (marca: Sigma-Aldrich, número CAS: 1718-51-0) e uma solução contendo cinco padrões internos de HPA (marca: Sigma-Aldrich) mostrados na Tabela 4.

Substância	Número CAS	Pureza (%)
Naftaleno	91-20-3	99,7
Acenaftileno	208-96-8	99,4
Acenafteno	83-32-9	99,3
Fluoreno	86-73-7	98,7
Fenantreno	85-01-8	98,0
Antraceno	120-12-7	99,0
Fluoranteno	206-44-0	99,5
Pireno	129-00-0	99,2
Benzo[a]antraceno	56-55-3	98,5
Criseno	218-01-9	97,4
Benzo[b]fluoranteno	205-99-2	97,3
Benzo[k]fluoranteno	207-08-9	99,5
Benzo[a]pireno	50-32-8	96,7
Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	98,3
Benzo[g,h,i]perileno	191-24-2	99,4
Indeno[1,2,3-cd]pireno	193-39-5	99,0

TABELA 3 – INFORMAÇÕES DOS 16 PADRÕES DE HPA PRIORITÁRIOS UTILIZADOS NO ESTUDO.

Substância	Número CAS	Pureza (%)
Naftaleno-d8	1146-65-2	96,3
Acenafteno-d10	15067-26-2	99,8
Fenantreno-d10	1517-22-2	99,3
Criseno-d12	1719-03-5	98,8
Perileno-d12	1520-96-3	99,5

TABELA 4 – INFORMAÇÕES DOS CINCO PADRÕES INTERNOS DE HPA UTILIZADOS NO ESTUDO.

Partindo das soluções acima, foram preparadas, em balões volumétricos de 10 mL, soluções estoque na concentração de 80,0 mg L<sup>-1</sup>. A partir das soluções estoque, soluções intermediárias de padrões de HPA, padrões internos e padrão sub-rogado foram preparadas nas concentrações de 1000  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e 5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em n-hexano grau HPLC (Macron Chemicals). Tanto as soluções estoque como as soluções intermediárias foram acondicionadas em frascos âmbar com tampa contendo septo de teflon e armazenadas em congelador (-18 °C).

Para evitar possíveis contaminações, todas as vidrarias e outros materiais utilizados nos experimentos passaram, previamente, por um procedimento de limpeza, conforme o tipo de vidraria (volumétrica ou não volumétrica). A vidraria não volumétrica foi lavada com detergente (Extran® 2% v/v), enxaguada em água corrente e, posteriormente, colocada em banho ultrassônico (USC 2800, Unique) por 10 min. A vidraria foi enxaguada três vezes com água tipo III produzida por osmose reversa a 1,3  $\mu$ S cm<sup>-1</sup> (Evolution RO 0510, Permution) e, mais uma vez, colocada em banho ultrassônico por 10 min. Numa terceira etapa, a vidraria foi lavada mais três vezes com água ultrapura (tipo I) com resistividade 18,2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Milli-Q Plus, Millipore) e colocada em banho ultrassônico por mais 10 min. Finalmente, a vidraria foi enxaguada com água Milli-Q e seca em estufa a 150 °C. A fim de eliminar possíveis resíduos orgânicos, a vidraria foi colocada em forno mufla a 400 °C por 4 h. Após o resfriamento, a vidraria foi protegida com papel alumínio e armazenada em caixa de polipropileno com tampa, protegida da poeira e umidade, até a sua utilização.

Para a vidraria volumétrica, o procedimento de limpeza consistiu das mesmas etapas de lavagem descritas no parágrafo anterior. Ao final da terceira etapa de lavagem, o material foi rinsado duas vezes com alíquotas de acetona grau HPLC, seco a temperatura ambiente e armazenado em caixa de polipropileno com tampa, protegida da poeira e umidade, até a sua utilização.

# 3.2 MANUTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Os experimentos descritos nos itens 3.2 a 3.4 foram realizados no GIA UFPR, com a colaboração do Dr. Giorgi Dal Pont.

Peixes adultos da espécie *Astyanax altiparanae* foram adquiridos em uma instalação comercial em Curitiba (PR) e levados ao GIA UFPR para aclimatação. Após a chegada, foram submetidos a tratamentos profiláticos (2 h em NaCl 6 g L<sup>-1</sup> e 2 h em malaleuca 1% (Melafix®) + solução fungicida (Mydor fungus-ease®)) e, posteriormente, mantidos em tanques de manutenção (1000 L) equipados com sistema fechado de filtragem física e biológica, aeração constante e temperatura controlada (25,0 ± 0,7 °C; oxigênio dissolvido (OD) 6,57 ± 0,87 mg L<sup>-1</sup>; pH 7,2 ± 0,6) por aproximadamente um ano. Durante esse período, a ocorrência de mortalidade foi de aproximadamente 2%. A alimentação foi realizada diariamente, *ad libitum*, com ração comercial (Kowalski®, proteína bruta = 47%) (Dal Pont, 2018).

# 3.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DA GASOLINA

A gasolina comum foi escolhida para os ensaios de contaminação por apresentar a maior toxicidade em espécies de *A. altiparanae* quando comparada ao óleo cru e seus derivados, como o diesel e óleos lubrificantes, conforme resultados obtidos em experimentos anteriores feitos pelo GIA. Nesses experimentos foram avaliadas a influência da temperatura da água e pH, a biotransformação, estresse oxidativo e biomarcadores neurotóxicos, além de respostas fisiológicas (osmorregulação, metabolismo ácido-base, hematológico e energético) nas espécies em estudo (Dal Pont, 2018).

A gasolina utilizada neste experimento foi adquirida no comércio local de Curitiba (PR) e levada ao GIA para obtenção da fração solúvel em água (FSA G), conforme a metodologia descrita por Anderson et al. (1974). Resumidamente, uma parte da gasolina comum foi adicionada a nove partes de água em um frasco Mariotte (22 L), mantido sob agitação por 22 h à temperatura ambiente (25 °C) e coberto com papel alumínio para evitar incidência luminosa. A velocidade de agitação foi mantida constante e suficiente para gerar um vórtex que correspondia a 1/3 da altura da coluna formada pela água e gasolina. Ao final desse período, o agitador magnético foi desligado e a solução mantida em repouso com o intuito de promover a separação de partículas insolúveis em suspensão. Após a separação, a FSA G foi imediatamente adicionada aos tratamentos experimentais descritos no item 3.4 (Dal Pont, 2018).

#### 3.4 AMOSTRAGEM DO TECIDO DE PEIXE

Dois banhos-maria (25 °C) foram confeccionados em madeira e impermeabilizados para evitar vazamento de água e, consequente, variação de volume. Doze aquários redondos de vidro foram dispostos no banho-maria e preenchidos com 4 L de água limpa e declorada (OD 6,33  $\pm$  0,27 mg L<sup>-1</sup>; pH 7,24  $\pm$  0,66 e alcalinidade 40,00  $\pm$  12,40 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>).

Exemplares de *Astyanax altiparanae* (Figura 5A) foram previamente separados do tanque de manutenção e acondicionados individualmente nos aquários de vidro. A aclimatação às condições laboratoriais foi realizada por 48 h, não havendo registro de morte de animais durante esse período. Quatro exemplares dessa espécie foram expostos à concentração correspondente a  $CL_{10} - 96$  h (0,5% - v/v) e outros quatro à  $CL_{50} - 96$  h (2,65% - v/v) da FSA G por 48 h. Um tratamento controle (n = 4) foi mantido em água limpa, sem adição da FSA G, ao longo do mesmo período. O experimento foi conduzido em sistema semi-estático, com renovação diária de 80% do volume de água.

Ao final do período de exposição os peixes foram anestesiados com solução tamponada de tricaína metanosulfonada (MS-222 a 5 mg L<sup>-1</sup> – pH 7,2) (Ostrensky et al., 2015) e insensibilizados por secção medular para a coleta do tecido muscular (Figura 5B). Imediatamente após a coleta, os tecidos foram identificados e armazenados em ultrafreezer a -80 °C até a realização das análises. Amostras de água dos tratamentos também foram coletadas para a determinação da concentração de HPA (Dal Pont, 2018).

FIGURA 5 – A) ESPÉCIE A. altiparanae. B) TECIDO MUSCULAR RETIRADO APÓS MORTE POR HIPOVOLEMIA.



# Nota Ética

Todos os procedimentos experimentais descritos nos itens 3.2 a 3.4 foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Paraná (protocolo Nº 874).

#### 3.5 PREPARO DA MMT-HDMIM-BR

O preparo da MMT-HDMIM-Br foi feito no laboratório do GICTA conforme descrito a seguir.

O IL HDMIM-Br foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por MIN et al. (2006). Resumidamente, o procedimento consistiu em misturar quantidades equimolares de metilimidazol (5,0 g, 61 mmol) e 1-bromohexadecano (18,3 g, 61 mmol) em acetato de etila em um balão de reação (50 mL). A mistura foi vigorosamente agitada em refluxo durante 48 h e, após este tempo, o solvente foi evaporado para obtenção do HDMIM-Br, na forma de um sólido amarelo pálido. O IL foi caracterizado por <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C NMR (Fiscal-Ladino et al., 2017).

Posteriormente, 1 g de MMT foi disperso em 3,0 g de uma solução de HDMIM-Br em metanol a 13% v/v e a dispersão foi agitada vigorosamente durante 1 h à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada e, a fim de remover o excesso de líquido iônico, o material foi lavado três vezes com metanol (20 mL de cada vez) e mais três vezes com água destilada. O sólido foi seco em estufa por um período de 24 h a 105 °C. A modificação da MMT com HDMIM-Br foi confirmada por termogravimetria (TGA), difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com

transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy,* FTIR) os quais comprovaram o aumento do espaçamento basal devido a substituição dos íons Na<sup>+</sup> presentes na camada interlamelar pelo IL (Fiscal-Ladino et al., 2017).

# 3.6 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A determinação de HPA foi realizada em um cromatógrafo a gás, modelo GC2010 Plus (Shimadzu), acoplado a um espectrômetro de massas em tandem com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ8040). A injeção dos compostos foi realizada por meio de um amostrador automático, modelo AOC-5000 Plus (Shimadzu) e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna SH-Rtx-5MS (Shimadzu) com dimensões de 30 m × 0,25 mm × 0,25  $\mu$ m, sendo hélio 5.0 o gás de arraste. As demais condições cromatográficas empregadas foram escolhidas com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Leite, 2008; Taverna, 2011; Ferreira et al., 2012) e podem ser visualizadas na Tabela 5.

	Temperatura do injector	270 °C	
	Modo de injeção	Splitless (4 min)	
	Volume de injeção	1 μL	
	Vazão do gás de arraste	1,2 mL min <sup>-1</sup>	
Cromatógrafo a gás	Programa de aquecimento da coluna	T = 40 ° C por 2 min; 50 ° C min <sup>-1</sup> até 80 ° C; 10 ° C min <sup>-1</sup> até 240 ° C; 240 ° C por 2 min; 4 ° C min <sup>-1</sup> até 260 ° C; 260 ° C por 5 min; 20 ° C min <sup>-1</sup> até 300 ° C; 300 ° C por 7 min	
	Tempo de corrida	39,8 min	
	Temperatura da linha de Transferência	280 °C	
Espectrômetro de massas	Temperatura da fonte de Ionização	230 °C	
	Energia de ionização	70 eV	
	Analisador de massas	Triplo quadrupolo	
	Modo de aquisição	SCAN, SIM	
	Faixa de aquisição	m/z 45 a 500	

TABELA 5 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE HPA POR GC-MS.

Para avaliar a separação e identificação dos compostos com base nas condições cromatográficas utilizadas, inicialmente o espectrômetro de massas foi

operado no modo de varredura completa (SCAN), com uma faixa de aquisição dos íons variando de m/z 45 a 500. O modo de Monitoramento Seletivo de Íons (*Select ion Monitoring,* SIM) também foi utilizado a fim de analisar apenas os íons característicos de cada um dos HPA, tornando a exatidão do MS ainda maior.

#### 3.7 PREPARO DA MSPD

As condições iniciais de extração foram adaptadas de estudos feitos por Pensado et al. (2005) e Concha-Granã et al. (2015), ambos para a determinação de HPA em material biológico, empregando a MSPD. Inicialmente, 0,5 g de tecido muscular de peixe foi fortificada com 500,0  $\mu$ L da solução intermediária de padrões de HPA (1000  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e 30,0  $\mu$ L da solução intermediária de padrão sub-rogado pterfenil-d14 (5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup>). Esses volumes foram escolhidos para essa etapa pois correspondem a uma concentração dentro da faixa linear do método instrumental de determinação desta classe de compostos, favorecendo o desenvolvimento inicial do processo de otimização da técnica. A amostra fortificada foi mantida em capela por, aproximadamente, 30 min para evaporação do solvente e interação dos analitos com a matriz. Posteriormente, 0,5 g de MMT-HDMIM-Br e 0,5 g de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foram adicionados e homogeneizados em almofariz e pistilo de porcelana por 3 min.

### 3.8 EXTRAÇÃO POR VA-MSPD

O sólido obtido na etapa anterior foi transferido para um tubo de vidro de fundo cônico de 15 mL e 10,0 mL do solvente extrator foram adicionados, seguido de extração assistida por vórtex (Vortex 1, IKA®) por 1 min e centrifugação a 5000 rpm por 5 min. O extrato obtido foi concentrado até a secura em concentrador rotativo à vácuo (RVC 2- 18CD, Christ) a 60 °C e 80 rpm e, posteriormente, redissolvido a 980 mL em n-hexano. Uma alíquota de 20 µL da solução de padrões internos de HPA (5120 µg L<sup>-1</sup>) foi adicionada para análise cromatográfica por GC-MS.

#### 3.9 EXTRAÇÃO POR VA-MSPD COM ETAPA DE CLEAN-UP

Para realizar a etapa de *clean up* na extração por VA-MSPD, o procedimento adotado foi adaptado de estudos feitos por Rodrigues (2010), que avaliou a influência da etapa de *clean up* na extração de agrotóxicos de cebola pelo método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*). Essa etapa consistiu em coletar o sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação do sólido proveniente da MSPD com o solvente extrator (10 mL de ACN) e adicioná-lo em um tubo de fundo cônico contendo 1,5 g de Florisil®. Posteriormente, foi feita agitação por vórtex por 1 min, seguida de centrifugação a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à vácuo a 60 °C e 80 rpm e, posteriormente, redissolvido a 980 mL em n-hexano. Uma alíquota de 20 µL da solução de padrões internos de HPA (5120 µg L<sup>-1</sup>) foi adicionada para análise cromatográfica por GC-MS.

# 3.10 ETAPA DE *CLEAN UP* EM COLUNA DE VIDRO UTILIZANDO SÍLICA E ALUMINA COMO FASE ESTACIONÁRIA

A etapa de *clean up* foi feita em coluna de vidro (7 mm d.i. x 30 cm) previamente descontaminada com acetona grau HPLC. Um chumaço de lã de vidro calcinada foi introduzido no fundo da coluna a fim de reter a fase sólida. Em seguida, foram adicionados 2 g de sílica ativada em estufa (160 °C por 4 h), 1 g de alumina neutra calcinada (400 °C por 4 h) e ativada em estufa (160 °C por 4 h) e 0,5 g de agente secante, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O empacotamento da coluna foi feito com adição de n-hexano sob vazão contínua de N<sub>2</sub>. Esta etapa foi baseada em estudos feitos por Taverna (2011) para a determinação de HPA, entre outros contaminantes, em amostras de sedimento.

Após a coluna ser empacotada o sólido proveniente da etapa descrita no item 3.7 foi adicionado ao topo da coluna e eluído com 10 mL do solvente apropriado, conforme esquema apresentado na Figura 6. O extrato obtido foi concentrado até a secura em concentrador rotativo à vácuo e redissolvido em n-hexano. Uma alíquota de 20 µL da solução de padrões internos de HPA (5120 µg L<sup>-</sup>) foi adicionada para análise cromatográfica por GC-MS.

#### FIGURA 6 – ESQUEMA DA COLUNA UTILIZADA NA ETAPA DE *CLEAN UP*, EMPACOTADA COM SÍLICA E ALUMINA.



# 3.11 AVALIAÇÃO DO USO DA MMT NÃO MODIFICADA COMO SUPORTE SÓLIDO

Uma massa de 0,3 g de tecido muscular de peixe foi fortificada com 100,0  $\mu$ L da solução intermediária de padrões de HPA (1000  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e 10,0  $\mu$ L da solução intermediária de padrão sub-rogado p-terfenil-d14 (5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup>). A amostra fortificada foi mantida em capela por aproximadamente 30 min para evaporação do solvente e interação dos analitos com a matriz. Posteriormente, 0,3 g de MMT não modificada foram adicionadas e homogeneizadas em almofariz e pistilo por 3 min. O sólido proveniente foi adicionado ao topo de uma coluna de vidro preparada conforme descrito no item 3.10 e eluído com 10 mL de acetonitrila. O extrato obtido foi concentrado até a secura, redissolvido a 200  $\mu$ L em n-hexano, juntamente com uma alíquota de 20  $\mu$ L da solução de padrões internos de HPA (5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) para análise cromatográfica por GC-MS.

## 3.12 ESTIMATIVA DA EXATIDÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Uma massa de 0,3 g de tecido muscular de peixe foi fortificada com 62,5 µL da solução intermediária de padrões de HPA (1000 µg L<sup>-1</sup>) e 12,0 µL da solução intermediária de padrão sub-rogado p-terfenil-d14 (5120 µg L<sup>-1</sup>). Esses volumes foram utilizados pois satisfazem a concentração intermediária da faixa linear do método, um dos pontos necessários para avaliar a exatidão da metodologia proposta. A amostra fortificada foi mantida em capela por, aproximadamente, 30 min para evaporação do solvente e interação dos analitos com a matriz. Posteriormente, 0,3 g de MMT-HDMIM-Br foram adicionados e homogeneizados em almofariz e pistilo por 3 min. O sólido proveniente foi adicionado ao topo de uma coluna de vidro preparada conforme descrito no item 3.10 e eluído com 10 mL de acetonitrila. O extrato foi tratado como descrito no item anterior, e uma alíquota de 20 µL da solução de padrões internos de HPA (5120 µg L<sup>-1</sup>) foi adicionada para análise cromatográfica por GC-MS.

#### 3.13 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Uma massa de 0,3 g de tecido muscular de peixe foi homogeneizada em almofariz e pistilo com 0,3 g de MMT-HDMIM-Br por 3 min. O sólido proveniente foi adicionado ao topo de uma coluna de vidro preparada conforme descrito no item 3.10 e eluído com 10 mL de acetonitrila. O extrato obtido foi concentrado até a secura em concentrador rotativo à vácuo a 60 ° C e 80 rpm e, posteriormente, redissolvido a 200  $\mu$ L em n-hexano, juntamente com uma alíquota de 20  $\mu$ L da solução de padrões internos de HPA (5120  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) para análise cromatográfica por GC-MS.

# 3.14 DETERMINAÇÃO DOS HPA PRESENTES NA ÁGUA UTILIZADA NO EXPERIMENTO ENVOLVENDO AMOSTRAS REAIS

Para extração dos HPA presentes na água utilizada no experimento descrito no item 3.4, utilizou-se a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (*Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction,* VA-DLLME) (Araki et

al.,2018). Esse protocolo foi desenvolvido com base na adaptação dos trabalhos de Rezaee et al. (2007) e Zhang et al., (2012). Em tubos de vidro de fundo cônico (15 mL) foi adicionada uma alíquota de 5,00 mL da solução padrão de HPA prioritários (1000  $\mu$ g L<sup>-1</sup>). Nesta solução, 1,00 mL de solução contendo clorofórmio (75  $\mu$ L) solubilizado em acetona (925  $\mu$ L) foi rapidamente adicionado com o auxílio de uma micropipeta. A injeção rápida propiciou a formação de microgotas de clorofórmio no meio, devido a sua imiscibilidade com a fase aquosa. A efetividade da transferência de massa entre as fases foi favorecida com agitação por vórtex durante 1 min. Em seguida, por centrifugação durante 10 min, ocorreu a formação de uma fase sedimentada (gota), a qual foi removida quantitativamente (50  $\mu$ L) e finalmente transferida para um insert cromatográfico contendo 10  $\mu$ L solução de padrões internos de HPA, fornecendo uma concentração de 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Por fim, essas soluções foram injetadas no GC-MS para obtenção dos sinais analíticos e elaboração das curvas analíticas.

#### 3.14.1 Construção das curvas analíticas

As curvas analíticas para determinação dos HPA foram realizadas em triplicatas e preparadas utilizando o procedimento VA-DLLME, conforme descrito no item anterior. Para tanto, foi utilizado o método de calibração externa com uso de padrões internos, com 16 HPA e um padrão sub-rogado, todos em 5 níveis de concentração: 0,10; 0,25; 0,50. 0,75 e 1,00 µg L<sup>-1</sup>, contendo os 5 padrões internos na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup>.

### 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Uma solução contendo 16 padrões de HPA, o padrão sub-rogado e os cinco padrões internos, todos na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, foi injetada no GC-MS no modo SCAN a fim de se obter os tempos de retenção ( $t_R$ ) e íons de quantificação (IQ) e de confirmação (IC) de cada um dos compostos, que foram identificados com o auxílio da Biblioteca do Espectro de Massas da NIST (*National Institute of Standards and Technology – USA*), e estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 – TEMPOS DE RETENÇÃO ( $t_R$ ), ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (IQ) E DE CONFIRMAÇÃO (IC) DE CADA UM DOS 16 HPA, 5 PADRÕES INTERNOS E PADRÃO SUB-ROGADO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Composto	t <sub>R</sub> (min)	IQ (m/z)	IC (m/z)
Naf-d8	8,121	136	137
Naf	8,162	128	127
Aci	11,619	152	151
Ace-d10	11,959	162	164
Ace	12,032	153	152
Flu	13,250	166	165
Fen-d10	15,459	188	184
Fen	15,513	178	176
Ant	15,635	178	176
Fla	18,356	202	203
Pir	18,876	202	201
p-terf-d14	19,442	244	243
B <i>a</i> A	22,885	228	226
Cris-d12	22,913	236	240
Cris	23,013	228	226
B <i>b</i> F	27,561	252	253
B <i>k</i> F	27,710	252	253
BaP	29,275	252	253
Per-d12	29,630	260	264
IP	33,989	276	277
D <i>ah</i> A	34,157	278	279
BahiP	34 780	276	274

Para a implementação do modo SIM foi feita a análise de cada um dos compostos no cromatograma obtido, selecionando seus íons característicos. Após a criação do modo SIM, a solução contendo os compostos citados na Tabela 6, na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, foi injetada novamente no GC-MS no modo criado para avaliar se todos os padrões foram devidamente identificados. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 7 e os picos correspondentes a cada um dos

compostos presentes na solução estão apresentados com mais detalhes no Apêndice 1.

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS, NO MODO SIM, DOS PADRÕES DE HPA,



LEGENDA: Naf-d8, naftaleno-d8; Naf, naftaleno; Aci, acenaftileno; Ace-d10, acenafteno-d10; Ace, acenafteno; Flu, fluoreno; Fla, fluoranteno; Fen-d10, fenantreno-d10; Fen, fenantreno; Ant, antraceno; Fla, fluranteno; Pir, pireno; p-terf-d14, pterfenil-d14; BaA; benzo[a]antraceno; Cris-d12, criseno-d12; Cris, criseno; B*b*F, benzo[b]fluoranteno; B*k*F, benzo[k]fluoranteno; B*a*P; benzo[a]pireno; Perf-d12; perileno-d12; IP, indeno[1,2,3-cd]pireno; B*ghi*P, benzo[ghi]perileno.

# 4.2 CURVA ANALÍTICA INSTRUMENTAL

Soluções de concentrações iguais a 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 250,0; 500,0; 750,0 e 1.000 µg L<sup>-1</sup> de padrões de HPA foram preparadas em n-hexano, inicialmente, a fim de avaliar a linearidade das respostas instrumentais para os compostos em estudo, por meio da construção da curva analítica pelo método de padronização interna. Nesse método, a razão entre a concentração do analito e do padrão interno é plotada contra a razão das suas respectivas áreas de pico. Uma solução contendo cinco padrões internos de HPA deuterados, apresentados anteriormente na Tabela 5, na concentração fixa de 102,4 µg L<sup>-1</sup> foi utilizada para este fim.

Uma curva analítica para o padrão sub-rogado p-terfenil-d14 também foi construída na faixa de concentração de 25,0 a 500,0 µg L<sup>-1</sup>, utilizando como padrão interno o criseno-d12 na concentração de 102,4 µg L<sup>-1</sup>.

Soluções para cada concentração estudada foram injetadas em triplicata no GC-MS e, com o auxílio do software GCMS Solution do equipamento e do programa

Excel, foram obtidas as curvas analíticas para cada um dos 16 compostos em estudo. Com isso, a linearidade da curva analítica pôde ser verificada por meio dos dados de regressão linear e coeficiente de correlação (r). Observou-se, por exemplo, que para concentrações acima de 500,0 µg L<sup>-1</sup> ocorria uma perda de linearidade. Sendo assim, a concentração máxima utilizada na construção das curvas analíticas passou a ser 500,0 µg L<sup>-1</sup>.

A faixa linear demonstra a faixa em que a resposta obtida pelo instrumento de análise é proporcional à concentração ou massa do composto de interesse, enquanto o coeficiente de correlação demonstra se as repostas apresentadas na faixa linear são significativas. Quanto mais próximo de 1 for o valor do coeficiente de correlação, menor será a dispersão do conjunto de níveis experimentais que envolvem a curva analítica e, com isso, menor será a incerteza dos coeficientes estimados (ANVISA, 2017). Os coeficientes de correlação obtidos (Tabela 7) estão acima de 0,990, valor este recomendando pela ANVISA (2017), mostrando que o modelo de regressão linear proposto é adequado para a determinação quantitativa dos compostos em estudo.

Composto	R
Naf	0,9982
Aci	0,9987
Ace	0,9987
Flu	0,9987
Fen	0,9989
Ant	0,9990
Fla	0,9989
Pir	0,9978
B <i>a</i> A	0,9986
Cris	0,9985
B <i>b</i> F	0,9985
B <i>k</i> F	0,9983
BaP	0,9985
IP	0,9984
D <i>ah</i> A	0,9982
B <i>ghi</i> P	0,9982
p-terf-d14	0,9970

TABELA 7 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) PARA CADA UM DOS 16 HPA E DO PADRÃO SUB-ROGADO.

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram calculados como 3,3 vezes e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de 3 curvas analíticas construídas, dividido pela inclinação

média dessas curvas (ANVISA, 2017). Os valores de LOD e LOQ instrumentais estimados para cada um dos 16 HPA prioritários estão apresentados na Tabela 8 e variam de 1,00 a 7,76  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e de 3,03 a 23,50  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente e, para o padrão sub-rogado foi 13,76 e 41,68  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ziarrusta e colaboradores (2015) fizeram o uso da MSPD para determinar, entre outros poluentes orgânicos, 15 HPA em moluscos por GC-MS e obtiveram LOQ instrumentais na faixa de 1,3 a 13  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Portanto, os valores apresentados indicam, para a classe de compostos em estudo, a boa detectabilidade do método.

Composto	LOD	LOQ
Naf	2,11	6,39
Aci	1,54	4,67
Ace	1,17	3,55
Flu	1,00	3,03
Fen	4,20	12,74
Ant	7,76	23,50
Fla	2,95	8,94
Pir	3,37	10,21
B <i>a</i> A	3,14	9,50
Cris	2,00	6,07
B <i>b</i> F	3,72	11,28
B <i>k</i> F	6,78	20,55
BaP	3,24	9,83
IP	5,30	16,05
D <i>ah</i> A	1,81	5,49
B <i>ghi</i> P	4,75	14,40
p-terf-d14	13,76	41,68

TABELA 8 – LOD E LOQ INSTRUMENTAIS PARA CADA UM DOS 16 HPA E DO PADRÃO SUBROGADO, EM  $\mu g \ L^{-1}.$ 

# 4.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO MSPD

#### 4.3.1 Extração de HPA por VA-MSPD

O aspecto do sólido obtido na etapa de MSPD está apresentado na Figura 8A e a extração foi realizada conforme descrito no item 3.8. Três solventes foram avaliados na eficiência de extração de HPA: acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), hexano (HX) e uma mistura de diclorometano:hexano (DCM:HX), na proporção 6:4, todos em um volume inicial de 10 mL. Os solventes foram escolhidos com base em estudos publicados na literatura, os quais empregam a MSPD para extração de HPA de matrizes como tecido animal e vegetal (Pensado et al., 2005; Concha-Graña et al., 2015; Sampaio, 2016; Vilela Júnior, 2017).

Os extratos obtidos após a etapa de secagem do solvente no evaporador rotativo à vácuo apresentaram resíduos com coloração levemente amarelada, que se intensificaram conforme a diminuição da polaridade do solvente utilizado, indicando a presença de compostos de baixa polaridade na matriz. A Figura 8B mostra o extrato obtido com HX e a Figura 8C mostra os extratos obtidos com DCM:HX (6:4) (imagem da esquerda) e DCM (imagem da direita). O extrato mais limpo foi obtido com o uso de ACN, indicando que esse solvente diminui a coextração de espécies presentes na matriz, como por exemplo os lipídios. Esse resultado é semelhante ao descrito por Pensado et al. (2005), Sampaio (2016) e Vilela Júnior (2017), que avaliaram a eficiência de solventes de diferentes polaridades na extração de HPA por MSPD em amostras de biota aquática.

FIGURA 8 – A) ASPECTO DO SÓLIDO (AMOSTRA+SUPORTE SÓLIDO+SECANTE) OBTIDO APÓS A ETAPA DE MSPD. B) EXTRATO OBTIDO APÓS A SECAGEM DE HX. C) EXTRATO OBTIDO APÓS A SECAGEM DE HX:DCM (6:4) NA ESQUERDA E APÓS A SECAGEM DE DCM NA DIREITA

A) B)



Porém, após redissolver o extrato de ACN em n-hexano, a solução obtida apresentou uma mistura heterogênea, com a formação de sólidos em suspensão de coloração branca. A solução foi filtrada com auxílio de filtro de seringa de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,45 µm de porosidade e o restante do procedimento ocorreu como descrito no item 3.8.

O extrato final (1 mL em n-hexano) foi injetado no GC-MS no modo Splitless e a varredura dos compostos foi feita no modo FULL SCAN. Porém, esse modo de varredura apresentou picos com elevada intensidade de sinal, causando saturação no detector (Figura 9). Ao consultar a Biblioteca do Espectro de Massas da NIST, confirmou-se que os picos são referentes a alcanos de cadeia longa, possivelmente proveniente do sal HDMIM-Br, e lipídios.





Devido a esses fatores, viu-se a necessidade de realizar a etapa de *clean up* para remoção dos interferentes e preservação da coluna cromatográfica.

#### 4.3.2 Extração de HPA por VA-MSPD com etapa de clean up

A solução obtida após redissolução do extrato em 1 mL de n-hexano era translúcida e não havia sólidos em suspensão, o que indica que os sólidos observados na etapa sem *clean up* podem ser de interferentes de alta polaridade, que foram adsorvidos pelo Florisil ® nessa etapa de limpeza. O extrato final (1 mL) foi então injetado no GC-MS no modo SCAN.

Florisil® (Mg-Al(SiO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>) possui alta polaridade e é um dos sorventes mais utilizados em aplicações ambientais devido à sua alta eficiência na remoção de impurezas hidrofílicas, graças à sua capacidade de adsorção (Hoff & Pizzolato, 2018; Caldas et al., 2013). Villaverde-de-Sáa e colaboradores (2013) avaliaram a eficiência de diferentes sorventes na etapa de limpeza para a extração de retardantes de chama halogenados em moluscos por MSPD e concluíram que os extratos mais limpos foram obtidos com o uso de Florisil®. Para isto, foram utilizados 0,5 g de amostra e 0,5 g de sorvente PSA (amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*) na etapa de MSPD e 2,0 de Florisil® como sorvente

auxiliar na etapa de limpeza, promovendo boas recuperações para os analitos nessas condições.

O cromatograma obtido para a extração assistida por vórtex com etapa de *clean up* está apresentado na Figura 10. O mesmo (representado em preto) foi sobreposto ao cromatograma obtido na etapa de extração assistida por vórtex sem a etapa de *clean up* (representado em rosa).

FIGURA 10 – ROSA: CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS NO MODO FULL SCAN, APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRA DE PEIXE FORTIFICADA COM PADRÕES DE HPA (1 µg g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,31 µg g<sup>-1</sup>), UTILIZANDO 10 mL DE ACN COMO SOLVENTE EXTRATOR E SEM REALIZAR A ETAPA DE *CLEAN UP*. PRETO: MESMAS CONDIÇÕES, PORÉM, COM ETAPA DE *CLEAN UP*, UTILIZANDO FLORISIL COMO SORVENTE.



Como não houve melhoras ao utilizar esse procedimento de limpeza, tendo em vista que os picos interferentes que aparecem em, aproximadamente, 33 e 35 min, não foram eliminados nem quando se utilizou o modo de varredura SIM e coeluíram com os HPA de maior massa molar, interferindo na análise quantitativa dos mesmos. Como mencionado anteriormente, de acordo com a Biblioteca do Espectro de Massas da NIST, os picos podem ser referentes a lipídios, então, optouse por estudar outro procedimento de *clean up*, utilizando sorventes auxiliares menos polares em relação ao Florisil®.

# 4.3.3 Extração de HPA com etapa de *clean up* em coluna de vidro, utilizando sílica e alumina como fases estacionárias

No trabalho apresentado por Taverna (2011), realizado no GQA, a etapa de *clean up*, utilizando sílica e alumina como sorventes auxiliares, foi otimizada para melhor remoção de interferentes e extração de HPA na matriz estudada. A sílica (- Si-OH) e a alumina neutra (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>n</sub> são fases estacionárias de caráter polar amplamente utilizadas na etapa de limpeza para a remoção de interferentes de caráter lipofílico de amostras de tecido biológico (Collins, 2006; Caldas et al., 2013). O aparato montado para extração de HPA de tecido de peixe com etapa de *clean up* em coluna de vidro, como previamente descrito no item 3.10, está apresentado na Figura 11 e o cromatograma obtido após o procedimento de extração e *clean up* está apresentado na Figura 12.

FIGURA 11 – COLUNA UTILIZADA NA ETAPA DE CLEAN UP, EMPACOTADA COM 2, 0 g DE SÍLICA, 1,0 g DE ALUMINA, E CONTENDO O SÓLIDO HOMOGÊNEO PROVENIENTE DA ETAPA DE MSPD.



FIGURA 12 – CROMATOGRAMA OBTIDO VIA GC-MS NO MODO FULL SCAN, APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRA DE PEIXE FORTIFICADA COM PADRÕES DE HPA (1  $\mu$ g g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,31  $\mu$ g g<sup>-1</sup>), E CLEAN UP EM COLUNA DE VIDRO, CONTENDO SÍLICA E ALUMINA COMO SORVENTES AUXILIARES, E UTILIZANDO 10 mL DE ACN COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO.



Essa etapa de *clean up* se mostrou eficiente na remoção dos interferentes que apareciam em, aproximadamente, 33 min de corrida, o que indica a eficiência da sílica e alumina na remoção dos interferentes. Conforme consulta na Biblioteca do Espectro de Massas da NIST, o pico em aproximadamente 17,5 min pode ser referente a alcanos de cadeia longa, possivelmente do sal HDMIM-Br. Apesar da alta intensidade de sinal, o pico é eliminado ao utilizar o modo de varredura SIM, assim como não coelui com nenhum analito e não causa saturação no detector. O possível sal também é completamente eliminado ao passar o branco de gás e/ou solvente, não comprometendo a vida útil da coluna cromatográfica. Devido a esses fatores, optou-se por utilizar a etapa de *clean up* nessas condições apresentadas para os próximos experimentos.

#### 4.3.4 Avaliação de parâmetros do método

Todos os procedimentos de extração relatados a seguir foram realizados em triplicata e injetados no sistema cromatográfico no modo de varredura SIM.

#### Escolha do solvente de eluição

Os solventes estudados na extração de HPA de tecido de peixe com etapa de *clean up* em coluna de vidro foram os mesmos descritos no item 4.3.1. A média dos percentuais de recuperação obtidos para cada um dos solventes estão mostrados na Figura 13. A recuperação média do padrão sub-rogado (p-terf-d14) foi igual a 111  $\pm$  4% ao utilizar ACN, 109  $\pm$  3% ao utilizar DCM e 112  $\pm$  3% ao utilizar DCM:HX, o que comprova a eficiência de extração da metodologia inicialmente proposta. Já para 16 HPA, a recuperação média variou de 7 a 128% ao utilizar ACN, 10 a 134% ao utilizar DCM e 8 a 135% ao utilizar DCM:HX. Os baixos percentuais de recuperação obtidos para os HPA de menor massa molar - Naf, Aci, Ace e Flu, podem estar relacionados com a perda por volatilização na etapa de secagem do solvente, devido às suas maiores pressões de vapor quando comparados aos demais. Esses resultados também corroboram com estudos feitos por Sampaio (2016), que obteve recuperações abaixo de 80% para Naf, Aci e Ace na extração de HPA por MSPD, utilizando C<sub>18</sub> como suporte sólido e ACN como solvente de eluição.

Ferreira et al. (2012) constataram que, quando há a secagem completa do solvente, a recuperação dos HPA pode variar de 2 a 82%, sendo as baixas recuperações associadas aos compostos de menor massa molar. Quando o solvente foi seco para, aproximadamente 1,0 mL, havia um aumento nas porcentagens de recuperação desses compostos de 50 a 97%, porém, essa abordagem reduziu o rendimento analítico, além de induzir a erros devido à dificuldade em alcançar o volume aproximado em 1,0 mL antes da etapa de quantificação.

FIGURA 13 – RECUPERAÇÃO MÉDIA DOS COMPOSTOS APÓS FORTIFICAÇÃO COM PADRÕES DE HPA (1  $\mu$ g g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,31  $\mu$ g g<sup>-1</sup>) UTILIZANDO 0,5 g DE MASSA DE AMOSTRA, 0,5 g DE MASSA DE SUPORTE SÓLIDO E 10,0 mL DE SOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES.



Ao utilizar ACN, a recuperação da maioria dos compostos se encontra na faixa de 80 a 120%, além de ser o solvente que apresentou menores valores de desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*, RSD) (desvios < 6%). Além de ser um solvente não-tóxico, o uso de ACN reduz a coextração de lipídios presentes na matriz (Caldas et al., 2013) e os resultados corroboram com estudos já realizados por Vilela Júnior (2017), Sampaio (2016), Pensado et al. (2005), que realizaram a extração de HPA por MSPD em biota aquática, utilizando ACN como solvente extrator. Devido a esses fatores, ACN foi escolhido como solvente de eluição nas etapas seguintes.

#### Avaliação da massa de amostra

No que se refere à extração por MSPD em amostras biológicas, são empregadas massas de amostra que variam de 0,2 a 3,0 g. Portanto, com o intuito de avaliar a eficiência de extração de HPA ao utilizar uma massa de amostra menor, 0,3 g de tecido muscular de peixe foi utilizado nessa etapa. Os dados obtidos de recuperação média dos compostos em estudo estão apresentados na Figura 14.





A recuperação média dos compostos variou de 9 a 115%, com RSD menores que 9%, indicando que uma menor massa de amostra não afeta significativamente a eficiência de extração. Esse resultado está de acordo com estudos feitos por Ziarrusta e colaboradores (2015), que utilizaram 0,3 g de amostra de molusco e 0,3 g de suporte sólido para a extração de HPA prioritários (exceto o naftaleno), entre outros compostos, por MSPD, e posterior determinação por GC-MS, obtendo recuperações que variaram de 69 a 117%.

Quando se trata de amostras complexas como tecido biológico, a massa de amostra utilizada em MSPD mais comumente relatada na literatura é igual a 0,5 g (Pensado et al, 2005; Villaverde-de-Sáa et al., 2013; Sampaio, 2016; Vilela Júnior, 2017). Tendo em vista que, ao utilizar 0,3 g de tecido de peixe, a recuperação média da maioria dos HPA ficou entre 70 a 120%, essa foi a massa de amostra escolhida para a realização das etapas seguintes.

#### Avaliação da massa de sorvente

Segundo Capriotti et al. (2015), a proporção entre a massa de amostra e do sorvente utilizado varia de 1:1 a 1:4. Essa variação ocorre devido à combinação de diferentes fatores como o tipo de sorvente empregado, da amostra em estudo, do solvente extrator utilizado e das características dos analitos a serem quantificados. Conforme mencionado por Dórea (2015), o ideal é que o sólido obtido após a etapa de homogeneização esteja com aspecto pulverulento, para que haja maior penetração do eluente na amostra. Portanto, avaliou-se a eficiência de extração ao utilizar a proporção 1:1 e 1:2 de massa de amostra e massa de sorvente. Para isto, 0,3 g de tecido muscular de peixe foi fortificado como já mencionando anteriormente e à esta amostra foram adicionados 0,3 g de MMT-HDMIM-Br e 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (proporção 1:1) e 0,6 g de MMT-HDMIM-Br e 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (proporção 1:2). O processo de extração de ambas as amostras ocorreu como já descrito no item 3.8 e etapas anteriores. O extrato final (1 mL em n-hexano) de ambas foi injetado no sistema cromatográfico e os dados obtidos de recuperação média dos compostos em estudo estão apresentados na Figura 15.

FIGURA 15 – RECUPERAÇÃO MÉDIA DOS COMPOSTOS APÓS FORTIFICAÇÃO COM PADRÕES DE HPA (1 μg g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,31 μg g<sup>-1</sup>) UTILIZANDO A PROPORÇÃO 1:1 E 1:2 DE MASSA DE AMOSTRA:MASSA DE SORVENTE, E 10,0 mL DE ACN COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO.



A recuperação média dos compostos utilizando a proporção 1:1 variou de 11 a 111%, com valores de RSD menores que 6%, enquanto a recuperação média dos compostos utilizando a proporção 1:2 variou de 16 a 136%, com valores de RSD que chegaram a 17%.

A maior recuperação para os compostos utilizando a proporção 1:2 de massa de amostra e massa de sorvente pode ser explicada devido ao fato de uma maior massa de sorvente promover um aumento nos sítios de sorção disponíveis e, consequentemente, um aumento na extração de interferentes presentes na matriz. Observa-se que alguns compostos apresentaram recuperações acima de 120% ao utilizar essa proporção, indicando um efeito de matriz, o que altera a eficiência da ionização dos analitos, enriquecendo, nesse caso, o sinal dos mesmos (Rodrigues, 2010; Vilela Júnior, 2017). Portanto, a proporção 1:1 de massa de amostra e massa de sorvente foi a escolhida como condição de compromisso para a extração de HPA em tecido de peixe.

Outros estudos encontrados na literatura, porém poucos, utilizaram a mesma proporção, como Ziarrusta e colaboradores (2015), citado no item anterior, que utilizaram 0,3 g de massa de amostra e 0,3 g de massa de Florisil® como sorvente, além de 4,0 g de sílica ativada e 25,0 mL de DCM como solvente de eluição para extração de poluentes orgânicos de amostras de moluscos.

Diante disso, as condições de compromisso para a extração de HPA de tecido muscular de peixe por MSPD foram 0,3 g de amostra, 0,3 g de suporte sólido, 0,3 g de agente secante e 10 mL de ACN como solvente extrator, que foram utilizados para as etapas seguintes.

Com base no estabelecimento das condições de compromisso, o LOQ do método (LOQ<sub>M</sub>) para cada um dos 16 HPA prioritários pode ser estimado e está apresentado na Tabela 9.

Composto	LOQM
Naf	2,54
Aci	1,85
Ace	1,41
Flu	1,20
Fen	5,06
Ant	9,33
Fla	3,55
Pir	4,05
BaA	3,77
Cris	2,41
B <i>b</i> F	4,48
B <i>k</i> F	8,15
BaP	3,90
IP	6,37
D <i>ah</i> A	2,18
B <i>ghi</i> P	5,71
p-terf-d14	1,13

TABELA 9 – LOQ<sub>M</sub> PARA CADA UM DOS 16 HPA E DO PADRÃO SUB-ROGADO, EM ng g<sup>-1</sup>.

Os valores de LOQ<sub>M</sub> para os HPA variam de 1,20 a 9,33 ng g<sup>-1</sup> e para o padrão sub-rogado é igual a 1,13 ng g<sup>-1</sup>. Ziarrusta e colaboradores (2015) fizeram o uso da MSPD para determinar, entre outros poluentes orgânicos, 15 HPA em moluscos por GC-MS e obtiveram LOQ<sub>M</sub> na faixa de 3,1 a 44 ng g<sup>-1</sup>. Sampaio (2016) utilizou a MSPD para determinar 16 HPA em caranguejo por GC-MS e obteve LOQ<sub>M</sub> na faixa de 0,6 a 9,8 ng g<sup>-1</sup>. Portanto, ao comparar os LOQ<sub>M</sub> obtidos com dados da literatura, pode-se afirmar que o método proposto possui uma boa detectabilidade para a classe de compostos em estudo.

4.4 AVALIAÇÃO DO USO DA MONTMORILONITA NÃO MODIFICADA COMO SUPORTE SÓLIDO Uma das finalidades do suporte sólido é promover a ruptura da estrutura física da amostra, formando um sólido pulverulento e homogêneo. A MMT, quando utilizada sem a modificação na etapa de maceração do suporte sólido com o tecido muscular de peixe úmido, formou um sólido de superfície lisa, que ficou impregnado nas paredes do almofariz (Figura 16A). Isso pode ser explicado devido ao fato da MMT não modificada ter grande capacidade de absorção de água e propriedades plásticas. A água funciona como um lubrificante e, ao entrar em contato com as folhas presentes na estrutura da MMT in natura, faz com que estas deslizem umas sobre as outras, o que torna sua superfície extremamente lisa (BRASIL. Serviço Geológico do, 2014). Isso dificulta a transferência de todo o sólido do almofariz para a coluna de vidro, o que resulta em perdas da amostra na etapa de maceração e torna a MMT não modificada inviável de ser utilizada como suporte sólido na presença de uma amostra contendo água.

FIGURA 16 – A) ASPECTO DO SÓLIDO PROVENIENTE DA MACERAÇÃO DE 0,3 g DE MÚSCULO DE PEIXE COM 0,3 g DE MMT IN NATURA. B) SÓLIDO PROVENIENTE DA MSPD DISPOSTO NA COLUNA DE VIDRO.





Mesmo assim, o sólido foi adicionado ao topo da coluna de *clean up* (Figura 16B) como descrito no item 3.11 e o extrato final foi injetado no sistema cromatográfico a fim de avaliar a capacidade sortiva da MMT sem modificação frente a compostos orgânicos. A Figura 17 mostra as recuperações dos 16 HPA, que

variaram de 0 a 64% e do padrão sub-rogado que foi igual a 57%. A figura também mostra as recuperações dos HPA quando se utiliza a MMT-HDMIM-Br como suporte sólido nas mesmas condições experimentais, que variam na faixa de 11 a 111% e do padrão sub-rogado, que foi igual a 103%.

Os resultados mostrados na Figura 17 evidenciam que a MMT sem modificação não se constitui em um suporte sólido adequado para a extração de HPA de tecido muscular de peixe por MSPD. Observa-se, também, que o argilomineral não é capaz de sorver satisfatoriamente os HPA presentes na amostra em estudo.

FIGURA 17 – RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS APÓS FORTIFICAÇÃO COM PADRÕES DE HPA (0,33 µg g<sup>-1</sup>) E PADRÃO SUB-ROGADO (0,10 µg g<sup>-1</sup>), UTILIZANDO 0,3 G DE MASSA DE AMOSTRA, 0,3 G DE MASSA DE SUPORTE SÓLIDO E 10 mL DE ACN COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO.



## 4.5 ESTIMATIVA DA PRECISÃO E EXATIDÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA

Para se ter uma estimativa da precisão, por meio da repetibilidade, e da exatidão do método proposto, foram realizadas três determinações que contemplam o nível intermediário da faixa linear, igual a 250 µg L<sup>-1</sup>, como descrito no item 3.12. Essas determinações foram feitas adicionando-se concentrações conhecidas da solução padrão de HPA prioritários na amostra e os resultados obtidos, em termos de recuperação dos compostos, estão apresentados na Figura 18, juntamente com o RSD referente a cada um deles.

A faixa de recuperação média obtida para os HPA prioritários foi de 24% a 92% e a do padrão sub-rogado p-terf-d14 foi de 72%, sendo esses valores considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos. Os HPA de menor massa molar como Naf, Aci e Ace apresentaram recuperações abaixo de 70% em função de perdas por volatilização, que ocorrem, possivelmente, ao longo das etapas de concentração e extração, o que ficou evidenciado pelos testes de recuperação apresentados para essas etapas. Os valores de RSD para os compostos em estudo variaram de 7,0% a 16%, sendo esses valores considerados satisfatórios, uma vez que, em análise de traços, valores de até 20% são aceitos (ANVISA, 2017).

FIGURA 18 – RECUPERAÇÃO MÉDIA (n=3) DOS COMPOSTOS APÓS ADIÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE HPA PRIORITÁRIOS E PADRÃO SUB-ROGADO (AMBOS A 0,21 µg g<sup>-1</sup>), UTILIZANDO 0,3 G DE MASSA DE AMOSTRA, 0,3 G DE MASSA DE SUPORTE SÓLIDO E 10 mL DE ACN COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO.



Conforme a ANVISA (2017), para efeitos de validação parcial da metodologia proposta, parâmetros de precisão, exatidão e seletividade devem ser avaliados. Portanto, destaca-se aqui, a necessidade de uma avaliação completa da precisão e exatidão, com ensaios de recuperação (n=3) da adição de concentrações conhecidas do padrão de HPA prioritários e do padrão sub-rogado na amostra, que contemplem outros dois níveis de concentração (um baixo e um alto) do método analítico.

A seletividade pode ser avaliada pelo efeito matriz através da comparação entre a resposta da curva analítica preparada no extrato branco da matriz em função da resposta da curva analítica preparada no solvente puro. Esse estudo é de fundamental importância para avaliar se a matriz contribui para a redução e/ou aumento da resposta obtida para cada analito em estudo (Wang et al., 2007).

#### 4.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA EM AMOSTRAS REAIS

Foram avaliadas 12 amostras de tecido de peixe: 4 amostras controle (CT), as quais não foram expostas às concentrações letais da FSA G, 4 amostras que foram expostas à concentração letal de FSA G para 10% da população (CL<sub>10</sub>) e 4 amostras que foram expostas à concentração letal de FSA G para 50% da população (CL<sub>50</sub>). As concentrações dos HPA, em ng g<sup>-1</sup>, encontradas em cada uma das amostras está apresentada na Tabela 10.

HPA	CT_A	CT_B	CT_C	CT_D	CL <sub>10</sub> _A	CL <sub>10</sub> _B	CL <sub>10</sub> _C	CL <sub>10</sub> _D	CL <sub>50</sub> _A	CL <sub>50</sub> _B	CL <sub>50</sub> _C	CL <sub>50</sub> _D
Naf	<0,77	<0,77	<0,77	<0,77	<2,54	<0,77	<0,77	<0,77	<0,77	<0,77	<0,77	<0,77
Aci	<1,85	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56
Ace	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43	<0,43
Flu	2,74	1,21	<1,20	<1,20	2,59	1,71	5,95	5,64	1,98	1,68	<1,20	<1,20
Fen	7,92	<5,06	<5,06	<5,06	7,10	5,08	15,15	13,08	<5,06	<5,06	<5,06	5,69
Ant	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83	<2,83
Fla	3,71	nd	<3,55	<3,55	<3,55	<3,55	<3,55	<3,55	3,59	<3,55	3,70	<3,55
Pir	<1,23	<1,23	<1,23	<1,23	<1,23	<1,23	<1,23	<1,23	<4,05	<1,23	<4,05	<1,23
BaA	40,73	<1,14	<1,14	10,72	<1,14	<1,14	18,87	34,72	7,11	<3,77	8,32	14,14
Cris	40,01	30,13	24,88	10,62	20,43	24,46	18,50	33,98	23,63	23,00	23,53	17,64
B <i>b</i> F	26,64	<4,48	<4,48	<4,48	<4,48	<4,48	<1,36	<4,48	15,09	6,94	16,03	4,62
B <i>k</i> F	<8,15	<8,15	<2,47	<8,15	<2,47	<2,47	<2,47	<2,47	10,52	<8,15	12,14	<8,15
BaP	<3,90	<3,90	<3,90	4,33	<3,90	<3,90	<1,18	<1,18	14,60	7,51	14,85	5,58
IP	nd	nd	<6,37	<6,37	nd	<6,37	<6,37	<6,37	nd	nd	nd	nd
DahA	5,47	3,38	nd	6,03	3,58	nd	8,13	8,47	15,27	7,55	17,88	6,30
B <i>ghi</i> P	16,89	<5,71	<5,71	<5,71	<5,71	<5,71	<1,73	<1,73	10,94	5,75	12,49	<5,71
∑HPA	144,11	34,72	24,88	31,70	33,70	31,25	63,44	95,89	102,73	52,43	108,94	53,97

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE CADA UM DOS HPA (ng g<sup>-1</sup>, MASSA ÚMIDA) ENCONTRADO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXE.

nd = não detectado

Nas amostras CT, apenas o Cris foi encontrado em praticamente todas as amostras, com concentrações que variaram de 24,88 a 40,01 ng g<sup>-1</sup> (massa úmida). Flu, Fen, Fla, B*a*A, B*b*F, B*k*f, D*ah*A e B*ghi*P também foram encontrados, porém, apenas em algumas amostras. Nas amostras CL<sub>10</sub>, Flu, Fen e Cris foram encontrados em todas as amostras com concentrações que variaram de 1,71 a 5,95 ng g<sup>-1</sup>, 5,08 a 15,15 ng g<sup>-1</sup> e 18,50 a 33,98 ng g<sup>-1</sup> (massa úmida), respectivamente. BaA DahA também foram encontrados, porém, não foram comuns a todas as amostras. Nas amostras  $CL_{50}$ , o Cris, BbF, BaP e DahA foram encontrados em todas as amostras com concentrações que variaram de 17,64 a 23,63 ng g<sup>-1</sup>, 4,62 a 16,03 ng g<sup>-1</sup>, 5,58 a 14,85 ng g<sup>-1</sup> e 6,30 a 17,88 ng g<sup>-1</sup> (massa úmida), respectivamente. Flu, Fen, Fla, BaA, B*k*F e B*ghi*P também foram encontrados, porém, não são comuns a todas as amostras.

Devido às suas propriedades lipofílicas, os HPA (principalmente os de maior massa molar) tendem a se acumular em tecidos com maior conteúdo lipídico, como vísceras, cérebro e fígado quando comparados com o músculo (Xu et al., 2011; Zhao et al., 2014). No entanto, o maior conteúdo lipídico de um determinado tecido não é um fator determinante da maior concentração de HPA encontrada no mesmo, como mostra um estudo feito por Xu e colaboradores (2011). No referido estudo, foram avaliados os níveis dos HPA prioritários acumulados nos tecidos hepáticos, cerebrais, branquiais e musculares de quatro espécies de peixes de água doce comestíveis (carpa cruciana, peixe cabeça de cobra, carpa capim e carpa prateada). O tecido que apresentou maior conteúdo lipídico para todas as espécies foi o cérebro, assim como nesse tecido foram encontradas as maiores concentrações do  $\Sigma$ HPA, exceto para a carpa cruciana, que apresentou a maior concentração do  $\Sigma$ HPA no tecido muscular.

As concentrações de HPA presente no tecido de peixe são influenciadas não só pelas propriedades físico-químicas de cada HPA, como o Kow por exemplo, mas também pelo conteúdo lipídico, metabolismo e nível trófico de cada espécie, além do grau de contaminação por HPA no ambiente aquático em questão (Xu et al., 2011; Yu et al., 2019). Como os peixes utilizados nesse experimento foram expostos aos ensaios de toxicidade exclusivamente para aplicação do método analítico desenvolvido, qualquer consideração de natureza ambiental seria meramente especulativa.

Conforme o NOAA, a maioria das amostras analisadas enquadram-se na categoria de minimamente contaminadas, por conter o  $\Sigma$ HPA entre 10 e 99 ng g<sup>-1</sup>. Cabe ressaltar que não há legislação brasileira específica que determine a concentração máxima permitida de HPA em amostras de peixe. Apenas o B*a*P é mencionado em alguns produtos específicos, direcionando os estudos

desenvolvidos nacionalmente a se adaptarem a regulamentações de outros países. Diante disto, pode-se afirmar que há a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de controle e gestão ambiental a nível nacional que estabeleçam os níveis máximos permitidos dos HPA prioritários, ou pelo menos dos considerados potencialmente carcinogênicos, em alimentos de origem aquática.

Como os HPA são lipofílicos, eles tendem a se acumular em tecidos com maior conteúdo lipídico, como músculo e fígado. Um estudo feito por Frapiccini e colaboradores (2018) mostrou que o maior teor lipídico do tipo de tecido não está diretamente relacionado com a maior acumulação de HPA no mesmo e que o conteúdo lipídico não pode ser o único fator determinante da bioacumulação de HPA no tecido.

# 4.7 AVALIAÇÃO DA ÁGUA UTILIZADA NO EXPERIMENTO ENVOLVENDO AMOSTRAS REAIS

Foram avaliadas 6 amostras de água: 2 amostras controle (CT), as quais não foram expostas às concentrações letais da FSA G, 2 amostras que foram expostas à concentração letal de FSA G para 10% da população (CL<sub>10</sub>) e 2 amostras que foram expostas à concentração letal de FSA G para 50% da população (CL<sub>50</sub>). As concentrações dos HPA, em ng g<sup>-1</sup>, encontradas em cada uma das amostras está apresentada na Tabela 11.

Composto	CT_A	CT_B	CL <sub>10</sub> _A	CL <sub>10</sub> _B	CL <sub>50</sub> _A	CL <sub>50</sub> _B
Naf	<0,10	nd	66,52	65,18	109,59	70,04
Aci	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ace	<0,03	<0,03	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Flu	<0,03	<0,03	<0,10	<0,10	0,11	<0,10
Fen	<0,03	<0,03	<0,10	<0,10	0,10	<0,10
Ant	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,10	<0,03
Fla	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Pir	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
BaA	<0,10	<0,10	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Cris	<0,10	<0,10	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
B <i>b</i> F	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
B <i>k</i> F	<0,10	<0,10	<0,10	0,10	<0,10	0,10
BaP	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	0,10	<0,10
IP	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,03	<0,03
DahA	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10

TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DE HPA (µg L-1) DETERMINADAS EM AMOSTRAS AQUOSAS CONTENDO FRAÇÕES SOLÚVEIS DA GASOLINA

BghiP <0,10 <0,10 <0,10 <0,03 <0,03 <0,03

nd: não detectado; <0,03 abaixo do limite de detecção e <0,10 abaixo do limite de quantificação.

Os resultados mostram que, para todas as amostras analisadas, as concentrações de quase todos os HPA estão abaixo do  $LOQ_M$ , exceto para o Aci, que não foi detectado em nenhuma amostra, e para o Naf, na qual as concentrações encontradas nas amostras  $CL_{10}$  A e  $CL_{10}$  B são, respectivamente 66,52 e 65,18 µg  $L^{-1}$  e nas amostras  $CL_{50}$  A e  $CL_{50}$  B são, respectivamente 109,59 e 70,04 µg  $L^{-1}$ .

A solubilidade em água de cada um dos HPA varia entre os altamente insolúveis, como o B*ghi*P, a pouco solúveis, como o Naf. Os HPA de menor massa molar tendem a se associar à matéria orgânica dissolvida ao entrar em contato com o meio aquático, enquanto os de maior massa molar (5 ou 6 anéis) se associam ao material orgânico particulado e, consequentemente, se depositam nos sedimentos (Behera et al., 2018). Portanto, era esperado que a concentração dos HPA encontrada nas amostras em estudo fosse baixa, exceto para o Naf, que possui solubilidade igual a 32 mg L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos publicados por Rodrigues e colaboradores (2010), que avaliaram os danos causados às larvas *Odontesthes argentinensis* quando expostas à diferentes frações solúveis em água de petróleo, diesel e gasolina. Nas águas contaminadas com 100 % da fração solúvel da gasolina não foi detectado nenhum HPA, exceto o Naf, que foi quantificado numa concentração igual a 403,04 µg L<sup>-1</sup>.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A realização dos experimentos descritos na presente pesquisa permitiu concluir que a MMT-HDMIM-Br mostrou ser um suporte sólido promissor na extração de HPA por MSPD, sendo capaz de romper a estrutura física do tecido de peixe e sorver os compostos em estudo, os quais puderam ser separados e quantificados por GC-MS.

A etapa de *clean up*, utilizando coluna de vidro contendo sílica e alumina neutra como fases estacionárias, mostrou-se necessária na remoção de espécies endógenas presentes na matriz, tendo em vista o alto teor lipídico presente na amostra estudada, favorecendo uma melhoria nos sinais analíticos dos compostos em estudo.

Os parâmetros como polaridade do solvente de eluição, massa de amostra e massa de suporte sólido foram otimizados e recuperações na faixa de 70 a 120 % foram obtidas para a maioria dos compostos ao utilizar 10 mL de ACN e uma proporção de 1:1 de massa amostra e massa de suporte sólido.

Os limites de quantificação do método variaram na faixa de 1,20 a 9,33 ng g<sup>-</sup> <sup>1</sup>, enquanto a precisão e exatidão intermediárias variaram de 70 a 92% para a maioria dos compostos, indicando boa sensibilidade e aplicabilidade satisfatória para os compostos em estudo.

O método proposto foi aplicado em amostras de peixe contaminadas com a fração solúvel da gasolina (CL<sub>10</sub> E CL<sub>50</sub>) em água, as quais apresentaram Criseno, HPA considerado possivelmente carcinogênico pela IARC, comum a todas as amostras.

# REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Diário oficial da União. Poder Executivo, 25 de julho de 2017.

Aftafa, C., Pelit, F. O., Yalçınkaya, E. E., Türkmen, H., Kapdan, I., Ertaş, F. (2014). Ionic liquid intercalated clay sorbents for micro solid phase extraction of steroid hormones from water samples with analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography* A, *1361*, 43-52.

Anderson, J. W., Neff, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., Hightower, G. M. (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology*, *27*(1), 75-88.

Anjos, V., Rohwedder, J. R., Cadore, S., Abate, G., Grassi, M. T. (2014). Montmorillonite and vermiculite as solid phases for the preconcentration of trace elements in natural waters: Adsorption and desorption studies of As, Ba, Cu, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr, V, and Zn. *Applied Clay Science*, *99*, 289-296.

Açışlı, O., Karaca, S., Gürses, A. (2017) Investigation of the alkyl chain lengths of surfactants on their adsorption by montmorillonite (Mt) from aqueous solutions. *Appl. Clay Sci, 142*, 90–99.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. (1989) Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475(2), 353-361.

Barron, M.G. *et al.* (1999) Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*, *46*(3-4), 253-268.

Behera, B. K., Das, A., Sarkar, D. J., Weerathunge, P., Parida, P. K., Das, B. K., Thavamani, P., Ramanathan, R., Bansal, V. (2018). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in inland aquatic ecosystems: Perils and remedies through biosensors and bioremediation. *Environmental Pollution*, *241*, 212–233.

Braga, M.A., Brauko, K.M., Vicentini, M., Salgado, L.D., Silva de Assis, H.C., Dolatto, R.G., Grassi, M.T., Sandrini-Neto, L., Lana, P.C. (2018) Cytotoxicity and enzymatic biomarkers as early indicators of benthic responses to the soluble-fraction of diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *164*, 21–31.

Caldas, S. S., Rombaldi, C., Cerqueira, M. B. R., Soares, B. M., Primel, E. G. (2014). Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. *Scientia Chromatographica*, *5*(3), 190–213.

Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., Ventura, S., Laganà, A. (2015). Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 186–193.

Casado, J., Castro, G., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R. (2015). Selective extraction of antimycotic drugs from sludge samples using matrix solid-phase dispersion followed by online clean-up. *Anal Bioanal Chem*, 407, 907–917. Chatterjee, N. S., Utture, S., Banerjee, K., Shabeer, T. P. A., Kamble, N., Mathew, S., Kumar, K. A. (2016). Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*, *196*, 1–8.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia.* Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., Nicola, F., Aboal, J. R., Rey-Asensio, A. I., Giordano, S., Reski, R., López-Maía, P., Prada-Rodríguez, D. (2015) Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclicaromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A*, *1406*, 19-26.

Dal Pont, G. (2018) Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astianix altipanarae*. Tese Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Dong, X., Wang, Q., Peng, J., Wu, M., Pan, B., & Xing, B. (2018). Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from mother to fetus in relation to pregnancy complications. *Science of the Total Environment*, 636, 61–68.

Dórea, H. S. Dispersão da matriz em fase sólida. In: Figueiredo, E. C.; Borges, K. B.; Queiroz, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos, 1<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 2015, 80-87.

Ferreira, V. R.; Gouveia, C. D.; et. al. (2012) Optimization of an analytical protocol for the extraction, fractionation and determination of aromatic and aliphatic hydrocarbons in sediments. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(8), 1460-1468.

Fiscal-ladino, J. A., Cardona, Rosero-moreano, M., W., Giraldo, L. F., Richter, P., Monta, D. F. (2017). Ionic liquids intercalated in montmorillonite as the sorptive phase for the extraction of low-polarity organic compounds from water by rotating-disk sorptive extraction. *Analytica Chimica Acta*, *953*, 23–31.

Fontana, J. P., Camilo, F. F., Bizeto, M. A., & Faez, R. (2013). *Evaluation of the role of an ionic liquid as organophilization agent into montmorillonite for NBR rubber nanocomposite production. Applied Clay Science, 83-84, 203–209.* 

Franco, M. E., Lavado, R. (2019). Applicability of in vitro methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fi sh: Advances and challenges. *Science of the Total Environment*, 671, 685–695.

Frapiccini, E., Annibaldi, A., Betti, M., Polidori, P., Truzzi, C., Marinni, M. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in di ff erent common sole (Solea solea) tissues from the North Adriatic Sea peculiar impacted area. *Marine Pollution Bulletin, 137*, 61–68.

G1 Santos – Disponível em < https://g1.globo.com/sp/santos-regiao/noticia/vazamento-decombustivel-gera-risco-de-explosao-e-evacua-tres-quarteiroes-em-sp.ghtml. Acesso em 03 jun. 2019.

Gao, P., Hou, L., Denslow, N. D., Xiang, P., Ma, L. Q. (2018). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. *Environment International*, *119*, 466–477.

Guz, L., Curutchet, G., Torres Sánchez, R.M., Candal, R. (2014) Adsorption of crystal violet on montmorillonite (or iron modified montmorillonite) followed by degradation through Fenton or photo-Fenton type reactions. *J. Environ. Chem. Eng*, 2, 2344–2351.

He, W. T., Liao, S. T., Xiang, Y. S., Long, L. J., Qin, S. H., Yu, J. (2018) Structure and properties study of PA6 nanocomposites flame retarded by aluminium salt of diisobutylphosphinic acid and different organic montmorillonites. *Polymers*, 10, 312.

Hoff, R. B., Pizzolato, T. M. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *109*, 83–96.

Leite, N. F. (2008) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e bifenilas policloradas (PCBs) em sedimentos: desenvolvimento analítico e diagnóstico ambiental. Tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

León-González, María & Rosales-Conrado, N. (2017). Determination of ibuprofen enantiomers in breast milk using vortex-assisted matrix solid-phase dispersion and direct chiral liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *514*, 88-94.

Li, Y., Wang, C., Zou, X., Feng, Z., Yao, Y. (2019). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coral reef fi sh from the South China Sea. *Marine Pollution Bulletin*, *139*, 339–345.

Mendonça, F., J.S. Filho, E., Bertoli, A. C., Fernández M. A., Torres Sanchez, R. M., Lago, R. (2019). Use of montmorillonite to recover carboxylic acids from aqueous medium. Separation and Purification Technology. 115751.

Meng, Y., Liu, X., Lu, S., Zhang, T., Jin, B., Wang, Tang, Z., Liu, Y., Guo, X., Zhou, J., Xi, B. (2019). A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China. *Science of the Total Environment*, *651*, 2497–2506.

Min, G.H., Yim, T., Lee, H.Y., Huh, D.H., Lee, E., Mun, J., Oh, S.M., Kim, Y.G. (2006) Synthesis and properties of ionic liquids: imidazolium tetrafluoroborates with unsaturated side chains. *Bull. Korean Chem. Soc.*, *27*(6), 847-852.

Ostrensky, A.; Pedrazzani, A. S.; Vicente, A. L. (2015) Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2,6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra Astyanax altiparanae (Teleostei, Characidae). *Aquaculture Research*, 47(11), 3477-3488.

Pensado, L., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R. (2005) Application of matrix solid phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, *1077*(2), 103-109.

Pereira, G. M. C., Emiliano, P. C., Ferraz, R. B., Salaro, A.L., Alves, R. F. S. (2017) Análise de sobrevivência aplicada ao estudo da mortalidade de lambari-do-rabo-amarelo. *Acta Biol. Par., 46*(3-4), 77-88.

Plaza-Bolaños, P., Frenich, A. G., Vidal. J. L. (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, *1217*(41), 6303-6326.
Rascón, A. J., Azzouz, A., Ballesteros, E. (2019). Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw and processed meat and fish products from European markets by GC-MS. *Food Control*, *101*, 198-208.

Recabarren-villalón, T., Ronda, A. C., Arias, A. H. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and potential biomarkers in a native South American marine fish. *Regional Studies in Marine Science*, *29*, 100695.

Reinert, L., Batouche, K., Lévêque, J., Muller, F., Bény, J., Kebabi, B., Duclaux, L. (2012). Adsorption of imidazolium and pyridinium ionic liquids onto montmorillonite : Characterisation and thermodynamic calculations. *Chemical Engineering Journal*, *209*, 13–19.

Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., Nishigaki, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(3), 182–189.

Rodrigues, S. A. (2010) Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. (a)

Rodrigues, R. V.; Miranda-Filho, K. C.; Gusmão, E. P.; Moreira, C. B.; Romano, L. A.; Sampaio, L. A. (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey Odontesthes argentinensis larvae. *Science of the Total Environment*, *408*, 2054–2059. (b)

Sampaio, M. F. C. (2016) Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em caranguejo-uçá (*ucides cordatus*). Dissertação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

Santos, P. M., Nogal, S., Cordero, B. M. (2019a). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples : A critical review. *Trends in Analytical Chemistry*, *113*, 194–209 (a).

Santos, E. O., Gonzales, J. O., Ores, J. C., Marube, L. C., Caldas, S. S., Furlong, E. B., Primel, E. G. (2019b) Sand as a solid support in ultrasound-assisted MSPD: a simple, green and low-cost method for multiresidue pesticide determination in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 678, 123-132.

Shah, K. J., Pan, S. Y., Shukla, A.D., Shah, D. O., Chiang, P.C. (2018) Mechanism of organic pollutants sorption from aqueous solution by cationic tunable organoclays, *J. Colloid Interface Sci*, *529*, 90–99.

Tan, D., Jin, J., et al. (2017) Phenyltrichlorosilane-functionalized magnesium oxide microspheres: Preparation, characterization and application for the selective extraction of dioxin-like polycyclic aromatic hydrocarbons in soils with matrix solid-phase dispersion. *Analytica Chimica Acta*, 956,14-23.

Taverna, L. (2011). Protocolo Analítico em Escala Reduzida para Determinação de n-Alcanos, HPA e Esteróis em Sedimentos e Diagnóstico Ambiental Preliminar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, *1116*, 1–9.

Rodrigues, R. V., Miranda-filho, K. C., Pereira, E., Bonucci, C., Alberto, L., André, L. (2010). Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey Odontesthes argentinensis larvae. *Science of the Total Environment, 408*(9), 2054–2059.

Valencia, T. M. G., Llasera, M. P. G. (2017) On-line MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues. *Food Chemistry*, 223, 82–88.

Vela-Soria, F.; Ballesteros, O.; Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, L., Navalón, A. (2015) Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchemical Journal*, *118*, 32–39.

Vilela Júnior, A. R. (2017) Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em camarão (Litopenaeus vannamei). Dissertação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

Villaverde-de-Sáa, E., Valls-Cantenys, C., Quintana, J. B., Rodil, R., Cela, R. (2013) Matrix solid-phase dispersion combined with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of fifteen halogenated flame retardants in mollusks. *Journal of Chromatography A*, 1300, 85-94.

Wianowska, D., Gil, M. (2019). Trends in Analytical Chemistry New insights into the application of MSPD in various fi elds of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 29–51.

Wu, L., Liao, L., Lv, G., Qin, F., Li, Z. (2014). Microstructure and process of intercalation of imidazolium ionic liquids into montmorillonite. *Chemical Engineering Journal*, 236, 306–313.

Xu, F., Wu, W., Wang, J., Qin, N., Wang, Y., He, Q., He, W. Tao, S. (2011). Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai-Yang-Dian, Northern China. *Ecological Modelling*, 222(2), 275–286.

Yu, Z., Lin, Q., Gu, Y., Du, F., Wang, X., Shi, F., Ke C., Xiang, M. Yu, Y. (2019). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine fish from the coastal waters of the northern South China Sea: Risk assessment for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *180*(May), 742–748.

Zhang, Y., Lee, H. K. (2012) Determination of ultraviolet filters in water samples by vortexassisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1249*, 25–31.

Zhao, M., Wei, L., Zheng, Y., Liu, M., Wang, J., Qiu, Y. (2019). Structural effect of imidazolium-type ionic liquid adsorption to montmorillonite. *Science of the Total Environment*, *666*, 858–864.

Zhao, Z., Zhang, L., Cai, Y., Chen, Y. (2014). 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*, *104*, 323–331.

Ziarrusta, H., Olivares, M., Delgado, A., Posada-Ureta, O., Zuloaga, O., Etxebarria, N. (2015). Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, *1391*(1), 18–30.

## APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMA PARCIAL DE CADA UM DOS 16 HPA

Parcial do cromatograma, no modo SIM, de cada um dos 16 HPA prioritários, 5 padrões internos e padrão sub-rogado na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, contendo seus respectivos íons de quantificação (primeiro íon) e de confirmação (segundo e terceiro íons).





1-Acenaftileno; 2-Acenaftileno-d10 e 3-Acenafteno









1-Fenantreno-d10; 2-Fenantreno e 3-Antraceno





1-Benzo[a]antraceno; 2-Criseno-d12 e 3-Criseno









1-Benzo[b]fluoranteno e 2-Benzo[k]fluoranteno

1-Indeno[1,2,3-cd]pireno; 2-Dibenzo[a,h]antraceno e 3-Benzo[g,h,i]perileno

