



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANTÔNIO RODRIGUES VILELA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CAMARÃO
(*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**

**METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS DETERMINATION IN
SHRIMP(*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANTÔNIO RODRIGUES VILELA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CAMARÃO**
(Litopenaeus vannamei)

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre

**METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS DETERMINATION IN
SHRIMP(LITOPENAEUS VANNAMEI)**

*Master dissertation presented to the
Graduate Programm in Chemistry of
the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. in Chemistry.*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

V699d Vilela Júnior, Antônio Rodrigues
Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em camarão (*Litopenaeus vannamei*) / Antônio Rodrigues Vilela Júnior ; orientador Marcelo da Rosa Alexandre. – São Cristóvão, 2017.
104 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Química. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Camarão. I. Alexandre, Marcelo da Rosa, orient. II. Título.

CDU 547.6:595.384.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-graduação em Química -
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Antônio Rodrigues Vilela Júnior apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 24/02/2017.

Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Alain Gaujac
Instituto Federal de Sergipe -IFS

Prof.ª Dr.ª Flaviana Cardoso Damasceno
Departamento de Química - UFS

RESUMO

O Brasil está entre os dez maiores produtores de camarão do mundo, sendo a região nordeste a maior produtora de camarão cultivado no país. As regiões de cultivo estão sob forte estresse ambiental, acarretando contaminação por vários compostos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Estes compostos têm sido fonte de diversos estudos, por apresentarem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Diante do exposto, este trabalho objetiva desenvolver um método analítico baseado na técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, para determinação de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em camarão. As condições ótimas de trabalho foram 0,5 g da amostra; 0,5 g de C₁₈; 1,5 g de alumina; 150 segundos de homogeneização e 8 mL de acetonitrila como solvente de eluição. Estas três últimas variáveis estabelecidas através de um planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central mais seis pontos axiais, avaliando-as pela metodologia de análise de superfície de resposta. A validação do método analítico apresentou linearidade na faixa de 0,9915 a 0,999 e sensibilidade no intervalo de concentração de 5 a 100 ng g⁻¹; seletividade com base no efeito de matriz, exatidão e precisão, com valores de recuperação entre 70 - 104% coeficientes de variação inferiores a 13%, nos três níveis de fortificação (10, 25 e 50 ng g⁻¹); limites de detecção e quantificação (peso seco) de 0,7 a 5,0 ng g⁻¹ e 1 a 5 ng g⁻¹ respectivamente; robustez foi avaliada através dos gráficos de contorno, o qual indicou que o método pode ser considerado robusto. Este método foi aplicado em quatro amostras (A, B, C e D), com predominância dos HPA de 2 a 4 anéis, sendo a amostra A com a maior concentração total de HPA, 280 ng g⁻¹. Nas amostras A, B, C foram encontrados benzo[a]antraceno 21; 18 e 14 ng g⁻¹, respectivamente, este que é considerado provável cancerígeno ao homem. O método pode ser considerado eficiente na extração de HAP, quando comparado aos métodos relatados na literatura. Integra o processo de extração e limpeza em uma única etapa e econômico, pois o consumo de materiais é minimizado.

Palavras-chave: Camarão, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, MSPD, GC-MS e Planejamento Fatorial

ABSTRACT

Brazil is among the ten largest cultivated shrimp producers in the world, with the northeast being the largest producer of shrimp cultivated in the country. These regions of cultivation may undergo strong anthropic stress due contamination by all sort of compounds, including the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). These compounds have been the source of several studies because they are considered mutagenic and carcinogenic. The objective of this work is to develop an analytical method based on the matrix solid phase dispersion (MSPD) and gas chromatography coupled to mass spectrometry for determination of 16 PAH in shrimp. The optimal working conditions were 0.5 g of the sample; 0.5 g of C₁₈; 1.5 g of alumina; 150 seconds of homogenization and 8 mL of acetonitrile as the elution solvent. These last three variables were established through a factorial design of 2³ with triplicate at the central point plus six axial points, evaluating them by the methodology of response surface analysis. The validation of the analytical method presented linearity in the range of 0.9915 to 0.999 and sensitivity in the concentration range of 5 to 100 ng g⁻¹; selectivity based on matrix effect, accuracy and precision, with recovery values between 70 - 104% coefficients of variation lower than 13%, in the three levels of fortification (10, 25 and 50 ng g⁻¹); (dry weight) limits of 0.7 to 5.0 ng g⁻¹ and 1 to 5 ng g⁻¹ respectively, the robustness was evaluated through the contour charts, which indicated that the method can be considered robust. This method was applied in four samples (A, B, C and D), with HPA predominating from 2 to 4 rings, sample A being the one with the highest concentration (280 ng g⁻¹ for total PAH). In the three samples (A, B and C) benzo [a] anthracene have reached concentrations of 21, 18 and 14 ng g⁻¹ respectively, which is considered probable carcinogenic to humans. The method was considered efficient in the extraction of PAH, when compared to the methods reported in the literature. It integrates the process of extraction and cleaning in a single and economical method and the consumption of materials used during the process is minimized.

Keywords: Shrimp, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, MSPD GC-MS and Factorial Design

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e sabedoria para enfrentar os desafios da vida.

A minha família em especial minha mãe, pois graças as seus esforços fui agraciado com a oportunidade de frequentar uma instituição de ensino superior.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa durante esses dois anos, pela amizade, troca de conhecimento e momentos de distração junto a família LCP 2

À minha noiva, amiga e companheira de estudo Amanda Paulina, pelo companheirismo, amor, carinho e por me aturar nos momentos que cheguei estressado ao longo desses 24 meses.

As amigas formadas junto aos integrantes do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes – LCP pelo trabalho, incentivo, conselhos e momentos de descontração.

Ao meu amigo Ewerton por ter prestando auxílio durante a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

A Universidade Federal de Sergipe e ao professores que compõem o Programa de Pós Graduação em Química.

A CAPES, pelo auxílio financeiro

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira dos Criadores de Camarão
ADEMA	Administração Estadual do Meio Ambiente
ANOVA	Análise de Variância (do inglês <i>Analysis of Variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Extração Acelerada por Solvente (do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de massas (do inglês <i>Gas Chromatography/ Mass Spectrometry</i>)
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
C.V	Coeficiente de Variação
EM	Efeito Matriz (do inglês <i>Matrix Effect</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas Para Alimentação (do Inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LCP	Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MGHPA	Media Geométrica dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
MIP	Polímeros Molecularmente Impressos (do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
MS	Espectrometria de Massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)

MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>)
PI	Padrão Interno
PLE	Extração com Líquido Pressurizado (do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
SIM	Monitoramento de Íon Seletivo (do inglês <i>Selective Ion Monitoring</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro (do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>)
PCBs	Bifenilas Policloradas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre a produção de peixe para o consumo humano proveniente da aquicultura e pesca. Fonte: Adaptado de FAO 2016 [14]	2
Figura 2 - Comparação entre pesca e aquicultura para o consumo humano no período de 2013 a 2015 e projeção para 2025. Fonte: Adaptado de FAO 2016 [14]	3
Figura 3 – Estágios do ciclo de vida do camarão. Fonte: adaptado de Indústria e Investimento NSW, 2010 [16].	4
Figura 4 - Evolução da produção e área do cultivo de camarão no Nordeste para o período de 2000 a 2015. Fonte: Vidal, 2016 [19]	5
Figura 5 – Estruturas químicas dos 16 HPA prioritários de acordo com a US EPA.	9
Figura 6 – Procedimento de extração por MSPD. Fonte: Adaptado de Barker, [10].	14
Figura 7 – Representação cúbica da distribuição dos pontos de um planejamento 2^3 com ponto central mais seis pontos axiais. Fonte: Bezerra, 2008 [90].	20
Figura 8 – Aspecto pulverulento da amostra com o suporte sólido após 1 minuto de homogeneização.	36
Figura 9 – Representação da capacidade de retenção da carga orgânica proporcionada pelo C_{18} , utilizando acetonitrila como solvente de eluição.	38
Figura 10 – Esquema do processo de MSPD.	38
Figura 11 – Gráfico dos valores de recuperação e seus respectivos desvios padrão para os 16 HPA empregando sílica, alumina neutra e florisil como adsorventes.	39
Figura 12 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando sílica como adsorvente.	40

Figura 13 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando alumina como adsorvente.....	40
Figura 14 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando florissil como adsorvente.	41
Figura 15 – Gráfico para os valores de recuperação (%) e seus respectivos desvios padrão para os 16 HPA empregando alumina neutra e florissil como adsorvente, desativados a 5% com água ultra pura.	41
Figura 16 - Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando alumina como adsorvente, desativada a 5% com água ultra pura.	42
Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando florsil como adsorvente, desativado a 5% com água ultra pura.	42
Figura 18 - Gráfico de Pareto para o planejamento 2^3 com triplicata no ponto central mais seis pontos axiais.....	45
Figura 19 - Gráfico para os valores observados versus os valores preditos. ...	48
Figura 20 – Gráfico para distribuição normal dos resíduos.	50
Figura 21 – Superfície de resposta com o tempo de homogeneização fixo no ponto central (150 segundos).....	51
Figura 22 - Superfície de resposta com o volume do solvente fixo no ponto central (8 mL).	52
Figura 23 - Superfície de resposta com a massa do adsorvente fixa no ponto central (1,5 g).	53
Figura 24 – Condição de extração idealizada segundo o modelo.....	55
Figura 25 – Comparação do desempenho entre o método univariado e multivariado para os 16 HPA.....	56

Figura 26 – Comparação dos cromatogramas obtidos no modo Scan para o perfil da amostra no modo univariado e multivariado. 57

Figura 27 - Recorte dos cromatogramas obtidos por GC-MS no método SIM para uma solução no extrato da matriz, fortificada com a solução conjunta dos 16 HPA e os 5 padrões sub-rogados na concentração de 100 ng mL^{-1} 63

Figura 28 – Gráfico de contorno gerado com a massa do adsorvente fixa no ponto central (1,5 g). 67

Figura 29 – Gráfico de contorno gerado com a variável volume do solvente fixa no ponto central (8,0 mL). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de camarão na região nordeste, Fonte IBGE 2015 [2].....	5
Tabela 2 – Distribuição do número de produtores ativos em 2011, por município, área produtiva, produção, fonte de captação de água e que possuem licença ambiental. Fonte: Adaptado de ABCC, 2013 [25].	7
Tabela 3 - Propriedades físico-química dos 16 HPA considerados prioritários pela US EPA. Fonte: Adaptado de TORRE, 2014 [39].	11
Tabela 4 - Aplicações da MSPD para extração de HPA e outras classes de compostos em uma variedades de matrizes.	16
Tabela 5 - Condições cromatográficas para análise dos HPA	28
Tabela 6 – Tempo de retenção (T_r) e m/z para identificação e quantificação dos HPA e seus respectivos padrões sub-rogados.	29
Tabela 7 – Variáveis e respectivos níveis empregados para otimização do método usando planejamento fatorial.	30
Tabela 8 - Matriz do planejamento 2^3 com triplicata no ponto central incluindo os valores reais e codificados para cada uma das variáveis.	31
Tabela 9 – Preparo da curva analítica no extrato da matriz no intervalo de 5 a 100 ng g^{-1} , com volume final correspondente a 1 mL.	32
Tabela 10 – Avaliação da precisão e seus respectivos níveis de fortificação utilizados em cada dia.	33
Tabela 11 – Valores de recuperação (%) para os 16 HPA obtidos nos 17 ensaios, empregando as condições de extração de acordo com os dados da tabela 8.	44
Tabela 12 - Análises de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.	46
Tabela 13 - Tabela ANOVA para media quadrática, soma dos resíduos e validação do modelo.	47

Tabela 14 – Valores observados, valores previstos e resíduos de acordo com o modelo.	49
Tabela 15 - Comparação da resposta prevista pelo modelo matemático com a performance experimental para a média geométrica dos 16 HPA.	56
Tabela 16 – Valores de recuperação e desvio padrão relativo para os 16 HPA mais a média geométrica, empregando as condições definidas pelo modelo: 1,5 g do suporte sólido, 150 segundos de homogeneização e 8 mL de acetonitrila.	57
Tabela 17 – Equação da reta e valores dos coeficientes de correlação dos 16 HPA e os cinco surrogates, obtidos a partir das curvas de calibração.....	59
Tabela 18 – Valores de limite de detecção e quantificação para os 16 HPA e seus respectivos padrões sub-rogados.....	60
Tabela 19 – Avaliação do efeito matriz (EM) para os 16 HPA e os 5 padrões sub-rogados, com soluções na concentração de 100 ng g ⁻¹	62
Tabela 20 - Recuperação e coeficientes de variação dos HPA e padrões sub-rogados, correspondente aos três níveis de fortificação 10, 25 e 50 ng g ⁻¹	66
Tabela 21 – Comparação do método de extração (MSPD) desenvolvido neste trabalho com outros métodos reportados na literatura	69
Tabela 22 – Teor de umidade e carga orgânica extraída.....	70
Tabela 23 – Avaliação da eficiência de extração com base nos valores de recuperação (Rec %) e coeficientes de variação para os padrões sub-rogados nas quatro amostras de camarão de Sergipe.....	71
Tabela 24 – Concentrações (ng g ⁻¹) dos HPA encontradas nas amostras (A, B, C e D).....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aquicultura.....	2
1.2	Carcinicultura.....	3
1.3	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	8
1.4	Características físico-químicas dos HPA	9
1.5	Extração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Biota.....	12
1.5.1	Dispersão da Matriz em Fase Sólida	13
1.6	Validação de método analítico.....	18
1.7	Planejamento Fatorial	19
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.	OBJETIVOS.....	24
3.1	Geral:	24
3.2	Específicos:	24
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.1	Coleta, conservação e preparo das amostras	25
4.1.1	Teor de umidade e carga orgânica da amostra	25
4.2	Limpeza dos materiais	26
4.3	Descarte dos resíduos	26
4.4	Padrões Analíticos	26
4.5	Adsorventes e solventes utilizados	27
4.6	Equipamentos	27
4.7	Parâmetros Cromatográficos	27
4.8	Ensaio de Recuperação	30
4.9	Otimização empregando análise Multivariada	30
4.10	Ensaio de Validação	32
4.10.1	Linearidade e Sensibilidade.....	32
4.10.2	Limite de detecção e limite de quantificação.	33
4.10.3	Exatidão e Precisão.....	33
4.10.4	Seletividade	33

4.10.5	Robustez	34
4.11	Extração da amostra empregando MSPD	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Desenvolvimento da metodologia de extração empregando dispersão da matriz em fase sólida	36
5.1.1	Seleção da coluna auxiliar de limpeza e solvente de eluição	36
5.1.2	Seleção do suporte sólido	38
5.2	Otimização empregando análise multivariada	43
5.3	Validação do método analítico	58
5.3.1	Linearidade e sensibilidade	58
5.3.2	Limite de detecção e Limite de quantificação	59
5.3.3	Avaliação do Efeito Matriz	61
5.3.4	Seletividade	63
5.3.5	Exatidão e Precisão	65
5.3.6	Robustez	67
6.	Aplicação do método em amostras obtidas no estado de Sergipe	70
6.1	Avaliação do teor de umidade e carga orgânica extraída	70
6.1.1	Determinação quantitativa de HPA	71
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS	76
	Apêndice	92

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por fontes de proteína de origem animal tem impulsionado a aquicultura brasileira, destacando-se nesse setor a produção de camarão [1]. A produção e o comércio de camarão apresentam-se como um dos setores da aquicultura brasileira que mais tem se desenvolvido [1]. Segundo a Organização das Nações Unidas Para Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil está entre os dez maiores produtores de camarão cultivado do mundo, com destaque para o nordeste que foi responsável por mais de 99% da produção total de camarão no país em 2015 [1, 2].

O estado de Sergipe foi considerado o quinto maior produtor de camarão do Brasil em 2015 [2]. Esta produção está baseada no monocultivo de base familiar, em que os viveiros estão dispostos em torno dos ambientes estuarinos [3]. Estas áreas estão sob diferentes influências antrópicas, acarretando contaminação por diversos poluentes, dentre eles os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), considerados possíveis causadores de efeitos adversos à saúde [4 - 6].

As características físico-químicas destes compostos possibilitam a bioacumulação nos organismos e ampla capacidade de distribuição no meio ambiente [7]. Em decorrência disso, há uma demanda crescente por métodos de preparo de amostras que possibilitem a extração desses compostos de matrizes ambientais, com o mínimo de interferentes [8].

As técnicas de extração associadas à detecção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) têm sido fundamentais para determinação de poluentes orgânicos em nível traço, unindo precisão, sensibilidade e seletividade em um único método [9].

A técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) tem sido aplicada a uma ampla variedade de matrizes com características sólidas, semissólidas e/ou altamente viscosas para determinação de diversas classes de compostos [10]. A disseminação deste método aplicado a matrizes com essas características está baseada nas vantagens que o mesmo apresenta, dentre elas a viabilidade, flexibilidade, versatilidade, rapidez e baixo custo [11].

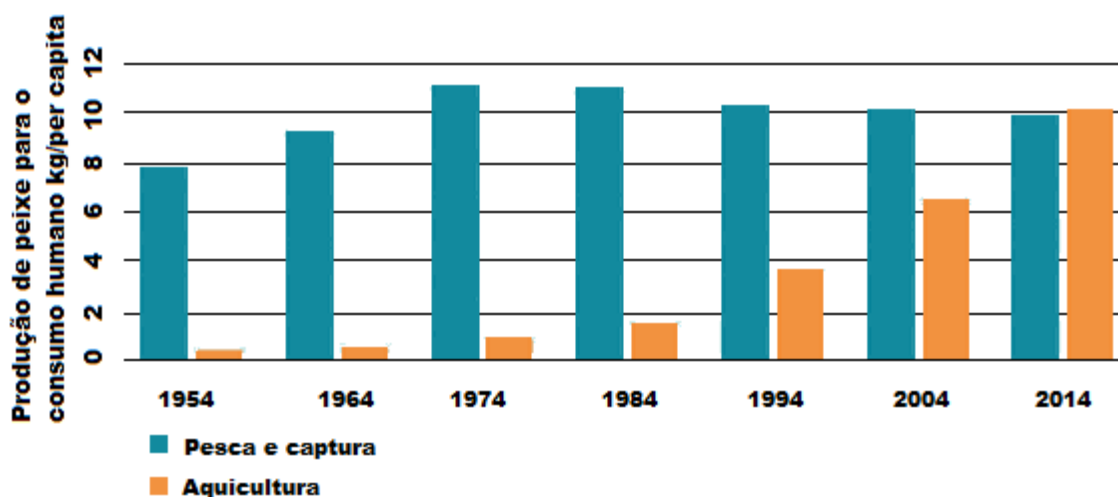
Diante do que foi apresentado, este trabalho objetiva desenvolver um método baseado na técnica de MSPD e GC-MS para determinação de 16

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em camarão. Estes compostos são considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, pois alguns tiveram propriedades mutagênicas e carcinogênicas comprovadas.

1.1 Aquicultura

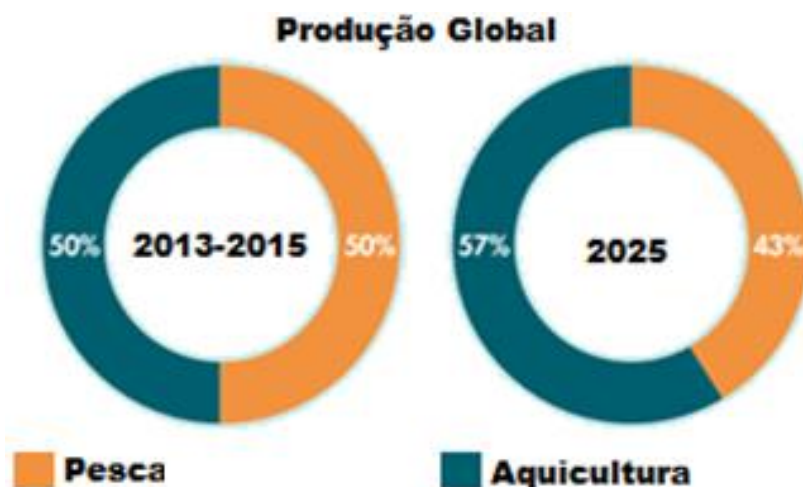
A crescente demanda por fonte de proteínas de origem animal tem impulsionado o desenvolvimento da aquicultura. Segundo a FAO, a produção mundial de pescado estabilizou em cerca de 90 milhões de toneladas nas últimas duas décadas e se manteve estável até o ano de 2014 [1]. A aquicultura vem crescendo rapidamente, quando comparado a outros setores alimentícios, com média de 6,2% ao ano entre 2000 e 2012 [12, 13]. Segundo esta mesma organização, a produção aquícola superou a produção proveniente da pesca e captura no ano de 2014 (Figura 1) [14].

Figura 1 - Comparação entre a produção de peixe para o consumo humano proveniente da aquicultura e pesca. Fonte: Adaptado de FAO 2016 [14]



Projeções realizadas indicam que o consumo de pescado (*per capita*) irá aumentar em todos os continentes, passando de 19,6 para 24,3 Kg em 2025 e que a aquicultura suprirá essa demanda, sendo responsável por 57% do pescado disponível para o consumo em 2025 (Figura 2) [14].

Figura 2 - Comparação entre pesca e aquicultura para o consumo humano no período de 2013 a 2015 e projeção para 2025. **Fonte:** Adaptado de FAO 2016 [14]



Estima-se que o Brasil deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura em 2025. Segundo o estudo, o aumento na produção brasileira será o maior registrado na região, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. O crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos [14].

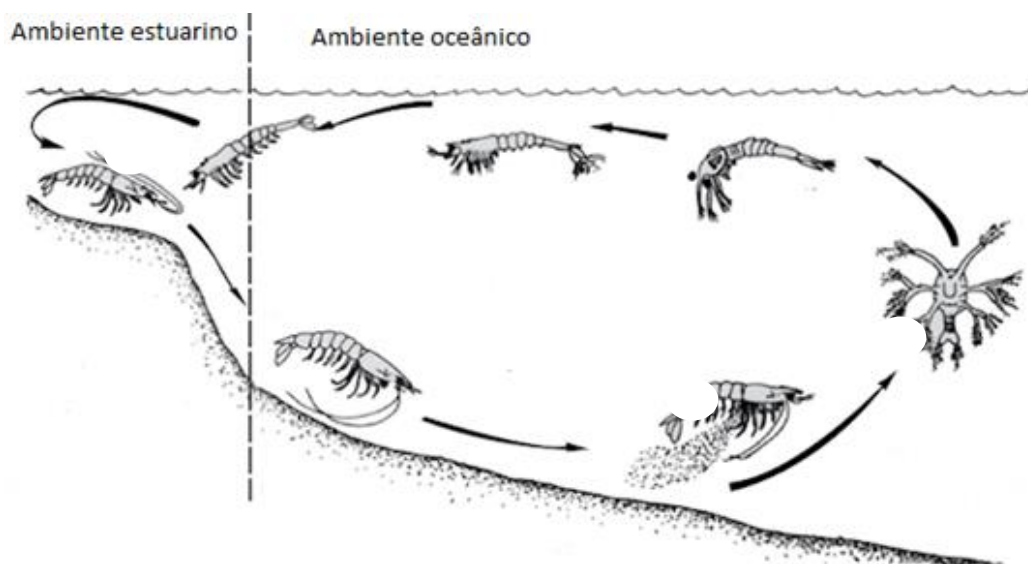
1.2 Carcinicultura

No setor aquícola, o cultivo de camarão (carcinicultura) é uma das atividades que mais se expandiu no mundo nas últimas décadas, possuindo uma taxa média de crescimento em torno de 6,5% no período de 2004 a 2013. Essa atividade concentra-se nos países da Ásia e América Latina, os quais respondem por 99,6% da produção mundial, sendo estas direcionadas para a exportação [1]. Esta expansão está associada ao crescimento do mercado internacional e a rentabilidade [14]. Esses fatores aliado às inovações tecnológicas atraem investimentos, públicos e privados para o desenvolvimento da carcinicultura [3].

O camarão é um crustáceo do grupo dos Artrópodes, está amplamente distribuído nos diversos continentes, exceto no Antártico [15]. Frequenta os ambientes estuarinos durante a fase pós-larva, adquirindo hábitos bentônicos,

permanecendo nestes espaços por alguns meses em fase de crescimento, retornando ao oceano onde reinicia o ciclo de vida (Figura 3) [16].

Figura 3 – Estágios do ciclo de vida do camarão. Fonte: adaptado de Indústria e Investimento NSW, 2010 [16].

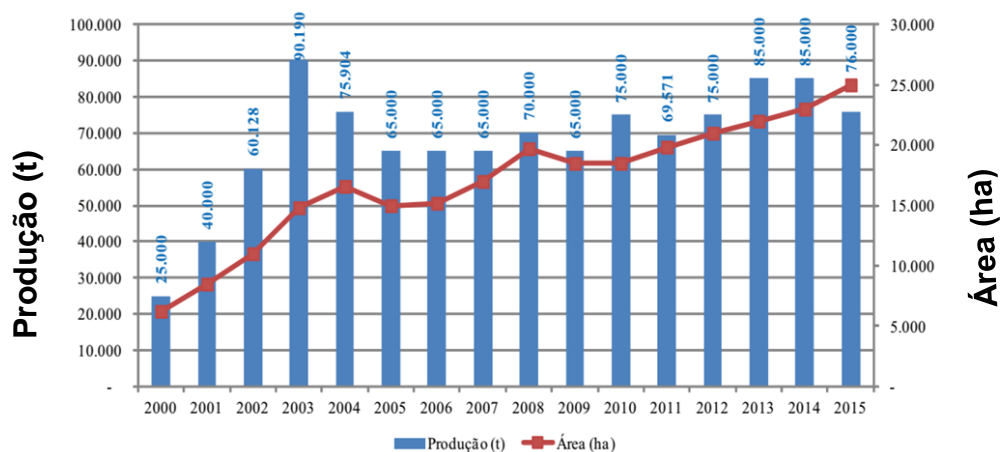


No Brasil, a produção de camarão foi de 69,4 mil toneladas em 2015, representando um aumento de 7,4% em relação a 2014 (65.018t). A região nordeste foi a maior produtora, responsável por 99,3% de toda produção do país. O Ceará se manteve na liderança nacional, 58,7% dos camarões produzidos, seguido pelo Rio Grande do Norte com 25,7%. Juntos, os dois estados responderam por 84,4% da produção nacional, seguido dos estados do Piauí 5,1%; Bahia 4,0%; Sergipe 3,2% e pelas regiões Sul 0,6% e norte 0,1% [2]. A produção referente aos estados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Produção de camarão na região nordeste, Fonte IBGE 2015 [2].

Estado	Produção (kg)	Produção (%)
Ceará	40.717.779	58,7
Rio Grande do Norte	17.829.519	25,7
Piauí	3.572.253	5,1
Bahia	2.806.140	4,0
Sergipe	2.232.133	3,2
Pernambuco	944.700	1,4
Paraíba	937.900	1,4
Alagoas	260.000	0,4
Maranhão	84.655	0,1

Este fato está relacionado com as características intrínsecas da espécie *Litopenaeus Vannamei*, originária da costa do Pacífico, popularmente conhecido como camarão branco do pacífico ou camarão cinza. Esta espécie foi introduzida no mercado brasileiro na década de 1980, adaptando-se rapidamente as condições edafoclimáticas brasileira, sobre tudo as da região nordeste, proporcionando desta forma até três ciclos de cultivo durante o ano [17, 18]. A Figura 4 apresenta a evolução da cadeia produtiva e área do cultivo de camarão no Nordeste para o período de 2000 a 2015.

Figura 4 - Evolução da produção e área do cultivo de camarão no Nordeste para o período de 2000 a 2015. **Fonte:** Vidal, 2016 [19]

O estado de Sergipe possui uma área territorial de 22.050,40 km², e representa 1,41% da região nordeste e 0,26% do território brasileiro, localizado entre as latitudes 9°30'49" e 11°34'05"Sul e as longitudes 36°23'40" e 38°15'00" Oeste. Sua região litorânea corresponde a 28,52% da área estadual e nela existem oito bacias hidrográficas: bacia do rio Japaratuba com 1.856,64km², correspondendo a 8,42% da superfície estadual, São Francisco com área total de 638.574km² dos quais 4.952,9km² estão localizados no estado de Sergipe, correspondendo a 20,3% do território sergipano, Piauí 4.150km² correspondentes a 18% do território sergipano, Sergipe com 3.673km², Vaza-Barris com área total 16.787km² dois quais 16% dessa área correspondendo encontrasse no estado de sergipe, Real 4.968,44 km², Grupo de bacias costeiras GC-1(118,34km²) e GC-2 (161,38km²) [20].

No estado de Sergipe a produção de camarão é baseada no monocultivo de base familiar [3]. Os viveiros de camarão encontram-se em torno dos estuários dos rios São Francisco, Sergipe, Vaza-Barris, Piauí e Real [3]. Estes estão em áreas sob diferentes influências antrópicas, fator determinante para o papel das fazendas de camarão como absorventes; provocadas pelo estresse ambiental ou emissora de insumos provenientes da carcinicultura aos ecossistemas adjacentes [4, 5, 21, 22].

Segundo Machado (2009) e Lima (2012), a produção de camarão no estado de Sergipe pode ser classificada em dois grupos: as fazendas que estão localizadas em terras baixas, não licenciadas, por estarem situadas em áreas de Preservação Permanente (APP). No segundo grupo encontram-se as fazendas de terras altas, licenciadas ou com possibilidades de licenciamento ambiental, localizadas fora das APP [23, 24]. Os dados referentes aos municípios produtores estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição do número de produtores ativos em 2011, por município, área produtiva, produção, fonte de captação de água e que possuem licença ambiental. **Fonte:** Adaptado de ABCC, 2013 [25].

Municípios	Número de produtores	Área em hectares	Produção em toneladas	Fonte de captação			Licença ambiental	
				Estuário	Rio	Oceano	Sim	Não
Aracaju	16	52	96	16	-	-	-	16
Barra dos coqueiros	4	23	87	4	-	-	3	1
Brejo Grande	7	27	46	7	-	-	-	7
Estância	3	40	147	1	2	-	2	1
Indiaroba	13	63	287	12	1	-	2	11
Itaporanga	11	155	669	9	2	-	4	7
Nossa Senhora do Socorro	82	282	685	79	3	-	1	81
Pacatuba	38	190	348	35	2	1	-	38
Propriá	1	3	38	-	1	-	-	1
Santa Luzia	94	51	200	9	-	-	-	9
Santo Amaro	4	43	157	1	3		1	3
São Cristóvão	36	111	214	36	-	-	-	36
Total	224	1040	2973	209	14	1	13	211

1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

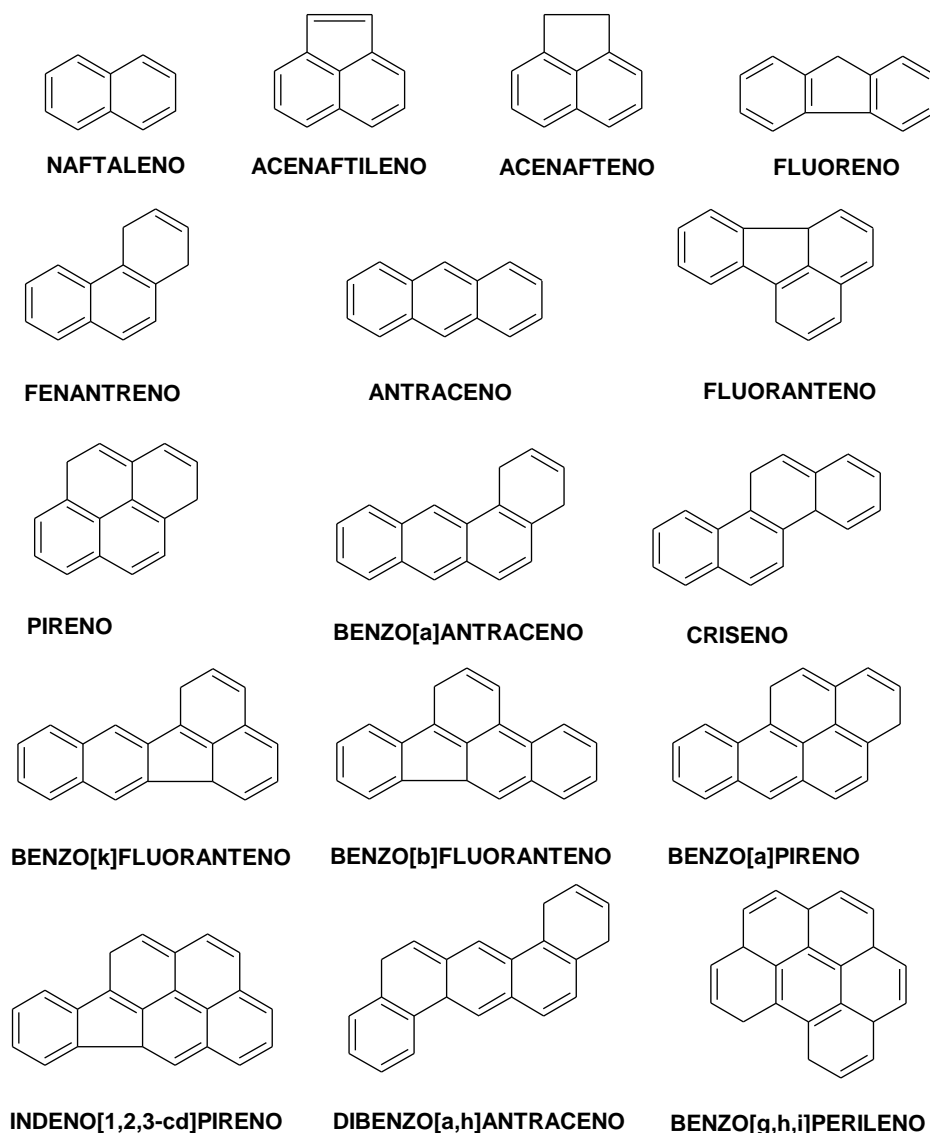
Os HPA são moléculas orgânicas constituídas por carbono e hidrogênio contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados. Podem se dividir em duas categorias: compostos de baixa massa molecular possuindo até três anéis e compostos de elevada massa molecular, apresentando quatro ou mais anéis, sendo geralmente sólidos cristalinos nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP) [26].

Devido às suas características físico-químicas, esses compostos são considerados persistentes no meio ambiente [27]. Além de possuir alta capacidade de distribuição, podendo ser encontrados em áreas remotas distantes das fontes de poluição, quando associados ao material particulado [28, 29].

Estudos comprovam os efeitos adversos que esses compostos podem causar ao meio ambiente e à saúde humana, bem como de seus derivados nitratos e oxigenados, sendo capazes de desencadear doenças degenerativas no ser humano, dependendo da condição genética de cada indivíduo e frequência de exposição [6, 30-34].

A contaminação ambiental por HPA tornou-se uma questão de séria preocupação nos ciclos biogeoquímicos globais. Até agora, mais de 200 HPA foram encontrados, dos quais dezesseis desses compostos (Figura 5) são considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA), em virtude do maior número de informações disponíveis, suspeitos de serem os mais nocivos à saúde e estarem disponíveis em maiores concentrações nos ambientes [35].

Figura 5 – Estruturas químicas dos 16 HPA prioritários de acordo com a US EPA.



1.4 Características físico-químicas dos HPA

Os HPA possuem algumas características físicas e químicas de grande importância que ajudam na determinação da distribuição e avaliação do comportamento desses compostos nos diversos compartimentos ambientais (solo, sedimento, atmosfera e água), bem como os possíveis efeitos adversos causados ao homem e ambiente [36].

Nos HPA, a volatilidade diminui com o aumento da massa molecular, em consequência disto, os HPA mais leves possuem maior pressão de vapor [36].

A solubilidade desses compostos reduz à medida que o número de anéis aumenta, além de apresentar coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000; isto demonstra sua grande afinidade lipofílica, que aumenta com o número de anéis. Essas características os tornam bioacumulativos nos organismos marinhos, podendo afetar o desenvolvimento das espécies, assim como a saúde humana através da ingestão desses organismos contaminados [37].

Essas propriedades contribuem para dispersão desses compostos no ambiente. Por exemplo, compostos de baixa massa molecular podem ser encontrados em áreas distante das fontes de origem, já as concentrações de HPA de alta massa molecular decaem exponencialmente à medida que aumenta a distância das fontes de origem [38].

Nos corpos d'água os HPA tendem a serem rapidamente associados ao material particulado em suspensão e posteriormente depositado sobre o sedimento, que são considerados depósitos para esses compostos [39]. A Tabela 3 apresenta algumas características físico-químicas dos HPA considerados prioritários pela US EPA.

Tabela 3 - Propriedades físico-química dos 16 HPA considerados prioritários pela US EPA. **Fonte:** Adaptado de TORRE, 2014 [39].

HPA	MM ¹ (g/mol)	PE ² (°C)	Sol (H ₂ O) ³ (mg/L) a 25 °C	Log Kow ⁴	Log Koc ⁵	Log Kd ⁶	Pv ⁷ (Pa a 25 °C)
Naftaleno	128	218	31,8	3,4	3,0	1,7	10,5
Acenaftileno	152	265	16,1	4,1	-	-	4,14
Acenafteno	154	279	3,7	3,9	3,7	-	0,36
Fluoreno	166	293	1,98	4,2	3,9	-	9x10 ⁻²
Fenantreno	178	340	1,2	4,6	4,2	2,7	1,8x10 ⁻²
Antraceno	178	340	1,29	4,57	4,4	2,7	7,5x10 ⁻⁴
Fluoranteno	202	375	0,26	5,2	4,9	3,7	1,2x10 ⁻³
Pireno	202	360	0,15	5,2	-	3,7	8,86x10 ⁻⁴
Benzo-a-Antraceno	228	400	1,1x10 ⁻²	5,84	-	4,2	7,3x10 ⁻⁶
Criseno	228	448	3x10 ⁻³	5,84	-	4,2	5,7x10 ⁻⁷
Benzo-b-Fluoranteno	252	481	1,5x10 ⁻³	6,6	5,2	5,0	6,7x10 ⁻⁵
Benzo-k-Fluoranteno	252	480	7,6x10 ⁻⁴	6,8	5,9	4,9	6,0x10 ⁻⁷
Benzo-a-Pireno	252	496	3,8x10 ⁻³	6,4	6,0	4,9	7,3x10 ⁻⁷
Indeno(1,2,3-c,d)Perileno	276	536	1,9x10 ⁻⁴	6,6	6,8	5,6	1,3x10 ⁻⁸ (20°)
Dibenzo(a,h)Antraceno	278	524	5,1x10 ⁻⁴	6,7	6,1	5,6	3,7x10 ⁻¹⁰
Benzo (g,h,i) Perileno	276	545	5,5x10 ⁻³	7,04	-	5,6	6,0x10 ⁻⁸

1 – Massa molar ; 2 - Ponto de Ebulição; 3 - Solubilidade em água; 4 - Coeficiente de partição octanol/água; 5 - Coeficiente de partição carbono orgânico/água; 6 - Coeficiente de partição sedimento água; 7 - Pressão de vapor.

1.5 Extração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Biota

Embora o desenvolvimento da instrumentação analítica tenha possibilitado avanços em muitos aspectos da química, o preparo de amostras ambientais ainda constitui um dos entraves em análise quantitativa [40]. Isso ocorre devido a fatores relacionados à complexidade da matriz, que dificulta a eliminação de compostos indesejados [41]. Para contornar esta questão, são empregados uma série de procedimentos de preparo da amostra que se estendem desde a coleta até o momento da análise instrumental [8].

A principal técnica empregada para a extração de HPA em amostras sólidas e semi-sólidas de elevada complexidade é a extração por Soxhlet. Essa técnica consome grandes volumes de solventes orgânicos por amostra, longos períodos de extração, grande quantidade de amostra que deve estar disponível para análise, além da necessidade de realizar a limpeza do extrato em uma etapa posterior [8].

Em virtude da necessidade de desenvolver técnicas que minimizem gastos e o tempo de análise, algumas técnicas foram desenvolvidas e aplicadas para análise de HPA em amostras sólidas, semissólidas e/ou altamente viscosas, entre elas estão a extração por líquido pressurizado (PLE) em musgos e sedimentos marinhos [42, 43], extração acelerada por solvente e extração por ultrassom para análise de HPA em camarões [44, 45], extração de HPA em peixes por micro-ondas [46]; extração em fase sólida (SPE) em amostras de plasma sanguíneo [47], QuEChERS em camarão, carne, mexilhões, ostras, ouriço do mar e peixe [48].

Estas técnicas estão relacionadas à análise de HPA em amostras ambientais, possuem vantagens em termos de tempo e consumo de solventes, quando comparada a extração por Soxhlet, embora para amostras que contém compostos lipídicos seja necessário uma etapa de limpeza para eliminar os interferentes, dentre eles os ácidos graxos, que ainda persistem no substrato.

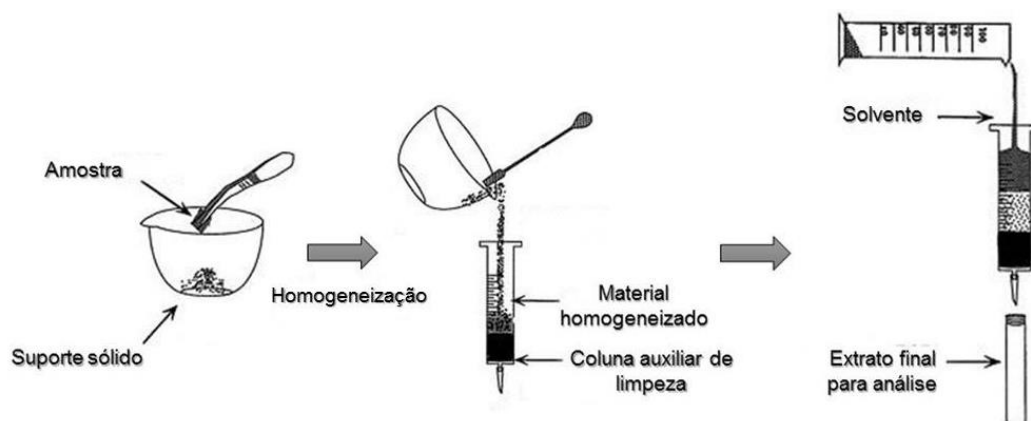
1.5.1 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

A fim de minimizar os custos operacionais e tempo de análise, a técnica introduzida por Barker e colaboradores em 1989, denominada de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), aplicada em amostras biológicas, proporciona a extração utilizando volumes de solventes inferiores a técnica de extração por Soxhlet, sem a necessidade de uma etapa posterior de limpeza como é utilizado nas técnicas de extração em fase sólida, PLE, ultrassom, micro-ondas e QuEChERS [49, 50]. Este método têm sido eficiente na análise de vários compostos em uma ampla variedade de matrizes [11, 51, 52].

O princípio que constitui o processo de MSPD consiste em misturar a matriz em um suporte sólido até completa homogeneização [53]. Este processo produz forças que rompem a arquitetura da amostra, sendo esta dispersa sobre a superfície do material através de interações hidrofóbicas e hidrofílicas dos vários componentes que constituem a matriz [10, 54]. Em seguida, essa mistura é transferida para uma coluna para posterior eluição com solvente apropriado. A adição do eluente tem a função de solubilizar os analitos de interesse e retirá-los do material da coluna por fluxo gravitacional à pressão atmosférica ou com a ajuda de vácuo para reduzir o tempo de extração [55].

Segundo Baker e colaboradores (2000), a hipótese é de que as membranas celulares possam ser rompidas através da solubilização dos componentes lipídicos no material adsorvente, possibilitando o rendimento da extração [53]. Em síntese, o procedimento de extração por MSPD é governado pelos fenômenos de sorção entre analitos, amostra, adsorvente e solvente de eluição [56]. O esquema básico para o preparo de amostras por MSPD aparece na Figura 6.

Figura 6 – Procedimento de extração por MSPD. **Fonte:** Adaptado de Barker, [10].



Algumas considerações devem ser feitas durante o desenvolvimento de método de extração envolvendo a MSPD, entre elas estão: características do suporte sólido, proporção entre massa do suporte e quantidade de amostra, tempo empregue no processo de dispersão da amostra sobre o agente dispersante e características do solvente de eluição [10].

Para a relação entre massa da amostra e suporte sólido, segundo Barker (2000), geralmente, cerca de 0,5g de amostra é disperso com o suporte sólido, na proporção de 1:1 a 1:4 com algumas exceções [53]. Embora a proporção de 1:4 seja a mais comum, está ainda pode ser otimizada em função da complexidade da amostra ou das características físico-químicas do material [54 - 56].

A definição do tempo que a amostra entra em contato com o suporte sólido é fixada com o intuito de permitir maior interação do analito com o adsorvente; geralmente até o material homogeneizado apresentar aspecto pulverulento [56]. Esse período pode variar de 30 segundos a 15 minutos, dependendo das características da amostra e da proporção entre a massa da amostra e suporte sólido [57, 58].

Para o solvente de eluição, este deve possuir força eluotrópica próxima a dos analitos e distintas dos interferentes que compõe a matriz. Isto pode garantir a dessorção total dos analitos e quando associado com a coluna auxiliar de limpeza, pode permitir o mínimo de interferentes no extrato final.

Tal versatilidade tem impulsionado o desenvolvimento de materiais alternativos para serem utilizados como agente dispersante em metodologias de preparo de amostra que fazem o uso da técnica MSPD. Entre eles, materiais a base de carbono, materiais híbridos a base de sílica, polímeros molecularmente impressos e líquidos iônicos [59 – 61]. Bem como a união desta técnica de extração com outras, para aumentar o rendimento do processo [62 - 64].

O procedimento de extração por MSPD, assim com os outros métodos de extração empregados no preparo de amostras orgânicas apresentam algumas desvantagens como, impossibilidade de automação do processo e a reprodução inter-laboratorial [11, 56]. A Tabela 4 apresenta algumas das aplicações da MSPD.

Tabela 4 - Aplicações da MSPD para extração de HPA e outras classes de compostos em uma variedades de matrizes.

Classe de Compostos	Matriz	Adsorvente	Massa da amostra	Solvente de eluição	Limpeza	Análise	Ref.
6 HPA	Peixe	C ₁₈ - 2,0 g + Na ₂ SO ₄ - 0,5 g	0,6 a 0,8 g	ACN – 10 mL	2 g Florisil + 1 g C ₁₈	HPLC/f luoresc ência	[63]
8 HPA	Bivalves	C ₁₈ - 0,4 g	0,1 g	ACN – 1,2 mL	Florisil	HPLC/f luoresc ência	[64]
27 HPA	Lodo de esgoto	Alumina - 3 g	2: 3*	DCM – 15 mL	C ₁₈	GC/M S	[65]
19 HPA	Musgo	C ₁₈ - 0,5 g	0,25 g	10 mL de H +10 mL DCM: H (20:80)	Florisil – 1 g + 0,5 g de Na ₂ SO ₄	PTV-GC-MS / MS	[66]
Multiresíduos incluindo 15 HPA	Molusco	Florisil - 0,3 g	0,3 g	DCM – 25 mL	Sílica desativada – 0,6 g Ativada – 4,0 g	GC-MS / MS	[67]
16 HPA	Solo	Florisil - (1 g)	1: 2*	Hexano/acetona (50:50) 6 mL	Florisil + sílica	UV-vis/ fluores cência	[68]

HPA	Poeira domiciliar	Florisil -1,4857 g	0,5 g	Acetona/hexano (82:18) 12 mL	C ₁₈ - 0,5143 g	LC-UV-DAD; GC/MS	[69]
PCBs e Pesticidas	Tecido de pulmão humano	Florisil – 2 g + 2 g de Na ₂ SO ₄	0,5 g	Hexano/DCM (11:89) 15,45 mL	Florisil - 1,5401 g	LC-ESI-MS / MS	[60]
Conservantes	Frutos do mar	Florisil 1 g + 0,5 g de Na ₂ SO ₄	0,5 g	ACN – 12 mL	Sílica + C ₁₈ (9:1) – 1,5 g	GC-MS	[70]
Pesticidas	Ovo	Florisil – 1,5 g	0,25 g	ACN – 10 mL	C ₁₈ – 0,5 g	GC-MS	[71]
Pesticida	Fruta (Açaí)	Alumina 3,0 g	1,0 g	Ciclo-hexano / acetato de etilo (1:1) – 20 mL	-	HPLC / UV-DAD	[72]
PCBs	Molusco	Sílica – 1,2 g	0,5 g	ACN – 10 mL	C ₁₈ – 3 g	GC-MS/MS	[73]
Metrafenona	Vegetais	Alumina e sílica	8,0 g	DCM –120 mL	Florisil 0,1 g	GC-MS	[74]
Desreguladores endócrinos	Tecido (Placenta humano)	Sílica – 0,75 g	0,25 g	Metanol – 12,5 mL	PSA – 0,75 g	HPLC / UV	[61]

* – Proporção entre massa da amostra e suporte sólido; ACN - Acetonitrila; DCM – Diclorometano; PSA – Amina Poli secundária.

1.6 Validação de método analítico

A validação de métodos analíticos consiste em um conjunto de procedimentos que asseguram que o método proporcione resultados confiáveis e precisos, atendendo preceitos das legislações vigentes. No Brasil as agências ANVISA e INMETRO sugerem que os parâmetros avaliados sejam linearidade, sensibilidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez [75, 76].

A linearidade é definida como a capacidade de um método responder de forma linear em intervalos de concentrações pré-determinados [75]. Para o estudo da linearidade, faz-se necessário a confecção de uma curva analítica, possuindo no mínimo cinco pontos que devem cobrir uma faixa de 50 a 150% do valor que se espera encontrar no estudo [77].

A sensibilidade de um método corresponde a capacidade que o mesmo possui em discriminar concentrações muito próximas de um analito. A sensibilidade pode ser determinada por meio do coeficiente angular da reta. O valor do ângulo encontrado pode ser utilizado para estimar o quão sensível é um método, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método [78].

Para que um método possa ser considerado seletivo, ele deve ser capaz de distinguir de maneira inequívoca os analitos de outras substâncias, que possam interferir em sua determinação [78].

O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato [79]. Enquanto que, o limite de quantificação (LQ) corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada [79].

A exatidão do método analítico é conceituada como sendo o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado experimento e um valor de referência considerado como verdadeiro [77]. A precisão pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade [79]. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos;

ensaios de recuperação e adição padrão [78]. Já a precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expresso através do desvio padrão e/ou coeficiente de variação (usualmente expressos em %) (INMETRO).

A robustez pode ser definida como a capacidade da resposta de um método já validado permanecer inalterada frente a alterações mínimas. Estas variações podem ser ocasionadas por erros aleatórios e sistemáticos que constituem um procedimento [79].

1.7 Planejamento Fatorial

Quando um procedimento apresenta um conjunto de variáveis que possam influenciar nos resultados, um planejamento experimental pode ser adotado com intuito de obter as condições ótimas de um processo e o máximo de informações a respeito do sistema em estudo [80, 81].

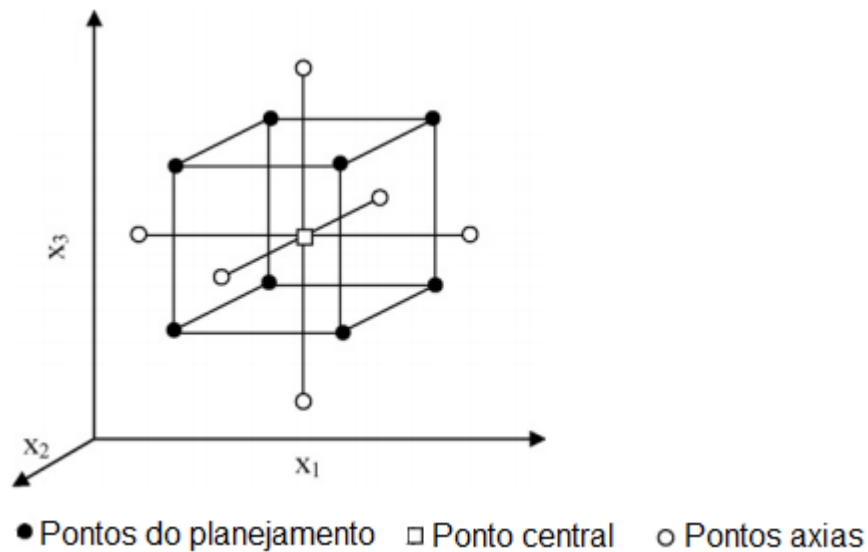
Para que a análise multivariada possa ser utilizada é necessário determinar as variáveis assim como seus respectivos níveis, avaliar a relação custo benefício, escolher que tipo de planejamento deve ser utilizado e os efeitos de suas interações na resposta do processo [81]. Após a definição destes pontos, o planejamento experimental é posto em prática.

A metodologia de superfície de resposta está entre as técnicas multivariadas mais relevantes utilizadas na otimização analítica. Considerada uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, capaz de fazer previsões estatísticas a partir de um conjunto de dados. O objetivo é otimizar simultaneamente os níveis das variáveis para obter o melhor desempenho do sistema [82].

Alguns estudos que foram desenvolvidos a partir da análise multivariada, utilizando planejamentos experimentais, entre eles o fatorial completo, Box-Behnken, Matriz Doehlert, Simplex e planejamento com pontos centrais [70, 84 – 87]. Destacaremos aqui o planejamento em dois níveis com pontos centrais mais a função de ortogonalidade, permitindo desta forma a determinação de modelos lineares e quadráticos. Desenvolvido originalmente por Box e Wilson [88] e melhorado por Box e Hunter [89]. O número de ensaios

exigidos para esse tipo de planejamento inclui o fatorial padrão de 2^k com a sua origem no centro, pontos fixados axialmente a uma distância α do centro para gerar os termos quadráticos [89] (Figura 7).

Figura 7 – Representação cúbica da distribuição dos pontos de um planejamento 2^3 com ponto central mais seis pontos axiais. **Fonte:** Bezerra, 2008 [90].



Réplicas no ponto central do planejamento são necessárias, pois permitem estimar a variância do erro experimental, além da possibilidade de investigar a adequabilidade do modelo ajustado. Os pontos axiais são escolhidos de tal forma que permitem a rotação [89], o que garante que a variância da predição do modelo é constante em todos os pontos equidistante do centro do planejamento (Figura 7).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Até o presente momento não há relato na literatura de trabalhos que fazem o uso das técnicas dispersão da matriz em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para determinação dos 16 HPA considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA em camarão. Deste modo, esta revisão apresenta alguns estudos que utilizaram a MSPD como técnica de extração em matrizes ambientais, bem como a utilização de outras técnicas para determinação dessa classe de compostos em camarão.

Pensado *et al.*, 2005 [63], realizaram a extração de HPA por MSPD em tecido de peixe. Eles utilizaram 0,6-0,8 g de amostra dispersa em 2,0 g de C₁₈ e sulfato de sódio anidro que em seguida puseram em um cartucho que continha 2,0 g de florisil e 1,0 g de C₁₈ que atuaram como coluna auxiliar de limpeza. Em seguida o material foi eluído com 10 mL de acetonitrila. Este método apresentou recuperações acima de 80% para os compostos analisados [63].

Campíns-Falcó *et al.*, 2008, extraíram HPA de mexilhões utilizando MSPD, onde 100 mg da amostra liofilizada foi homogeneizada com 0,4 g de C₁₈ e transferida para um cartucho que continha 0,1 g de florisil, e em seguida eluída com 1,2 mL de acetonitrila, obtendo recuperações na faixa de 52-100% [64].

Sánchez-Brunete e colaboradores (2007) desenvolveram um método de extração empregando a MSPD assistida por ultrasson para determinação de 27 HPA em lodo de esgoto. O método consistiu na dispersão de 3 g da amostra liofilizada com 2 g sulfato de sódio anidro, posteriormente o material foi transferido para uma coluna de vidro de 5 ml. Os HPA foram eluídos duas vezes com 6 ml de diclorometano. Os extratos foram concentrados até aproximadamente 0,5 ml e diluídos com acetonitrila até 2 ml, em seguida transferido para uma coluna de vidro de 5 ml, contendo 2 g de C₁₈ e eluídos com 10 mL de acetonitrila, o método rendeu recuperações entre 85 e 105% [65].

Conha-Graña *et al.*, (2015) desenvolveram e validaram um método de extração por MSPD para a determinação de HPA em musgo. O

procedimento consistiu na dispersão de 0,25 g de amostra com 0,5 g de C₁₈, durante 3 min. Em seguida o material disperso foi transferido para um cartucho contendo 1,0 g de florisil e 0,5 g de sulfato de sódio anidro, sendo eluidos com 10,0 mL de hexano e 10,0 mL de hexano-diclorometano (2:8). Esse método possibilitou recuperações que variou de 77 a 116% [66].

Ziarrusta e colaboradores (2015) utilizaram a MSPD para extração de HPA em molusco. O procedimento consistiu na homogeneização de 0,3 g da amostra liofilizada com 0,3 g de florisil durante 2 minutos em um almofariz. Posteriormente o material homogeneizado foi transferido para uma seringa de vidro de 10 mL, preenchida com 4,6 g de sílica, das quais 0,6 g eram desativadas, que atuaram como coluna auxiliar de limpeza. Posteriormente, a eluição foi realizada utilizando 25,0 mL de diclorometano e o extrato foi seco utilizando fluxo de N₂ e reconstituído até um volume final de 140 µL em n-hexano [67].

Pena *et al.*, 2007, utilizaram as técnicas de MSPD - UVVis/DAD para determinação de HPA em amostras de solo. Em condições otimizadas foram utilizadas 0,5 g da amostra liofilizada, utilizando em 1,0 g de florisil para promover o rompimento da arquitetura da amostra; 0,5 g de florisil e 0,5 g sílica como coluna auxiliar de limpeza, sendo necessários 6,0 mL de uma mistura hexano-acetona (1:1) como solvente de eluição. Este procedimento rendeu recuperações que variaram de 94,3 e 103,9% [68].

Carls e colaboradores (2016) aplicaram um método baseado em extração acelerada por solvente para determinação de HPA e HA em três espécies de camarão. Os extratos foram separados em frações alifática e aromática em uma coluna contendo 20 g de sílica gel desativada a 5% sobre 10 g de alumina desativada a 2%. Os compostos aromáticos foram eluidos com 250 ml de uma mistura 1:1 de pentano e diclorometano. Em seguida purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, equipada com colunas por exclusão por tamanho. Os limites de quantificação foram 0,3 ng g⁻¹ (peso seco). A precisão das análises foi de aproximadamente 15%. A exatidão expressa como coeficiente de variação ficou entorno de 30%. As recuperações dos padrões sub-rogados foram, em média, 60% [48].

Um método baseado na suspensão da amostra com acetato de etila em meio aquoso foi empregado por Dosunmulin e colaboradores (2016) para determinação de HPA em amostras de camarão. Em resumo, adicionaram-se 5 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila e 10 g de amostra de camarão liofilizada e homogeneizada. Para o procedimento de limpeza utilizou-se uma mini coluna composta por 1g de sílica e sulfato de sódio, condicionada com 14 mL de n-hexano:diclorometano (3:1, v/v), seguido por 12 mL de hexano. Este procedimento rendeu recuperações de 60-130%, com coeficientes de variação inferiores a 20%; exceto para o naftaleno que apresentou 48% de recuperação e desvio padrão de 22% [44].

Zhang *et al* 2015, utilizaram a técnica de extração por ultrassom para avaliação da contaminação por HPA em organismos marinhos, entre eles camarões. Dois gramas de amostra liofilizada foi submetida ao processo extração duas vezes por ultrassom, cada uma delas com o tempo de 30 min com 30 mL de hexano e diclorometano (1:1, v/v) a 30°C. O procedimento de limpeza foi feito através de uma coluna de sílica gel, logo após foram eluidos com 50 ml de hexano/diclorometano (1:1, v/v). Este método rendeu recuperações 68-96% para amostras de biota, os limites de detecção e quantificação foram de 0,02-2,0 ng g⁻¹(peso seco) [7].

O método de extração por Soxhlet foi utilizado por Jaward e colaboradores (2012), para extração de HPA em camarões. As amostras foram liofilizadas, em seguida, submetidas ao processo de extração com n-hexano. A limpeza foi realizada empregando cromatografia em coluna utilizando 10 g de sílica e 5 g de alumina (e 0,5 cm de Na₂SO₄). A eluição foi feita com 100 mL de uma mistura 1:1 de n-hexano/DCM. Os extratos foram purificados por cromatografia de permeação em gel utilizando 6 g de Biobeads SX 3. Este método proporcionou recuperações que variaram de 68 a 112% (média 102%), LD= 0,4 a 3 ng g⁻¹ para todos HPA (peso húmido) [91].

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Desenvolver um método analítico para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em camarão empregando dispersão da matriz em fase sólida com análise por GC-MS.

3.2 Específicos:

- Avaliar entre os solventes hexano, diclorometano e acetonitrila qual é o mais adequado para extração de HPA em camarão;
- Determinar entre os materiais sílica, florisil® e alumina neutra, qual é o mais indicado para compor a coluna auxiliar de limpeza.
- Avaliar a eficiência dos materiais sílica, florisil® e alumina neutra como agente dispersante;
- Otimizar variáveis: massa do adsorvente, tempo de homogeneização e volume do solvente empregando análise multivariada;
- Validar o método analítico;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de camarão provenientes de diferentes regiões do estado de Sergipe.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Coleta, conservação e preparo das amostras

As amostras utilizadas foram oriundas dos locais: Mercado Municipal Albano Franco (amostra para desenvolvimento e validação do método - AM), Nossa senhora do Socorro (amostra aplicação - A1), Ponta do Mangue (amostra aplicação - A2), Calumbi (amostra aplicação - A3) e Coqueiral (amostra aplicação - A4). Logo após, foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes – LCP, onde foram trituradas durante 1 minuto e 30 segundos em um liquidificador comercial, armazenadas em recipientes de alumínio e colocadas em ultrafreezer (UFR30 Liotop) a -78 °C durante 3 horas.

Em seguida, foram submetidas ao processo de liofilização em um Liofilizador L101 (Liotop) durante 52 horas. Após esse período, foram dispersas com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana e levadas a um moinho de esferas (Retschs PM 100), onde foram trituradas durante 5 minutos com inversão de sentido na metade desse tempo, a 400 rpm.

4.1.1 Teor de umidade e carga orgânica da amostra

Para a avaliação do teor de umidade foi realizado o seguinte procedimento: diferentes quantidades de camarão foram pesadas, postas em recipientes de alumínio, levadas ao ultrafreezer a -78 °C durante três horas e submetidas ao processo de liofilização durante 52 horas. O cálculo do teor de umidade feito com base na equação 1:

$$\text{Teor de umidade} = \frac{\text{Massa final} \times 100}{\text{Massa inicial}} \quad (\text{eq. 1})$$

Já a carga orgânica total da amostra, definida neste estudo como a quantidade de lipídios extraíveis com solvente orgânico, foi determinada por análise gravimétrica, onde 3g de camarão liofilizado foram eluidos com auxílio de um *manifold* com 48 mL de diclorometano, o eluato recolhido em um balão de 50 mL previamente pesado. O teor de carga orgânica foi determinado com base na equação 2.

$$Carga\ orgânica\ extraível = \frac{Massa\ final\ do\ balão - Massa\ inicial\ do\ balão}{Massa\ da\ amostra\ (mg)} \quad (eq. 2)$$

4.2 Limpeza dos materiais

Todas as vidrarias e materiais empregados no desenvolvimento deste trabalho foram limpos em solução de detergente, onde permaneceram durante aproximadamente 12 horas. As vidrarias de menor volume foram levadas ao ultrassom durante 25 min, em seguida enxaguadas e lavadas com água corrente e destilada, levadas a estufa para secagem a 70 °C durante 3 horas (exceto as vidrarias calibradas) em seguidas foram retiradas e lavadas com hexano grau HPLC. Todos os materiais tiveram suas extremidades envolvidas com papel alumínio previamente calcinadas a 400 °C durante 4 horas, colocados em recipientes com tampa e guardados em um local destinado para esse fim.

4.3 Descarte dos resíduos

Todos os resíduos gerados durante o desenvolvimento dos trabalhos analíticos foram armazenados em recipientes (vidro para líquidos e galões de plástico para sólidos) identificados e alocados em um abrigo temporário até o momento da coleta.

4.4 Padrões Analíticos

Foi utilizada uma solução padrão contendo 16 HPA considerados prioritários (EPA) naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluorantreno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno adquirido da Sigma Aldrich (USA) em concentração de 100 µg mL⁻¹ dissolvido em diclorometano. uma mistura de 5 HPA (padrões sub-rogados) (AccuStandard, EUA) na concentração de 4000 µg mL⁻¹ dissolvidos em hexano e uma solução utilizada como padrão interno (PI) contendo p-terfenil d14 (Sigma Aldrich) na concentração 2000 µg mL⁻¹ dissolvido em hexano.

Para a quantificação dos HPA, as soluções citadas anteriormente foram diluídas para dar origem as soluções de trabalho: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução conjunta dos HPA; 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução do PI e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução dos padrão sub-rogados.

4.5 Adsorventes e solventes utilizados

Os solventes utilizados foram acetonitrila, diclorometano e hexano, todos com grau HPLC da marca TEDIA. Já os adsorventes foram Florisil® 100-200 mesh (Sigma–Aldrich), C₁₈ 50 μm (Sigma–Aldrich), sílica-gel 60 (70-230 mesh, Êxodo científica, Brasil) e alumina neutra (70-270 mesh, Sorbtech, Sorbent Technologies, EUA). Todos os adsorventes foram calcinados a 400 °C durante 4 horas com intervalos regulares de quinze dias.

4.6 Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu, AY220); Banho ultrassônico (Unique, 1400); Centrífuga (EEQ-9904/A); Ultra-freezer UFR30 (Liotop); Liofilizador LJJ04 (JJ Científica); Moinho de esferas (Retsch PM 100); Evaporador rotatório (Fisaton-801); Bomba de vácuo (Fanem 089-CAL); Sistema para SPE *vacuum manifold* (Varian, Walnut Creek, EUA); Mufla (TC45); Cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo GC-2010Plus, acoplado ao espectrômetro de massas modelo TQ-8040. Injetor AOC5000Plus e coluna capilar SLB - 5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano; 30 m; 0,25 mm de diâmetro 0,25 μm ; Supelco, EUA).

4.7 Parâmetros Cromatográficos

A análise dos HPA foi realizada com auxílio de um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo GC-2010Plus, acoplado ao espectrômetro de massas modelo TQ-8040. Injetor AOC5000Plus e coluna capilar SLB - 5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano; 30 m; 0,25 mm de diâmetro 0,25 μm ; Supelco, EUA). Para a identificação e quantificação dos

analitos foram empregadas condições de análise já em uso no LCP, conforme apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas para análise dos HPA

Parâmetros	Condição
Temperatura do injetor (°C)	280
Temperatura da interface (°C)	280
Fonte de íons (°C)	280
Modo de injeção	Splitless por 1 min
Volume de injeção (µL)	1,0
Gás de arraste	Hélio (99,999%)
Vazão do gás de arraste (mL min ⁻¹)	1,0
Modo de operação do espectrômetro de massas	Modo SIM
Programação da temperatura	40 °C (1min), 15 °C min ⁻¹ até 120 °C, 20° min ⁻¹ até 170 °C, 5° min ⁻¹ até 250 °C, 15 °C min até 300 °C (7min).

Os HPA, surrogates e PI foram divididos em cinco grupos, cada um deles correspondente a um surrogate, sendo identificados pelos íons de identificação e quantificação, além do tempo de retenção (Tabela 6), através de análises realizadas no modo de monitoramento de íon seletivo (SIM).

Tabela 6 – Tempo de retenção (Tr) e m/z para identificação e quantificação dos HPA e seus respectivos padrões sub-rogados.

Composto	Tr (min)	Íon de identificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)	Íon de quantificação (m/z)
<i>Naftaleno-d8*</i>	8,390	136	137	136
Naftaleno	8,423	128	127	128
Acenaftileno	10,885	152	151	152
<i>Acenaftileno-d10*</i>	11,147	164	162	162
Acenafteno	11,210	154	153	153
Fluoreno	12,335	166	165	165
<i>Fenantreno-d10*</i>	14,945	188	184	188
Fenantreno	15,021	178	176	178
Antraceno	15,180	178	179	178
Fluoranteno	19,390	202	200	202
Pireno	20,290	202	200	202
<i>p-terfenil-d14 (PI)*</i>	21,180	244	243	244
Benzo[a]antraceno	25,550	228	226	228
<i>Criseno-d12*</i>	25,585	240	236	240
Criseno	25,685	228	226	228
Benzo[b]fluoranteno	28,665	252	250	252
Benzo[k]fluoranteno	28,730	252	250	252
Benzo[a]pireno	29,455	252	250	252
<i>Perileno-d12*</i>	29,455	264	260	264
Indeno[1,2,3-cd]pirileno	32,692	276	274	276
Dibenzo(a,h)antraceno	32,776	278	279	278
Benzo[ghi]perileno	33,605	276	274	276

*Padrões marcados isotopicamente (surrogates);

4.8 Ensaios de Recuperação

Para avaliação da eficiência do método de extração, foram adicionados a amostra 50 µL da solução conjunta dos HPA (1 µg mL⁻¹) e ao fim do procedimento de extração foram adicionados 50 µL da solução do PI (0,5 µg mL⁻¹). Essa amostra foi denominada de amostra extraída. Os testes foram realizados em triplicata.

O cálculo da recuperação foi realizado por meio da razão de área dos analitos presentes na amostra extraída pelo PI, dividida pela razão de área dos analitos pelo PI presentes na solução de comparação no extrato da matriz, a qual corresponde a 100% da concentração dos analitos, conforme apresentado na equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\frac{\text{Amostra Extraída}}{\text{PI}}}{\frac{\text{solução de comparação no extrato da matriz}}{\text{PI}}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

4.9 Otimização empregando análise Multivariada

Com o propósito de otimizar de forma multivariada as condições de extração empregando a dispersão da matriz em fase sólida, foram selecionados três variáveis que podem influenciar no desempenho do processo de extração, massa do adsorvente, tempo de homogeneização e volume do solvente (Tabela 7).

Tabela 7 – Variáveis e respectivos níveis empregados para otimização do método usando planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
M.ad = Massa do adsorvente (g)	0,65	1,00	1,50	2,00	2,35
T h = Tempo de homogeneização (s)	50,0	90,0	150,0	210,0	252,0
Vs = Volume do solvente (mL)	4,00	5,50	8,00	10,50	12,00

Definidas as variáveis, o próximo passo foi construir a matriz de planejamento correspondente ao planejamento fatorial completo, composto por três fatores e dois níveis 2³ com triplicata no ponto central (0), mais seis pontos

axiais (- α ; + α), esta que foi gerada a partir da versão teste do software *Statistica 7.0*. O número de experimentos, designação dos fatores e seus respectivos níveis estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz do planejamento 2^3 com triplicata no ponto central incluindo os valores reais e codificados para cada uma das variáveis.

	Massa do adsorvente (M.ad, g)	Tempo de homogeneização (Th, s)	Volume do solvente (Vs, mL)
Experimentos	Real/Codificado	Real/Codificado	Real/Codificado
1	1 (-1)	90 (-1)	5,5 (-1)
2	2 (1)	90 (-1)	5,5 (-1)
3	1 (-1)	210 (1)	5,5 (-1)
4	2 (1)	210 (1)	5,5 (-1)
5	1 (-1)	90 (-1)	10,5 (1)
6	2 (1)	90 (-1)	10,5 (1)
7	1 (-1)	210 (1)	10,5 (1)
8	2 (1)	210 (1)	10,5 (1)
9	1 (0)	150 (0)	8,0 (0)
10	1 (0)	150 (0)	8,0 (0)
11	1,5 (0)	150 (0)	8,0 (0)
12	0,65 (-1,68)	150 (0)	8,0 (0)
13	2,35 (1,68)	150 (0)	8,0 (0)
14	1,5 (0)	50 (-1,68)	8,0 (0)
15	1,5 (0)	252 (1,68)	8,0 (0)
16	1,5 (0)	150 (0)	4,0 (-1,68)
17	1,5 (0)	150 (0)	12,5 (1,68)

Os ensaios foram realizados em grupos e de forma aleatória. A quantificação foi realizada a partir de uma solução de comparação no extrato da matriz correspondente a cada ensaio. Em cada conjunto de experimentos foi realizado um branco do método para garantir o controle de qualidade

4.10 Ensaios de Validação

4.10.1 Linearidade e Sensibilidade

A linearidade foi avaliada por meio de diluições da solução conjunta dos HPA e outra contendo os surrogates, ambas na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 9). Estas diluições resultaram em soluções com concentrações iguais a 5, 10, 25, 50 e 100 ng mL^{-1} , as quais foram adicionadas $25 \mu\text{L}$ do padrão interno na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram injetadas e quantificadas através da razão de área de cada um dos analitos pelo padrão interno.

A sensibilidade foi avaliada através do coeficiente angular da reta, o qual indica que quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método para o analito. As curvas analíticas para cada um dos compostos foram obtidas com o auxílio do Software Microsoft Excel.

Tabela 9 – Preparo da curva analítica no extrato da matriz no intervalo de 5 a 100 ng g^{-1} , com volume final correspondente a 1 mL.

Pontos da Curva ng mL^{-1}	Padrão Interno $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volume μL	Solução conjunta dos HPA $[\mu\text{g mL}^{-1}]$	Volume μL	Solução dos padrões sub-rogados $[\mu\text{g mL}^{-1}]$	Volume μL
5	0,5	50	0,5	10	0,5	10
10	0,5	50	0,5	20	0,5	20
25	0,5	50	1,0	25	1,0	25
50	0,5	50	1,0	50	1,0	50
100	0,5	50	1,0	100	1,0	100

4.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação.

Estes parâmetros foram determinados através da relação sinal/ruído do equipamento. Para o limite de detecção foi realizada diluições do primeiro ponto da curva preparado no extrato da matriz, até ser atingida uma concentração que fosse possível obter o sinal do analito três vezes maior que o ruído gerado pelo equipamento. O limite de quantificação foi estabelecido como uma concentração que gerasse um sinal dez vezes maior que o ruído.

4.10.3 Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada através da análise em triplicata de amostras de camarão fortificadas em três níveis de concentração (10, 25 e 50 ng g⁻¹), contemplando o intervalo da curva linear de trabalho, como proposto pela ANVISA [75]. A precisão foi determinada em condições de repetibilidade, sendo realizadas extrações em três níveis de fortificação, interdía e intradía, conforme Tabela 10. A precisão foi avaliada por meio do coeficiente de variação (C.V).

Tabela 10 – Avaliação da precisão e seus respectivos níveis de fortificação utilizados em cada dia.

	1º Dia	2º Dia	3º Dia
Nível de fortificação	10 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹
	25 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	25 ng g ⁻¹
	25 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹

4.10.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção dos 16 HPA e os cinco padrões sub-rogados de duas soluções, sendo uma com matriz (50 ng g⁻¹) e outra na ausência da matriz (50 ng mL⁻¹) em hexano, ambas injetadas no modo SIM.

4.10.4.1 Avaliação de Efeito Matriz

O efeito matriz (EM) foi avaliado por comparação das áreas dos picos dos compostos presentes no extrato da matriz pós-extração, com as áreas dos picos correspondentes em uma solução preparada na ausência da matriz, conforme apresentado na equação 4, ambas em 100 ng g⁻¹. Quando o EM apresentar um valor maior que um, isto significa que há um aumento da resposta induzido pela matriz, caso o valor de EM seja menor que um, estará havendo redução da resposta [92 - 95].

$$EM = \frac{\text{Valor de area para o analito X no extrato da matriz}}{\text{Valor de area para o analito X na ausência da matriz}} \quad (\text{eq. 4})$$

4.10.5 Robustez

Pode ser definida como a capacidade da resposta de um método já validado permanecer inalterado frente a alterações mínimas provocadas durante o procedimento experimental. Estas variações podem ser ocasionadas por erros aleatórios e sistemáticos envolvidos no procedimento de preparo de amostra [83]. Esse parâmetro foi avaliado por meio das superfícies de contorno geradas a partir da análise multivariada descrita no tópico 4.9

4.11 Extração da amostra empregando MSPD

O procedimento de extração em condições otimizadas foi definido da seguinte forma: 0,5g de camarão liofilizado foi posta em uma almofariz e logo após foram fortificados com 50 µL da solução conjunta dos HPA (1 µg g⁻¹), 50 µL da solução contendo os padrões sub-rogados HPA (1 µg g⁻¹), permanecendo 30min em repouso para evaporação do solvente e interação dos analitos com a matriz. Posteriormente foi adicionado 1,5 g de alumina neutra, previamente calcinada a 400 °C (4h), a qual foi homogenizado durante 150 segundos com auxílio de pistilo. Para o empacotamento da coluna de vidro, a base foi preenchida com lã de vidro e 0,5 g do adsorvente C18, sendo este material condicionado com 2,0 mL de acetonitrila sem deixar secar. O homogeneizado

foi adicionado acima da coluna auxiliar de limpeza, sendo eluído com 8 mL de acetonitrila em um sistema para SPE Vacuum Manifold (Varian, Walnut Creek, EUA), o tempo de eluição variou entre 15 e 18 min. O extrato foi parcialmente seco em evaporador rotatório (Fisatom 802D, 60°C e 80 rpm), seco totalmente em fluxo brando de nitrogênio. Logo após, 50 µL da solução de padrão interno p-Terfenil D14 ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$) foi adicionado e o extrato reconstituído ao volume final de 1,0 mL em hexano, transferidos para frascos e posteriormente submetidos a análise por GC-MS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da metodologia de extração empregando dispersão da matriz em fase sólida

5.1.1 Seleção da coluna auxiliar de limpeza e solvente de eluição

Foram realizados ensaios apartir de adaptação feitas na metodologia descrita por Pensado e colaboradores (2005) e Concha-Graña et al 2015, ambas para determinação de HPA em biota empregando a MSPD. Assim, 0,5 g de C₁₈ foram utilizados como coluna auxiliar de limpeza; 0,5 g de camarão; 1 g de sílica (previamente calcinada a 400 °C, 4h) como agente dispersante, 1 minuto como tempo necessário para promover a dispersão (Figura 8) e 10 mL como o volume necessario para a eluição [63, 66]. A utilização da sílica neste momento, deve-se a maior disponibilidade deste material no laboratório.

Figura 8 – Aspecto pulverulento da amostra com o suporte solido após 1minto de homogeneização.



A seleção do solvente foi realizada com base na tonalidade do extrato obtido no final do procedimento de extração. Para tal, foram testados hexano, diclorometano e acetonitrila como solventes de eluição. Através da coloração dos extratos finais, foi possível perceber que a tonalidade do extrato tornava-se mais intensa a medida que a polaridade do solvente era reduzida, indicando

que a matriz é rica em compostos de baixa polaridade. Sendo a acetonitrila o solvente que proporcionou extratos mais limpos.

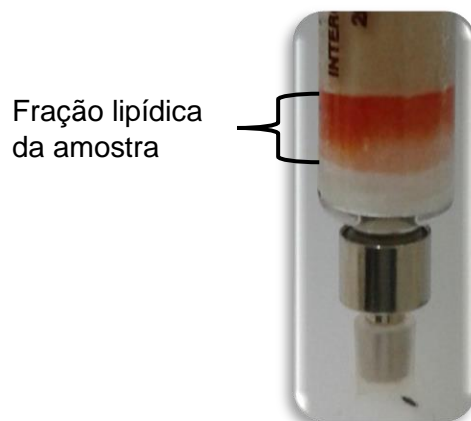
A capacidade da acetonitrila em eluir uma quantidade de interferentes inferior a hexano e diclorometano, foi também observada no trabalho de Sampaio, 2016 para extração de HPA em carangueijo [96]. Isto á classifica como um bom solvente de eluição para ser utilizado na extração de compostos em matrizes biológicas empregando a MSPD [63, 64, 70, 71, 73].

Foi avaliado outros materiais como constituintes da colula auxiliar de limpeza, entre eles C₁₈, Florisil, Alumina e silica; todos na quantidade de 0,5 g; assim com a combinação de cada um dos adsorventes 1:1 com o C₁₈. Entre os testes, a utilização de 0,5 g de C₁₈ apresentou os extratos mais limpos do ponto de vista visual. Foram testadas massas inferiores a 0,5 g, sendo constado a presença de extratos com tons amarelados, o que os torna inadequados para análise neste momento, sendo necessário um procedimento de limpeza posterior. Desta forma, foi definido a utilização de 0,5 g de C₁₈ como constituinte da coluna auxiliar de limpeza.

A existência de cor nos extratos é um dos indícios para a presença de alta carga orgânica na matriz, esta pode ser relacionada com a força eluotrópica do solvente (GARCÍA et al.,2009; [82]). A injeção desse tipo de extrato no sistema cromatográfico deve ser evitada, para que o mesmo não venha a comprometer o tempo de vida útil da coluna [63, 97].

Os principais fatores que viabilizaram a adoção da acetonitrila como solvente de eluição e C₁₈ como coluna auxiliar de limpeza foram a capacidade de interação entre a carga orgânica presente na matriz com o C₁₈ (Figura 9), impedindo que grandes quantidades de interferentes estejam presentes no extrato final [98]. Aliado com a baixa capacidade que a acetonitrila possui em dissolver gorduras de baixa polaridade ou proteínas polares [99]. Além disso, é esperado que a acetonitrila proporcione interações do tipo π quando em contato com os HPA.

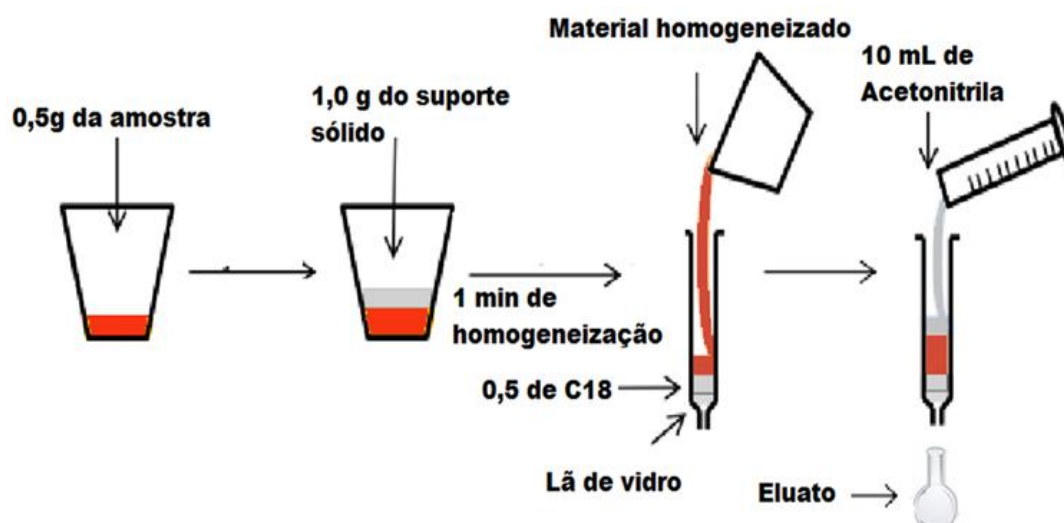
Figura 9 – Representação da capacidade de retenção da carga orgânica proporcionada pelo C₁₈, utilizando acetonitrila como solvente de eluição.



5.1.2 Seleção do suporte sólido

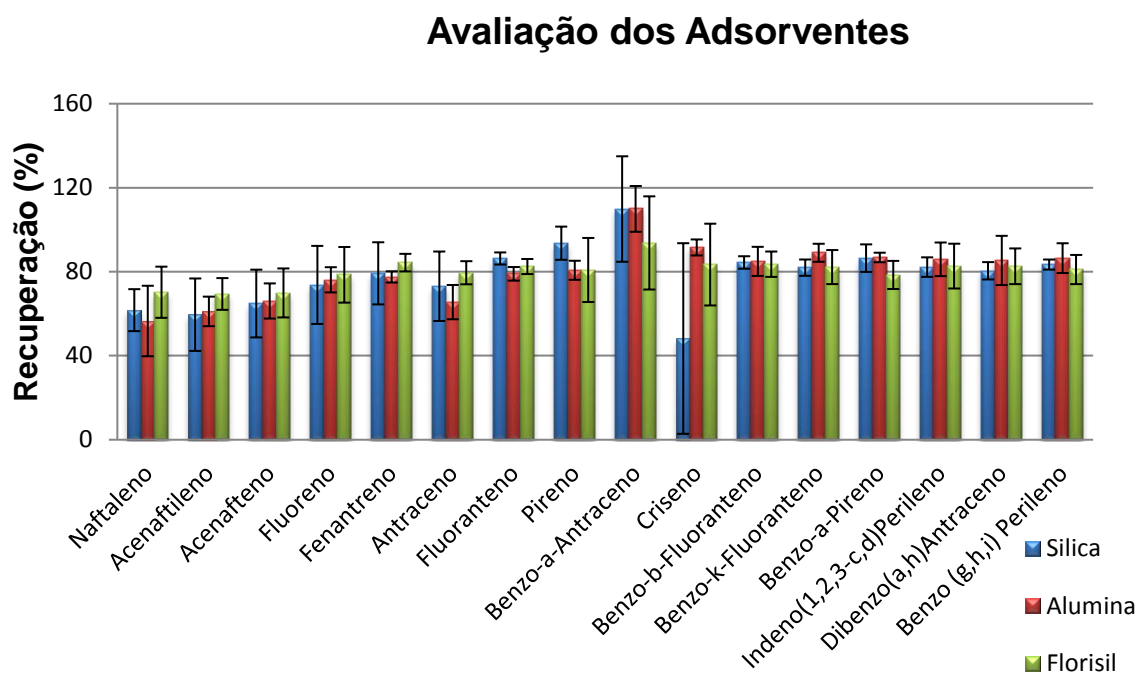
Os adsorventes avaliados neste trabalho foram sílica, alumina neutra e florisil. Esses materiais já foram utilizados na determinação de poluentes orgânicos em matrizes ambientais por meio da MSPD [65, 67, 69, 72 - 74]. O processo de extração empregado nesta etapa está resumido na Figura 10.

Figura 10 – Esquema do processo de MSPD.



O ensaio de recuperação pode ser considerado como o método mais utilizado para avaliação da eficiência de métodos analíticos, pois reflete a quantidade de analitos recuperados durante o processo, em relação a quantidade adicionada inicialmente na amostra [100]. O procedimento foi descrito no tópico 4.8 (Ensaio de Recuperação). As recuperações variaram de 60 a 110% com desvio padrão relativo de 2 a 45% para sílica, de 57 a 110% com desvio padrão relativo de 2 a 17% para alumina e de 69 a 94% com desvio padrão relativo que variaram de 4 a 22% (Figura 11). Os valores de recuperação estão apresentados no apêndice 1.

Figura 11 – Gráfico dos valores de recuperação e seus respectivos desvios padrão para os 16 HPA empregando sílica, alumina neutra e florisil como adsorventes.



Para decidir qual dos adsorventes apresentou maior desempenho, inicialmente foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados obedecem uma distribuição normal. O mesmo apresentou valor de P inferiores a 5% (0,05), sendo rejeitada a hipótese de normalidade.

Desta forma, foi utilizado o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, onde foi possível inferir que os adsorventes utilizados possuem a mesma

capacidade de extração, pois apresentaram valores de P ajustados de 0,8162, sendo superiores a 0,05; ou seja não apresentam diferença significativa.

Os três adsorventes avaliados apresentaram valores de recuperação estatisticamente equivalentes. Diante disto, foi preparado um extrato na matriz insento dos padrões correspondente a cada um dos adsorventes e injetados no modo Scan (Figura 12, Figura 13 e Figura 14). Dos quais a sílica apresentou perfil cromatográfico com maior número de picos (Figura 12), além de apresentar valores de desvios padrão relativos maiores. Deste modo está foi considerada inadequada.

Figura 12 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando sílica como adsorvente.

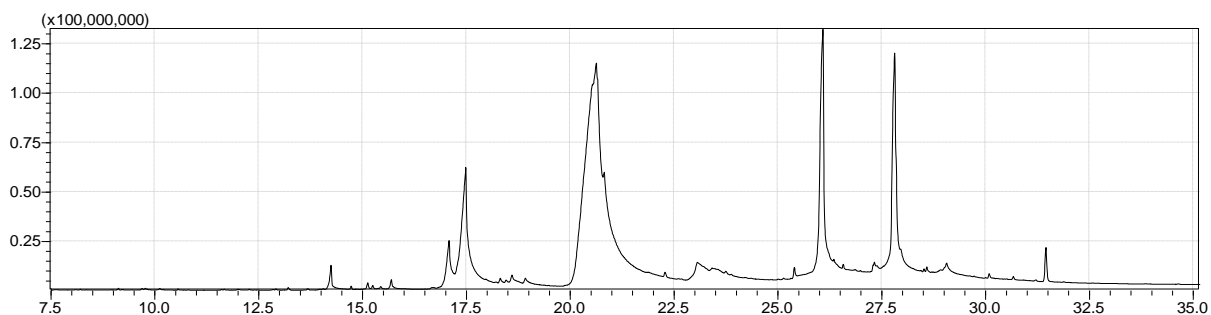


Figura 13 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando alumina como adsorvente.

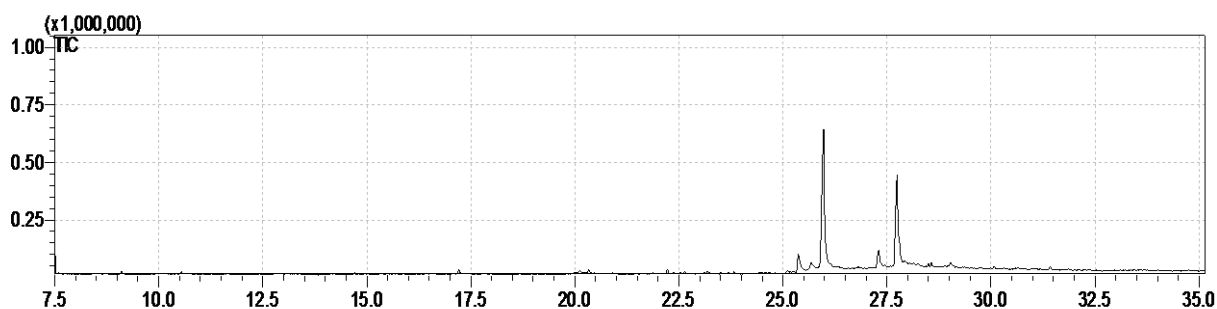
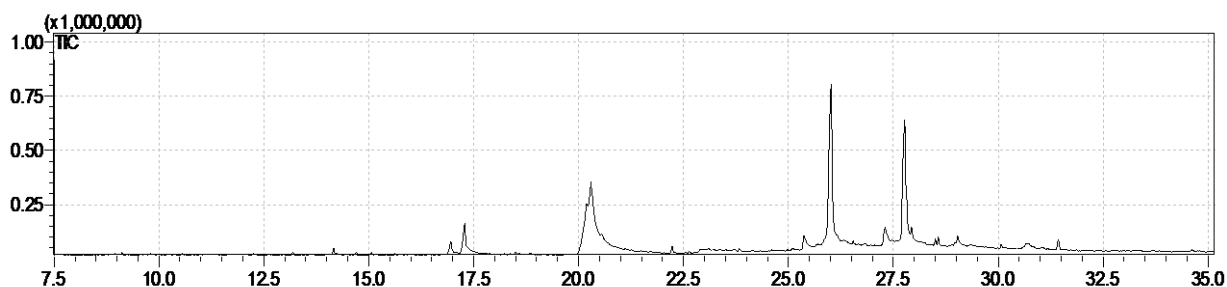
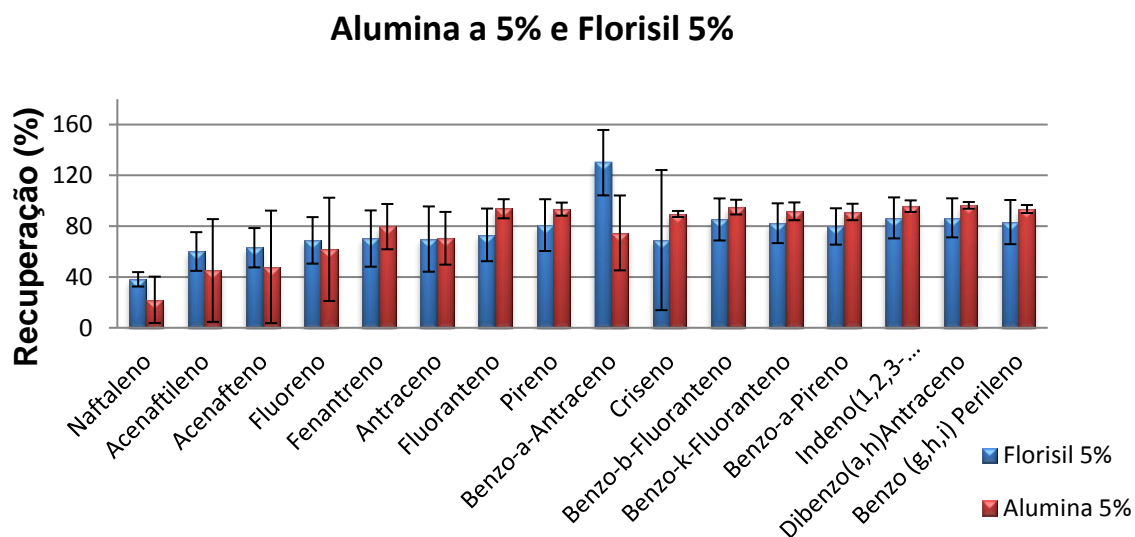


Figura 14 – Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando florisil como adsorvente.



Desta forma, foi avaliada a influência da desativação dos adsorventes alumina e florisil ambos com 5% de água. Os valores de recuperação (Figura 15) variaram de 22 a 96% com desvio padrão relativo de 3 a 44% para a alumina e de 38 a 130% com desvios padrão relativo de 6 a 55% para o florisil (Apêndice 2).

Figura 15 – Gráfico para os valores de recuperação (%) e seus respectivos desvios padrão para os 16 HPA empregando alumina neutra e florisil como adsorvente, desativados a 5% com água ultra pura.



O processo de desativação proporcionou o aumento no coeficiente de variação para o florisil e alumina. Já o perfil dos extratos (Figura 16 e Figura 17) apresentou variações mínimas, assim sendo, o processo de desativação não apresentou bons resultados nos valores de recuperação, sendo este descartado.

Figura 16 - Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando alumina como adsorvente, desativada a 5% com água ultra pura.

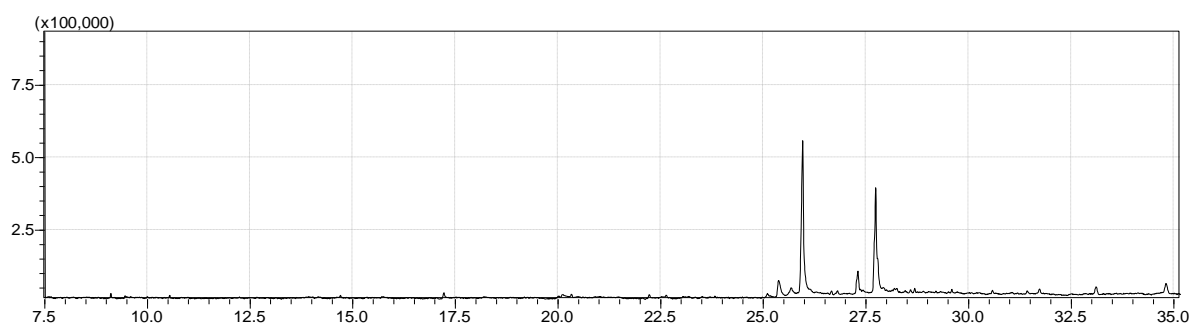
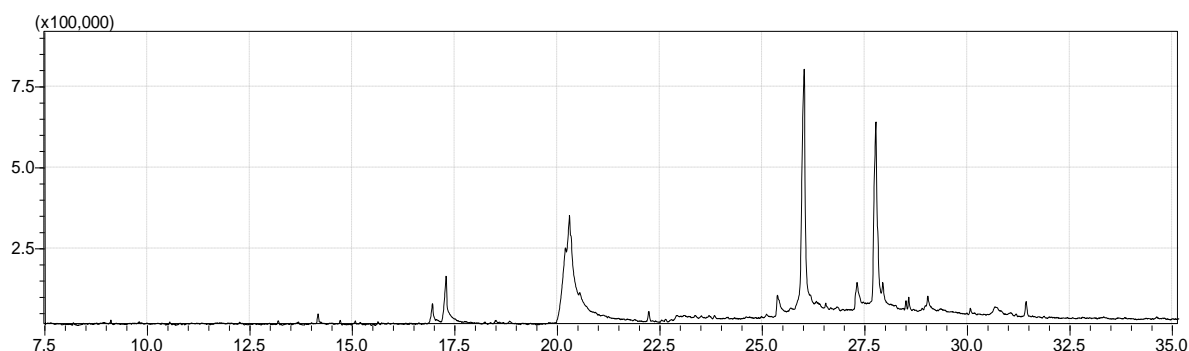


Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato obtido no modo scan para extração realizada empregando florsil como adsorvente, desativado a 5% com água ultra pura.



Os resultados obtidos para os três adsorventes não foram influenciados por contaminações durante o procedimento, como pode ser visto pelos cromatogramas obtidos no modo scan para um extrato não fortificado na ausência da matriz (Apêndices 3, 4 e 5). Deste modo, foi escolhido um 1 g de adsorvente alumina como agente dispersante; 0,5 g da amostra liofilizada; 0,5 g de C₁₈ como coluna auxiliar de limpeza; 1 minuto de homogeneização e 10 mL de acetonitrila como solvente de eluição, por proporcionar extratos mais limpos, maiores valores de recuperação, coeficientes de variação mais baixos e menor relação custo benefício. Essa condição foi selecionada para ter três variáveis otimizadas de forma multivariada.

5.2 Otimização empregando análise multivariada

O planejamento com composto central mais seis pontos axiais foi conduzido conforme as condições especificadas no procedimento experimental (tabela 8). A análise foi realizada utilizando a Média Geométrica dos 16 HPA (MGHPA) referente a cada experimento. A Tabela 11 apresenta os valores de recuperação para os 16 HPA e a média geométrica para cada ensaio.

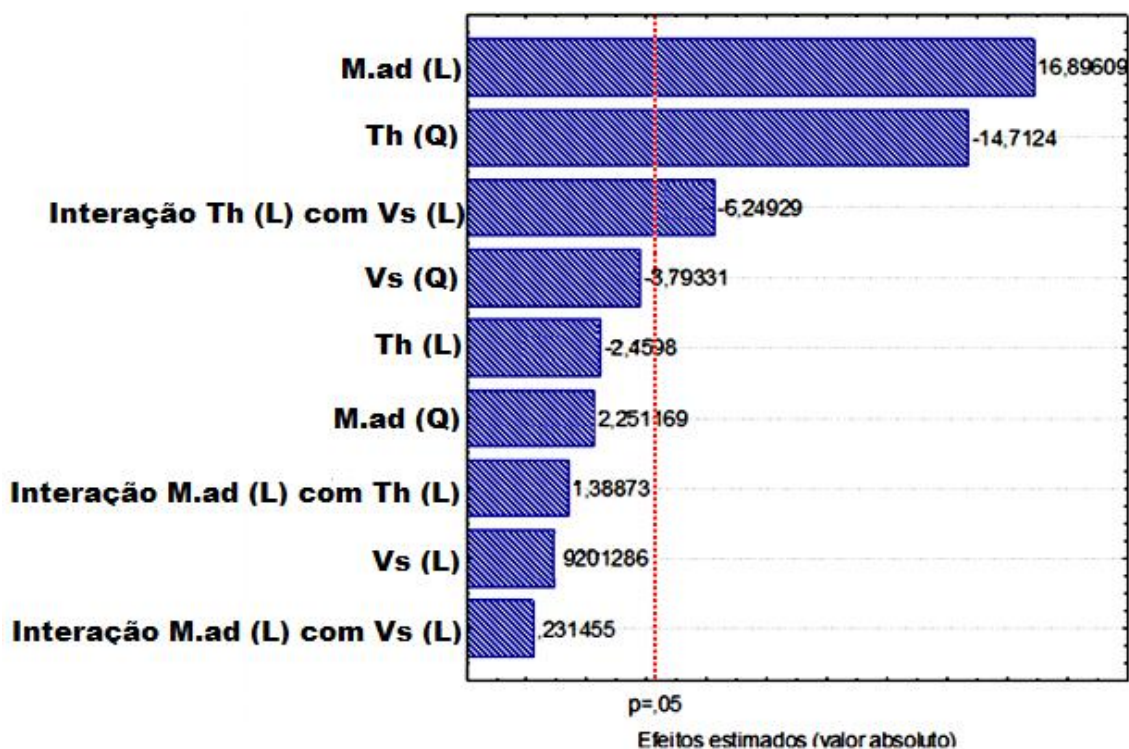
Os efeitos das variáveis e suas respectivas interações estão apresentados sob a forma de gráfico de Pareto (Figura 18) ao nível de 95% de significância. O comprimento da barra é a relação entre os valores dos efeitos divididos pelos seus erros padrão, sendo estes proporcionais a importância dos fatores.

Tabela 11 – Valores de recuperação (%) para os 16 HPA obtidos nos 17 ensaios, empregando as condições de extração de acordo com os dados da tabela 8.

Compostos	Ensaio																
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17
	(PC)								(PC)								(PC)
Naftaleno	20	20	41	41	52	54	20	47	49	39	33	55	24	21	42	50	45
Acenaftileno	44	31	63	77	78	58	50	70	77	74	64	93	44	40	76	79	81
Acenafteno	51	45	64	76	77	63	51	74	63	71	66	91	46	42	76	80	76
Fluoreno	52	51	77	80	99	62	64	69	77	89	78	98	58	39	75	76	89
Fenantreno	61	53	94	91	96	63	65	76	76	94	82	107	60	55	91	89	97
Antraceno	71	54	76	78	96	58	61	76	82	76	81	100	54	52	91	87	87
Fluoranteno	63	50	109	106	97	70	71	80	80	95	84	118	65	62	96	91	98
Pireno	73	61	111	104	99	69	71	77	81	96	79	117	65	63	96	95	99
Benzo-a-Antraceno	61	59	117	112	92	87	69	83	90	91	75	151	66	61	94	86	97
Criseno	69	61	100	109	98	69	68	92	79	90	73	154	64	63	95	92	99
Benzo-b-Fluoranteno	56	68	119	117	102	80	74	86	80	95	76	169	71	59	85	94	98
Benzo-k-Fluoranteno	73	63	117	112	92	70	68	86	81	92	78	166	68	58	96	90	93
Benzo-a-Pireno	70	55	113	108	97	70	71	78	79	94	66	165	61	60	90	90	99
Indeno(1,2,3-c,d)Perileno	61	51	113	100	106	71	71	85	78	95	74	173	67	58	68	92	94
Dibenzo(a,h)Antraceno	66	61	115	112	98	78	73	79	74	96	76	172	67	59	89	93	95
Benzo (g,h,i) Perileno	63	50	114	81	106	82	69	77	76	95	73	164	66	57	47	91	94
MGHPA	57	50	93	91	91	68	61	76	76	85	71	125	58	51	80	85	89

(PC) - Ponto Central

Figura 18 - Gráfico de Pareto para o planejamento 2^3 com triplicata no ponto central mais seis pontos axiais.



Segundo o gráfico de Pareto apresentado na Figura 18, a resposta é influenciada linearmente com o aumento da variável M.ad (massa do adsorvente). O aumento dessa variável provoca maior capacidade de adsorção dos componentes da amostra sobre a superfície do suporte sólido. A variável Th (tempo de homogeneização) influencia de forma quadrática, contribuindo para a redução da resposta. Já a interação entre as variáveis Th (L) e Vs (L) (volume do solvente) influenciam negativamente na resposta.

Análise de variância (ANOVA) foi empregada para estimativa dos principais efeitos, bem como a validação do modelo, utilizando os critérios do teste F e valor de p. As Tabela 12 e 13 apresentam os dados necessários para decidir se modelo pode ser utilizado para prever respostas dentro do domínio avaliado [86].

Tabela 12 - Análises de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.

	Coef.R	Puro Erro	Valor de t	Valor de p	Coef. lim. min 95%	Coef.Lim max.95%
Intercepto	88,791	1,759112	50,4752	0,000392	81,2226	96,36029
M.ad (L)	13,997	0,828417	16,8961	0,003485	10,4326	17,56140
M.ad (Q)	2,0617	0,915830	2,2512	0,153227	-1,8788	6,00219
T h (L)	-2,0377	0,828417	-2,4598	0,133068	-5,6021	1,52665
T h (Q)	-13,474	0,915830	-14,7124	0,004588	-17,4145	-9,53353
Vs (L)	0,7623	0,828417	0,9201	0,454641	-2,8021	4,32664
Vs (Q)	-3,4740	0,915830	-3,7933	0,063000	-7,4145	0,46647
Interação						
M.ad L* T h	1,5000	1,080123	1,3887	0,299351	-3,1474	6,14740
L						
Interação						
M.ad L* Vs	0,2500	1,080123	0,2315	0,838485	-4,3974	4,89740
L						
Interação T						
h L* Vs L	-6,7500	1,080123	-6,2493	0,024663	-11,3974	-2,10260

Os valores de $p < 0,05$ foram utilizados para identificar a significância de cada variável no processo de extração. Os resultados da análise estatística (Tabela 12) mostram que os termos M.ad linear ($p = 0,003485$), Th quadrático ($p = 0,004588$) e o termo de interação entre a variável Th e Vs linear ($p = 0,024663$) possuem efeito significativo na extração dos analitos, assim como indicadas pelo gráfico de Pareto.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 12 e analisando o coeficiente de regressão (88,8) apresentado pelo modelo matemático, representado pela equação 5, a qual descreve as variações dentro do domínio avaliado; pode-se afirmar que o modelo prevê valores de recuperação de 81 a 96% (Coef.Lim de e mínimo e máximo).

$$\text{Recuperação (\%)} = 88,8 + 14\text{Mad} + 2,1\text{Mad}^2 - 2,0\text{Th} - 13,5\text{T.h}^2 + 0,76\text{Vs} - 3,5\text{Vs}^2 + 1,5\text{Mad*Th} + 0,25\text{Mad*Vs} - 6,75\text{Th*Vs} \text{ (eq.5)}$$

A validação do modelo foi feita a partir da análise dos valores presentes na tabela ANOVA para a soma dos resíduos (Tabela 13). Para isto foi utilizado o valor de F. Quando o valor de F encontrado ($F_{\text{observado}}$) for maior que o F crítico (F_{tabelado}), o teste estatístico é significativo ao nível de confiança selecionado. Para a razão $\text{MQ}_{\text{Regressão}}/\text{MQ}_{\text{Resíduo}} > F_{\text{crítico}}$ (nível de 95%) foi obtida a evidência estatística que existe uma relação linear entre as variáveis y e x [86].

Tabela 13 - Tabela ANOVA para media quadrática, soma dos resíduos e validação do modelo.

Parâmetros	Soma dos Resíduos	G. L	Média quadrática	Valor de F	$F_{\text{crítico}}$ (0,05)
Regressão	5576,2	9	619,58	21,952	3,677
Resíduos	197,6	7	28,224		
Total	5773,8	16	360,86		
Erro Puro	18,7	2	9,3333	3,8336	19,296
Falta de Ajuste	178,9	5	35,780		
R ²	0,9658		R - ajustado	0,9218	
M.ad (L)	2664,5	1	2664,5	285,48	0,0035
M.ad (Q)	47,299	1	47,299	5,0678	0,1532
T h (L)	56,472	1	56,472	6,0506	0,1331
T h (Q)	2020,2	1	2020,2	216,45	0,0046
Vs (L)	7,9019	1	7,9019	0,8466	0,4546
Vs (Q)	134,30	1	134,30	14,389	0,0630
Interação M.ad L com T h L	18	1	18	1,9286	0,2993
Interação M.ad L com Vs L	0,5	1	0,5	0,0536	0,8385
Interação T h L com Vs L	364,5	1	364,5	39,053	0,0247
Falta de Ajuste	178,90	5	35,780	3,8336	0,2197
Erro Puro	18,667	2	9,3333		
Total SS	5773,8	16			

G.L. Graus de liberdade.

Além disso, foi realizado o teste de falta de ajuste, para verificar a capacidade do modelo em representar dados no domínio experimental, em pontos que não estão incluídos na regressão, também foi verificada por meio

da razão entre $MQ_{\text{Falta de ajuste}}/MQ_{\text{Erro puro}}$, o valor para esta razão foi menor que o $F_{\text{crítico}}$, sendo este um indicativo de que a regressão é significativa. Isto é; o modelo possui a capacidade de distinguir entre resposta e erro, não apresentando falta de ajuste.

A avaliação do coeficiente de determinação do modelo ($R^2 = 0,9678$), assim como do coeficiente de determinação ajustado ($R_{\text{ajustado}} = 0,9218$), estes que confirmam a significância do modelo e asseguram a correlação satisfatória entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo (Figura 19) e (Tabela 14).

Figura 19 - Gráfico para os valores observados versus os valores preditos.

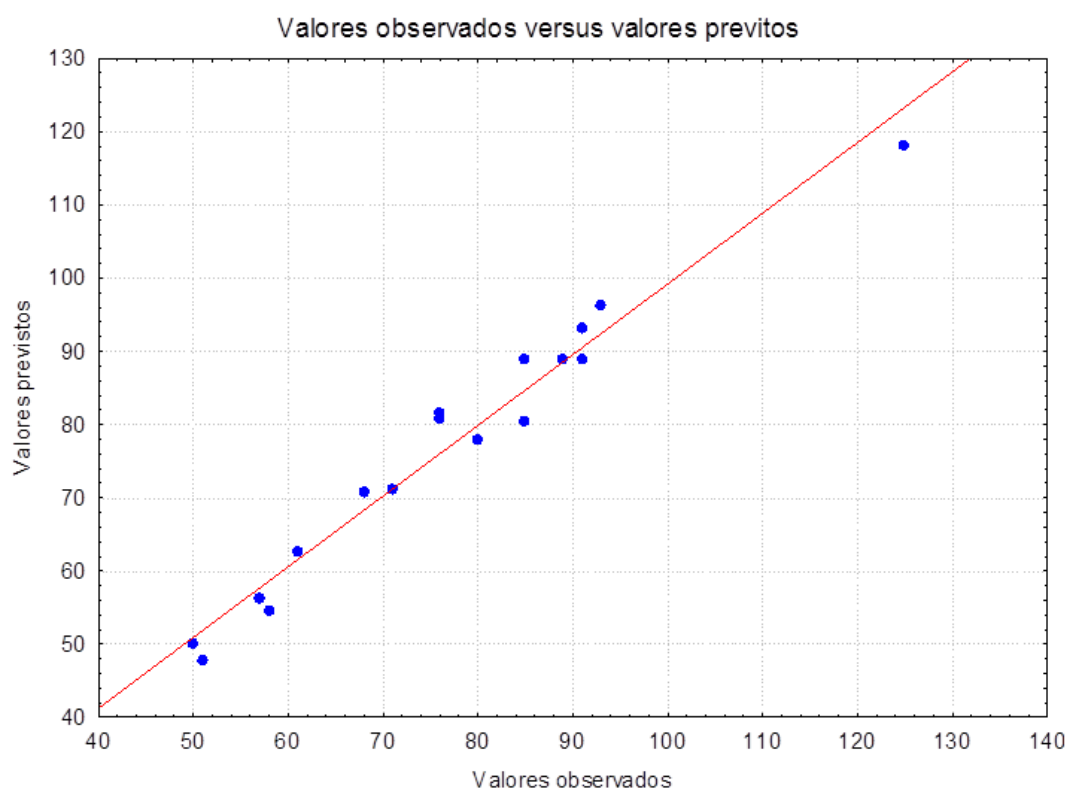
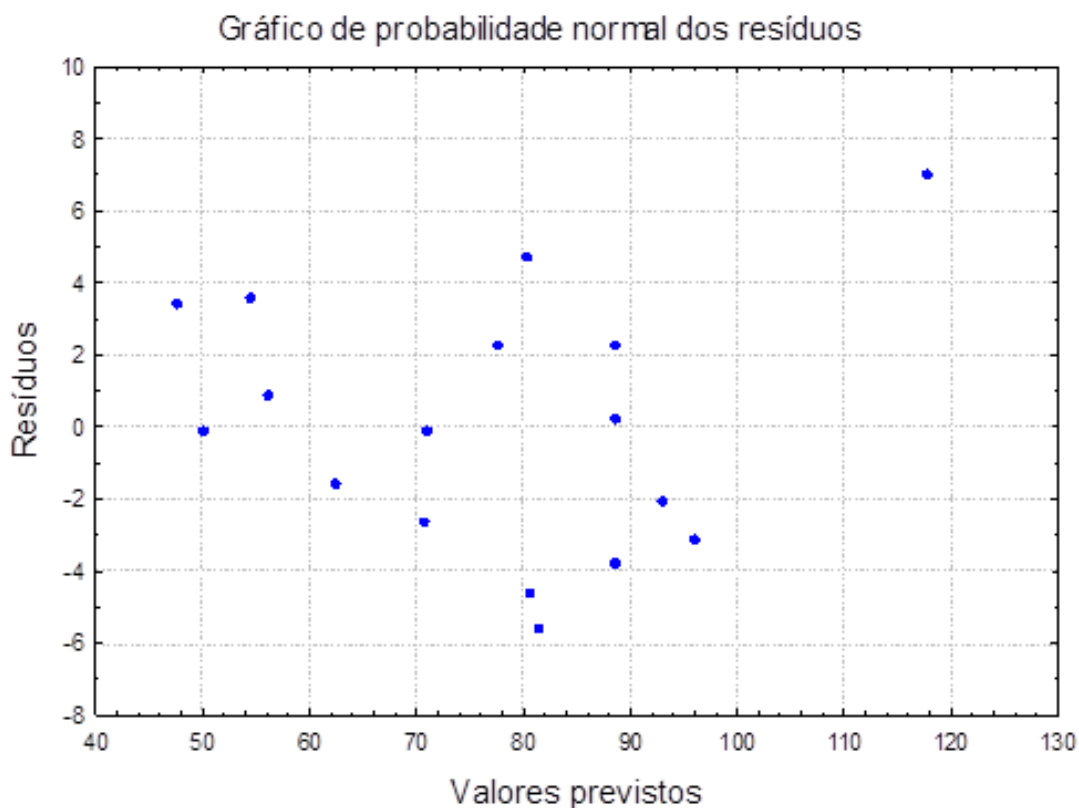


Tabela 14 – Valores observados, valores previstos e resíduos de acordo com o modelo.

Ensaio	Observados	Preditos	Resíduos
1	57,0	56,2	0,8
2	50,0	50,1	-0,1
3	93,0	96,2	-3,2
4	91,0	93,1	-2,1
5	91,0	88,8	2,2
6	68,0	70,7	-2,7
7	61,0	62,6	-1,6
8	76,0	80,7	-4,7
90	76,0	81,6	-5,6
10	85,0	88,8	-3,8
11	71,0	71,1	-0,1
12	125,0	118,0	7,0
13	58,0	54,5	3,5
14	51,0	47,7	3,3
15	80,0	77,8	2,2
16	85,0	80,3	4,7
17	89,0	88,8	0,2

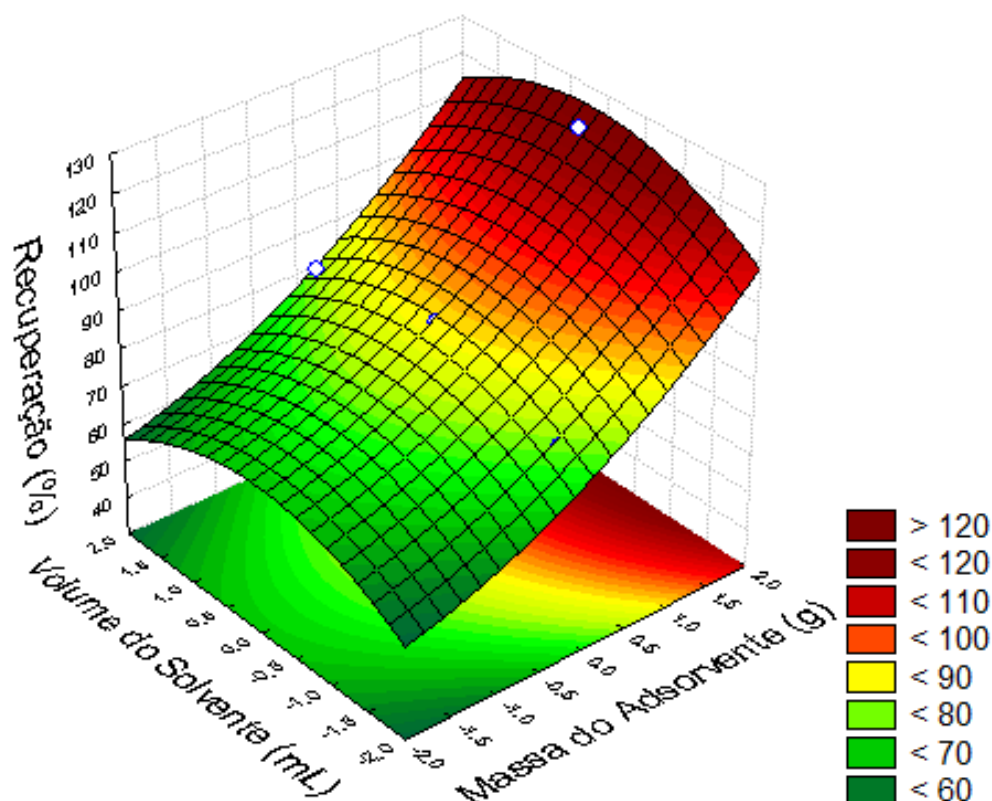
Além da avaliação matemática, foi realizada a inspeção visual da distribuição dos resíduos (Figura 20). Sendo possível observar que o modelo se apresenta ajustado, uma vez que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória. Isto é um dos indícios que comprovam que os erros associados ao planejamento encontram-se distribuídos ao acaso ao longo dos 17 ensaios.

Figura 20 – Gráfico para distribuição normal dos resíduos.



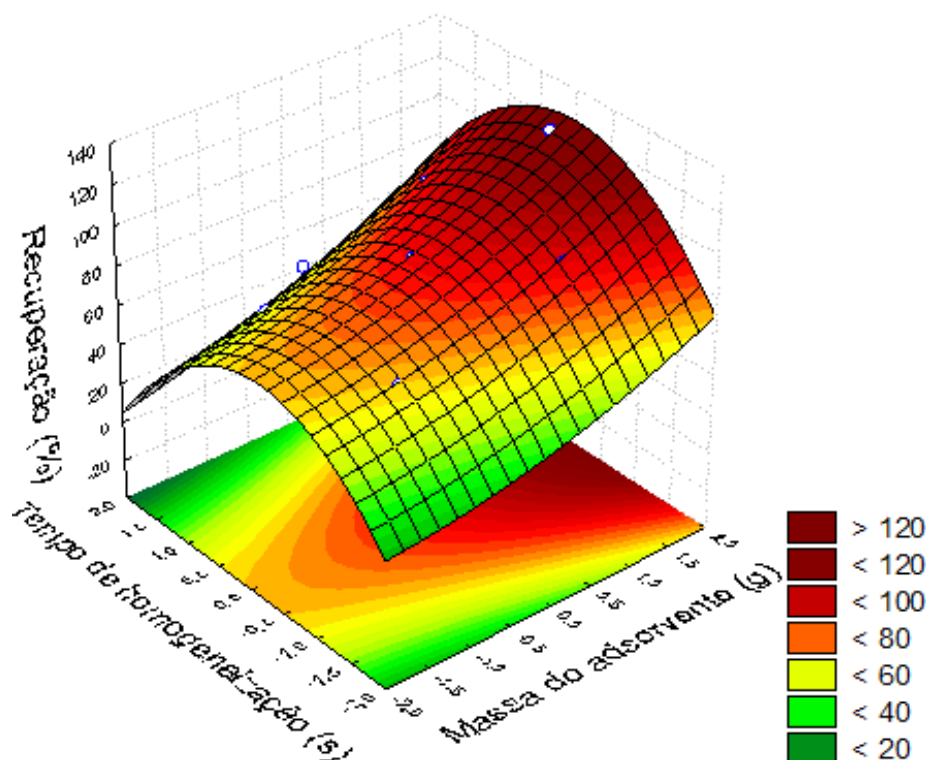
Constado que o modelo pode ser utilizado, três superfícies de resposta (Figura 21, Figura 22 e Figura 23) foram obtidas em função do mesmo. Através da análise da figura 21 é possível afirmar que o volume do solvente pode ser considerado insignificante, uma vez que a região de máximo (zona vermelha) pode ser encontrada em todo o domínio avaliado. Já a massa do adsorvente proporciona o aumento linear do rendimento da extração; esse fato pode ser observado no alto valor do coeficiente para essa variável presente na equação 5.

Figura 21 – Superfície de resposta com o tempo de homogeneização fixo no ponto central (150 segundos).



A provável justificativa para essa observação é que o aumento da massa promove maior capacidade de adsorção dos analitos e interferentes sobre a superfície do suporte sólido (alumina). Para o efeito do tempo de homogeneização em função da massa do adsorvente (Figura 22) o primeiro responde de forma quadrática na eficiência do processo de extração. Isto indica que o aumento dessa variável proporciona o acréscimo nos valores de recuperação, este que atinge uma região de máximo, havendo redução dos valores após esse ponto.

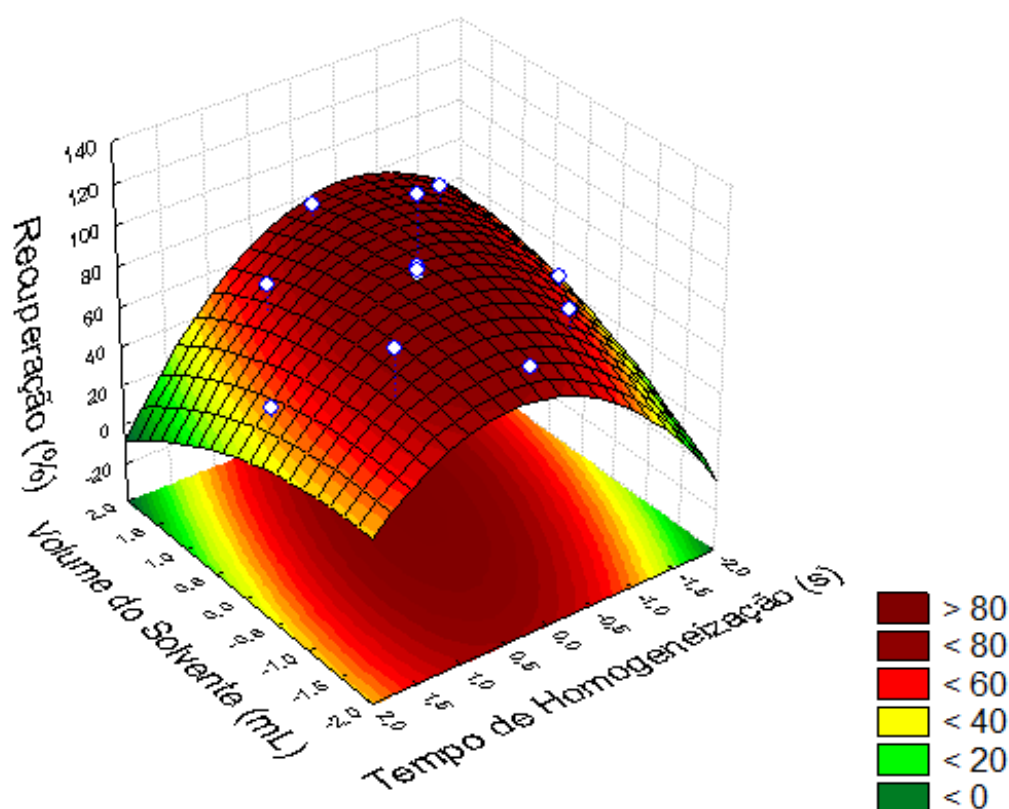
Figura 22 - Superfície de resposta com o volume do solvente fixo no ponto central (8 mL).



Analisando os valores da figura 22 temos que: no menor nível o valor de recuperação esperado é 50%, de 80 a 100% no ponto central e recuperação próxima a 50% no mais alto nível. A provável justificativa para esse comportamento é que com o aumento do tempo de homogeneização a interação entre analitos e suporte sólido torna-se mais forte. Para contornar esse fato, seria necessário maior tempo eluição na coluna de MSPD, isto proporcionaria o aumento da interação do solvente com os analitos retirando-os da superfície do adsorvente.

Já para análise do volume do solvente em função do tempo de homogeneização (Figura 23), pode ser observada a região de máximo em sua totalidade, indicando valores de recuperação superiores a 80%. Uma vez que o volume do solvente foi insignificante, o tempo de homogeneização atinge o ponto de máximo na região entorno do ponto central (ver figura 22) e a interação entre as variáveis V_s e T_h contribuem para a redução da extração; seja pelo o aumento ou pela redução de ambas as variáveis, como pode ser visto na figura 23.

Figura 23 - Superfície de resposta com a massa do adsorvente fixa no ponto central (1,5 g).



O resultado obtido para a média geométrica pode apresentar recuperações superiores 100%, caso seja adotado o nível mais alto para variável M.ad, como pode ser observado para o experimento 12 (Tabela 10), e figuras 19 e 20. Desta forma, é possível indicar que esta resposta elevada é ocasionada pelo efeito matriz, já que o aumento da massa do suporte sólido pode promover um aumento na extração de interferentes da matriz, tornando inviável a utilização dessa condição.

Uma vez que o modelo pode ser utilizado para prever respostas dentro da região estuda, foi utilizada a Equação 6 descrita por Bezerra et al (2008), para determinação da melhor condição experimental [94]. A partir desta, foi possível determinar que, para as variáveis M.ad e Th, a condição ideal está entorno do ponto central. Enquanto que, para a variável Vs foi adotado o ponto

central, uma vez que o aumento desta variável pode ocasionar a diminuição na resposta, pois existe uma interação significativa com a variável Th.

$$M.ad = Coef L M.ad / Coef Q M.ad \text{ (eq.6)}$$

A complexidade da matriz é apontada como o principal fator que dificulta análise de contaminantes, principalmente nas matrizes ambientais. O comportamento dos analitos assim como dos materiais utilizados durante a etapa de preparo da amostra são distintos e dependerá das características dos analitos, bem como da matriz avaliada [9].

Comportamento semelhante ao obtido neste trabalho foram encontrados em métodos de extração que utilizam a MSPD. Por exemplo, Cai e colaboradores (2011), avaliaram a influencia da quantidade da amostra e do suporte solido, em um intervalo de 3:1 a 9:1 para extração e análise de peptídeos em suínos e constataram que em baixas proporções há dispersão ineficiente dos analitos sobre a superfície do suporte sólido. Já em proporções maiores (7:1 e 9:1) os analitos ficam fortemente adsorvidos reduzindo a resposta, em consequência do aumento da área superficial, sendo definida a relação 5:1. Os mesmos autores estudaram a influencia do volume do solvente (5 a 15 mL) e concluíram que havia uma relação linear entre o aumento desta variável e o valor de recuperação, sendo este insignificante quando atingia volumes superiores a 10 mL [101].

Su *et al* 2011, otimizaram a MSPD de forma multivariada para extração de hormônios em manteiga, e constataram que a massa do adsorvente contribui de forma quadrática. Quando a massa do adsorvente aumentava a eluição dos analitos era reduzida, sendo necessários maiores volumes do solvente de eluição. Em consequência disto, o aumento no volume do solvente proporcionava melhores valores de recuperação [102].

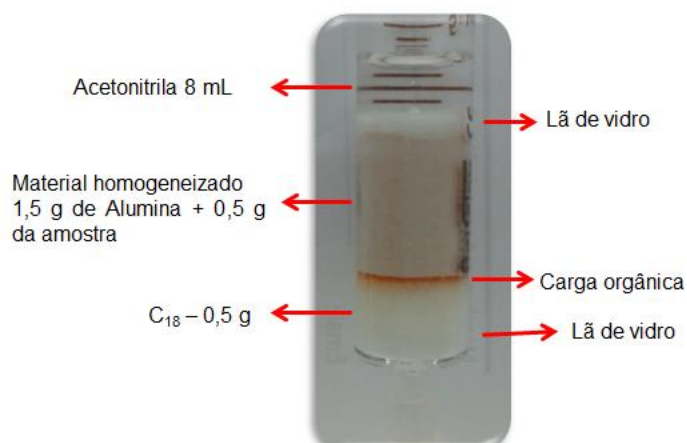
Ralins e colaboradores (2012) desenvolveram um método envolvendo a MSPD empregando análise multivariada para determinação de pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas em tecido de pulmão humano, e perceberam que quando se utilizava baixos volumes do solvente de eluição a eficiência da extração era reduzida. Quando foi empregado grandes volumes

do solvente o extrato final continha uma alta quantidade de interferentes que foi evidenciada pela cor do extrato. Os mesmos autores também avaliaram a significância do tempo de homogeneização com estudos de dispersão entre 15 e 30 min. Esta variável se apresentou como insignificante neste domínio [57].

Provavelmente, um dos fatores que viabilizou a insignificância do tempo de homogeneização no trabalho desenvolvido por Ralins e colaboradores (2012) tenha sido a faixa de tempo utilizado, possivelmente o menor tempo utilizado na homogeneização (15 min) tenha sido suficiente para provocar a ruptura da amostra e distribuição dos analitos ao longo da superfície do suporte sólido.

Conforme apresentado anteriormente, as condições que levaram a condição ideal de extração adotando a média geométrica para os 16 HPA foram 1,5 g de alumina (M.ad), 150 segundos de homogeneização (Th) e 8 mL para o solvente de eluição (Vs) (Figura 24). Essa condição foi realizada em triplicata e quantificada com uma solução de comparação preparada no extrato da matriz.

Figura 24 – Condição de extração idealizada segundo o modelo



Este método foi avaliado quanto a sua qualidade preditiva obtida pela Equação 4, através da observação do erro relativo entre os valores obtidos experimentalmente para a média geométrica dos HPA e os valores previstos pelo modelo matemático (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação da resposta prevista pelo modelo matemático com a performance experimental para a média geométrica dos 16 HPA.

	Valores preditos (%)	Valores experimentais (%)	Erro relativo (%)
Média	89	91	2
Geométrica	89	91	2
	89	94	5

Conforme a Tabela 15, o desempenho predito pelo modelo é concordante com os resultados encontrados experimentalmente, para a extração, sendo observado um baixo erro relativo. Além disso, os resultados obtidos experimentalmente estão dentro do intervalo de confiança para a resposta prevista, que é de 81,22 a 96,36 %. O processo de otimização empregando análise multivariada proporcionou o aumento no rendimento do processo e maior reprodutibilidade (Figura 25 e Tabela 16) além de proporcionar extratos mais limpos (Figura 26).

Figura 25 – Comparação do desempenho entre o método univariado e multivariado para os 16 HPA.

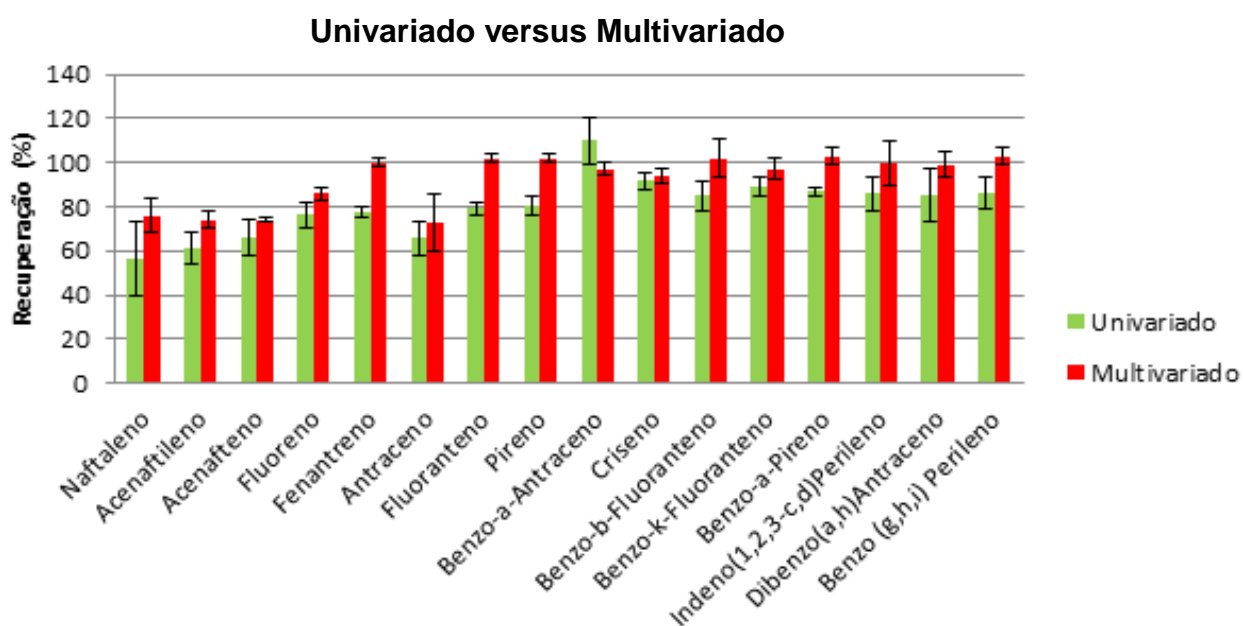
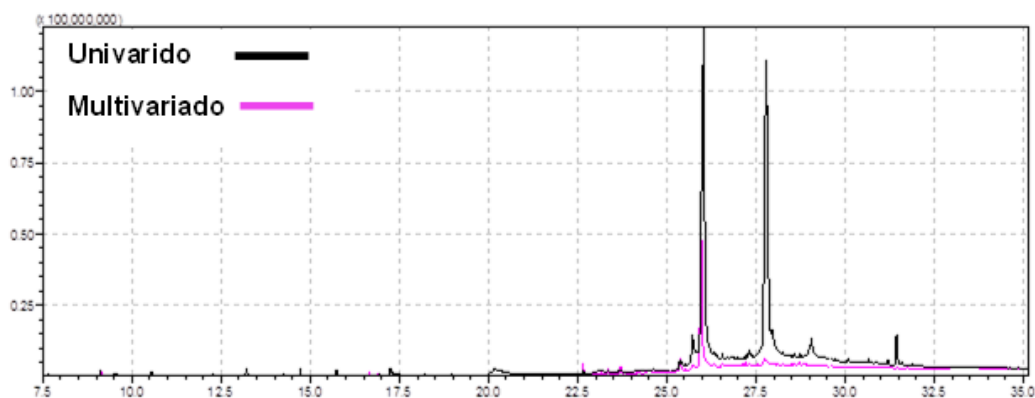


Tabela 16 – Valores de recuperação e desvio padrão relativo para os 16 HPA mais a média geométrica, empregando as condições definidas pelo modelo: 1,5 g do suporte sólido, 150 segundos de homogeneização e 8 mL de acetonitrila.

Composto	Rec (%)	C.V. (%)
Naftaleno	76	8
Acenaftileno	74	4
Acenafteno	74	1
Fluoreno	86	3
Fenantreno	100	2
Antraceno	73	13
Fluoranteno	102	2
Pireno	102	2
Benzo[a]antraceno	97	3
Criseno	94	3
Benzo[b]fluoranteno	102	9
Benzo[k]fluoranteno	97	5
Benzo[a]pireno	103	4
Indeno[1,2,3-cd]perileno	100	10
Dibenzo[a,h]antraceno	99	6
Benzo[g,h,i]perileno	103	4
Media geométrica	92	2

Figura 26 – Comparação dos cromatogramas obtidos no modo *Scan* para o perfil da amostra no modo univariado e multivariado.



5.3 Validação do método analítico

5.3.1 Linearidade e sensibilidade

As curvas de analíticas foram elaboradas conforme descrito no item 4.10.1 e avaliada tendo como base o valor do coeficiente de correlação linear (r) igual ou superior a 0,99. Foram encontrados valores superiores a 0,99 (tabela 17), estando em conformidade com os critérios estabelecidos pelos órgãos nacionais ANVISA e INMETRO que definem os valores do coeficiente de correlação iguais ou superiores a 0,90 e 0,99, respectivamente, garantindo desta forma que os resultados a serem encontrados sejam diretamente proporcionais a concentração do(s) analito(s) presentes na amostra [75, 76].

Com relação à sensibilidade, o composto mais sensível ao método foi o benzo[k]fluoranteno (coeficiente angular 0,2885), já o surrogate acenafteno-d10 foi o que exibiu a menor sensibilidade, com coeficiente angular igual a 0,0500 (Tabela 17), as curvas de calibração estão no apêndice 6. O benzo[k]fluoranteno e acenafteno-d10, estão mais susceptíveis a variações no sinal analítico frente a alterações mínimas nos valores de concentração [78].

Tabela 17 – Equação da reta e valores dos coeficientes de correlação dos 16 HPA e os cinco surrogates, obtidos a partir das curvas de calibração.

Composto	Equação Da reta	Valor do coeficiente de correlação (r)
Naftaleno-d8	$y = 0,0876x + 0,0085$	0,9996
Naftaleno	$y = 0,1667x + 0,1480$	0,9915
Acenaftileno	$y = 0,1568x + 0,0059$	0,9985
Acenaftileno-D10	$y = 0,0500x + 0,0050$	0,9989
Acenafteno	$y = 0,1148x + 0,0065$	0,9992
Fluoreno	$y = 0,1086x + 0,0042$	0,9989
Fenantreno-D10	$y = 0,0742x - 0,0058$	0,9989
Fenantreno	$y = 0,1484x + 0,0454$	0,9983
Antraceno	$y = 0,1636x + 0,0014$	0,9995
Fluoranteno	$y = 0,1846x + 0,0118$	0,9993
Pireno	$y = 0,1851x + 0,0299$	0,9992
Benzo[a]antraceno	$y = 0,2173x + 0,0092$	0,9977
Criseno-D12	$y = 0,1052x + 0,0017$	0,9969
Criseno	$y = 0,2527x + 0,0245$	0,9992
Benzo[b]fluoranteno	$y = 0,2525x - 0,0055$	0,9976
Benzo[k]fluoranteno	$Y = 0,2885x + 0,0801$	0,9995
Benzo[a]pireno	$Y = 0,2653x - 0,0405$	0,9956
Perileno-d12	$Y = 0,1243x + 0,0067$	0,9983
Indeno[1,2,3-cd]perileno	$Y = 0,1183x + 0,0084$	0,9996
Dibenzo[a,h]antraceno	$Y = 0,1404x - 0,0017$	0,9992
Benzo[g,h,i]perileno	$Y = 0,2613x + 0,0083$	0,9989

5.3.2 Limite de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através da razão sinal/ruído obtidos por meio de soluções preparadas no extrato da matriz em um intervalo de concentração de 0,7 a 5 ng g⁻¹, sendo

admitido como LD uma razão igual a 3 e para o LQ uma razão igual a 10, como recomendado pela ANVISA [75].

Os valores de LD e LQ encontrados para cada HPA e padrão sub-rogado estão descritos na Tabela 18. Os valores de LD encontrados estão entre 0,7 e 4 ng g⁻¹. Enquanto que, os LQ apresentaram variação de 1 a 5 ng g⁻¹.

Tabela 18 – Valores de limite de detecção e quantificação para os 16 HPA e seus respectivos padrões sub-rogados.

Composto	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
Naftaleno-d8	1	3
Naftaleno	0,7	1
Acenaftileno	3	4
Acenaftileno-D10	4	5
Acenafteno	2	4
Fluoreno	4	5
Fenantreno-D10	4	5
Fenantreno	2	4
Antraceno	2	5
Fluoranteno	2	3
Pireno	2	3
Benzo[a]antraceno	4	5
Criseno-D12	4	5
Criseno	4	5
Benzo[b]fluoranteno	4	5
Benzo[k]fluoranteno	3	5
Benzo[a]pireno	3	5
Perileno-d12	3	5
Indeno[1,2,3-cd]perileno	3	5
Dibenzo[a,h]antraceno	4	5
Benzo[g,h,i]perileno	3	5

5.3.3 Avaliação do Efeito Matriz

Em estudos envolvendo a análise em matrizes complexas, podem ocorrer recuperações com rendimentos superiores a 100%. Este fenômeno é conhecido como aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz. Uma das maneiras que pode ser utilizadas para avaliar esse efeito é através da comparação das áreas dos analitos em duas soluções, sendo uma destas na ausência da matriz [92 – 105]. Os valores de EM calculados neste estudo variaram de 0,36 a 6,19 conforme apresentado na tabela 19, indicando que matriz contribui para a redução e/ou aumento da resposta, dependendo das características e do tempo de retenção dos analitos.

Tabela 19 – Avaliação do efeito matriz (EM) para os 16 HPA e os 5 padrões sub-rogados, com soluções na concentração de 100 ng g⁻¹.

Composto	EM
Naftaleno-d8	1,00
Naftaleno	6,19
Acenaftileno	3,47
Acenaftileno-d10	0,73
Acenafteno	3,18
Fluoreno	2,59
Fenantreno-d10	0,49
Fenantreno	2,12
Antraceno	2,32
Fluoranteno	1,84
Pireno	1,71
Benzo[a]antraceno	1,22
Criseno-d12	6,09
Criseno	1,18
Benzo[b]fluoranteno	1,11
Benzo[k]fluoranteno	0,44
Benzo[a]pireno	1,02
Perileno-d12	0,36
Indeno[1,2,3-cd]perileno	0,87
Dibenzo[a,h]antraceno	0,42
Benzo[g,h,i]perileno	0,94

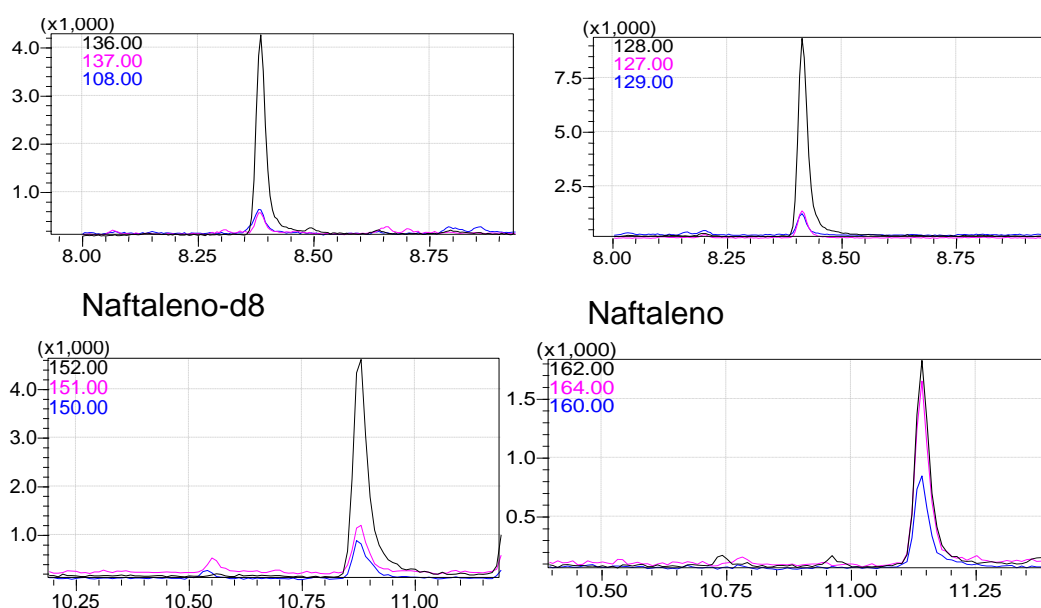
Valores de EM superiores a 1 é um indicativo que está ocorrendo o aumento da resposta induzido pela matriz. Alguns autores afirmam que isto pode estar associado com a existência dos analitos na matriz e com a carga orgânica que a compõe; onde os interferentes presentes na matriz competem com os analitos pelos os sítios ativos do liner. [92 – 95].

Quando a quantidade de analitos e interferentes adsorvidos no liner se matem aproximadamente constantes, temos EM iguais a 1 (exemplo EM calculado para o naftaleno-d8), indicando que não houve variação na resposta induzida pela matriz. Valores de EM superiores a 1 podem ser provenientes de dois casos: (I) a existência do analito na matriz, (II) adsorção do analito nos sítios ativos do liner; sendo liberados em uma injeção posterior (Naftaleno EM = 6,19) e (III) analitos que estão em regiões com existência de muitos interferentes (Criseno d-12 EM = 6,09) [92 – 95].

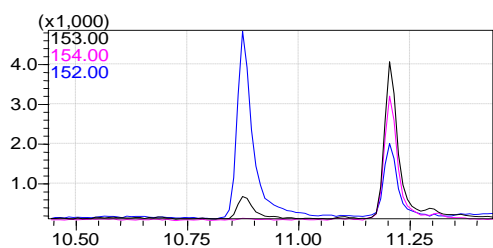
5.3.4 Seletividade

O método pode ser considerado seletivo, uma vez que foi possível determinar qualitativamente e quantitativamente os analitos dos compostos presentes na matriz. Vale ressaltar que os compostos benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno, assim como indeno[1,2,3-cd]perileno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno apresentaram co-eluição; no entanto não comprometeu a seletividade do método, uma vez que foi utilizado o modo do monitoramento de íon seletivo, conforme apresentado na figura 27.

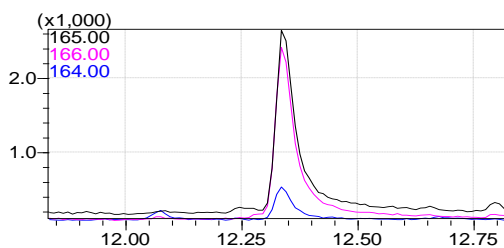
Figura 27 - Recorte dos cromatogramas obtidos por GC-MS no método SIM para uma solução no extrato da matriz, fortificada com a solução conjunta dos 16 HPA e os 5 padrões sub-rogados na concentração de 100 ng mL⁻¹.



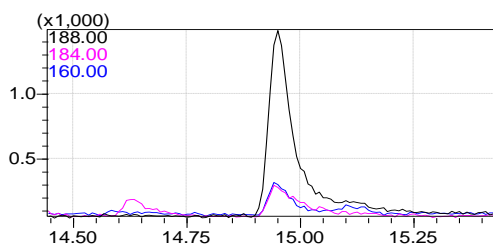
Acenaftileno



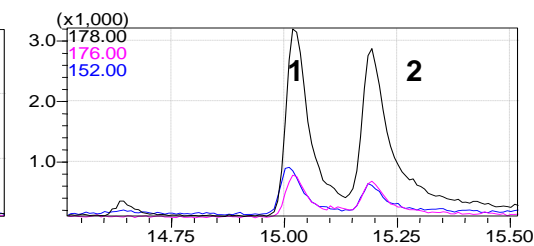
Acenaftileno-D10



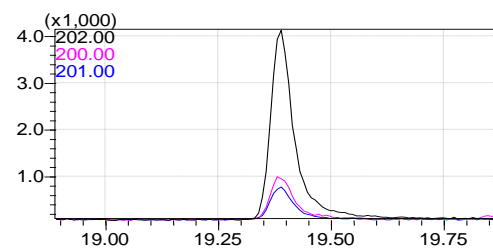
Acenafteno



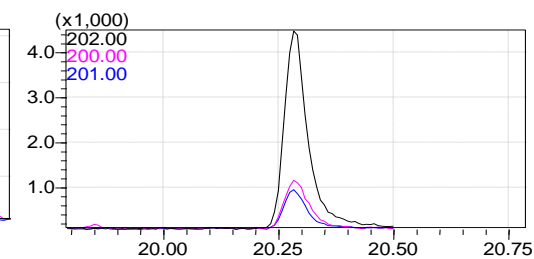
Fluoreno



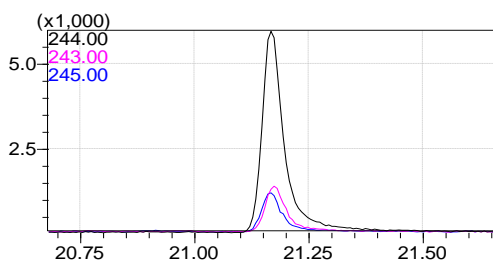
Fenantreno-D10



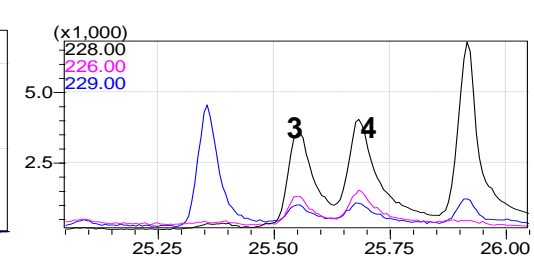
(1)Fenantreno, (2) Antraceno



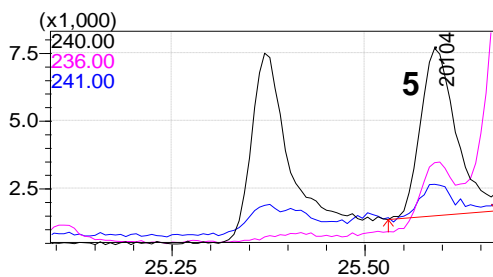
Fluoranteno



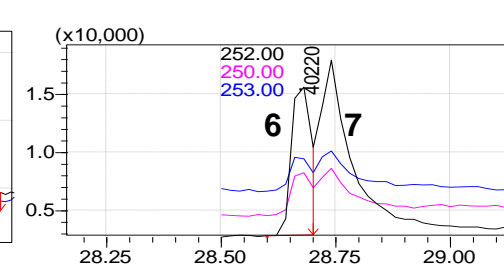
Pireno



P- terfenil – D14

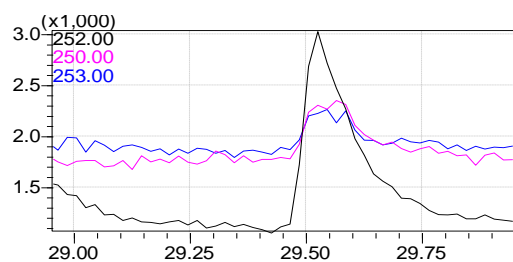


(3)Benzo[a]antraceno,(4)Criseno

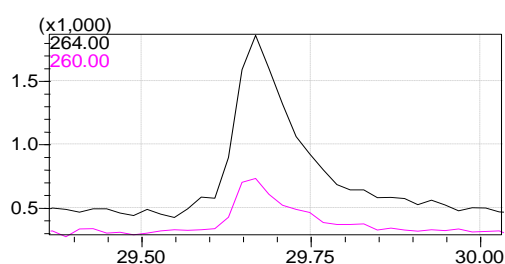


(5)Criseno-D12

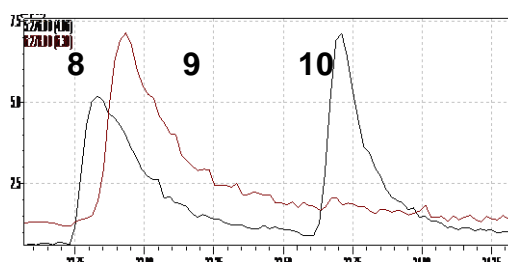
(6) Benzo[b]fluoranteno, (7) Benzo[k]fluoranteno



Benzo[a]pireno



Perileno-d12



(8) Indeno[1,2,3-cd]perileno

(9) Dibenzo[a,h]antraceno

(10) Benzo[g,h,i]perileno

5.3.5 Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada por meio da análise em triplicata de amostras fortificadas com a solução mista dos HPA e dos padrões sub-rogados em três diferentes níveis de concentração (10, 25 e 50 ng g⁻¹), contemplando o intervalo linear da curva, como proposto pela Resolução RE nº899, da ANVISA [75]. Os valores de recuperação obtidos estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20 - Recuperação e coeficientes de variação dos HPA e padrões sub-rogados, correspondente aos três níveis de fortificação 10, 25 e 50 ng g⁻¹

Composto	Fortificação 10 ng g ⁻¹		Fortificação 25 ng g ⁻¹		Fortificação 50 ng g ⁻¹	
	Rec	C.V.	Rec	C.V.	Rec	C.V.
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Naftaleno -d8	42	3	33	4	38	3
Naftaleno	91	4	82	2	70	2
Acenaftileno	72	3	77	6	71	4
Acenaftileno -D10	75	3	64	2	73	4
Acenafteno	79	3	76	6	74	1
Fluoreno	85	4	88	9	84	3
Fenantreno -D10	78	3	85	3	85	4
Fenantreno	94	3	99	2	96	7
Antraceno	80	10	89	3	68	2
Fluoranteno	98	2	98	3	100	5
Pireno	98	3	104	3	97	5
Benzo[a]antraceno	93	6	92	4	94	5
Criseno -D12	86	6	94	4	95	2
Criseno	90	3	96	5	92	4
Benzo[b]fluoranteno	101	5	97	5	100	12
Benzo[k]fluoranteno	85	3	94	5	97	5
Benzo[a]pireno	60	4	93	5	94	13
Perileno-d12	57	7	99	5	90	9
Indeno[1,2,3-cd]perileno	86	10	80	6	102	8
Dibenzo[a,h]antraceno	60	5	103	3	101	8
Benzo[g,h,i]perileno	89	1	100	2	99	9

O método se mostrou adequado para os três níveis de fortificação, apresentando recuperações de 57 a 104% para os analitos e surrogates, exceto para o naftaleno-d8 nos três níveis de fortificação, com coeficientes de variação entre 1 e 13. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$, no entanto dependendo da complexidade da matriz esse valor pode ser considerado entre 50 e 120% [78, 67]. Não foram constadas contaminações que possam comprometer o procedimento de validação (Ver apêndice 7).

5.3.6 Robustez

Foi avaliada utilizando os gráficos de contorno (Figura 28 e Figura 29), gerados a partir do planejamento, conforme Tabela 8, os quais indicam que variações mínimas provocadas na região do centro do planejamento (melhor condição) não interferem significativamente nos valores de recuperação do método.

Figura 28 – Gráfico de contorno gerado com a massa do adsorvente fixa no ponto central (1,5 g).

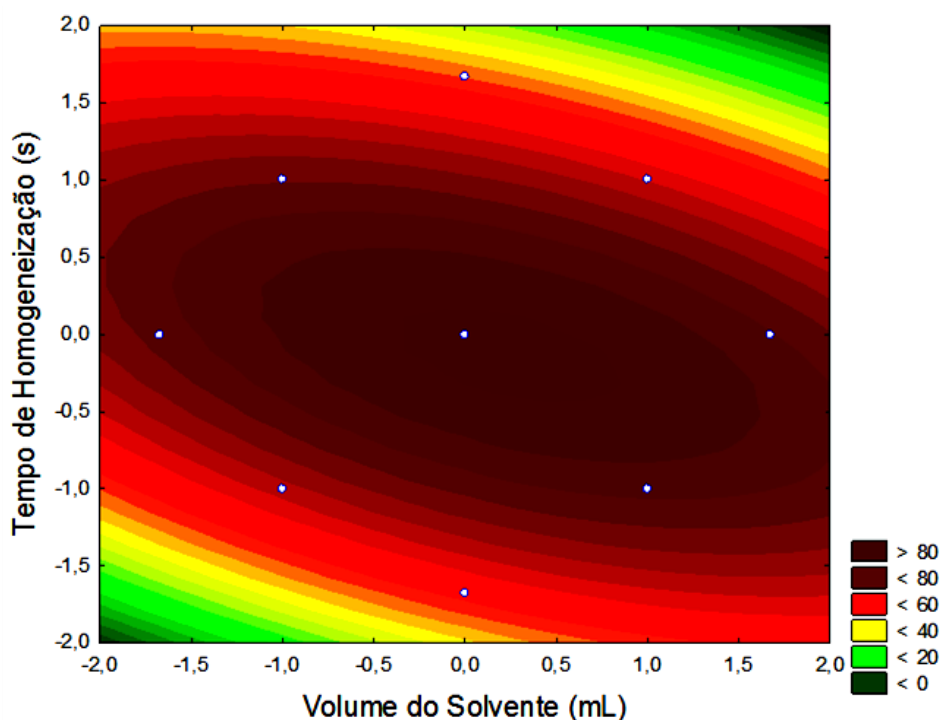
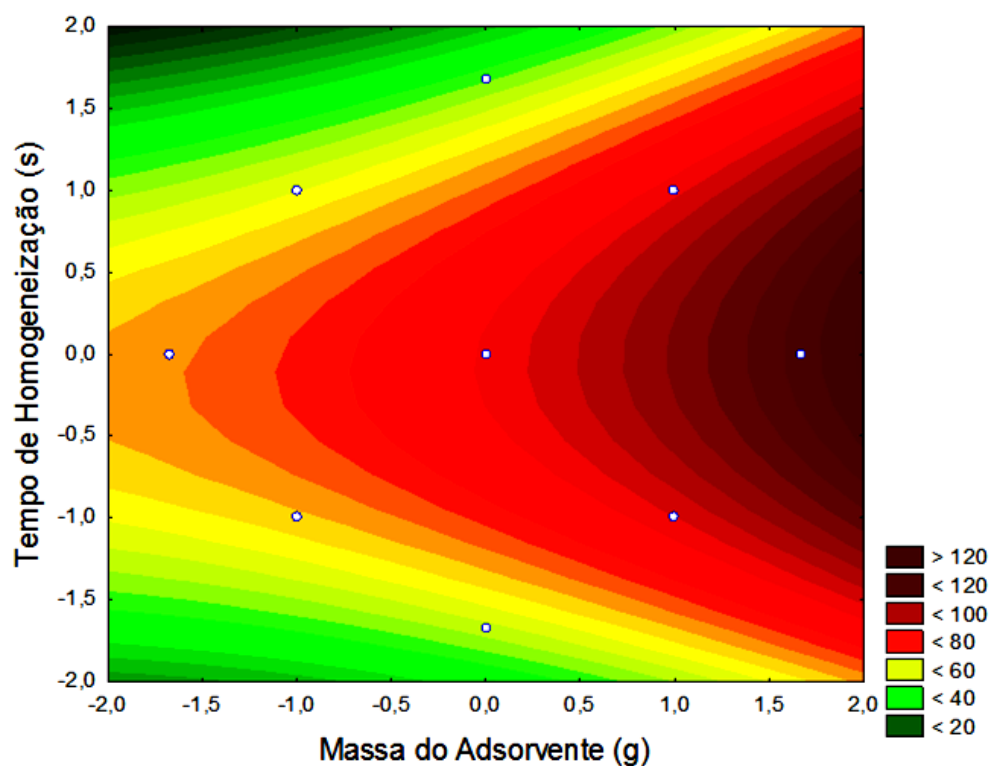


Figura 29 – Gráfico de contorno gerado com a variável volume do solvente fixa no ponto central (8,0 mL).



Uma vez que não há relatos na literatura que utilizem as técnicas MSPD e GC-MS para determinação de HPA em camarão, foi realizado a comparação dos dados deste trabalho com estudos que realizaram a utilização de outras técnicas de extração (Tabela 21) para determinação destes compostos em amostras de camarão.

Tabela 21 – Comparação do método de extração (MSPD) desenvolvido neste trabalho com outros métodos reportados na literatura

	Massa	Materiais	Solvente	Rec (%)	LQ	Ref
MSPD	0,5 g	1,5 g de Alumina 0,5 g de C18	8 mL de Acetonitrila	57 - 104 ±13	1 a 5 ng g ⁻¹	*
ASE	Ovos de camarão	20 g de sílica 10 g de alumina	250 mL de pentano : DCM	60 - 74 ± 30	0,3 ng g ⁻¹	[45]
Ultrassom	2,0 g		60 mL de hexano:DCM	68-96	2,0 ng g ⁻¹	[7]
Acetato de etila	10 g	4 g de sulfato de magnésio, 2 g de cloreto de sódio, 1 g de sílica e Sulfato de sódio	10 mL Acetato de etila e 21 mL n-hexano: DCM	60 – 130	--	[44]
Soxhlet	10g	10 g de sílica, 5 g de alumina, 5 cm de Na ₂ SO ₄ e 6 g de Biobeads	100 mL de n-hexano/DCM	68 a 112%	0,4 a 3 ng g ⁻¹ (úmido)	[91]

*Este trabalho

Diante do que foi apresentado, o método de extração baseado nas técnicas de MSPD e GC-MS, proporcionou melhores resultados de recuperação, com limites de quantificação equivalentes ao encontrados por outros métodos de extração, sendo utilizado menores quantidades de amostra, solvente e menor tempo de extração.

6. Aplicação do método em amostras obtidas no estado de Sergipe

6.1 Avaliação do teor de umidade e carga orgânica extraída

As amostras para aplicação do método foram adquiridas junto a atravessadores, no Mercado Central de Aracaju, provenientes dos municípios e localidades de Nossa Senhora do Socorro, Ponta do Mangue, Coqueiral e Calumbi. Foi avaliado o teor de umidade e carga orgânica possível de ser extraída. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Teor de umidade e carga orgânica extraída

Amostras	Massa da amostra (g)	Teor de Umidade (%)	C.v. (%)	Carga orgânica (mg g ⁻¹)
Amostra A	14,09	80,09	0,07	19,24
Amostra B	26,96	76,72	0,47	35,54
Amostra C	15,56	77,72	0,09	27,98
Amostra D	21,23	78,03	2,41	29,57
Amostra M	16,24	78,25	0,08	32,29

Amostra M: amostra utilizada para desenvolver o método; C.v: Coeficiente de variação

O teor de umidade variou entre 76,72 (amostra B) a 80,09% (amostra A), enquanto que a carga orgânica apresentou variação de 19,24 a 35,54. Consequentemente, para as amostras com maior teor de umidade foram encontrados menor teor de carga orgânica. Uma forte correlação negativa foi observada ($R^2 = -0,9175$) quando aplicada a análise de Pearson com auxílio do software Excel. Desta forma, é possível inferir que o aumento do teor de umidade é inversamente proporcional ao teor de carga orgânica.

6.1.1 Determinação quantitativa de HPA

As extrações foram realizadas em triplicata, com as quantificações feitas a partir de uma curva preparada no extrato da matriz no intervalo de concentração de 5 a 100 ng g⁻¹. A eficiência do processo foi avaliada por meio das recuperações dos padrões sub-rogados no nível de fortificação em 50 ng g⁻¹ (Tabela 23).

Tabela 23 – Avaliação da eficiência de extração com base nos valores de recuperação (Rec %) e coeficientes de variação para os padrões sub-rogados nas quatro amostras de camarão de Sergipe.

Padrões sub-rogados	A Rec (%)	C.V. (%)	B Rec. (%)	C.V. (%)	C Rec (%)	C.V. (%)	D Rec. (%)	C.V. (%)
Naftaleno - d8	20	27	27	20	18	17	17	1
Acenaftileno- d10	68	13	74	3	58	15	57	1
Fenantreno - d10	94	2	99	6	78	10	80	5
Criseno - d12	100	1	97	1	79	9	78	11
Perileno - d12	99	4	105	2	94	7	89	5

Os valores de recuperação para os padrões sub-rogados estão dentro dos limites estabelecidos, exceto para o naftaleno-d8. Este valor não está necessariamente relacionado com perdas durante o processo de roto-evaporação, pois como foi apresentado nos testes de exatidão e precisão, o naftaleno, apresentou valores de recuperação de 70 a 91% para os três níveis de fortificação, diferentemente de seu padrão sub-rogado correspondente, naftaleno-d8, que apresentou recuperação de 33 a 42%.

Comportamentos semelhantes foram observados por IYer *et al.*, 2004 durante a avaliação da força de interação entre compostos deuterados e seus homólogos não deuterados com a fase estacionária. E concluíram que os compostos substituídos isotopicamente possuem interações mais fortes com a fase estacionária [103]. Isto pode estar ocorrendo com o naftaleno-d8, repercutindo na redução dos valores de recuperação.

O controle de qualidade foi realizado através da avaliação da contaminação, realizada a partir de um branco do método de MSPD com ausência da matriz, para cada uma das amostras e injetados no modo scan (Apêndice 8). As concentrações dos HPA encontradas nas amostras de camarão estão apresentadas na Tabela 24.

Entre as amostras analisadas, a amostra A apresentou as maiores concentrações de HPA, com destaque para os compostos de 3 e 4 anéis (naftaleno 43 ng g⁻¹, fenantreno 54 ng g⁻¹, antraceno 17 ng g⁻¹, fluoranteno 50 ng g⁻¹, pireno 43 ng g⁻¹, benzo[a]antraceno 21 ng g⁻¹, Criseno 20 ng g⁻¹), que juntos respondem por 85 % dos HPA totais ($\sum_{total} [HPA] = 280 \text{ ng g}^{-1}$) encontrados. Isto indica que a bioacumulação de HPA em camarões provenientes do município de Nossa senhora do Socorro diminui à medida que o número de anéis aumenta. Isto indica que os camarões oriundo desse município estão mais suscetível a contaminação de HPA de baixo peso molecular.

Para a amostra B a $\sum_{total} [HPA] = 152 \text{ ng g}^{-1}$, sendo os mais abundantes os compostos naftaleno 81 ng g⁻¹, fenantreno 30 ng g⁻¹ e benzo[a]antraceno 18 ng g⁻¹, os quais corresponderam a 98% da contração total de HPA nessa amostra. Na amostra C foram encontrados fenantreno 19 ng g⁻¹, e benzo [a] antraceno 14 ng g⁻¹. Já a amostra D apresentou os compostos naftaleno 11 ng g⁻¹, fluoreno 3 ng g⁻¹ e fenantreno (20 ng g⁻¹).

Tabela 24 – Concentrações (ng g⁻¹) dos HPA encontradas nas amostras (A, B, C e D).

HPA	A ^a	A ^b	B ^a	B ^b	C ^a	C ^b	D ^a	D ^b
Naftaleno	43	9	81	19	<LD	<LD	11	2
Acenaftileno	5	1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Acenafteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoreno	6	1	7	2	<LD	<LD	3	1
Fenantreno	54	11	30	7	19	4	20	4
Antraceno	17	3	9	2	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoranteno	50	10	7	2	<LD	<LD	<LD	<LD
Pireno	43	9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]antraceno	21	4	18	4	14	3	<LD	<LD
Criseno	20	4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[b]fluoranteno	14	3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[k]fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Indeno[1,2,3-cd]perileno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Dibenzo[a,h]antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[g,h,i]perileno	6	1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Somatória dos HPA	280	56	152	35	33	29	34	7

a - (peso seco); b - (peso úmido); <LD – Menor que o limite de detecção

A variação dos HPA encontrados nas amostras A, B, C e D, assim como a concentração em cada uma são distintas. Isto revela que os camarões analisados possuem diferentes graus de bioacumulação, isto está associado ao estado de maturação de cada indivíduo, bem como a capacidade que esses organismos possuem em metabolizar esses compostos e ainda as condições de cultivo dos mesmos [96].

Os valores para a somatória das concentrações encontrada em cada uma das amostras analisadas estão abaixo dos valores encontrados no estudo conduzido por Dosunmulin e colaboradores (2016), para análise de HPA em

camarão, com concentrações de 172 a 550 ng g⁻¹ para os 16 HPA [47]. Carls *et al* (2016) conduziram um estudo para avaliação da contaminação em sedimentos e camarão por HPA, proveniente da liberação de navios petroleiros em um Porto . Foram encontradas concentrações entre 564 a 4065 ng g⁻¹ em ovos de camarão [45].

Zhang *et al* (2015), avaliaram a distribuição e acumulação de HPA em um lago na China, encontrando concentrações entre 67 e 534 ng g⁻¹ em peixes e camarão, sendo os compostos de 2 e 3 anéis os mais abundantes [7], concordantes com os HPA encontrados neste estudo.

A autoridade europeia para a segurança dos alimentos, estabeleceram o limite máximo para o benzo[a]pireno em 5 ng g⁻¹ em peso úmido e de 30 ng g⁻¹ para a somatória dos compostos benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno e Benzo[a]pireno. Neste trabalho os valores encontrados para esses compostos estão abaixo do limite máximo permitido. No entanto estudos conduzidos por Tarantini e colaboradores (2011), indicaram que misturas de HPA podem afetar a carcinogenicidade de cada HPA individualmente [32].

As pesquisas conduzidas por Tarantini (2011) corrobora com as descobertas realizadas por Cioroiu e colabores (2013), que detectaram 15 HPA em pulmões de 31 pacientes com câncer de pulmão na Roménia, dos quais; benzo[a]antraceno, antraceno, fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno foram considerados os principais componentes da mistura. Encontrando concentrações que variaram de 0,33 – 31,94 ng g⁻¹ para os HPA carcinogênico e 2,46 – 218,19 ng g⁻¹ para os não cancerígenos, ambas as concentrações referentes a peso húmido do tecido [33, 34].

Diante disto, há a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de controle e gestão ambiental a nível nacional que estabeleçam os níveis máximos permitido de cada HPA, bem como a mistura deles. Uma vez que, estudos recentes apresentam evidências da potencialização dos efeitos carcinogênicos quando temos uma mistura de HPA.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi desenvolvido neste trabalho um método de extração empregando as técnicas de MSPD e GC/MS para análise de 16 HPA, considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA, em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

O método consistiu de uma abordagem univariada, seguida de uma otimização multivariada, obtida através de um planejamento fatorial 2^3 mais seis pontos axiais e a metodologia de superfície de resposta. A qual indicou como melhor condição 1,5 g para massa do adsorvente, 120 segundos para o tempo de homogeneização e 8 mL para o volume do solvente.

A garantia de resposta do método foi avaliada através dos parâmetros de validação, os quais asseguram a determinação dos 16 HPA em camarão, utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas empregando o modo do íon seletivo.

Quando comparado aos métodos reportados na literatura, pode ser considerado mais rápido; uma vez que integra o processo de extração e limpeza em um único método, e econômico; já que o consumo de materiais utilizadas durante o processo é reduzido.

A aplicação do método foi realizada em quatro amostras (A, B, C e D), em todas houve predominância dos HPA de 2 a 4 anéis. As concentrações dos HPA carcinogênicos estavam abaixo do limite permitido (5 ng g^{-1}) para o benzo[a]pireno e 30 ng g^{-1} para a somatória dos compostos benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, incluindo o benzo[a]antraceno.

Contudo, estudos comprovam que quando estes compostos estão associados aos HPA de menor massa molecular, possuem propriedades carcinogênicas. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de gestão de controle ambiental para o monitoramento de um número maior desses compostos.

REFERÊNCIAS

- [1] FAO. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service Global Aquaculture Produções – 1950-2013. FAO. **2014**.
- [2] IBGE 2015, disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>, acessado em 28 de fevereiro de 2017
- [3] Lima, J. S. G. Carcinicultura Marinha Familiar no Estuário do Rio Vaza-Barris, Sergipe: Implicações para uma Produção Sustentável. – Brasília, DF: *Embrapa*, **2014**.
- [4] Barbosa, J. C. S.; Santos, L. G.; Sant'Anna, M. V.; Souza, M. R., Damasceno, F. C.; Alexandre, M. R. Seasonal distribution of aliphatic hydrocarbons in the Vaza Barris estuarine system, Sergipe, Brazil. *Marine pollution bulletin*, vol. 104(1), **2016**, pag. 343-346.
- [5] Maciel, D. C.; de Souza, J. R. B.; Taniguchi, S.; Bicego, M. C.; Zanardi-Lamardo, E. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Marine pollution bulletin*, vol. 101(1), **2015**, pag. 429-433.
- [6] IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Chemicals. Industrial Processes and Industries Associated with inHumans. *International Agency Research on Cancer*. Lyon France. **1997**
- [7] Zhang, G.; Pan, Z.; Wang, X.; Mo, X.; Li, X. Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. *Environmental monitoring and assessment*, vol. 187(4), **2015**, pag. 173
- [8] Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, vol. 1221, **2012**, p.84-98.

- [9] Plaza-Bolaños, P.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of chromatography A*, vol. 1217(41), **2010**, pag. 6303-6326.
- [10] Barker, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 70, **2007**, pag. 151–162.
- [11] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Foglia, P.; Samperi, R.; Stampachiachiere, S.; Ventura, S.; Laganà, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 71, **2015**, pag. 186-193.
- [12] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Roma, **2014**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> >, **acessado em 19 de maio de 2016**.
- [13] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery and aquaculture statistics 2012. Roma, **2014**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3740t.pdf>>, **acessado em 28 de março de 2016**.
- [14] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pag. **2016**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>> acessado em 9 de dezembro de 2016
- [15] De Grave, S.; Cai, Y.; Anker, A. Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. *Hidrobiologia*, vol. 595, pag. 287-293, **2008**.
- [16] Primefact 268 – Biology and life cycles of prawns, **2010**. Disponível em <www.industry.nsw.gov.au/publications> acessado em 20 de janeiro 2017
- [17] ABCC – Associação brasileira de criadores de camarão; Brasil–ministério da pesca e aquicultura. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos

aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011. Convênio ABCC/MPA: nº 756578/2011. Natal, **2013**.

[18] Carvalho, M. E. S.; Fontes, A. L. A. Carcinicultura no Espaço Litorâneo Sergipano. *Revista da Fapese*, **2007**, vol.3, pag. 87-112.

[19] Vidal, M. F.; Luciano, J. F. X. Carcinicultura no Nordeste: velhos desafios para geração de emprego e de renda sustentáveis, até quando? n. 1, setembro, **2016**.

[20] Plano estadual de Recursos Hidricos de Sergipe PERH-SE, setembro 2010 Disponível em < http://www.redeacqua.com.br/wp-content/uploads/downloads/PERH-SE_RE16%20Final.pdf > acessado em 11/11/2017.

[21] Frena, M.; Bataglion, G. A.; Sandini, S. S.; Kuroshima, K. N.; Eberlinb, M. N.; Madureira, L. A. Distribution and Sources of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of Itajaí-Açu Estuarine System in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc*, vol. 00, pag.1-12, **2016**.

[22] Primavera, J. H.; Lavilla-Pitogo, C. R.; Ladja, J. M & Pena, M. D. A survey of chemical and biological products used in intensive prawn farms in the Philippines. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 26(1), **1993**, pag. 35-40.

[23] LIMA, J. S. G. Licenciamento da Carcinicultura Marinha Praticada em Áreas de Preservação Permanente no Estado de Sergipe: Diretrizes Para a Sustentabilidade Socioambiental. Relatório Técnico. Ministério Público Federal. Sergipe, **2012**, 95 pag.

[24] Machado, L. Dinâmica de nutrientes e matéria orgânica em viveiros de camarão marinho no estado de Sergipe. Monografia – Departamento de

Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, **2009**, 49 pag.

[25] ABCC - Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011 (Convênio ABCC/MPA: Nº 756578/2011), Natal, **2013**.

[26] Abdel-Shafy, H. I.; Mansour, M. S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 25(1), **2016**, pag. 107-123.

[27] Latimer, J. S.; Zheng, J. And Fate of PAHs in the Marine Environment. *PAHs: an ecotoxicological perspective*, pag. 9, **2003**.

[28] Foan, L.; Sablayrolles, C.; Elustondo, D.; Lasheras, E.; González, L.; Ederra, A.; Simon, V.; Santamaría, J. M. Reconstructing historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in a remote area of Spain using herbarium moss material. *Atmospheric Environment*, vol. 44(26), **2010**, pag. 3207–3214.

[29] Yuning Ma, Y.; Harrad, S. Spatiotemporal analysis and human exposure assessment on polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air, settled house dust, and diet: A review, *Environment International*, vol. 84, **2015**, pag. 7–16

[30] Kim, K.; Jahan, S. A.; Kabir, E.; Brownd, R J.C.; A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, vol. 60, **2013**, pag. 71–80.

[31] Lin, Y.; Qiu, X.; Ma, Y.; Ma, J.; Zheng, M.; Shao, M. Concentrations and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitrated PAHs (NPAHs) in the atmosphere of North China, and the transformation from PAHs to NPAHs. *Environmental Pollution*, vol. 196, **2015**, pag. 164-170.

- [32] Tarantini, A.; Maître, A.; Lefèbvre, E.; Marques, M.; Rajhi, A.; Douki, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo [a] pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology*, vol. 279(1), **2011**, pag. 36-44.
- [33] Cioroiu, B. I.; Tarcau, D.; Cucu-Man, S.; Chisalita, I.; Cioroiu, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in lung tissue of patients with pulmonary cancer from Romania. Influence according as demographic status and ABO phenotypes. *Chemosphere*, vol. 92(5), **2013**, pag. 504-511.
- [34] Moorthy, B.; Chu, C.; Carlin, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicological Sciences*, vol. 145(1), **2015**, pag. 5-15.
- [35] Xia, K.; Hagood, G.; Childers, C.; Atkins, J.; Rogers, B.; Ware, L.; Armbrust, K.; Jewell, J.; Diaz, D.; Gatian, N. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mississippi seafood from areas affected by the Deepwater Horizon oil spill. *Environmetal Science & Technology*, **2012**, vol. 46(10), pag. 5310–5318.
- [36] Sisinnio, C. L. S.; Oliveira-Filho, E. C.; Princípios de toxicologia ambiental: Conceitos e aplicações. Editora Interciência: Rio de janeiro, **2013**.
- [37] Sun, R. X.; Lin, Q.; Ke, C. L.; Du, F. Y.; Gu, Y. G.; Cao, K.; Luo, X.; Mai, B. X. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and marine organisms from the Daya Bay, South China. *Marine pollution bulletin*, vol. 103(1), **2016**, pag. 325-332
- [38] Ares, A.; Aboal, J. R.; Fernández, J. A.; Real, C & Carballeira, A. Use of the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum* to detect sources of small scale contamination by PAHs. *Atmospheric Environment*, vol. 43(34), pag. 5501-5509, **2009**

- [39] Torres, C. N. M.; Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos:Concentração e (Bio)disponibilidade. Dissertação Mestrado em Ciências do Mar, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, **2014**.
- [40] Hyötyläinen, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 394(3), **2009**, pag. 743-758.
- [41] Fumes, B. H.; Silva, M. R.; Andrade, F. N.; Nazario, C. E. D.; Lanças, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 71, **2015**, pag. 9-25.
- [42] Foan, L.; Simon, V. Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach and comparison of solid-phase extraction cleanup steps for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. *Journal of Chromatography A*, vol. 1256, **2012**, pag. 22-31.
- [43] Choi, M.; Kim, Y. J.; Lee, I. S.; Choi, H. G. Development of a one-step integrated pressurized liquid extraction and cleanup method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments. *Journal of chromatography A*, vol. 1340, **2014**, pag. 8-14.
- [44] Dosunmu, M. I.; Oyo-lta, I. O.; Oyo-lta, O. E. Risk assessment of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons via shrimp (*Macrobrachium felicinum*) consumption along the Imo River catchments, SE Nigeria. *Environmental geochemistry and health*, vol. 38(6), **2016**, pag. 1333-1345.
- [45] Carls, M. G.; Holland, L.; Pihl, E.; Zaleski, M. A.; Moran, J.; Rice, S. D. Polynuclear aromatic hydrocarbons in Port Valdez shrimp and sediment. *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 71(1), **2016**, pag. 48-59.

- [46] Ramalhosa, M. J.; Paíga, P.; Morais, S.; Sousa, A. M.; Gonçalves, M. P.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M. B. P. P. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: optimisation and validation of microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, vol. 135(1), **2012**, pag. 234-242.
- [47] Camacho, M.; Boada, L. D.; Orós, J.; Calabuig, P.; Zumbado, M.; Luzardo, O. P. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine pollution bulletin*, vol. 64(9), **2012**, pag. 1974-1980.
- [48] González-Curbelo, M. Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 71, **2015**, pag. 169-185.
- [49] Kristenson, E. M.; Udo, A. T.; Ramos, L. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25(2), **2006**, pag. 96-111.
- [50] Guerra, E.; Celeiro, M.; Lamas, J. P.; Llompart, M.; Garcia-Jares, C. Determination of dyes in cosmetic products by micro-matrix solid phase dispersion and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1415, **2015**, pag. 27-37.
- [51] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Laganà, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of chromatography A*, vol. 1217(16), **2010**, pag. 2521-2532.
- [52] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Laganà, A.; Piovesana, S.; Samperi, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 43, **2013**, pag. 53-66.

- [53] Barker, S. A. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, vol. 885(1), **2000**, pag. 115-127.
- [54] Barker, S. A.; Long, A. R.; & Short, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, vol. 475(2), **1989**, pag. 353-361.
- [55] Bogialli, S.; Di Corcia, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 70(2), **2007**, pag. 163-179.
- [56] Dórea, A. S. Dispersão da matriz em fase sólida. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos / organização: Eduardo Costa de Figueiredo, Keyller Basto Borges, Maria Eugenia C. Queiroz. – 1. Ed. – Rio de Janeiro: LTC, **2015**.
- [57] Rallis, G. N.; Sakkas, V. A.; Boumba, V. A.; Vougiouklakis, T.; Albanis, T. A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function. *Journal of Chromatography A*, vol. 1227, **2012**, pag. 1-9.
- [58] Vela-Soria, F.; Ballesteros, O.; Camino-Sánchez, F. J.; Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, L.; Navalón, A. Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchemical Journal*, vol. 118, **2015**, pag. 32-39.
- [59] Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J. Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1357, **2014**, pag. 110-146.

- [60] Liu, Q.; Shi, J.; Sun, J.; Wang, T.; Zeng, L.; Zhu, N.; Jiang, G. Graphene-assisted matrix solid-phase dispersion for extraction of polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated and hydroxylated analogs from environmental samples. *Analytica chimica acta*, vol. 708(1), **2011**, pag. 61-68.
- [61] Sun, X.; Wang, J.; Li, Y.; Yang, J.; Jin, J.; Shah, S. M.; Chen, J. Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples. *Journal of Chromatography A*, vol. 1359, **2014**, pag. 1-7.
- [62] Wang, Z.; Zhang, L.; Li, N.; Lei, L.; Shao, M.; Yang, X.; Song, Y.; Yu, A.; Zhang, H.; Qiu, F. Ionic liquid-based matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous liquid-liquid microextraction of synthetic dyes in condiments. *Journal of Chromatography A*, vol. 1348, **2014**, pag. 52-62.
- [63] Pensado, L.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, vol. 1077(2), **2005**, pag. 103-109.
- [64]. Campíns-Falcó, P.; Verdú-Andrés, J.; Sevillano-Cabeza, A.; Molins-Lagua, C.; Herráez-Hernández, R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, vol. 1211(1), **2008**, pag. 13-21.
- [65] Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Tadeo, J. L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, vol. 1148(2), **2007**, pag. 219-227.
- [66] Concha-Graña, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; De Nicola, F.; Aboal, J. R.; Rey-Asensio, A. I.; Giordano, S.; Reski, R.; Prada-Rodríguez, D. Matrix solid

phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A*, vol. 1406, **2015**, pag. 19-26.

[67] Ziarrusta, H.; Olivares, M.; Delgado, A.; Posada-Ureta, O.; Zuloaga, O.; Etxebarria, N. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, vol. 1391, **2015**, pag. 18-30.

[68] Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, vol. 1165(1), **2007**, pag. 32-38.

[69] Christopoulou, O. D.; Sakkas, V. A.; Albanis, T. A. Evaluation of matrix solid-phase dispersion extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in household dust with the aid of experimental design and response surface methodology. *Journal of separation science*, vol. 35(24), **2012**, pag. 3554-3560.

[70] Djatmika, R.; Hsieh, C. C.; Chen, J. M.; Ding, W. H. Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and on-line acetylation gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, vol. 1036, **2016**, pag. 93-99.

[71] Souza, M. R. R.; Moreira, C. O.; Lima, T. G.; Aquino, A; Dórea, H. S. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*, *Microchemical Journal*, vol. 110, **2013**, pag. 395–401.

[72] Fróes, M. B. R.; Santos, L. F. S.; Navickiene, S. Multi-residue determination of pesticides in açai tropical fruit (*Euterpe oleracea*) by matrix solid-phase dispersion combined with liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, vol. 6(1), **2013**, pag. 328-333.

- [73] Villaverde-de-Sáa, E.; Rodil, R.; Quintana, J. B.; Cela, R. Matrix solid-phase dispersion combined to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of paraben preservatives in mollusks. *Journal of Chromatography A*, vol. 1459, **2016**, pag. 57-66.
- [74] Li, J.; Li, Y.; Xu, D.; Zhang, J.; Wang, Y.; Luo, C. Determination of metrafenone in vegetables by matrix solid-phase dispersion and HPLC-UV method. *Food chemistry*, vol. 214, **2017**, pag. 77-81.
- [75] ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário oficial da União. Poder Executivo, 02 de junho de **2003**.
- [76] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2003**
- [77] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. F. S.; Melo, L. F. C.; validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, vol. 27(5), **2004**, pag. 771-780.
- [78] Lanças, F. M.; Validação de métodos cromatográficos de análise – São Carlos: ed. RiMa, 62p, **2004**
- [79] Leite, F. Validação em análise química, 5ª ed.; Editora Átomo: Campinas, **2008**.
- [80] Araujo, P. W.; Brereton, R. G. Experimental design III. Quantification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 15(3), **1996**, pag. 156-163.

[81] Barros Neto, B. B. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria I Benício de Barros Neto, Ieda Spacino Scarminio, Roy Edward Bruns. -- Campinas, SP: Editora da Unicamp, **2010**.

[82] Kincl, M.; Turk, S.; Vrečer, F. Application of experimental design methodology in development and optimization of drug release method. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 291(1), **2005**, pag. 39-49.

[83] Myers, R. H.; Montgomery, D. C. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, *John Wiley & Sons, Inc*, New York, **1995**.

[84] Ekbatani Amlashi, N.; Hadjmohammadi, M. R.; Sol-gel coating of poly (ethylene glycol)-grafted multiwalled carbon nanotubes for stir bar sorptive extraction and its application to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Separation Science*, vol. 39(17), **2016**, pag. 3445-3456.

[85] Ferreira, S. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H. S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandao, G. C.; Silva, E. G.P.; Portugal, L. A.; Dos Reis, P. S.; Dos Santos, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, vol. 597(2), **2007**, pag. 179-186.

[86] Kamankesh, M.; Mohammadi, A.; Hosseini, H.; Tehrani, Z. M. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Meat science*, vol. 103, **2015**, pag. 61-67.

[87] Yoshiara, L. Y.; Madeira, T. B.; Delaroza, F.; da Silva, J. B.; Ida, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International journal of food sciences and nutrition*, vol. 63(8), **2017**, pag 978-986.

- [88] Box, G. E. P.; Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B, Statistical Methodology*, vol. 13, **1951**, pag. 1–45.
- [89] Box, G. E. P.; Hunter, J.S. Multi-factor experimental design for exploring response surfaces, *Annals of Mathematical Statistics*, vol. 28, **1957**, pag. 195–241.
- [90] Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villa, L. S.; Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, vol. 76, **2008**, pag. 965–977.
- [91] Jaward, F. M.; Alegria, H. A.; Galindo Reyes, J. G.; Hoare, A. Levels of PAHs in the waters, sediments, and shrimps of Estero de Urias, an estuary in Mexico, and their toxicological effects. *The Scientific World Journal*, vol. 2012, **2012**.
- [92] Chatterjee, N. S.; Utture, S.; Banerjee, K.; Shabeer, T. A.; Kamble, N.; Mathew, S.; Kumar, K. A. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food chemistry*, vol. 196, **2016**, pag. 1-8.
- [93] Krueve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1187, **2008**, pag. 58–66.
- [94] Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Kurz, M. H. S.; da Costa Cabrera, L.; Duarte, F. A.; Zanella, R.; Primel, E. G. Comparison of matrix solid-phase dispersion and modified QuEChERS methods for extraction of pesticide residues from onion. *Analytical Methods*, vol. 4(6), **2012**, pag. 1820-1824.

- [95] Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Furlong, E. B.; Primel, E. G. Otimização e validação de método empregando quechers modificado LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola, *Química Nova*, vol.34, **2011**.
- [96] Sampaio, M. F. C. Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em caranguejo-uçá (*ucides cordatus*), Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe - São Cristóvão, 99 pag, **2016**.
- [97] Hess, P.; De Boer, J.; Cofino, W. P.; Leonards, P. E. G.; Wells, D. E. Critical review of the analysis of non-and mono-ortho-chlorobiphenyls. *Journal of chromatography A*, vol. 703(1-2), **1995**, pag. 417-465.
- [98] Anastassiades, M.; Maštovská, K.; Lehotay, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A*, vol. 1015(1), **2003**, pag. 163-184.
- [99] Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; & Yun, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, vol. 88(2), **2005**, pag. 630-638.
- [100] Brito, N M.; Junior, A.O. P; Posele, L.; Ribeiro, M.L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discurção. Pesticidas: *Revista Ecotoxicologia e Meio Mbiante*, vol.13, **2013**, pag. 129-146.
- [101] Cai, X.; Wang, C.; Xu, J.; Xue, X.; Zhang, X.; Liang, X. Application of matrix solid-phase dispersion methodology to the extraction of endogenous peptides from porcine hypothalamus samples for MS and LC–MS analysis. *Journal of Chromatography B*, vol. 879(9), **2011**, pag. 657-661.
- [102] Su, R.; Wang, X.; Xu, X.; Wang, Z.; Li, D.; Zhao, X.; Li, X.; Zhang, H.; Yu, A. Application of multiwall carbon nanotubes-based matrix solid phase dispersion extraction for determination of hormones in butter by gas

chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1218(31), **2011**, pag. 5047-5054.

[103] Iyer, S. S.; Zhang, Z. P.; Kellogg, G. E.; Karnes, H. T. Evaluation of deuterium isotope effects in normal-phase LC-MS-MS separations using a molecular modeling approach. *Journal of chromatographic science*, vol. 42(7), **2004**, pag. 383-387.

APÊNDICE

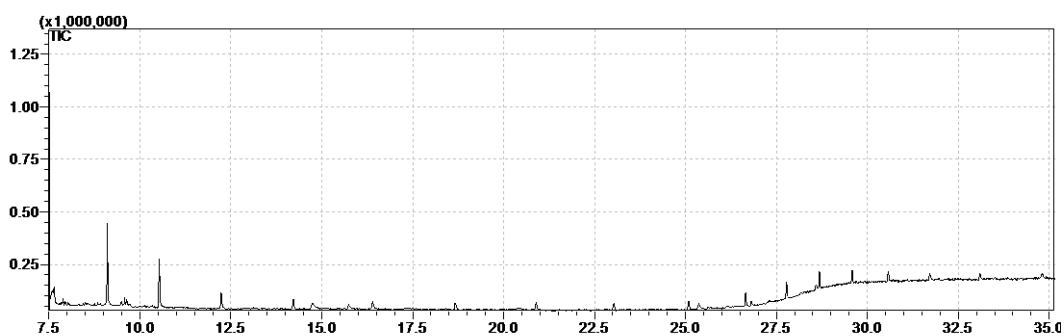
Apêndice 1 – Tabela com os valores de recuperação e coeficientes de variação para sílica, alumina e florisil.

Sílica	Cv	Alumina	Cv	Florisil	Cv
62	10	57	17	70	17
60	17	61	7	69	7
65	16	66	8	70	8
74	19	76	6	79	6
79	15	78	3	84	3
73	17	66	8	80	8
86	3	79	3	82	3
94	8	81	5	81	5
110	25	110	11	94	11
48	45	92	4	83	4
84	3	85	7	84	7
82	4	89	4	82	4
86	7	87	2	78	2
82	5	86	8	83	8
80	4	85	12	83	12
83	2	86	7	81	7

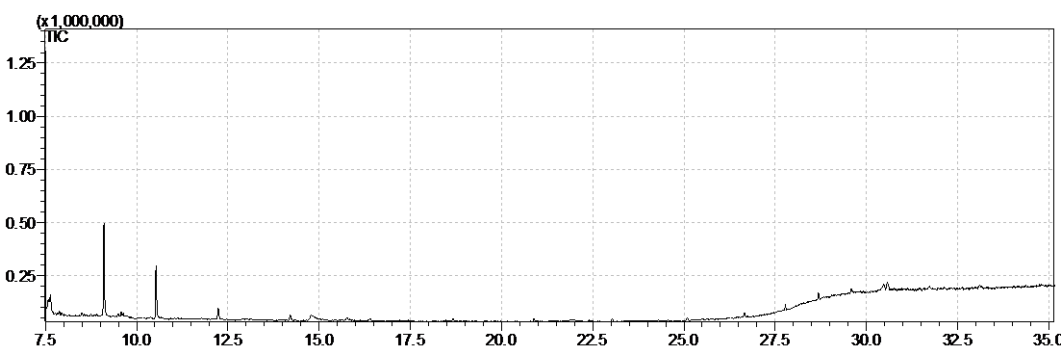
Apêndice 2 – Tabela com os valores de recuperação e coeficientes de variação para alumina florisil, ambos desativados a 5% com água ultrapura.

Florisil 5%	Cv	Alumina 5%	Cv
38	6	22	18
60	15	45	40
63	15	48	44
69	18	62	41
70	22	80	18
70	26	70	21
73	21	94	8
81	20	93	5
141	26	75	29
69	55	90	2
85	17	95	6
82	16	92	7
80	14	91	6
87	16	96	5
87	15	96	3
83	17	94	3

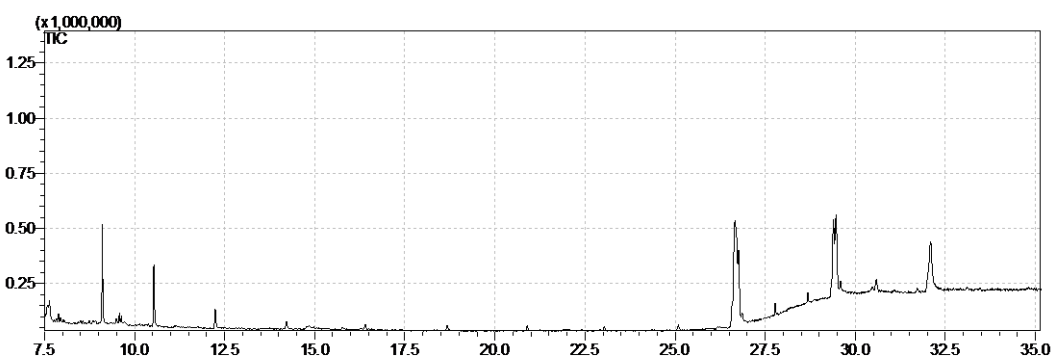
Apêndice 3 – Avaliação da contaminação utilizando alumina como adsorvente: cromatograma obtido no modo scan para um extrato não fortificado na ausência da matriz.



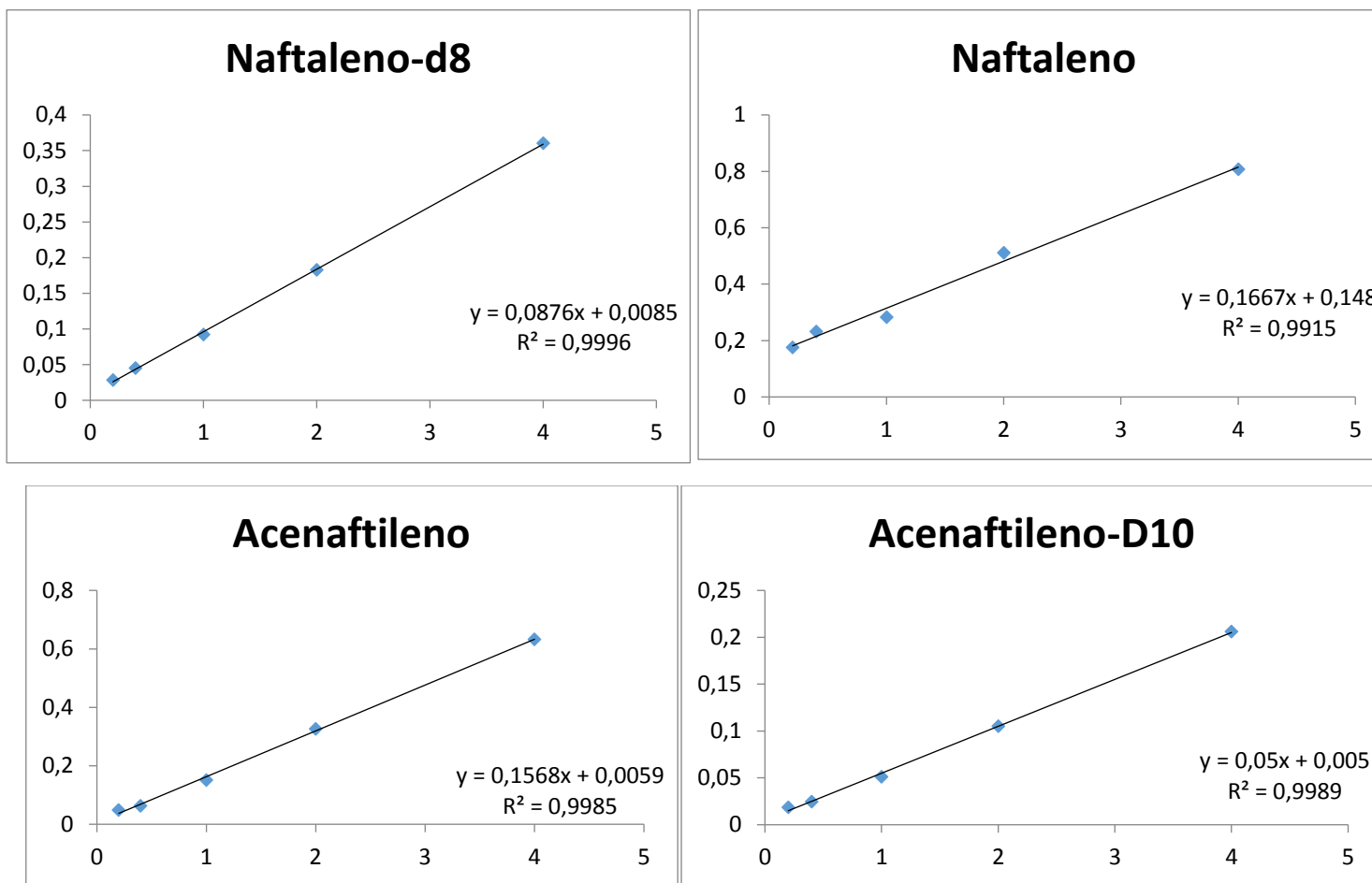
Apêndice 4 - Avaliação da contaminação utilizando florisil como adsorvente: cromatograma obtido no modo scan para um extrato não fortificado na ausência da matriz

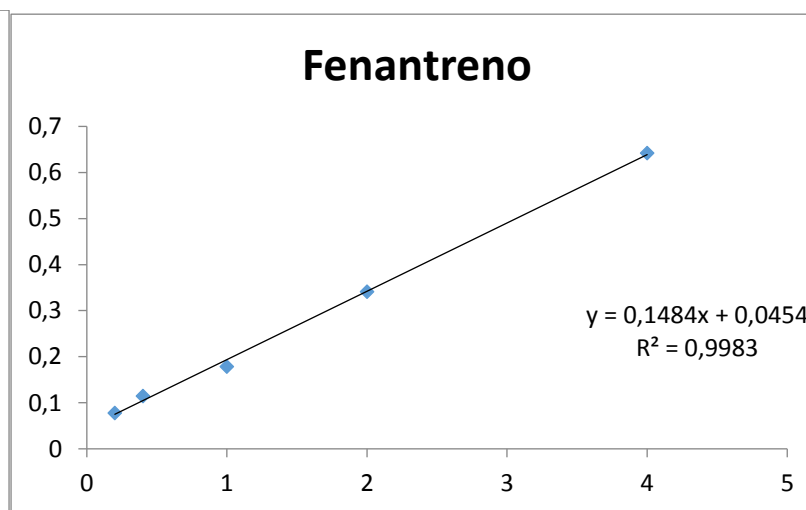
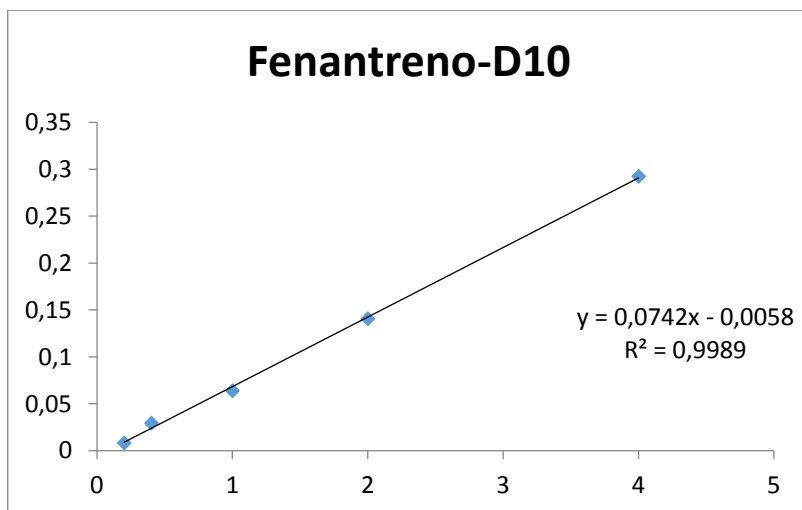
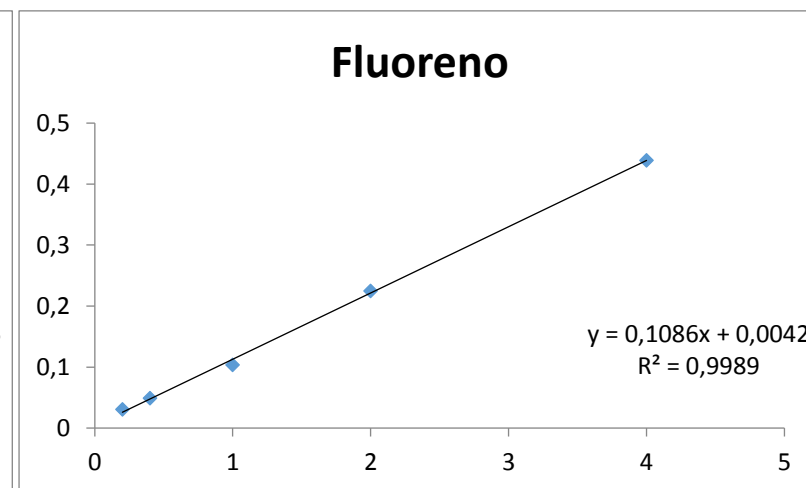
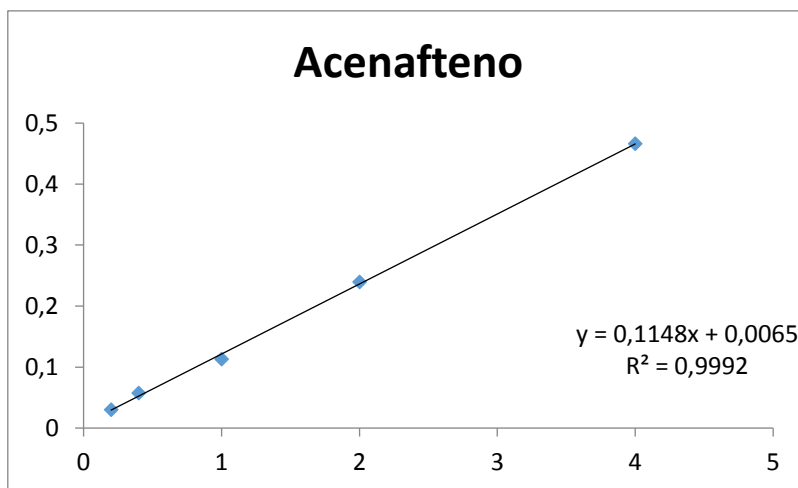


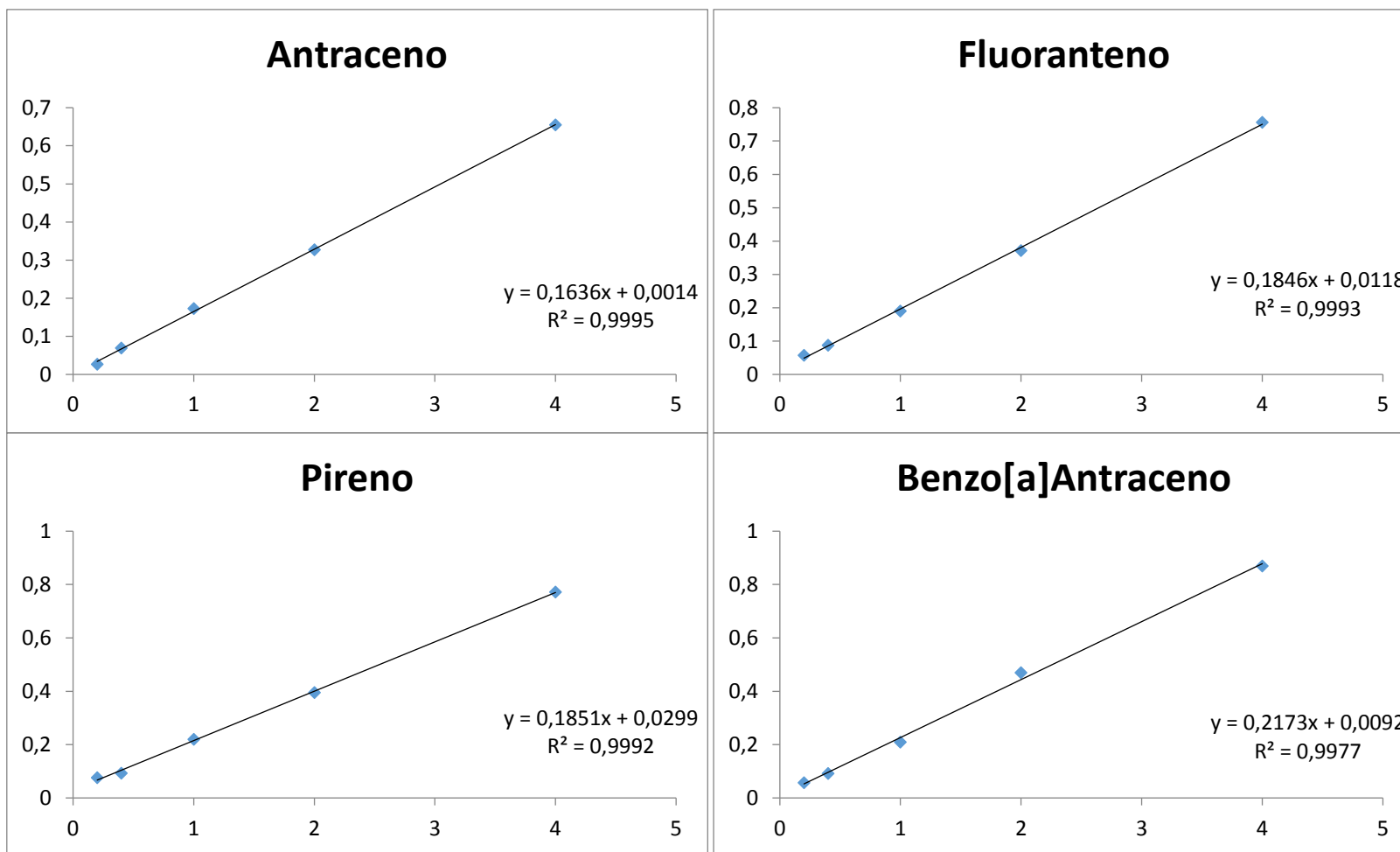
Apêndice 5 - Avaliação da contaminação utilizando sílica como adsorvente: cromatograma obtido no modo scan para um extrato não fortificado na ausência da matriz

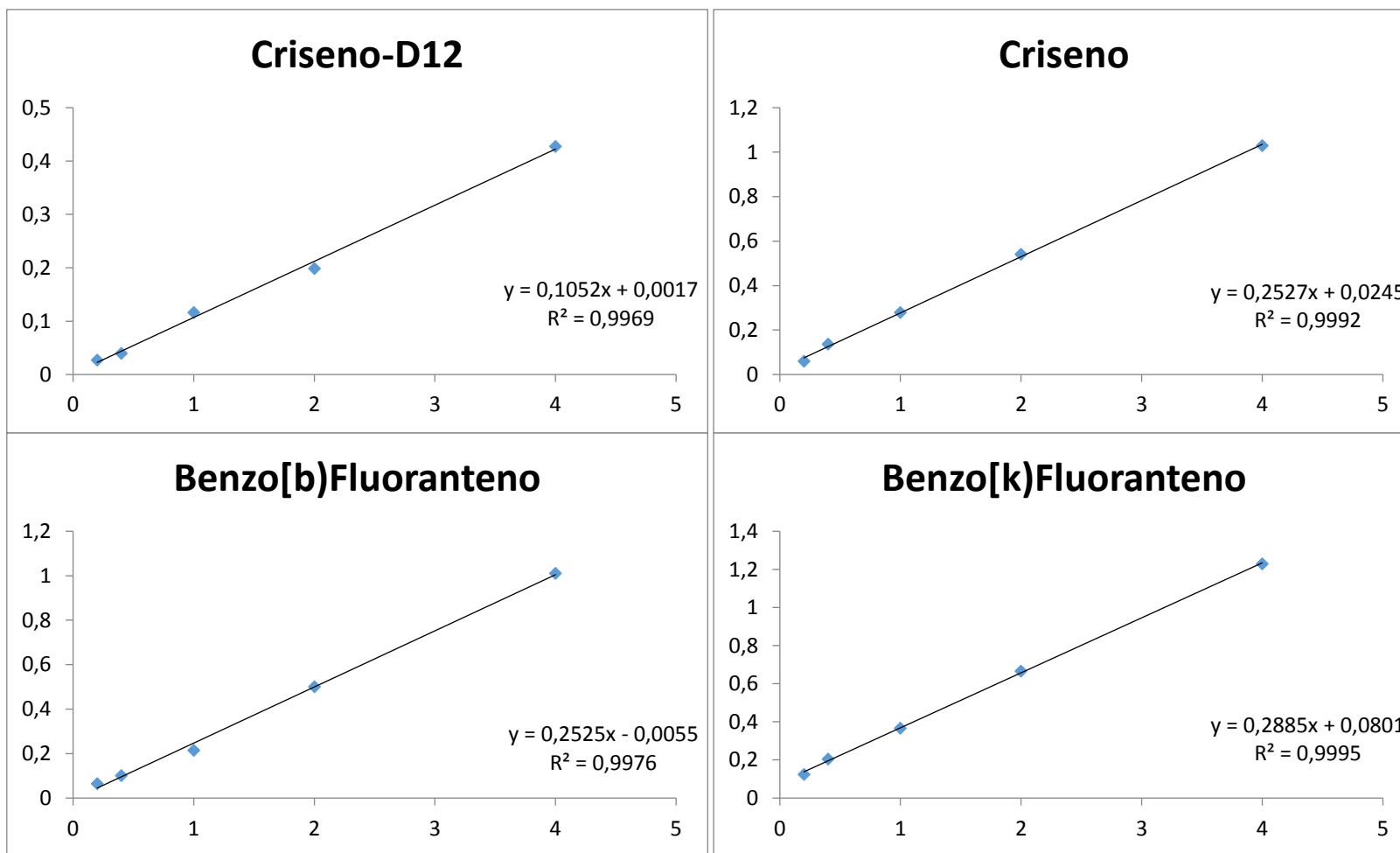


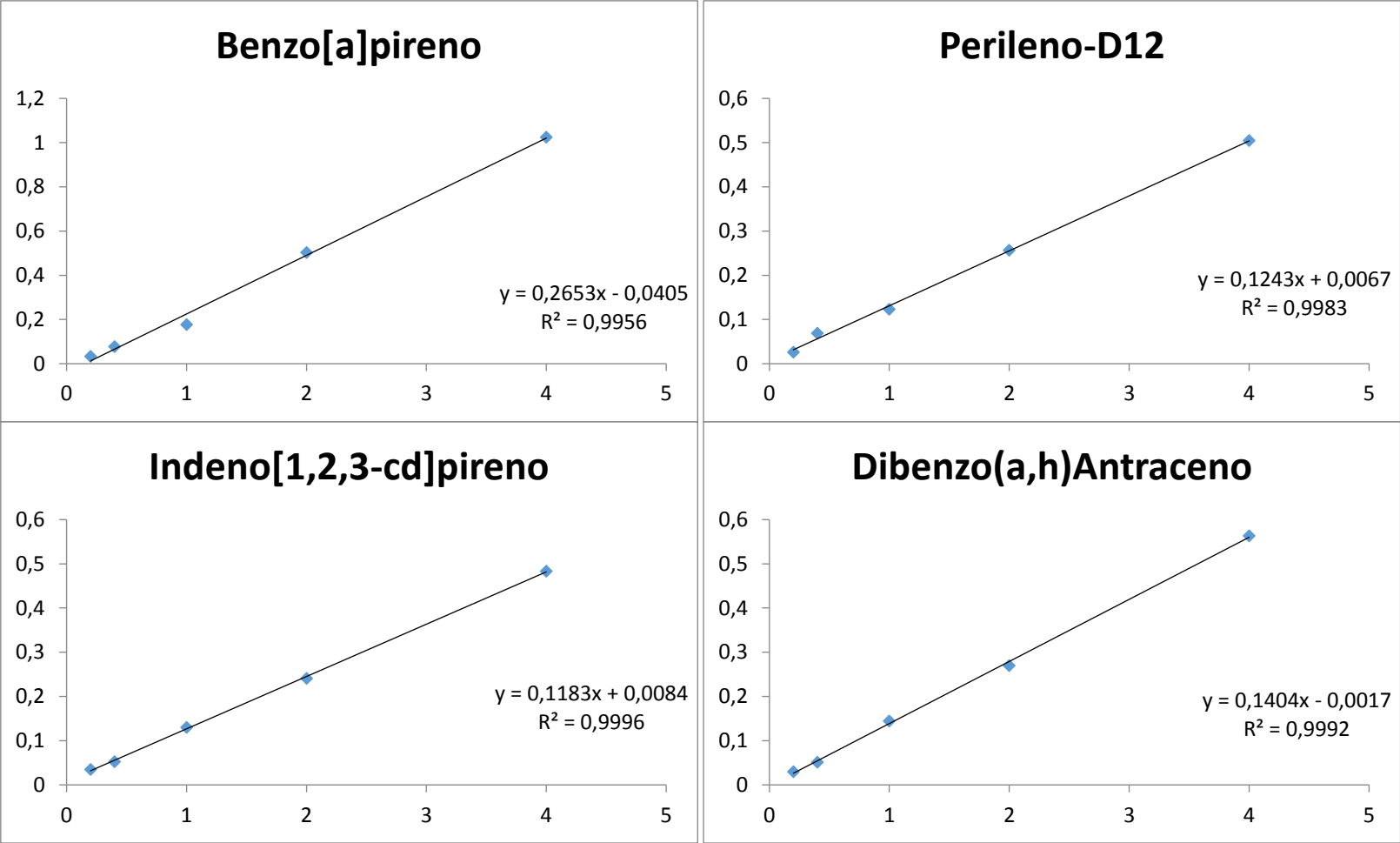
Apêndice 6 - Curvas analíticas dos 16 HPA mais os cinco surrogates preparadas no extrato da matriz, com a equação da reta e coeficientes de correlação (r).

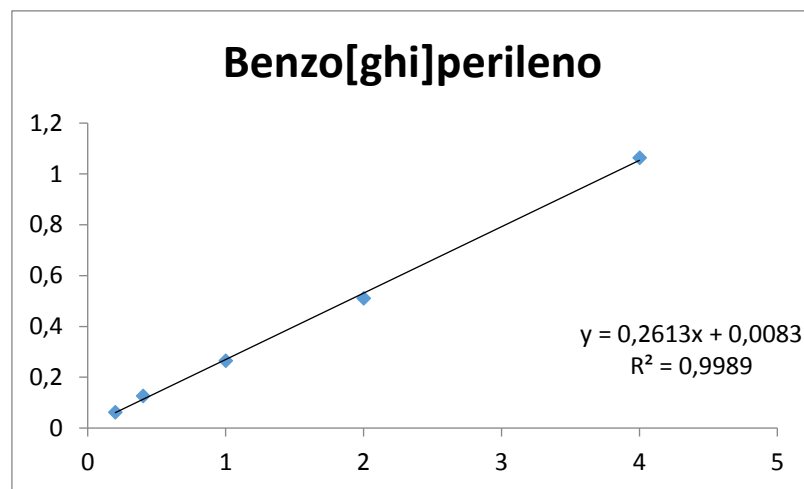




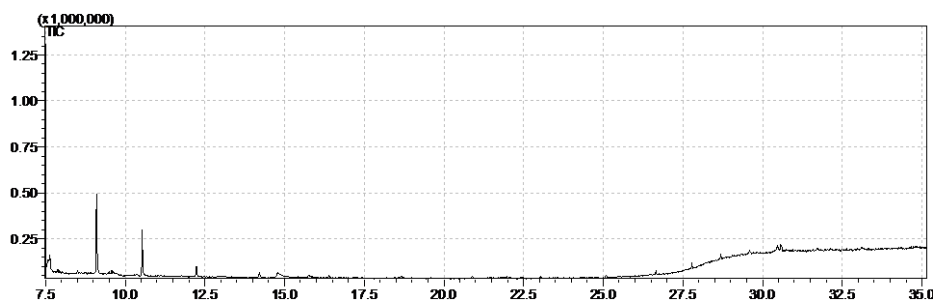






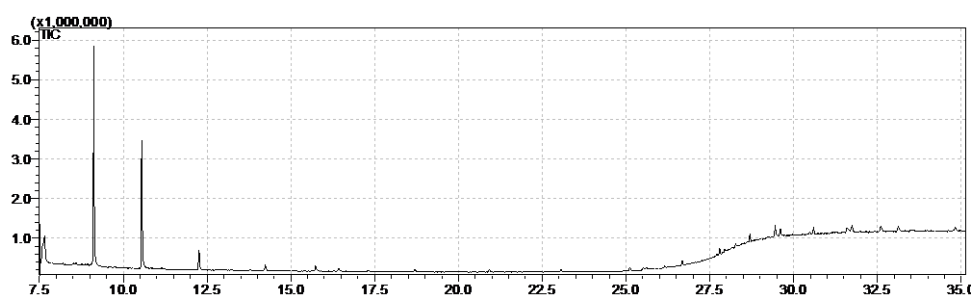


Apêndice 7 - Cromatograma no modo scan na ausência da matriz para a avaliação da contaminação durante o processo de validação

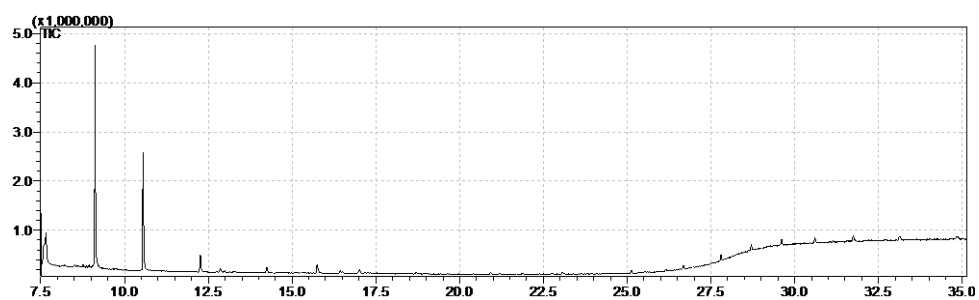


Apêndice 8 – Controle de qualidade – Avaliação da contaminação nas amostras A, B, C e D, realizadas através de um extrato preparado na ausência da matriz.

Amostra A

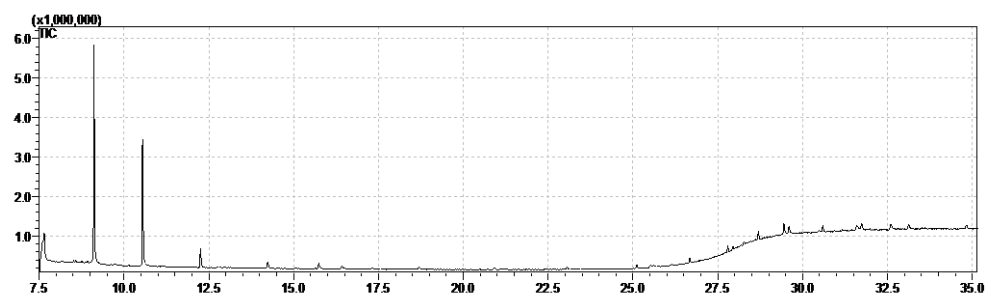


Amostra B

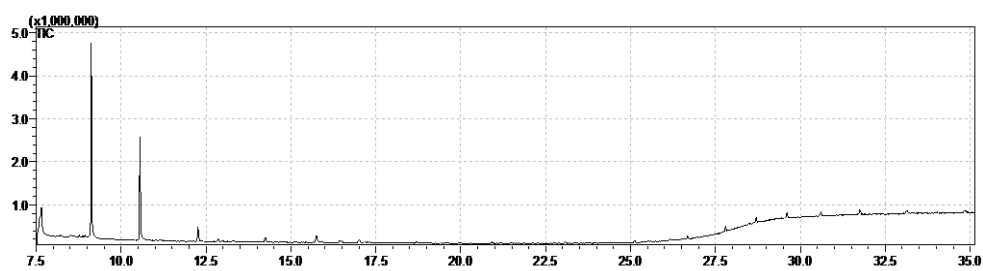


Amostra

C

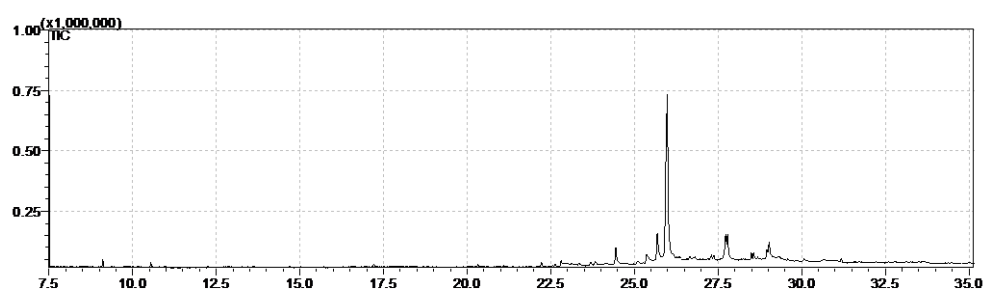


Amostra D

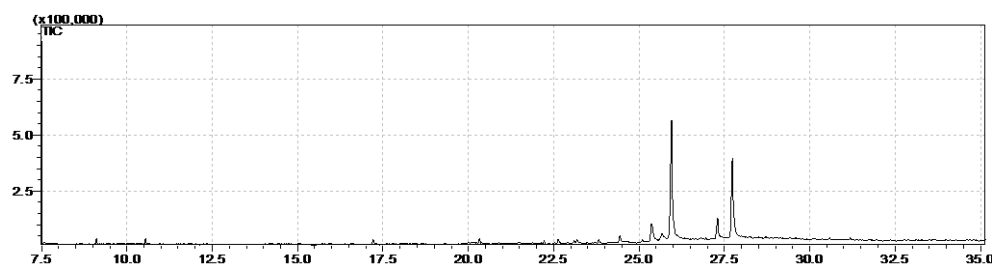


Apêndice 8 – Perfil (Scan) para as amostras B, C e D

Amostra B



Amostra C



Amostra D

