



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Ana Paula Zapelini de Melo

**Derramamento de petróleo no litoral brasileiro: desenvolvimento de métodos analíticos
para controle de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e
monitoramento de pescado baseado em risco**

Florianópolis
2023

Ana Paula Zapelini de Melo

**Derramamento de petróleo no litoral brasileiro: desenvolvimento de métodos analíticos
para controle de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e
monitoramento de pescado baseado em risco**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutora em Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Coorientador: Rodrigo Barcellos Hoff, Dr.

Florianópolis

2023

de Melo, Ana Paula Zapelini

Derramamento de petróleo no litoral brasileiro :
desenvolvimento de métodos analíticos para controle de
hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e monitoramento de
pescado baseado em risco / Ana Paula Zapelini de Melo ;
orientador, Pedro Luiz Manique Barreto, coorientador, Rodrigo
Barcellos Hoff, 2019.

148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Análise de alimentos. 3.
Avaliação de risco. 4. Saúde pública. 5. Validação de método. I.
Barreto, Pedro Luiz Manique. II. Hoff, Rodrigo Barcellos. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Ana Paula Zapelini de Melo

**Derramamento de petróleo no litoral brasileiro: desenvolvimento de métodos analíticos
para controle de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e
monitoramento de pescado baseado em risco**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 03 de agosto de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Fabiano Barreto, Dr.

Ministério da Agricultura e Pecuária

Heitor Daguer, Dr.

Ministério da Agricultura e Pecuária

Prof.^a Silvani Verruck, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutorado em Ciência dos Alimentos

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico esta obra ao meu nonno Antônio e à minha nonna Zélia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família: *nonna* Zélia, *nonno* Antônio, vó Celina, mãe Alessandra, padrasto Dinarte, tio Alex, marido Jardel e à minha filha e melhor amiga de quatro patas Loulou, por me amar e me apoiar incondicionalmente, além compreender a minha ausência nas várias datas festivas, finais de semana e feriados em virtude desta tese.

À minha parceira de bancada e amiga Thais de Oliveira, que foi meu apoio diante das dificuldades, que comemorou comigo cada etapa concluída, cada resultado satisfatório, cada artigo aceito. Obrigada por cada abraço.

Às minhas queridas amigas: Mari, Lu, Dani, Nara e Lorena por todo o carinho e compreensão, especialmente nos momentos que não pude estar presente em nossos encontros.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, por proporcionar a minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo fomento da minha bolsa de estudos (Processo nº 88882.344943/2019-01) e recursos para execução deste estudo (PROEX/CAPES nº 1138/2019).

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul por meio de seu Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC), pertencente à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), por disponibilizar sua estrutura física, pessoal e financeira para executar este estudo (Processo nº 21050.008429/2019-48).

Aos meus amigos e colegas da SLAV-SC, por toda a ajuda nas mais de mil análises realizadas neste estudo, especialmente às minhas queridas amigas Andressa e Samantha, por todo o apoio.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, pela oportunidade, atenção e confiança durante esses mais de dez anos de orientação.

Ao Auditor Fiscal Agropecuário e coorientador Dr. Rodrigo Barcellos Hoff, por todo o apoio e orientação para executar este estudo. Além das muitas horas ao meu lado na bancada e nos *softwares* de tratamento de dados.

Ao analista Dr. Luciano Molognoni, pelo apoio em todas as etapas deste estudo, por não medir esforços para me ensinar, ainda que fosse necessário me explicar uma dezena de vezes, e principalmente, pela amizade.

Ao Auditor Fiscal Agropecuário Dr. Heitor Daguer, por todas as orientações quanto à escrita, inclusive durante os finais de semana por ligação telefônica e por seu olhar meticuloso que, sem dúvidas, refinaram este estudo.

Toda a experiência de escrever esta tese foi emocionante e desafiadora. Estar envolvida em uma pesquisa de ponta, durante um dos desastres ambientais mais importantes da história do Brasil, teve um significado especial. Tão importante quanto publicar artigos científicos em periódicos de alto fator de impacto, é poder desenvolver um estudo que impacte na vida das pessoas, seja um pescador em uma comunidade no Nordeste ou milhares de consumidores de pescado do país. Por mais desafiador que tenha sido essa jornada, ter a companhia de profissionais que são referência como Rodrigo, Luciano e Heitor, fez com que eu desenvolvesse a capacidade de sentir quando estava no caminho certo. Obrigada por me encorajarem e motivarem a alcançar meus objetivos.

A todos, muito obrigada!

*“Pra induzir o sonho dentro de um pesadelo,
Entre um traçante e outro,
Dilatar o tempo e imaginar um mundo novo”*

Don L

RESUMO

Em 2019, um extenso derramamento de petróleo foi identificado na costa do Brasil. O evento causou a contaminação com petróleo de mais de 4.000 km do litoral do país, levando à interdição de praias e atividades pesqueiras, gerando prejuízos ao comércio de pescado. O desastre destacou a necessidade de um método analítico capaz de quantificar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado de forma ágil e com confiabilidade metrológica para a tomada de decisões. Esta tese, composta por três capítulos, teve como objetivo avaliar a contaminação de amostras de pescado com HPAs após o derramamento de petróleo de 2019. No primeiro capítulo, apresentado em formato de revisão da literatura, foram abordadas importantes questões envolvidas na contaminação de pescado com petróleo, incluindo os principais desastres de derramamento nos oceanos e os impactos na segurança do pescado; os marcadores químicos de contaminação; os possíveis efeitos à saúde humana devido ao consumo de pescado contaminado; os métodos analíticos de controle; e as abordagens mais adequadas para avaliar os riscos à saúde humana. As abordagens discutidas foram reproduzidas, adaptadas ou otimizadas neste estudo. Técnicas de extração modernas, detecção por espectrometria de massas e avaliação de risco foram empregadas. Pela primeira vez, um método baseado em extração por líquido pressurizado usando uma máquina de cápsula de café *espresso* e posterior quantificação de HPAs por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS) foi aplicado a amostras de pescado. O método desenvolvido, que correspondeu ao segundo capítulo desta tese, auxiliou as autoridades reguladoras a garantir a segurança sanitária do pescado. Os resultados iniciais fizeram parte do primeiro relatório oficial sobre a contaminação de pescado com HPAs após o desastre. No entanto, os desdobramentos da investigação demandaram o aumento da frequência analítica e da reprodutibilidade do método. Um método avançado de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) foi então desenvolvido para atender a esse propósito, proporcionando inovação química ao terceiro capítulo deste estudo. O novo método foi aplicado a várias amostras biológicas para analisar as evidências criminais do derramamento de petróleo, consolidando os dados do primeiro monitoramento oficial brasileiro de HPAs em pescado. Além disso, o risco da exposição à saúde dos consumidores de pescado foi avaliado pelo modelo determinístico de exposição dietética crônica e pela abordagem de margem de exposição (MOE). Com os métodos desenvolvidos, mais de 400 amostras foram analisadas. Apesar da baixa taxa de amostras não conformes (< 1%), HPAs foram mensurados em 23% das amostras de pescado ($n = 85$), compreendendo valores até $156 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o conjunto de marcador de contaminação de alimentos 8HPAs. O composto carcinogênico benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) estava presente em 7,7% ($n = 29$) das amostras. Os resultados da avaliação de risco indicaram que o desastre foi de baixa preocupação à saúde dos consumidores de pescado. Apesar disso, a exposição aos HPAs deve ser mantida o mais baixo quanto razoavelmente possível. Os produtos desta tese foram úteis não apenas para a inspeção de pescado, mas também foram aplicados na investigação forense do desastre. Com os métodos desenvolvidos foi possível mensurar concentrações de até $39.456 \mu\text{g kg}^{-1}$ de HPAs em órgãos e tecidos de aves, mamíferos e répteis. Dessa forma, foi demonstrada a importância de os laboratórios oficiais de controle respaldarem as investigações e ações das autoridades reguladoras, evitando prejuízos à economia pesqueira e preservando a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Análise de alimentos; Avaliação de risco; Saúde pública; Segurança de alimentos; Validação de método.

ABSTRACT

In 2019, an extensive oil spill was identified in the Brazilian coast. The event caused the oil contamination of more than 4,000 km of the country's coastline, leading to the banning of bathing on beaches and fishing activities, causing damage to seafood trade. The disaster highlighted the need for an analytical method capable of quantifying polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seafood quickly and with metrological reliability for decision-making. This thesis, consisting of three chapters, aimed to assess the PAH contamination of seafood samples after the 2019 oil spill. The first chapter presented a literature review, where important issues involved in the contamination of seafood with oil were addressed, including the main oil spill disasters in the oceans and its impacts on seafood safety; chemical markers of contamination; possible effects of the consumption of seafood contaminated with PAH on human health; analytical control methods; and the most appropriate approaches to assess its risks to human health. The approaches discussed were reproduced, adapted, or optimized in this study. Modern extraction techniques, mass spectrometry detection, and risk assessment were employed. For the first time, a method based on pressurized liquid extraction using a hard cap *espresso* coffee machine and subsequent quantification of PAH by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was applied to seafood samples. The developed method, which represented this thesis' second chapter, assisted regulatory authorities to guarantee seafood safety. The initial results were part of the first official report on PAH seafood contamination after the disaster. However, the investigation unfolding demanded an increase in the analytical throughput and method reproducibility. An advanced method of energized dispersive guided extraction (EDGE) was then developed to serve this purpose, providing chemical innovation to the third chapter of this study. The new method was applied to several samples of biological matrices in order to analyze criminal evidence of the oil spill, consolidating data of the first official Brazilian PAH monitoring in seafood. In addition, exposure risk to the health of seafood consumers was assessed by the deterministic model of chronic dietary exposure and the margin of exposure approach. With the developed methods, over 400 samples were analyzed. Despite the low rate of non-compliant samples, PAH were measured in 23% of the seafood samples ($n = 85$), comprising values up to $156 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the marker set PAH8. The carcinogenic compound benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) was present in 7.7% ($n = 29$) of the samples. The results of the risk assessment indicated that the disaster was of low concern for public health. Despite this, PAH exposure should be kept as low as reasonably achievable. The results of this thesis were useful not only for seafood inspection, but were also applied in the forensic investigation of the disaster. With the developed methods, concentrations of up to $39,456 \mu\text{g kg}^{-1}$ of PAH were measured in organs and tissues of birds, mammals, and reptiles. In this way, the importance of the official control laboratories supporting the investigations and actions of the regulatory authorities was demonstrated, preventing damage to the fishing economy, and preserving the health of consumers.

Keywords: Food analysis; Food safety; Method validation; Public health; Risk assessment.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Localidades atingidas pelo derramamento de petróleo no litoral do Brasil em 2019.	34
Figura 2 – Cronologia das investigações e monitoramento do derramamento de petróleo ocorrido no litoral do Brasil ente 2019 e 2020.	37
Figura 3 – Moléculas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com reentrâncias moleculares denominadas “baía” e “fiorde”. A esquerda uma molécula de benzo[<i>a</i>]pireno com uma região “baía” e a direita uma molécula de dibenzo[<i>a,l</i>]pireno com uma região “baía” e uma “fiorde”.	39
Figura 4 – Conversão metabólica de uma molécula de benzo[<i>a</i>]pireno em metabólitos potencialmente carcinogênicos.	40
Figura 5 – Principais métodos de extração, limpeza do extrato, concentração dos analitos e detecção e/ou quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado.	47
Figura 6 – Estrutura da análise de risco, composta por: avaliação de risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco, e suas etapas.	60
Figura 7 – Avaliação de risco à saúde humana associada ao consumo de pescado contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) através da equação de exposição dietética estimada e da abordagem de margem de exposição (MOE).	64
Figura 8 – Principais pontos-chave de cada uma das etapas de avaliação de risco à saúde humana pela exposição dietética aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) após derramamentos de petróleo no oceano.	67

CAPÍTULO II

Figura 1 – Etapas de preparo das amostras para determinar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado usando máquina de cápsula de café <i>espresso</i> e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).....	87
Figura 2 – Influência das abordagens de <i>salting out</i> na sensibilidade do método (intensidade do sinal analítico, em cps) e recuperação dos analitos (%).	95

Figura 3 – Influência do fator de concentração na sensibilidade do método, onde a intensidade do sinal analítico é expressa em porcentagem (%) e o sinal mais intenso é assumido como 100%.	96
Figura 4 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de amostra branca de mexilhão fortificada em 5 µg kg ⁻¹ usando as seguintes fases estacionárias: C ₁₈ (A), fenil-hexil (B), e Zorbax Eclipse PAH (C), onde (1) benzo[<i>a</i>]antraceno (5,7 min), (2) criseno (5,9 min), (3) benzo[<i>b</i>]fluoranteno (6,4 min), (4) benzo[<i>k</i>]fluoranteno (6,8 min), (5) benzo[<i>a</i>]pireno (7,1 min), (6) dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (7,5 min), (7) benzo[<i>ghi</i>]perileno (8,0 min) e (8) indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (8,4 min).	98
Figura 5 – Gráfico de injeções de (A) padrão em solvente (B) mexilhão (<i>Perna perna</i>), (C) ostra (<i>Crassostrea gigas</i>), (D) peixes com baixo teor de gordura (<i>Pangasius</i> spp.), (E) peixes com alto teor de gordura (<i>Thunnus</i> spp.), (F) camarão (<i>Penaeus</i> spp.), (G) material de referência certificado <i>shellfish</i> – FAPAS.	103

CAPÍTULO III

Figura 1 – Etapas do método de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado utilizando extração dispersiva guiada energizada (EDGE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).	120
Figura 2 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de uma amostra de peixe fortificada com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em 5,00 µg kg ⁻¹ , onde a parte A corresponde a extração dos analitos usando o método descrito por de Melo et al. (2022b) e a parte B corresponde a extração dispersiva guiada energizada (EDGE).	130
Figura 3 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de uma amostra de peixe fortificada com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em 5,00 µg kg ⁻¹ , onde a parte A corresponde a uma amostra branca de peixe e a parte B corresponde a uma amostra branca de peixe fortificada com HPAs (5,00 µg kg ⁻¹).	131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Os principais derramamentos de petróleo nos oceanos em ordem cronológica e toneladas de petróleo derramadas.....	29
Tabela 2 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) selecionados como prioritários de acordo com a <i>United States Environmental Protection Agency</i> (US EPA) e selecionados como marcadores de contaminação de alimentos de acordo com <i>European Food Safety Authority</i> (EFSA). Classificação de carcinogenicidade para humanos de acordo com a <i>International Agency for Research on Cancer</i> (IARC).....	42
Tabela 3 – Níveis de preocupação provisórios para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado estabelecidos pelos Estados Unidos após o derramamento de petróleo <i>Deepwater Horizon</i> e pelo Brasil após o derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do país (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).	45
Tabela 4 – Abordagens analíticas para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado, incluindo detalhes de tipo de matriz, quantidade de amostra, preparo de amostra, instrumentação analítica e parâmetros de desempenho.	49

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Parâmetros de condições de monitoramento de reação selecionada (SRM) para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).....	89
Tabela 2 – Níveis de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) usados na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) na validação do método.	92
Tabela 3 – Figuras analíticas de mérito obtidas na validação do método de determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).	101
Tabela 4 – Faixas de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i>	

com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) em pescado coletado na costa brasileira..... 106

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Parâmetros do monitoramento de reação selecionada (SRM) para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS). 122

Tabela 2 – Valores médios para consumo diário de pescado (kg) e massa corporal (kg) da população brasileira, estratificados por regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) e sexo (feminino e masculino)..... 125

Tabela 3 – Resultados analíticos de um material de referência (peixe defumado) submetido à quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS). 128

Tabela 4 – Performance de validação do método de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de pescado. 133

Tabela 5 – Faixa de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de pescado pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil (SIF) em toda a costa brasileira. 134

Tabela 6 – Valores de margem de exposição (MOE) obtidos pela avaliação de risco pela exposição dietética aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de consumidores de pescado no Brasil , estratificado por sexo (feminino e masculino) e regiões geográficas (Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste)..... 138

Tabela 7 – Faixas de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com ionização química a pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) em amostras forense do derramamento de petróleo. 140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	ionização química à pressão atmosférica (do inglês, <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
B[a]A	benzo[a]antraceno
B[a]P	benzo[a]pireno
B[b]F	benzo[b]fluoranteno
B[ghi]P	benzo[ghi]perileno
BMD	dose de referência (do inglês, <i>benchmark dose</i>)
BMDL	dose mais baixa de referência (do inglês, <i>benchmark dose lower confidence limit</i>)
BMDL ₁₀	dose mais baixa de referência para um aumento de 10% da incidência de tumores em animais, com 95% de probabilidade de acerto (do inglês, <i>95% lower confidence limit on the benchmark dose for a 10% response</i>)
CC _α	limite de decisão
CC _β	capacidade de detecção
Cri	criseno
CV	coeficiente de variação
D[a,h]A	dibenzo[a,h]antraceno
d-SPE	extração em fase sólida dispersiva (do inglês, <i>dispersive solid-phase extraction</i>)
EDGE	extração dispersiva guiada energizada (do inglês, <i>energized dispersive guided extraction</i>)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
HCCM	máquina de cápsula de café <i>espresso</i>
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
I[cd]P	indeno[1,2,3-cd]pireno
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-APCI-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo <i>tandem</i> com ionização química à pressão atmosférica (do inglês, <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization source</i>)
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MOE	margem de exposição (do inglês, <i>margin of exposure</i>)
M2	filtro de politetrafluoretileno com 0,22 µm de porosidade
PLE	extração por líquido pressurizado
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SRM	Monitoramento de reação selecionada
TEF	fator de equivalência tóxica (do inglês, <i>toxic equivalency factor</i>)
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
4HPAs	soma de benzo[<i>a</i>]antraceno, criseno, benzo[<i>b</i>]fluoranteno e benzo[<i>a</i>]pireno
8HPAs	soma de benzo[<i>a</i>]antraceno, benzo[<i>a</i>]pireno, benzo[<i>b</i>]fluoranteno, benzo[<i>ghi</i>]perileno, benzo[<i>k</i>]fluoranteno, criseno, dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno e indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno
16 US EPA HPAs	acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[<i>a</i>]antraceno, benzo[<i>a</i>]pireno, benzo[<i>b</i>]fluoranteno, benzo[<i>ghi</i>]perileno, benzo[<i>k</i>]fluoranteno, criseno, dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno, naftaleno e pireno
15 + 1 EU HPAs	benzo[<i>a</i>]antraceno, benzo[<i>a</i>]pireno, benzo[<i>b</i>]fluoranteno, benzo[<i>c</i>]fluoreno, benzo[<i>ghi</i>]perileno, benzo[<i>j</i>]fluoranteno, benzo[<i>k</i>]fluoranteno, criseno, ciclopenta[<i>c,d</i>]pireno, dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno, dibenzo[<i>a,i</i>]pireno, dibenzo[<i>a,e</i>]pireno, dibenzo[<i>a,h</i>]pireno, dibenzo[<i>a,l</i>]pireno, indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno e 5-metilcriseno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
 CAPÍTULO I: DESASTRES COM DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO NOS OCEANOS: IMPACTOS NA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS E MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROLE		
23		
1	INTRODUÇÃO	27
2	OS PRINCIPAIS DESASTRES COM PETRÓLEO NOS OCEANOS E SEUS IMPACTOS.....	29
2.1	A EXPERIÊNCIA BRASILEIRA COM DESASTRES COM DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO.....	33
3	MARCADORES QUÍMICOS DE CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO E TOXICOLOGIA.....	38
4	MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROLE PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM PESCADO.....	46
5	ANÁLISE DE RISCO	59
5.1	AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA ASSOCIADA AO CONSUMO DE PESCADO CONTAMINADO COM HPAs	61
6	CONCLUSÃO	68
7	REFERÊNCIAS	69
 CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE HPAS EM PESCADO POR PLE-LC-APCI-MS/MS APÓS O DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO NO NORDESTE E SUDESTE DO BRASIL		
79		
1	INTRODUÇÃO	83
2	MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1	PADRÕES E REAGENTES	85
2.2	AMOSTRAS	86
2.3	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	86
2.4	ANÁLISES POR LC-APCI-MS/MS	88

2.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	91
2.6	APLICABILIDADE DO MÉTODO	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	94
3.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES LC-APCI-MS/MS	97
3.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	100
3.4	APLICABILIDADE DO MÉTODO	104
4	CONCLUSÃO	107
5	REFERÊNCIAS	108

CAPÍTULO III: RÁPIDA EXTRAÇÃO DISPERSIVA GUIADA ENERGIZADA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PARA ANÁLISE DE EVIDÊNCIAS DO DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO E MONITORAMENTO PESCADO BASEADO EM RISCO..... 112

1	INTRODUÇÃO	116
2	MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1	PADRÕES E REAGENTES	118
2.2	AMOSTRAS	118
2.3	EXTRAÇÃO DISPERSIVA GUIADA ENERGIZADA (EDGE)	119
2.4	ANÁLISES POR LC-APCI-MS/MS	121
2.5	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DO MÉTODO	123
2.6	AVALIAÇÃO DE RISCO	124
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
3.1	EXTRAÇÃO DISPERSIVA GUIADA ENERGIZADA (EDGE)	126
3.2	ANÁLISE POR LC-APCI-MS/MS.....	129
3.3	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DO MÉTODO	131
3.4	PRIMEIRO MONITORAMENTO OFICIAL BRASILEIRO DE HPAS EM PESCADO.....	134
3.5	AVALIAÇÃO DE RISCO	136
3.6	APOIO LABORATORIAL À INVESTIGAÇÃO FORENSE	139
4	CONCLUSÃO	141
5	REFERÊNCIAS	143
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146

APÊNDICE A: PRODUTOS DA TESE.....	147
--	------------

1 INTRODUÇÃO

Em 2019, ocorreu um derramamento de petróleo no oceano Atlântico Sul atingindo mais de 4.000 km de extensão da costa brasileira. Esse desastre provocou severas consequências ambientais, sociais e econômicas. Em decorrência da grave situação instaurada, o governo brasileiro lançou uma força-tarefa para gerenciar as consequências do desastre. Órgãos nacionais e internacionais forneceram auxílio nas investigações, mitigação dos danos e monitoramento dos impactos ambientais e na saúde. A Marinha do Brasil, IBAMA e Polícia Federal foram os responsáveis pela coleta de amostras biológicas como evidências criminais do desastre e o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) foi designado para garantir a segurança sanitária do pescado, especialmente em relação a perigos químicos como a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (DE MELO et al., 2022b).

Os HPAs, presentes na composição química do petróleo, são marcadores de contaminação petrogênica. Existem evidências que correlacionam a ingestão de alimentos contaminados com HPAs com maiores riscos de desenvolvimento de câncer (IARC, 2010). O conjunto de 4HPAs, composto pela soma de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno e criseno e o conjunto de 8HPAs, composto pela soma de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno, são recomendados como marcadores de contaminação de alimentos (EFSA, 2008).

Uma das principais fontes de dados usadas para apoiar as autoridades em situações de desastres com petróleo são as medições químicas laboratoriais. O apoio laboratorial é fundamental para respaldar decisões importantes como liberação ou interdição de locais de pesca e comercialização de pescado, devido ao risco à saúde dos consumidores. No entanto, no momento do desastre não havia no Brasil um método analítico oficial para controle de HPAs em pescado, assim como também não havia um programa oficial de monitoramento desses contaminantes.

Visando respaldar as ações governamentais do MAPA após o derramamento de petróleo, o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA-RS), por meio do seu Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC) e o Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) formaram um grupo de pesquisa para atender a esse propósito, surgindo assim a necessidade de execução desta tese para auxiliar na investigação do desastre.

Para compreender o estado-da-arte da medição de HPAs, foi feita a fundamentação teórica, apresentada como revisão da literatura no Capítulo I – Desastres com derramamentos de petróleo nos oceanos: impactos na segurança dos alimentos e métodos analíticos de controle. Nesse capítulo, foram abordadas importantes questões envolvidas na contaminação de pescado com petróleo, incluindo os principais desastres de derramamento nos oceanos e os impactos na segurança do pescado; marcadores químicos de contaminação; possíveis efeitos à saúde humana devido ao consumo de pescado contaminado; métodos analíticos de controle e abordagens mais adequadas para avaliar os riscos à saúde humana. As abordagens discutidas no primeiro capítulo foram reproduzidas, adaptadas ou otimizadas na principal problemática desta tese: como avaliar a contaminação de amostras de pescado após o desastre com derramamento de petróleo no litoral do Brasil?

Essa problemática começou a ser resolvida no Capítulo II – Determinação de HPAs em pescado por PLE-LC-APCI-MS/MS após o derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do Brasil. Foi desenvolvido um método de extração por líquido pressurizado usando uma máquina de cápsula de café *espresso* e posterior quantificação de HPAs por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS). Esse método, confiável e de baixo custo, forneceu uma resposta rápida às autoridades reguladoras sobre a segurança sanitária do pescado durante o enfrentamento do desastre. Os resultados iniciais, obtidos pela aplicação do método, fizeram parte do primeiro relatório oficial sobre a contaminação de pescado com HPAs após o desastre.

No entanto, os desdobramentos da investigação demandaram o aumento da frequência analítica e da reprodutibilidade do método de quantificação de HPAs. Um método avançado de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) foi então desenvolvido para atender a esse novo propósito, proporcionando inovação química ao Capítulo III – Rápida extração dispersiva guiada energizada de HPAs: análise de evidências do derramamento de petróleo e monitoramento de pescado baseado em risco. O novo método permitiu uma extração ainda mais rápida e reprodutível de HPAs de diversas matrizes biológicas, aumentando a frequência analítica necessária para o controle oficial de pescado e consolidando o primeiro programa oficial brasileiro de monitoramento de HPAs em pescado.

Além das medições químicas laboratoriais, a avaliação de risco desempenha um papel fundamental quanto à segurança sanitária do pescado após um desastre com petróleo. Os dados fornecidos pela avaliação de risco podem ser usados para definir quais ações governamentais devem ser executadas, como revisar ou definir limites regulatórios, avaliar a frequência de testes laboratoriais, fornecer aconselhamento a subgrupo populacional, entre outras.

Considerando o potencial efeito nocivo dos HPAs na saúde humana, uma avaliação de risco feita pelo modelo determinístico de exposição dietética e a abordagem de margem de exposição foram utilizadas para fornecer respaldo científico às autoridades reguladoras.

Os produtos desta tese foram úteis não apenas para a inspeção de pescado, mas também foram aplicados na investigação forense deflagrada pela Polícia Federal (Operação Mácula), com o objetivo de apurar a origem e autoria do derramamento de petróleo. Amostras de órgãos e tecidos de aves, mamíferos e répteis foram analisadas para produzir elementos de condenação para o tribunal (Capítulo III).

Portanto, esta tese teve como objetivo avaliar a contaminação de amostras de pescado com HPAs após o derramamento de petróleo ocorrido no litoral brasileiro, desenvolvendo métodos analíticos para extração e quantificação de 8HPAs. Os métodos desenvolvidos foram aplicados ao monitoramento de amostras de pescado e o risco à saúde dos consumidores foi avaliado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contaminação de amostras de pescado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos após o derramamento de petróleo ocorrido em 2019 no litoral brasileiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de 8HPAs (benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS);

Desenvolver e validar um método de preparo de amostra de elevado desempenho analítico utilizando uma técnica moderna de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) para quantificação de 8HPAs;

Aplicar os métodos analíticos desenvolvidos no monitoramento de amostras de pescado provenientes do litoral brasileiro;

Avaliar o risco à saúde dos consumidores de pescado utilizando o modelo determinístico de exposição dietética crônica e a abordagem de margem de exposição (MOE) para os perigos B[*a*]P, 4HPAs (benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno e benzo[*a*]pireno) e 8HPAs.

CAPÍTULO I

**Desastres com derramamentos de petróleo nos oceanos:
impactos na segurança dos alimentos e métodos analíticos de controle**

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo, apresentado em formato de revisão da literatura, são abordados os impactos na segurança dos alimentos após derramamentos de petróleo nos oceanos. São discutidos com detalhes os principais desastres com petróleo nos oceanos, os marcadores químicos de contaminação de pescado, os métodos analíticos usados para avaliar a contaminação de pescado e, finalmente, as abordagens mais adequadas para avaliar os riscos à saúde humana associados ao consumo de pescado após desastres com petróleo. Esta revisão foi publicada no periódico *Food Research International*.

Artigo publicado (Apêndice A):

DE MELO et al. Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, v. 157, p. 111366, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111366>

RESUMO

Nos últimos 50 anos, mais de 5,8 milhões de toneladas de petróleo foram despejadas nos oceanos. Alguns desastres com petróleo ficaram marcados na história, provocando múltiplas consequências sociais e econômicas, além de catastróficos impactos ambientais. Recentemente, o Brasil e as Ilhas Maurício enfrentaram desastres que impactaram severamente a segurança sanitária do pescado. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), presentes na composição do petróleo, são os principais marcadores de contaminação de origem petrogênica. Existem evidências suficientes que correlacionam a ingestão de alimentos contaminados com HPAs com maiores riscos de desenvolvimento de câncer. O conjunto de 4HPAs, composto por benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno e criseno e o conjunto de 8HPAs, composto por benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno, são recomendados como marcadores de contaminação química de alimentos. Após desastres com petróleo nos oceanos, o risco à saúde dos consumidores de pescado é uma preocupação especial. A União Europeia estabelece limites máximos permitidos para benzo[*a*]pireno ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 4HPAs ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) em moluscos bivalves. Níveis de preocupação estabelecidos por países que enfrentaram desastres com petróleo têm especial atenção nesta revisão. As análises laboratoriais de HPAs em amostras de alimentos é muito desafiadora devido à complexidade das matrizes. Além disso, os resultados analíticos são geralmente relacionados à interdição e liberação de áreas de cultivo e locais de pesca. Portanto, os progressos dos métodos analíticos que empregam essas técnicas para determinação de HPAs em pescado são abordados com detalhes. As medições químicas laboratoriais fornecem dados essenciais para avaliar os riscos à saúde humana devido ao consumo de pescado contaminado com HPAs. As principais abordagens de avaliação de risco à saúde humana em um cenário de contaminação de pescado com HPAs são revisadas e discutidas, fornecendo uma ferramenta esclarecedora e orientativa sobre cada uma das etapas da estrutura de avaliação de risco.

Palavras-chave: Avaliação de risco; Carcinogênico; Contaminação química; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; Métodos analíticos; Pescado.

ABSTRACT

In the past 50 years, more than 5.8 million tonnes of oil have been spilled into the oceans. Some oil disasters marked history, causing multiple social and economic consequences in addition to catastrophic environmental impacts. Recently, Brazil and Mauritius faced oil disasters that have severely impacted seafood sanitary safety. One of the components of the oil composition are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which are the main contamination markers of petrogenic origin. There is enough evidence to correlate the intake of food contaminated with PAH with increased risks of developing cancer. The set PAH4, composed of benzo[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, and chrysene, and the set PAH8, composed of benzo[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*ghi*]perylene, chrysene, dibenzo[*a,h*]anthracene, and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene are recognized as markers of food chemical contamination. After oil disasters in the oceans, the risk to the health of seafood consumers tends to be of special concern. The European Union set maximum levels for benzo[*a*]pyrene ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) and PAH4 ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) in bivalve mollusks. Levels of concern established by countries that have faced oil disasters are given special attention in this review. Laboratory analysis of PAH in food samples is very challenging because it deals with quite different kinds of matrices. Furthermore, analytical results are usually related to the closure or reopening of cultivated areas and fishing points. Therefore, the progress of the analytical methods for PAH in seafood is covered in detail. Chemical laboratory measurements provide essential data to assess the risks to human health due to consumption of seafood contaminated with PAH. The main human health risk assessment approaches in a seafood contamination scenario with PAH are reviewed and discussed, providing an insightful and guiding tool to each step of the risk assessment framework.

Keywords: Analytical methods; Carcinogenic; Chemical contamination; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Risk assessment; Seafood.

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia e derivados do petróleo tem aumentado nas últimas décadas devido ao crescimento populacional e desenvolvimento econômico, especialmente em países emergentes. Embora associada ao progresso, a exploração de recursos petrolíferos representa uma prática insustentável e eleva os riscos de desastres ambientais em atividades de exploração e transporte marítimo. Como uma alternativa, vários programas de monitoramento foram implementados por diversos países com o objetivo de reduzir a dependência do petróleo, buscando assim, economias mais sustentáveis e verdes (GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020; LOH et al., 2018).

Nos últimos 50 anos, mais de 5,8 milhões de toneladas de petróleo foram despejadas nos oceanos por diversas causas, como colisões de navios-tanque, falha de equipamentos, incêndios e explosões de plataformas petrolíferas, eventos climáticos, erro humano, entre outras (ITOPF, 2021). Apesar dos esforços no desenvolvimento de novas abordagens para reduzir a frequência de eventos dessa natureza, estima-se que mais de 15.000 toneladas de petróleo foram despejadas nos oceanos por acidentes com petroleiros em 2022 (ITOPF, 2022).

Alguns desastres com petróleo nos oceanos ficaram marcados na história, provocando além de catastróficos impactos ambientais, múltiplas consequências sociais e econômicas, especialmente relacionadas à cadeia produtiva de pescado. Dois dos piores desastres com petróleo ocorreram no Kuwait, em 1991, durante a Guerra do Golfo e em 2010 no Golfo do México (FINGAS, 2016; KUJAWINSKI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021). Em 2019, enormes manchas de petróleo foram avistadas no litoral do Brasil, levando à interdição de praias, atividades pesqueiras e comércio de pescado proveniente das áreas afetadas. Esse evento, sem precedentes no país, foi considerado o pior desastre ambiental da costa brasileira e um dos piores já registrados no mundo (BRASIL, 2020b; IBAMA, 2020c; LOURENÇO et al., 2020).

Desastres com derramamentos de petróleo nos oceanos podem impactar severamente a produção e comercialização de alimentos, especialmente em relação à segurança sanitária do pescado, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo, cromo e outros). Os HPAs, presentes entre 0,2 e 7% na composição do petróleo, representam uma importante classe de poluentes químicos marcadores da contaminação petrogênica (IARC, 2010; PULSTER et al., 2020b). As exposições contínuas de seres humanos aos HPAs através da alimentação e ambiente implicam na promoção de

efeitos genotóxicos e carcinogênicos, representando um problema de saúde pública (IARC, 2010).

Avaliar a contaminação de pescado com derivados do petróleo após desastres nos oceanos é uma tarefa multifacetada e pode levar décadas para que os impactos sejam totalmente elucidados (KUJAWINSKI et al., 2020; PULSTER et al., 2020b). A situação é agravada quando há despreparo institucional, monitoramento inadequado, marcos regulatórios obsoletos ou inexistentes e políticas públicas que raramente dão assistência às populações afetadas (PENA et al., 2020). Portanto, em situações como essas, as autoridades precisam assegurar que as informações acerca dos impactos associados ao consumo de pescado sejam disponibilizadas e compreendidas por toda a população afetada, de forma rápida e assertiva (DE OLIVEIRA ESTEVO et al., 2021). Com esse propósito, abordagens de análise de risco são utilizadas para fornecer respaldo científico às autoridades reguladoras em ações de enfrentamento a desastres com petróleo, como a interdição ou liberação de áreas de cultivo e locais de pesca. Uma das principais fontes de dados usadas para apoiar as autoridades em situações de desastres são as medições laboratoriais.

As melhorias contínuas da capacidade analítica e laboratorial são fundamentais para a execução de estratégias emergentes para o enfrentamento de desastres com petróleo. De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA) os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de fluorescência (FLD) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) são abordagens sensíveis para mensurar HPAs em alimentos (EFSA, 2008). No entanto, essas técnicas requerem protocolos para preparo de amostras custosos e trabalhosos podendo envolver diversas etapas, como processos de derivatização, extração por Soxhlet, extração em fase sólida, entre outros (SFORZINI et al., 2018; SMALLING et al., 2016; SUN; WU, 2020; WANG et al., 2020a). O uso de técnicas de separação química associadas à espectrometria de massas em modo *tandem* é capaz de ampliar de modo expressivo a especificidade e a sensibilidade do método analítico. Métodos hifenados que combinam a cromatografia, líquida ou gasosa, à espectrometria de massas, quando associados com métodos de preparo de amostra modernos, específicos e de elevado poder de limpeza do extrato, fornecem aos laboratórios de controle a capacidade de separação e identificação inequívoca de HPAs (GALMICHE et al., 2021a, 2021b).

A maior parte dos estudos disponíveis na literatura se concentram em esclarecer os impactos associados ao meio ambiente e animais aquáticos. Por outro lado, os impactos na segurança dos alimentos foram raramente mencionados. Portanto, essa revisão teve como objetivo responder importantes questões envolvidas na contaminação de pescado com petróleo,

abrangendo: Quais foram os principais desastres com petróleo nos oceanos e impactos na segurança do pescado? Quais são os marcadores químicos de contaminação de pescado com petróleo? Quais são os possíveis efeitos à saúde humana devido ao consumo de pescado contaminado com HPAs? Quais são os métodos analíticos usados para avaliar a contaminação de pescado com HPAs? E finalmente, quais são as abordagens mais adequadas para avaliar os riscos à saúde humana associados ao consumo de pescado contaminado com HPAs?

2 OS PRINCIPAIS DESASTRES COM PETRÓLEO NOS OCEANOS E SEUS IMPACTOS

A implementação de severas políticas regulatórias e o desenvolvimento de novas abordagens de controle colaboraram para a diminuição do número de desastres com derramamento de petróleo nos oceanos. No entanto, desastres dessa natureza continuam a ocorrer, desde baixos volumes até milhões de toneladas de resíduos contaminantes. Os impactos socioeconômicos e na segurança alimentar podem ser severos, especialmente relacionados ao consumo de pescado (ESTEVO et al., 2021). Em retrospectiva, graves acidentes com petróleo nos oceanos desencadearam uma série de avanços científicos que permitiram compreender os impactos no ambiente marinho e na produção de alimentos. Os principais derramamentos de petróleo nos oceanos são apresentados em ordem cronológica na Tabela 1.

Tabela 1 – Os principais derramamentos de petróleo nos oceanos em ordem cronológica e toneladas de petróleo derramadas.

Ano	Derramamento de petróleo	Localização	Toneladas de petróleo
1967	<i>Torrey Canyon</i>	Scilly Island, Reino Unido	119.000
1978	<i>Amoco Cadiz</i>	Portsall Rocks, França	223.000
1979	<i>Atlantic Empress</i>	Mar do Caribe, Tobago	287.000
1983	<i>Castillo de Bellver</i>	Off Saldanha Bay, África do Sul	252.000
1989	<i>Exxon Valdez</i>	Prince William Sound, Alasca	42.000
1991	<i>Haven</i>	Geo, Itália	144.000
1991	Guerra do Golfo	Golfo Pérsico, Kuwait	800.000
1999	<i>Erika</i>	Malta, França	20.000
2002	<i>Prestige</i>	Galícia, Espanha	63.000
2007	<i>Hebei Spirit</i>	Daesan, Coreia do Sul	11.000
2010	<i>Deepwater Horizon</i>	Golfo do México, Estados Unidos	700.000
2018	<i>Sanchi</i>	Xangai, China	113.000

Ano	Derramamento de petróleo	Localização	Toneladas de petróleo
2019	Derramamento no Brasil	Nordeste e Sudeste do Brasil	> 5.000
2020	<i>MV Wakashio</i>	Pointe d'Esny, Ilhas Maurício	4.000
2022	Derramamento no Peru	Lima, Peru	1.100
2022	<i>X-Press Pearl</i>	Colombo, Sri-Lanka	> 300

Fonte: de Melo et al. (2022b).

O maior desastre registrado ocorreu durante a Guerra do Golfo no Kuwait em 1991. Devido às estratégias de guerra e conflitos armados, mais de 800.000 toneladas de petróleo foram despejadas propositalmente no mar do Golfo pelo exército iraquiano (BEJARANO; MICHEL, 2010; EL-BAZ, 2004; FINGAS, 2016). A exposição de militares e civis aos inúmeros compostos tóxicos contidos no petróleo implicaram em episódios de intoxicação, dores de cabeça, disfunção cognitiva, problemas respiratórios, gastrointestinais, dérmicos, entre outros, os quais ficaram conhecidos como a síndrome da Guerra do Golfo (BJØRKLUND et al., 2020; JOYCE; HOLTON, 2020).

Outros desastres que ficaram marcados na história foram o *Exxon Valdez* e o *Deepwater Horizon*, ambos nos Estados Unidos. Em 1989 o navio petroleiro *Exxon Valdez* encalhou em um recife em *Prince William Sound* no Alasca, enquanto desviava de blocos de gelo. Cerca de 42.000 toneladas de petróleo foram derramadas no Ártico, cobrindo cerca de 2.000 km da costa do Alasca. O petróleo levou a morte de muitos mamíferos, aves e peixes, e interrompeu os meios de subsistência dos habitantes da região que dependiam desses recursos para alimentação (PETERSON et al., 2003). A ausência de impactos antropogênicos no Ártico facilitou a identificação dos efeitos do desastre. Por outro lado, prejudicou as medidas de remediação. Ao contrário das estimativas iniciais de persistência do petróleo no ambiente, estudos subsequentes comprovaram que após 26 anos o petróleo ainda persistia nas áreas afetadas (LINDEBERG et al., 2018). Após o desastre *Exxon Valdez*, o Congresso dos Estados Unidos promulgou a Lei de Poluição por Óleo de 1990 que estabelece requisitos para prevenção, preparação e resposta a descargas de petróleo (USA, 1990). As medidas adotadas pelo governo norte-americano influenciaram nos padrões de derramamentos de petróleo no país e forneceram estrutura legal para auxiliar comunidades e ecossistemas a se recuperar de eventos subsequentes como, por exemplo, o derramamento de petróleo *Deepwater Horizon*.

Em 2010, vinte e um anos após o desastre *Exxon Valdez*, uma explosão em uma sonda de perfuração de petróleo semissubmersível contaminou quilômetros da costa dos Estados

Unidos. O evento, batizado com o nome da sonda – *Deepwater Horizon* ocorreu no Golfo do México e despejou cerca de 700.000 toneladas de petróleo no oceano Atlântico por 87 dias (AREKHI et al., 2021; KUJAWINSKI et al., 2020). A explosão causou a morte de onze pessoas e afetou mais de 2.000 km da costa dos Estados Unidos, incluindo estuários, praias e pântanos (BEYER et al., 2016). Após o desastre 4,0 – 8,3 bilhões de ostras e 2,0 – 5,0 trilhões de peixes foram perdidos (DICKEY; HUETTEL, 2016; NOAA, 2017).

Durante o desastre *Deepwater Horizon*, a *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) e a *Food and Drug Administration* (FDA) fecharam intermitentemente áreas federais de pesca expostas ao petróleo e níveis de preocupação provisórios para HPAs em pescado entre 35 – 2.000.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram estabelecidos baseados em abordagens de avaliação de risco (FDA, 2010). As agências federais e estaduais realizaram testes sensoriais de sabor e odor, e medidas químicas de HPAs e dispersantes químicos (surfactantes compostos por ésteres de sorbitano e dodecil sulfato de sódio) em amostras de peixes, camarões, caranguejos e ostras (> 8.000 amostras) (YLITALO et al., 2012). Após a ausência de HPAs e dispersantes químicos nas amostras de pescado, as áreas de pesca puderam ser reabertas gradativamente (DICKEY; HUETTEL, 2016; YLITALO et al., 2012).

Xia et al. (2012) conduziram uma abrangente investigação sobre a concentração de HPAs em pescado após o *Deepwater Horizon*. A amostragem do estudo considerou a coleta de amostras nos meses iniciais da interdição nas áreas de pesca até meses seguintes a serem reabertas. Durante quinze meses, 25 HPAs (incluindo benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, criseno, entre outros) foram monitorados em peixes ($n = 86$), camarões ($n = 65$), caranguejos ($n = 59$) e ostras ($n = 68$). A concentração de HPAs nas amostras estava entre 0,65 – 31,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e não excedeu os níveis de preocupação estabelecidos pela FDA. Além disso, as concentrações de HPAs mensuradas em ostras (1,11 – 19,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$) em relação aos dados de concentração herdados no passado proveniente de programas de monitoramento (NOAA *Mussel Watch Program* 1998 – 2005) (KIMBROUGH et al., 2008).

No ano seguinte, Wilson et al. (2015) avaliaram os riscos à saúde humana associados ao consumo de camarão contaminado com HPAs proveniente das regiões afetadas pelo *Deepwater Horizon*. Populações particularmente vulneráveis (vietnamita-americanos) foram selecionadas devido ao alto consumo de camarão (45,2 g dia^{-1}) e peso corporal (63 kg) abaixo do padrão americano (80 kg). Os resultados da avaliação de risco não demonstraram riscos à saúde humana considerando o grupo vulnerável e os níveis de preocupação estabelecidos pela FDA.

Mesmo após a confirmação da segurança dos produtos de pesca pelas autoridades governamentais, a opinião pública expressou preocupação e desconfiança sobre o real risco de consumir pescado proveniente das regiões atingidas pelo *Deepwater Horizon*, afetando imensamente a subsistência das comunidades pesqueiras (SIMON-FRIEDT et al., 2016). Além disso, alguns estudos relataram uma série de inconsistências quanto às métricas utilizadas pela FDA para estabelecer os níveis de preocupação para HPAs em pescado após o *Deepwater Horizon* como, elevado peso corporal do consumidor (80 kg), baixa estimativa de ingestão de pescado (13 – 49 g dia⁻¹), curta duração de exposição aos contaminantes (5 anos), entre outras (GOHLKE et al., 2011; ROTKIN-ELLMAN; WONG; SOLOMON, 2012).

Rotkin-Ellman, Wong e Solomon (2012) reavaliaram o protocolo adotado pela FDA para definir os níveis de preocupação para HPAs em pescado após o *Deepwater Horizon* e propuseram níveis de preocupação alternativos considerando populações vulneráveis, como mulheres grávidas, bebês (0 – 2 anos) e crianças (2 – 12 anos). Os níveis de preocupação alternativos propostos pelos autores (0,10 – 216,67 µg kg⁻¹) estavam entre dois e quatro ordens de magnitude abaixo dos níveis de preocupação estabelecidos pela FDA. Na prática, aplicando tais níveis em revisão dos dados, até 53% dos camarões do Golfo do México poderiam apresentar concentrações de HPAs superiores aos recomendados pelas agências reguladoras, revelando que os protocolos utilizados pela FDA não refletem nas melhores práticas de avaliação de risco e põem em risco populações vulneráveis, como mulheres grávidas.

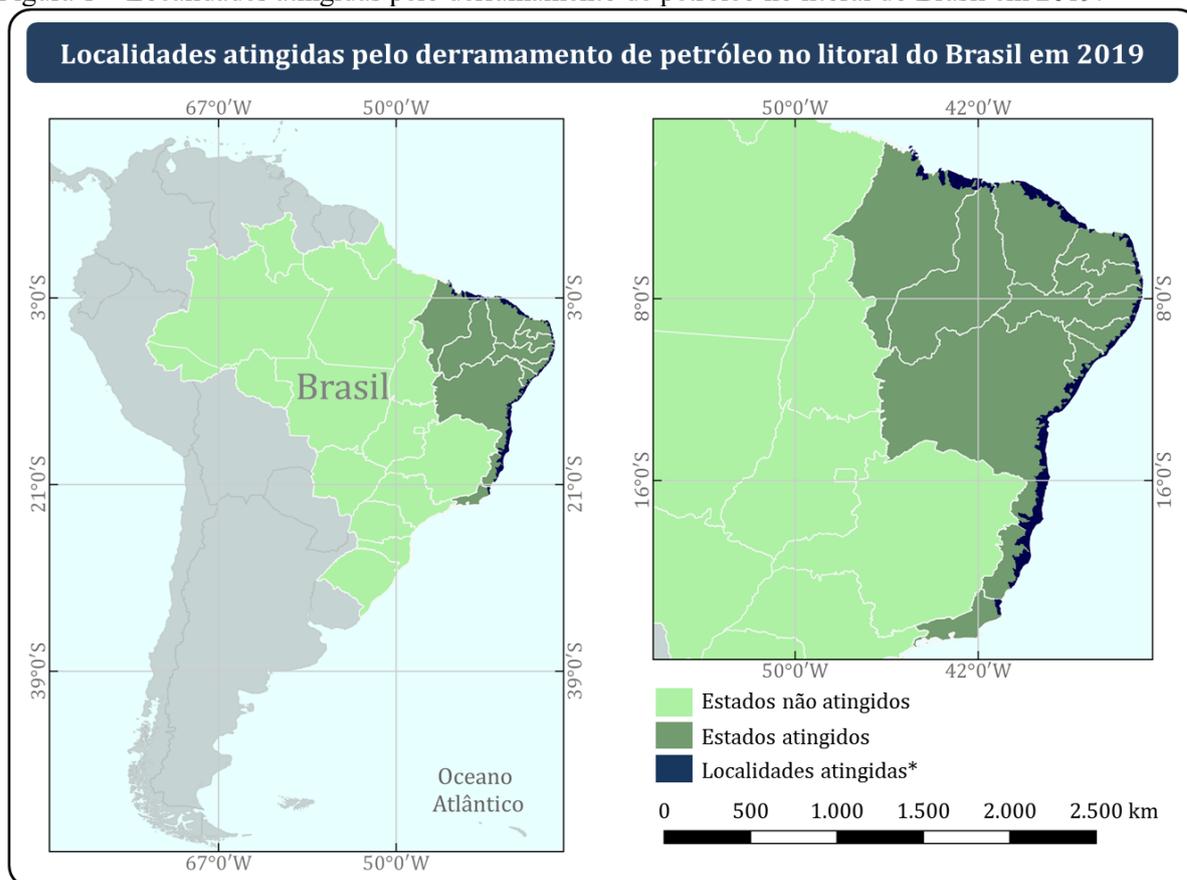
Em contraste com os grandes derramamentos de petróleo, eventos de menor magnitude, em termos de toneladas de petróleo derramadas (< 7 toneladas), mas com maior frequência e consequências potencialmente graves, são responsáveis por cerca de 80% dos desastres (ITOPF, 2021). Um exemplo disso ocorreu nas Ilhas Maurício, em julho de 2020. A embarcação *MV Wakashio*, de bandeira panamenha, estava a caminho da China para o Brasil, quando encalhou em um recife de coral e despejou 4.000 toneladas de petróleo no oceano Índico. O petróleo atingiu 15 km de costa, contaminando áreas ambientalmente sensíveis como recifes de corais e manguezais. Dezenas de animais foram encontrados mortos. Os impactos sociais, econômicos e à segurança alimentar e dos alimentos causados pelo desastre ainda estão sendo estudados e os responsáveis investigados (BARMANIA, 2020).

Outro desastre, que resultou em graves consequências ambientais, sociais e à cadeia produtiva de pescado, ocorreu no Brasil em 2019. A trajetória das investigações e monitoramento do maior desastre ambiental do litoral brasileiro merece especial atenção nesta revisão.

2.1 A EXPERIÊNCIA BRASILEIRA COM DESASTRES COM DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

No dia 30 de agosto de 2019, o Brasil foi palco do mais grave desastre ambiental ocorrido em seu litoral e um dos maiores já registrados no mundo. Enormes manchas de petróleo apareceram no litoral Nordeste e Sudeste brasileiro. As primeiras manchas surgiram no estado da Paraíba e em poucos meses, o poluente identificado como petróleo bruto, foi avistado em uma vasta área da costa brasileira, atingindo além da Paraíba, outros 10 estados. O desastre atingiu 130 municípios de 11 estados brasileiros, totalizando 1.009 localidades (IBAMA, 2020b) e aproximadamente 4.000 km de extensão (Figura 1) (BRASIL, 2019e). Voluntários da sociedade civil se reuniram com as agências governamentais e retiraram manualmente mais de 5.000 toneladas de resíduos de petróleo das praias e manguezais. Em decorrência da grave situação instaurada no Brasil, órgãos governamentais proibiram as atividades pesqueiras devido à contaminação por petróleo (BRASIL, 2019f). No entanto, dias após a proibição, os órgãos brasileiros revogaram a proibição com o objetivo de garantir a subsistência dos pescadores locais (BRASIL, 2019g).

Figura 1 – Localidades atingidas pelo derramamento de petróleo no litoral do Brasil em 2019.



*O conceito de localidade se restringe a uma área de 1 km ao longo da costa brasileira. Sistema de coordenadas geográficas, Datum SIRGAS 2000. Base cartográfica: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019). Informações das localidades afetadas: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2020b). Ilustração gerada no *software* QGIS Versão 3.14.0-Pi. Fonte: de Melo et al. (2022b).

Considerando a toxicidade dos contaminantes envolvidos e do potencial efeito nocivo à saúde dos consumidores, o governo brasileiro estabeleceu protocolos próprios de investigação. Uma força-tarefa interinstitucional formada por órgãos e agências federais, estaduais, municipais e internacionais, forneceu apoio para a mitigação e monitoramento dos danos, além de auxílio nas investigações. Representantes do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) foram designados para atuar no monitoramento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio) em amostras de pescado proveniente das áreas afetadas. No Brasil, o MAPA, através da rede de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs), dentre outras atribuições, é o órgão oficial responsável pelo controle de resíduos e contaminantes em alimentos.

Na ocasião do desastre, o Brasil dispunha de limites regulatórios definidos para contaminantes inorgânicos (0,2 – 1,0 mg kg⁻¹, para arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio) em pescado (BRASIL, 2013), porém não possuía tais parâmetros para HPAs (BRASIL, 2019a).

Um método analítico capaz de monitorar de maneira inequívoca HPAs em pescado foi desenvolvido, otimizado e validado em um dos laboratórios oficiais do MAPA. Uma abordagem simples de preparo de amostra baseada na extração por líquido pressurizado e subsequente quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS), determinou de maneira rápida, sensível e confiável os oito HPAs (benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno) considerados marcadores químicos de contaminação de alimentos (de MELO et al., 2022a).

Diante do risco iminente à saúde dos consumidores e da inexistência de diretrizes sanitárias brasileiras para monitoramento de HPAs em pescado, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu, de maneira emergencial e com base em abordagens de avaliação de risco, níveis de preocupação para benzo[*a*]pireno ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes e $18 \mu\text{g kg}^{-1}$ para moluscos e crustáceos) (BRASIL, 2019a), quase quatro vezes acima dos limites regulatórios estabelecidos pela Comunidade Europeia ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[*a*]pireno para moluscos bivalves) (EU, 2011).

Centenas de amostras de peixes, camarões, mexilhões, ostras, polvos e lagostas foram analisadas. Os relatórios oficiais indicaram que os valores mensurados para metais estavam abaixo dos limites regulatórios, enquanto para HPAs, apenas duas amostras estavam acima dos níveis de preocupação provisórios estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2019h). Baseado nessas análises, o governo brasileiro ratificou a segurança do pescado proveniente das regiões afetadas. No entanto, as notícias divulgadas pela mídia resultaram em consumidores inseguros e conseqüentemente, a venda e o consumo de pescado reduziram mais de 50% nas regiões afetadas, impactando imensamente a subsistência dos pescadores (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Em paralelo às investigações de contaminação de pescado, a Polícia Federal do Brasil deflagrou a “Operação Mácula” com o objetivo de apurar a origem e autoria do vazamento de petróleo (BRASIL, 2019i). O centro de pesquisas da estatal brasileira de petróleo (Petrobrás) emitiu uma nota atestando que o petróleo derramado não foi produzido, comercializado ou transportado pela estatal (PETROBRAS, 2019). A partir da localização inicial da mancha, cujo derrame suspeita-se ter ocorrido em sentido leste, a aproximadamente 700 km da costa brasileira, uma embarcação de origem grega foi identificada. A mesma havia atracado na Venezuela, seguiu rumo à Singapura pelo oceano Atlântico e aportou na África do Sul. Suspeita-se que o derramamento tenha ocorrido durante esse deslocamento (BRASIL, 2019i). Análises estatísticas multivariadas e de geoquímica forense identificaram que o petróleo

encontrado na costa brasileira possuía características compatíveis com o petróleo de origem venezuelana (DE OLIVEIRA et al., 2020).

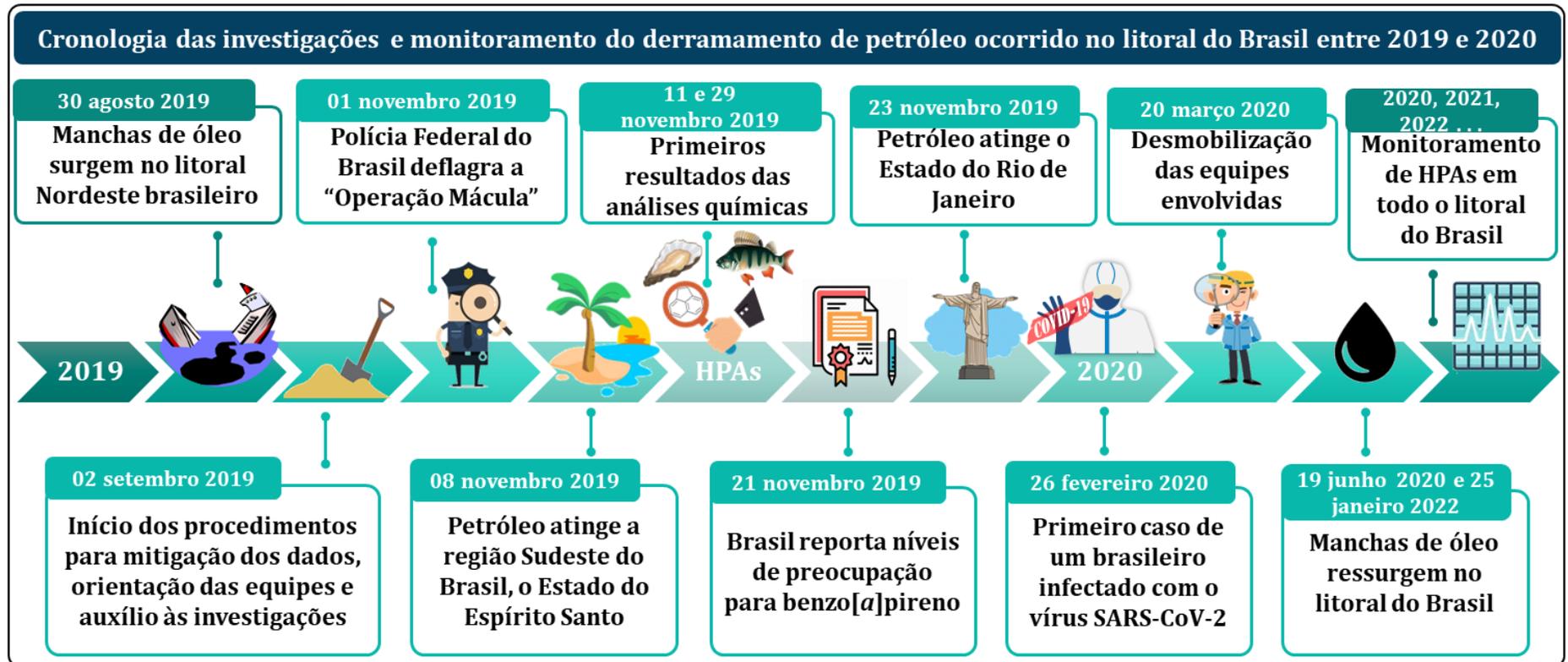
A Polícia Federal do Brasil, após mais de dois anos de investigação, indiciou um navio petroleiro de bandeira Grega (cujo nome não foi revelado) como responsável pelo derramamento de petróleo. A companhia responsável pelo petroleiro, o capitão e o engenheiro chefe foram indiciados pelos crimes de poluição, danos a unidades de conservação e não cumprimento das obrigações ambientais. O valor total do dano ambiental ainda está sendo avaliado. O valor mínimo é de aproximadamente 35 milhões de dólares. O atraso no indiciamento de culpados dificultou a recuperação das áreas afetadas, especialmente devido à ausência de acordos bilaterais (BRASIL, 2021).

Cinco meses após o desastre, em janeiro de 2020, órgãos oficiais do governo brasileiro informaram à imprensa que a situação aparentemente encaminhava-se para a normalidade, visto que poucas localidades ainda apresentavam vestígios de petróleo. Posto isso, em março do mesmo ano, as equipes envolvidas no monitoramento foram desmobilizadas, dificultando a avaliação do pescado proveniente das áreas afetadas. Essa situação foi agravada pela pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, que mudou o foco dos órgãos governamentais e subsequentemente reduziu as análises químicas de pescado devido à quarentena.

Surpreendentemente, quase um ano após o desastre, em junho de 2020, fragmentos de petróleo dispersos ressurgiram em praias do Rio Grande do Norte. As análises realizadas pela Marinha do Brasil confirmaram que os fragmentos encontrados apresentavam o mesmo perfil químico do petróleo derramado em agosto de 2019 (BRASIL, 2020c). Além disso, em janeiro de 2022, novas manchas de petróleo, com o mesmo perfil químico do óleo de 2019, apareceram em diversas praias do Nordeste do Brasil.

A cronologia das investigações e monitoramento deste, que foi o maior derramamento de petróleo do litoral brasileiro, é ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Cronologia das investigações e monitoramento do derramamento de petróleo ocorrido no litoral do Brasil entre 2019 e 2020.



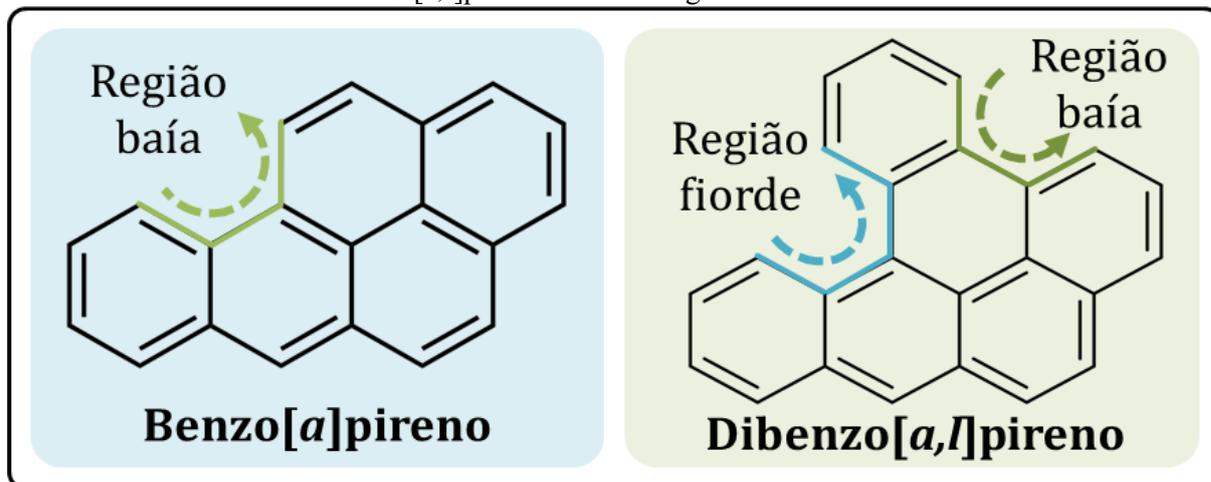
3 MARCADORES QUÍMICOS DE CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO E TOXICOLOGIA

Desastres com derramamentos de petróleo nos oceanos implicam na contaminação de pescado com poluentes como hidrocarbonetos e outros compostos contendo enxofre, arsênio, cádmio, chumbo, cromo, níquel, vanádio, zinco e outros (BAAWAIN et al., 2019; COLVIN; LEWIS; GALLOWAY, 2020; ORISAKWE, 2021). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são o grupo de constituintes químicos de maior preocupação devido aos seus efeitos tóxicos à saúde humana. São reconhecidos como marcadores químicos de contaminação por petróleo, o que justifica a ênfase e o direcionamento do texto aos HPAs.

Do ponto de vista toxicológico, a extensa evidência de carcinogenicidade induzida em animais, apoiada em estudos mecanísticos e epidemiológicos em humanos, indicam que moléculas de HPAs atuam de diferentes maneiras no processo de carcinogênese (IARC, 2012). Embora a toxicologia dos HPAs seja amplamente reportada na literatura, interações sinérgicas de diferentes moléculas no metabolismo humano não foram totalmente elucidadas (IARC, 2010). Esse fato sugere que mais estudos sobre o mecanismo toxicológico dos HPAs devem ser encorajados.

Uma condição básica para induzir a carcinogênese, mas não obrigatória, é a existência de, pelo menos, quatro anéis condensados na estrutura química do HPA (BINELLO et al., 2021). Foi postulado que HPAs com reentrâncias moleculares denominadas “baía” ou “fiorde” são capazes de induzir mutações genéticas quando ativados metabolicamente. A região “baía” é uma topologia molecular caracterizada por envolver quatro carbonos e três ligações carbono-carbono, enquanto a região “fiorde” é caracterizada por envolver cinco carbonos e quatro ligações carbono-carbono (Figura 3) (IARC, 2010).

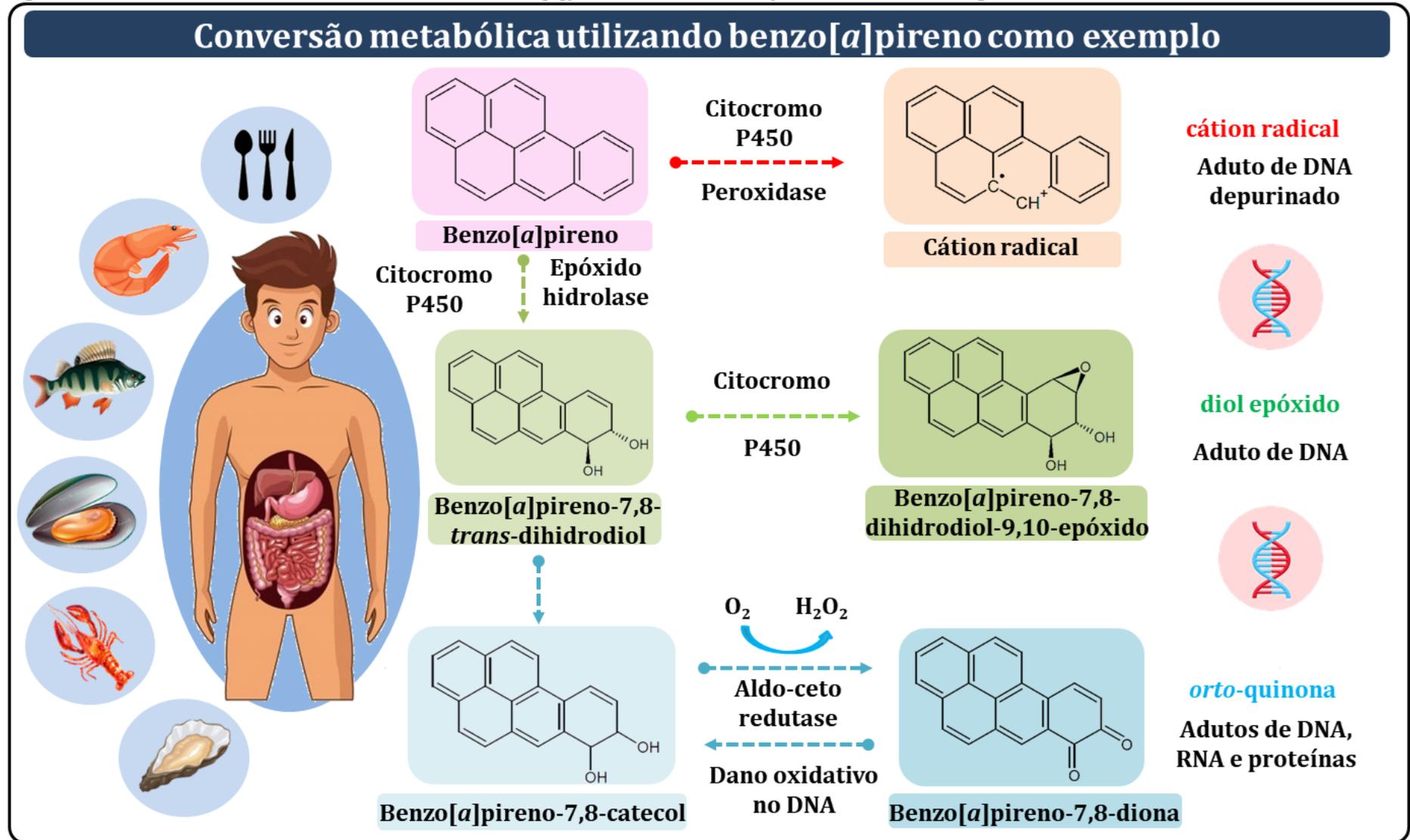
Figura 3 – Moléculas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com reentrâncias moleculares denominadas “baía” e “fiorde”. A esquerda uma molécula de benzo[*a*]pireno com uma região “baía” e a direita uma molécula de dibenzo[*a,l*]pireno com uma região “baía” e uma “fiorde”.



Fonte: de Melo et al. (2022b).

Um aspecto fundamental para compreender a carcinogênese dos HPAs é entender que moléculas originais de HPAs não induzem diretamente danos celulares. Os danos são atribuídos à geração de metabólitos ativos, que, quando ligados covalentemente à sítios nucleofílicos de RNA, DNA e proteínas, provocam mutações celulares (CAVALIERI; ROGAN, 2014; IARC, 2010). A conversão metabólica de HPAs parentais é catalisada por enzimas do citocromo P450 (CYPs) e ocorre por três principais vias: (I) peroxidase; (II) epóxido hidrolase e (III) aldo-ceto redutase (MOLDOVEANU, 2010; SEN; FIELD, 2013). Um exemplo simplificado de conversão de uma molécula de HPA em metabólitos potencialmente carcinogênicos é ilustrado na Figura 4 utilizando benzo[*a*]pireno como exemplo.

Figura 4 – Conversão metabólica de uma molécula de benzo[*a*]pireno em metabólitos potencialmente carcinogênicos.

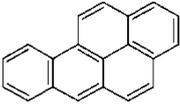
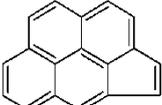
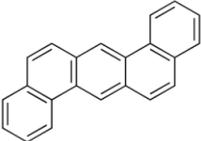
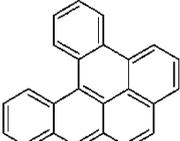
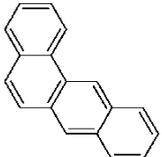
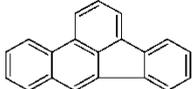
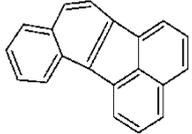
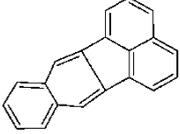
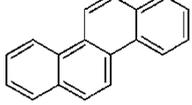
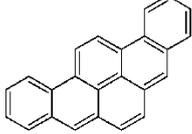
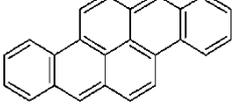


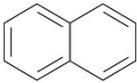
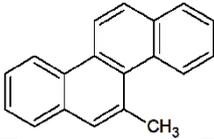
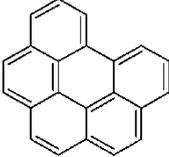
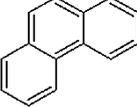
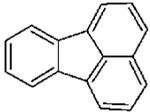
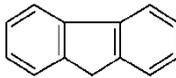
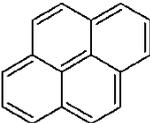
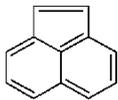
Fonte: de Melo et al. (2022b).

O mecanismo de desenvolvimento do câncer via peroxidase é iniciado com a oxidação de um elétron da molécula de benzo[*a*]pireno, formando cátions radicais. Nessa reação, os cátions radicais reagem com moléculas de DNA formando adutos específicos (adutos depurinados) capazes de remover adenina e guanina de moléculas de DNA. A remoção de adenina e guanina, por sua vez, pode gerar mutações que levam ao processo de carcinogênese (CAVALIERI; ROGAN, 2014; GAO et al., 2018; IFEGWU; ANYAKORA, 2015). A segunda via, epóxido hidrolase, apresenta uma sequência de transformações metabólicas. A molécula de B[*a*]P é hidrolisada formando um dihidrodiol (benzo[*a*]pireno-7,8-*trans*-dihidrodiol) que pode ser oxidado em um dihidrodiol epóxido (benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido), ou, seguir pela via aldo ceto-redutase formando um catecol (benzo[*a*]pireno-7,8-catecol) que novamente pode ser oxidado e uma *orto*-quinona (benzo[*a*]pireno-7,8-diona) (IARC, 2012; IFEGWU; ANYAKORA, 2016). A formação desses metabólitos desempenha um papel expressivo na iniciação do câncer, pois são responsáveis pela formação de adutos em sítios nucleofílicos de proteínas e ácidos nucleicos (IARC, 2010). Contudo, a atividade biológica dos HPAs não se restringe à carcinogênese, outros efeitos como, genotoxicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, comprometimento da função pulmonar, desregulação endócrina e reprodutiva, foram evidenciados na literatura (BOLDEN et al., 2017; CHEN et al., 2018; IARC, 2010; PATEL et al., 2020; ROSLUND et al., 2019; SUN et al., 2021).

A última revisão conduzida pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), avaliou o potencial carcinogênico de dezenas de HPAs. Até o momento, apenas o benzo[*a*]pireno e misturas de HPAs contendo benzo[*a*]pireno apresentaram evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos (Grupo 1). Vários outros congêneres do grupo dos HPAs foram avaliados como possivelmente carcinogênicos (Grupo 2A); provavelmente carcinogênicos (Grupo 2B) ou não classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para humanos (Grupo 3) (Tabela 2) (IARC, 2010, 2018).

Tabela 2 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) selecionados como prioritários de acordo com a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) e selecionados como marcadores de contaminação de alimentos de acordo com *European Food Safety Authority* (EFSA). Classificação de carcinogenicidade para humanos de acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC).

Nomenclatura (abreviação)	Estrutura química	Número CAS	Classificação de carcinogenicidade para humanos ^d
Benzo[<i>a</i>]pireno ^{a,b,c} (B[<i>a</i>]P)		50-32-8	Grupo 1A
Ciclopenta[<i>c,d</i>]pireno ^b (CP[<i>cd</i>]P)		27208-37-3	Grupo 2A
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno ^{a,b,c} (DB[<i>a,h</i>]A)		53-70-3	Grupo 2A
Dibenzo[<i>a,l</i>]pireno ^b (DB[<i>a,l</i>]P)		191-30-0	Grupo 2A
Benzo[<i>a</i>]antraceno ^{a,b,c} (B[<i>a</i>]A)		56-55-3	Grupo 2B
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno ^{a,b,c} (B[<i>b</i>]F)		205-99-9	Grupo 2B
Benzo[<i>j</i>]fluoranteno ^b (B[<i>j</i>]F)		205-82-3	Grupo 2B
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno ^{a,b,c} (B[<i>k</i>]F)		207-08-9	Grupo 2B
Criseno ^{a,b,c} (Cri)		218-01-9	Grupo 2B
Dibenzo[<i>a,i</i>]pireno ^b (DB[<i>a,i</i>]P)		189-55-9	Grupo 2B
Dibenzo[<i>a,h</i>]pireno ^b (DB[<i>a,h</i>]P)		189-64-0	Grupo 2B
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno ^{a,b,c} (I[<i>cd</i>]P)		193-39-5	Grupo 2B

Nomenclatura (abreviação)	Estrutura química	Número CAS	Classificação de carcinogenicidade para humanos ^d
Naftaleno ^a (Naf)		91-20-3	Grupo 2B
5-Metilcriseno ^b (5-MetCri)		3697-24-3	Grupo 2B
Benzo[ghi]perileno ^b (B[ghi]P)		191-24-2	Grupo 3
Fenantreno ^a (Fen)		85-01-8	Grupo 3
Fluoranteno ^a (Flu)		206-44-0	Grupo 3
Fluoreno ^a (Fl)		86-73-7	Grupo 3
Pireno ^a (Pir)		129-00-0	Grupo 3
Acenaftileno ^a (Acn)		208-96-8	–

^a: (US EPA, 2014). ^b, ^c: (EFSA, 2008). ^d: (IARC, 2010, 2018). Grupo 1: Carcinogênico para humanos. Grupo 2A: Provavelmente carcinogênico. Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico. Grupo 3: Não classificado quanto à sua carcinogenicidade para humanos. – Não classificado em nenhum dos grupos. Fonte: de Melo et al. (2022b).

Diversos relatórios científicos publicados por instituições governamentais selecionaram determinados HPAs como contaminantes prioritários. Na década de 1970, a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA), classificou dezesseis HPAs (16 US EPA HPAs) como contaminantes ambientais prioritários, considerando dados de ocorrência, potencial de exposição humana e toxicidade (US EPA, 2014). Desde então, esse grupo de compostos foi consagrado como indicador de contaminação ambiental, apesar de outros HPAs também apresentarem potencial toxicológico semelhante ou superior aos selecionados, indicando que a lista 16 US EPA HPAs negligenciou outros compostos importantes (Tabela 2).

As evidências de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em diversos tipos de ensaios biológicos com animais, forneceram à *European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain* (CONTAM Panel), evidências para classificar dezesseis

HPAs (15 + 1 EU HPAs) como contaminantes prioritários em alimentos (Tabela 2) (EFSA, 2008). Durante muitos anos o benzo[*a*]pireno foi considerado o principal marcador de contaminação de alimentos com HPAs, especialmente devido ao seu potencial carcinogênico e correlação com outros HPAs. No entanto, após extensas investigações em cerca de 10.000 amostras de alimentos de diversas categorias (principalmente cereais, óleos e gorduras, vegetais, sementes, frutas, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, produtos cárneos, pescado, laticínios e outros), a EFSA concluiu que a utilização de benzo[*a*]pireno como único marcador não é adequada para avaliar a contaminação de alimentos com HPAs. Cerca de 30% das amostras analisadas continham concentrações mensuráveis de HPAs, apesar da ausência de benzo[*a*]pireno. Além disso, os conjuntos denominados “8HPAs” (soma dos HPAs benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno) e “4HPAs” (soma dos HPAs benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno e criseno) foram detectados em até 80% das amostras. Dessa forma, esses conjuntos são recomendados como marcadores de contaminação de alimentos com HPAs, sendo o conjunto 4HPAs considerado um indicador suficiente para essa finalidade (EFSA, 2008).

Embora o consumo de alimentos contaminados com HPAs represente um risco para a saúde humana, poucos países apresentam programas oficiais de monitoramento e limites regulatórios estabelecidos para HPAs. Após desastres com petróleo nos oceanos, as preocupações costumam se concentrar no risco à saúde dos consumidores de peixes, crustáceos e moluscos, especialmente espécies bivalves. Moluscos bivalves, como ostras e mexilhões, são organismos sésseis que se alimentam por filtração. Esses animais apresentam baixa capacidade de metabolização e acumulam contaminantes presentes no ambiente, o que os torna bioindicadores de contaminação petrogênica (MURRAY; PENNING, 2018; PIE; HEYES; MITCHELMORE, 2015).

A União Europeia estabeleceu limites para benzo[*a*]pireno ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 4HPAs ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) em moluscos bivalves frescos, refrigerados ou congelados, apesar do benzo[*a*]pireno isoladamente não ser considerado um marcador adequado de contaminação. O limite diferenciado para benzo[*a*]pireno foi estabelecido para assegurar a comparabilidade de dados de monitoramento anteriores e futuros da ocorrência de HPAs em alimentos (EU, 2011).

Em países que já obtiveram alguma experiência com desastres com petróleo nos oceanos como o Brasil e os Estados Unidos, níveis de preocupação para HPAs foram estabelecidos de forma emergencial com o objetivo de mensurar os riscos à saúde humana associados ao consumo de pescado e, portanto, avaliar a necessidade de interdição de áreas de cultivo e locais de pesca. A abordagem utilizada em ambos os países é baseada em abordagens

de avaliação de risco desaconselhadas pela União Europeia (consulte a seção 5), resultando em níveis de preocupação pouco rigorosos. Os níveis de preocupação provisórios estabelecidos pelos Estados Unidos e Brasil após desastres com derramamento de petróleo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Níveis de preocupação provisórios para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado estabelecidos pelos Estados Unidos após o derramamento de petróleo *Deepwater Horizon* e pelo Brasil após o derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do país (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).

HPAs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Estados Unidos ^a		
	Camarão e caranguejo	Ostra	Peixe
Naftaleno	123.000	13.3000	32.700
Fluoreno	246.000	267.000	65.300
Antraceno e Fenantreno	1.846.000	2.000.000	490.000
Pireno	185.000	200.000	49.000
Fluoranteno	246.000	267.000	65.300
Criseno	132.000	143.000	35.000
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	13.200	14.300	3.500
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	1.320	1.430	350
Benzo[<i>a</i>]antraceno	1.320	1.430	350
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	1.320	1.430	350
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno	132	143	35
Benzo[<i>a</i>]pireno	132	143	35
HPAs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Brasil ^b		
	Moluscos e crustáceos	Peixes	
Benzo[<i>a</i>]pireno	18,0	6,0	

HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. ^a: (FDA, 2010). ^b: (BRASIL, 2019a). Fonte: de Melo et al. (2022b).

Embora instrumentos legais tenham sido estabelecidos para monitorar a contaminação de pescado em áreas contaminadas com petróleo, a magnitude e complexidade desses tipos de desastres reforçam a necessidade de revisar e harmonizar regulamentos para proteger o ambiente e a saúde pública de forma eficaz, evitando a interdição de locais de pesca. Atualmente, o uso da Metrologia Química é a principal abordagem para avaliar a contaminação de pescado com substâncias tóxicas, como os HPAs. Assim, em situações emergenciais como derramamentos de petróleo nos oceanos, o apoio de laboratórios dotados de métodos analíticos confiáveis é essencial para respaldar as investigações e ações das autoridades reguladoras.

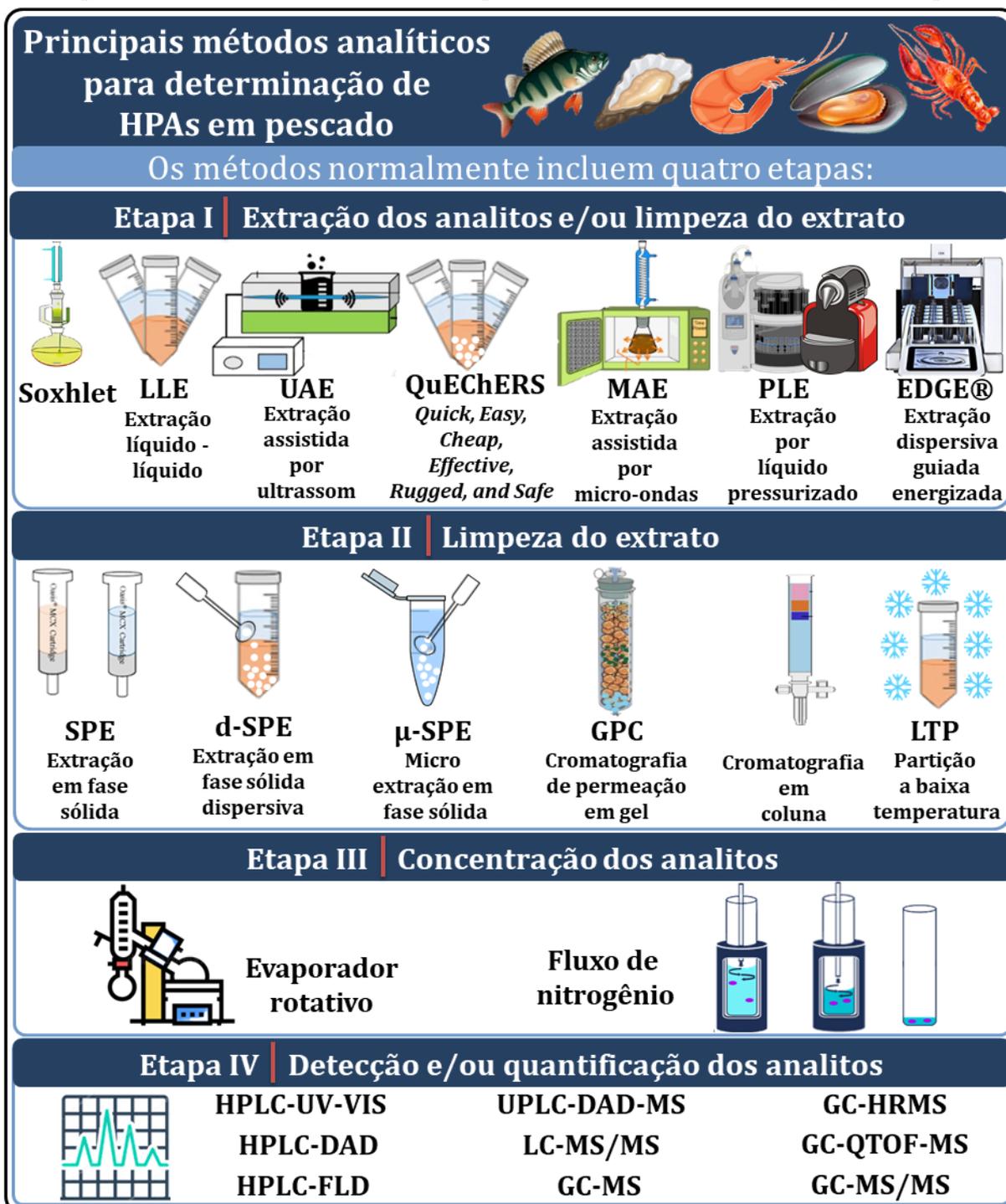
4 MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROLE PARA DETERMINAÇÃO DE HPAS EM PESCADO

Métodos analíticos destinados à inspeção de alimentos devem combinar praticidade, reprodutibilidade, e preferencialmente equilibrar custos, além de fornecer resultados analíticos confiáveis, com rastreabilidade e imparcialidade, evitando a perda de grandes lotes de alimentos, práticas comerciais inadequadas, suspensão do comércio internacional, prejuízos à saúde dos consumidores, entre outros (MOLOGNONI; DAGUER; HOFF, 2021). Independente do método analítico empregado para determinar HPAs em pescado, quando se refere a métodos “de referência” ou “oficiais”, a confiabilidade e repetibilidade devem ser demonstradas através de protocolos de validação, que estabelecem critérios de desempenho e interpretação de resultados acordados internacionalmente (DAGUER et al., 2018; MOLOGNONI et al., 2018a).

Analisar HPAs em pescado, especialmente durante e após desastres com petróleo, é um permanente desafio para Química de Alimentos, não apenas pela complexidade de interferentes e baixas concentrações dos analitos nas amostras, mas também devido à urgência por resultados. Normalmente, os métodos desenvolvidos incluem quatro etapas: (I) extração dos analitos na matriz alimentar; (II) limpeza do extrato; (III) concentração dos analitos e (IV) detecção e/ou quantificação dos analitos. Por outro lado, a tendência atual é optar por métodos de preparo de amostra miniaturizados e/ou com maior automação, que combinem técnicas analíticas de extração, limpeza e concentração em menos etapas, reduzindo o tempo e o consumo de reagentes e materiais.

Os métodos de extração de HPAs em pescado incluem, mas não estão limitados à extração por Soxhlet, saponificação, extração líquido-líquido (LLE), extração por líquido pressurizado (PLE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultrassom (UAE), QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), dentre outros. Os procedimentos de limpeza do extrato amplamente utilizados incluem a extração em fase sólida (SPE), cromatografia em coluna, cromatografia de permeação em gel (GPC), dentre outros. Antes da detecção dos analitos, uma etapa de concentração geralmente em evaporador rotativo e/ou em fluxo de nitrogênio é realizada devido às baixas concentrações de HPAs observadas nas amostras. Finalmente, os analitos são detectados e/ou quantificados por cromatografia líquida ou gasosa. Os principais métodos analíticos para determinação de HPAs em pescado são ilustrados na Figura 5.

Figura 5 – Principais métodos de extração, limpeza do extrato, concentração dos analitos e detecção e/ou quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado.



GC-HRMS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. GC-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*. GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. GC-QTOF-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo. HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. HPLC-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. HPLC-DAD-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e fluorescência. HPLC-UV-VIS/FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores ultravioleta e de fluorescência. LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*. UPLC-DAD-MS: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas. Fonte: de Melo et al. (2022b).

Os detalhes dos principais métodos analíticos para determinação de HPAs em pescado são apresentados na Tabela 4, incluindo informações de tipo e quantidade de amostra, métodos de extração, limpeza do extrato, concentração dos analitos, instrumentos de detecção e quantificação, colunas cromatográficas, fontes de ionização, fase móvel, eluição e parâmetros de desempenho do método.

Tabela 4 – Abordagens analíticas para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado, incluindo detalhes de tipo de matriz, quantidade de amostra, preparo de amostra, instrumentação analítica e parâmetros de desempenho.

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
Camarão Caranguejo Peixe Ostra (5 g)	16 US EPA HPAs Com exceção de acenafileno	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e acetato de sódio). Fator de concentração: 0,25. Amostra homogeneizada com H ₂ O. Extrato transferido para tubo QuEChERS, acetonitrila adicionada. Sobrenadante filtrado.	HPLC-FLD Coluna: Zorbax Eclipse PAH (50 mm × 4,6 mm; 1,8 μm) Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila Eluição: Gradiente (35 min)	LOD: 0,09 – 8,10 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,19 – 18,0 μg kg ⁻¹ Recuperação: 78 – 128%	(GRATZ et al., 2011)
Moluscos bivalves Peixe (1 g)	4HPAs	Extração: Saponificação (2 h) e LLE. Limpeza do extrato: SPE (sílica). Concentração: Evaporador rotativo (90 min). Amostra homogeneizada com solução etanólica de KOH. Fração insaponificável extraída por LLE com ciclohexano. Extrato concentrado, reconstituído em acetonitrila. Extrato limpo em SPE, pré-condicionado e eluído em acetonitrila. Extrato filtrado.	HPLC-FLD Coluna: Eclipse PAH C ₁₈ (50 mm × 2,1 mm; 1,8 μm) Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila Eluição: Gradiente (20 min)	LOD: 0,02 – 0,06 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,06 – 0,26 μg kg ⁻¹ Recuperação: 84 – 104%	(BOGDANOVIĆ et al., 2019)
Peixe (0,5 g)	16 US EPA HPAs Além de dibenzo[<i>a,l</i>]antraceno e benzo[<i>j</i>]fluoranteno. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno e benzo[<i>j</i>]fluoranteno reportados como uma somatória	Extração: MAE (20 min). Concentração: Evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio. Fator de concentração: 1,00. Amostra extraída por MAE com acetonitrila. Extrato filtrado, concentrado e reconstituído em acetonitrila.	HPLC-DAD/FLD Coluna: C ₁₈ CC 150/4 Nucleosil 100-5 PAH (150 mm × 4,0 mm; 5 μm) Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila	LOD: 0,04 – 8,15 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,15 – 27,16 μg kg ⁻¹	(RAMALHOS A et al., 2012)
Peixe Mexilhão (5 g)	16 US EPA HPAs	Extração: Hidrólise (2,5 h). Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna (sílica gel). Concentração: Não especificada. Amostra hidrolisada com KOH e Na ₂ S, enxaguada com <i>n</i> -hexano, etanol e H ₂ O. Fase aquosa extraída com <i>n</i> -hexano. Extrato limpo em GPC com Na ₂ SO ₄ e eluído com éter etílico e <i>n</i> -hexano. Extrato concentrado e reconstituído em acetonitrila.	HPLC-UV-VIS/FLD Coluna: Pinnacle II PAH (25 cm × 4,6 mm) Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila	LOD: 0,03 – 0,40 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,09 – 1,20 μg kg ⁻¹ Recuperação: 82 – 90%	(FASANO et al., 2018)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
Moluscos bivalves (10 g)	16 US EPA HPAs	Extração: Extração por Soxhlet (18 h). Limpeza do extrato: SPE (PSA). Concentração: Evaporador rotativo. Amostra liofilizada extraída por Soxhlet com acetona e diclorometano. Extrato seco em Na ₂ SO ₄ e evaporado em evaporador rotativo. Extrato limpo em SPE, eluído com diclorometano e <i>n</i> -hexano. Extrato seco com Na ₂ SO ₄ . Extrato concentrado, reconstituído em acetonitrila e filtrado.	HPLC-DAD Coluna: Zorbax Eclipse PAH C ₁₈ (4,6 mm × 250 mm; 5 μm) Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila Eluição: Gradiente (15 min)	LOD: 0,07 – 0,16 μg kg ⁻¹ Recuperação: 78 – 112%	(SUN et al., 2020b)
Peixe Camarão (10 g)	16 US EPA HPAs	Extração: UAE (4 h). Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna (sílica gel e alumina). Concentração: Evaporador rotativo. Fator de concentração: 2,00. Amostra homogeneizada com Na ₂ SO ₄ , extraída por UAE com metanol, KOH e H ₂ O. <i>N</i> -hexano adicionado. Extrato evaporado e ciclohexano adicionado. Extrato limpo em cromatografia em coluna de sílica gel e alumina com <i>n</i> -hexano e cloreto de metileno. Extrato evaporado e reconstituído em acetonitrila.	HPLC/UV-VIS Coluna: LC-PAH (250 mm × 4,6 mm; 5 μm) Fase móvel A: H ₂ O B: Acetonitrila Eluição: Gradiente (55 min)	LOD: 1,00 – 534 μg L ⁻¹ LOQ: 2,00 – 1780 μg L ⁻¹ Recuperação: 34 – 119%	(SAID; IDRIS; SAHLABJI, 2020)
Peixe Camarão (3 g)	16 US EPA HPAs	Extração: UAE. Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna (sílica gel). Concentração: Fluxo de nitrogênio. Amostra homogeneizada com Na ₂ SO ₄ e MgSO ₄ , e extraída por UAE usando hexano e acetona. Extrato concentrado. Extrato limpo em cromatografia em coluna de sílica gel com Na ₂ SO ₄ e eluído com hexano e diclorometano. Extrato diluído com acetona.	HPLC-UV-VIS/FLD Coluna: Não especificada (250 mm × 4,6 mm; 5 μm)	LOD: 0,10 – 1,80 μg kg ⁻¹ Recuperação: 77 – 98%	(SOLTANI et al., 2019)
Ostra (10 g)	16 US EPA HPAs	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e NaCl), PSA e MgSO ₄ . Fator de concentração: 0,45. Amostra homogeneizada com H ₂ O. Extrato transferido para tubo QuEChERS e acetonitrila	UPLC-APPI-MS Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C8 (2,1 mm × 50 mm; 1,8 μm) Ionização: APPI	LOQ: 0,013 – 0,129 μg kg ⁻¹ Recuperação: 77 – 110%	(CAI; STEVENS; SYAGE, 2012)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
		adicionada. Extrato limpo com PSA e MgSO ₄ . Extrato filtrado.	Dopante: Clorobenzeno Fase móvel A: H ₂ O:Acetonitrila (90:10, v/v). B: Acetonitrila Eluição: Gradiente (18,01 min)		
Camarão (10 g)	16 US EPA HPAs	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e NaCl), PSA e MgSO ₄ . Fator de concentração: 1,00. Amostra homogeneizada com acetonitrila e transferida para tubo QuEChERS. Extrato limpo com PSA e MgSO ₄ . Extrato filtrado.	LC-MS/MS Coluna: Waters PAH C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila Ionização: APPI Dopante: Tolueno Eluição: Gradiente (30 min)	LOD: 20,0 – 510 µg kg ⁻¹ Recuperação: 75 – 125%	(SMOKER; TRAN; SMITH, 2010)
Camarão Caranguejo Peixe Ostra Mexilhão (2 g)	8HPAs	Extração: PLE. Limpeza do extrato: <i>Salting-out</i> (MgSO ₄ e NaCl) Concentração: Fluxo de nitrogênio Fator de concentração: 4,00. Homogeneização com terra de diatomácea, PLE com H ₂ O e acetonitrila. Limpeza do extrato com <i>salting-out</i> . Extrato evaporado e reconstituído com acetonitrila.	LC-MS/MS Coluna: Zorbax Eclipse PAH RRHT (100 mm × 2,1 mm; 1,8 µm). Fase móvel A: H ₂ O. B: Acetonitrila. Ionização: APCI. Eluição: Gradiente (10 min).	LOD: 0.9 – 1.25 µg kg ⁻¹ LOQ: 1.25 – 5.00 µg kg ⁻¹ Recovery: 75 – 115%	(DE MELO et al., 2022a)
Peixe Camarão (10 g)	8HPAs	Extração: Saponificação (3 h) e LLE. Limpeza do extrato: SPE (Florisil®). Concentração: Evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio. Fator de concentração: 10,0. Amostra homogeneizada com solução etanólica de KOH e hexano. Extrato filtrado e adicionado em um funil de separação com hexano e etanol. Extração por LLE com hexano e lavagem com H ₂ O. Sobrenadante seco com Na ₂ SO ₄ e concentrado. Extrato limpo em SPE, eluído com hexano e diclorometano. Extrato concentrado e reconstituído em diclorometano.	GC-MS Coluna: HP-5MS-UI (30 m × 0,25 mm; 0,25 mm) Tempo de corrida: 50 min	LOD: 0,07 – 0,18 µg kg ⁻¹ LOQ: 0,21 – 0,54 µg kg ⁻¹ Recuperação: 80 – 120%	(KIM; PATRA; SHIN, 2022)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
Camarão Caranguejo Ostra (5 g)	16 US EPA HPAs	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e NaCl). Concentração: Fluxo nitrogênio. Fator de concentração: 5,33. Amostra homogeneizada com H ₂ O e acetonitrila, e transferida para tubo QuEChERS. Camada orgânica concentrada.	GC-MS Coluna: DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	LOD: 1,00 – 5,00 μg L ⁻¹	(FERNANDO et al., 2019)
Mexilhão (4 – 5 g)	16 US EPA HPAs	Extração: MAE e saponificação. Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna de sílica gel e alumina. Concentração: Fluxo de nitrogênio. Amostra liofilizada extraída por MAE com metanol. Adicionado KOH, H ₂ SO ₄ e hexano. Extrato de hexano evaporado. Extrato limpo em coluna cromatográfica de sílica gel e alumina usando diferentes solventes (não especificados). Extrato concentrado.	GC-MS Coluna: DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)	LOD: 4,15 – 8,97 μg kg ⁻¹	(KUCUKSEZGIN et al., 2020)
Peixe Crustáceo Cefalópode Moluscos bivalves (5 g)	16 US EPA HPAs	Extração: UAE (30 min). Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna (Florisil®, óxido de alumínio e Na ₂ SO ₄). Concentração: Não especificada. Amostra extraída por UAE com hexano e diclorometano. Extrato limpo com H ₂ SO ₄ e em cromatografia em coluna. Extrato concentrado.	GC-MS Coluna: HP-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm) Ionização: EI	LOD: 0,02 – 0,15 μg kg ⁻¹ Recuperação: 76 – 104%	(SUN et al., 2018)
Peixe (20 g)	16 US EPA HPAs Com exceção de acenafteno, acenaftileno, benzo[<i>b</i>]fluoranteno, benzo[<i>k</i>]fluoranteno e indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	Extração: Digestão alcalina (2 h). Limpeza do extrato: SPE (Florisil® e Na ₂ SO ₄). Concentração: Fluxo de nitrogênio. Amostra homogeneizada submetida à digestão alcalina (etanol e KOH). Extrato homogeneizado com H ₂ O e hexano. Extrato seco sobre Na ₂ SO ₄ e concentrado. Extrato limpo em SPE, eluído com hexano e diclorometano. Extrato concentrado e reconstituído em diclorometano.	GC-MS Coluna: DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm) Ionização: EI Tempo de corrida: 40 min	LOD: 0,10 – 2,00 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,30 – 4,00 μg kg ⁻¹ Recuperação: 85 – 110%	(STORELLI et al., 2013)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
Peixe (10 g)	4HPAs	<p>Extração: PLE.</p> <p>Limpeza do extrato: Cromatografia de permeação em gel (GPC) e SPE (sílica).</p> <p>Concentração: Não especificada.</p> <p>Fator de concentração: 100.</p> <p>Amostra homogeneizada com ácido poliacrílico e areia de Ottawa. Extração por PLE com acetona e <i>n</i>-hexano. Extrato concentrado e limpo em GPC e SPE, eluído com ciclohexano e acetato de etila. Extrato concentrado e reconstituído.</p>	<p>GC-MS</p> <p>Coluna: DB-5MS (50 m × 0,25 mm; 0,25 μm)</p> <p>Ionização: EI</p>	LOD: 0,30 μg kg ⁻¹	(DUEDAHL-OLESEN et al., 2020a)
Peixe Camarão Caranguejo Ostra (5 g)	25 HPAs Para mais informações consultar referência	<p>Extração: PLE (9 h).</p> <p>Limpeza do extrato: Cromatografia em coluna (sílica gel e alumina).</p> <p>Concentração: Fluxo de nitrogênio.</p> <p>Amostra homogeneizada com terra de diatomácea, enxaguada com cloreto de metileno e extraída por ASE com metileno e acetona. Extrato enxaguado com acetona e concentrado até aproximadamente 10 mL. Extrato enxaguado com cloreto de metileno e concentrado até aproximadamente 4 mL. Hexano adicionado (10 mL) e concentrado até aproximadamente 2 mL. Extrato limpo em cromatografia em coluna de sílica gel alumina usando éter de petróleo e cloreto de metileno. Extrato concentrado até 1 mL.</p>	<p>GC-MS/MS</p> <p>Coluna: DB-EUPAH CF (20 m × 0,18 mm; 0,14 μm)</p> <p>Ionização: EI</p> <p>Tempo de corrida: 24,25 min</p>	LOD: 0,50 μg kg ⁻¹	(XIA et al., 2012)
Peixe (1 g)	24 HPAs Para mais informações consultar referência	<p>Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (PSA, MgSO₄ e C₁₈) e LTP (2 h).</p> <p>Fator de concentração: 1,00.</p> <p>Amostra homogeneizada com acetonitrila e MgSO₄. Sobrenadante congelado. Extrato transferido para tubo QuEChERS e adicionado hexano. Extrato diluído em hexano e acetona.</p>	<p>GC-MS/MS</p> <p>Coluna: DB-17MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)</p> <p>Ionização: APCI</p> <p>Tempo de corrida: 30 min</p>	<p>LOD: 0,50 – 2,00 μg kg⁻¹</p> <p>LOQ: 2,00 μg kg⁻¹</p> <p>Recuperação: 71 – 117%</p>	(PORTOLÉS et al., 2017)
Peixe Mexilhão (6 g)	25 HPAs Para mais informações consultar referência	<p>Extração: QuEChERS (NaCl e Na₂SO₄).</p> <p>Limpeza do extrato: GPC e SPE (lã de vidro, sílica e Na₂SO₄).</p>	<p>GC-HRMS</p> <p>Coluna: DB35 (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm)</p> <p>Ionização: EI</p>	<p>LOD: > 0,20 μg kg⁻¹</p> <p>Recuperação: 52 – 131%</p>	(CLOUTIER et al., 2017)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
		Amostra homogeneizada com H ₂ O, acetato de etila, NaCl e Na ₂ SO ₄ . Extrato concentrado e submetido à GPC automatizada com cloreto de metileno. Extrato limpo em SPE, eluído com <i>n</i> -hexano e diclorometano. Extrato diluído com isoctano.			
Moluscos bivalves (5 g)	4HPAs	Extração/Limpeza do extrato: QuEChERS (citrato tribásico de sódio di-hidratado e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado), sorbente Z-Sep (zircônia ligada à sílica). Concentração: Evaporador sob vácuo. Fator de concentração: 5,00. Amostra homogeneizada com hexano e acetona. Extrato transferido para tubo QuEChERS e limpo com Z-Sep. Extrato evaporado e reconstituído em hexano.	GC-MS/MS Coluna: RXi-XLB (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm) Ionização: EI	LOQ: 0,50 μg kg ⁻¹ Recuperação: 75 – 82%	(CHIESA et al., 2018)
Peixe Mexilhão (1 g)	Acenaftileno Acenafteno Antraceno Fenantreno Fluoreno Naftaleno	Extração: Extração por <i>headspace</i> dinâmico <i>on-line</i> . Amostra liofilizada aquecida a 90 – 100 °C. Nitrogênio usado para “varrer” o <i>headspace</i> da amostra. Analitos termodesorvidos a 300 °C e resfriados a –25 °C.	GC-MS/MS Coluna: DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm) Ionização: EI Tempo de corrida: 15 min	LOQ: 0,01 – 0,60 μg kg ⁻¹ Recuperação: 9 – 62%	(GUIFFARD et al., 2020)
Peixe (4 g)	15 + 1 EU HPAs e 16 US EPA HPAs Os seguintes analitos foram reportados como uma somatória: benzo[<i>a</i>]antraceno e criseno; benzo[<i>b</i>]fluoranteno, benzo[<i>j</i>]fluoranteno e benzo[<i>k</i>]fluoranteno	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e NaCl), μ-SPE automatizado (MgSO ₄ , PSA, C ₁₈ , Z-Sep – zircônia ligada à sílica e CarbonX – carvão ativado). Fator de concentração: 0,86. Amostra homogeneizada com acetonitrila, MgSO ₄ e NaCl. Extrato limpo em μ-SPE automatizado.	GC-MS/MS Coluna: DB-5MS (15 m × 0,53 mm; 1 μm) Tempo de corrida: 10 min	LOQ: 1,00 – 20,0 μg kg ⁻¹ Recuperação: 55 – 131%	(HAN; SAPOZHNIKOVA, 2020)
Peixe (2,5 g)	4HPAs	Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (MgSO ₄ e NaCl), sorbente Z-Sep+ d-SPE (zircônia e C ₁₈ ligados à sílica). Concentração: Fluxo nitrogênio.	GC-QTOF-MS Coluna: HP5MS (15 m × 250 μm; 0,25 μm) Ionização: EI	LOD: 0,09 – 0,77 μg kg ⁻¹ LOQ: 0,17 – 1,64 μg kg ⁻¹ Recuperação: 93 – 117%	(DUEDAHL-OLESEN et al., 2020b)

Matriz (massa)	Analitos	Método de extração e limpeza do extrato	Instrumentação analítica e parâmetros	Parâmetros de desempenho	Referência
		<p>Fator de concentração: 12,5. Amostra homogeneizada com H₂O e acetonitrila. QuEChERS adicionado. Sobrenadante retirado e congelado (-80 °C). Alíquota do extrato descongelada e limpa em Z-Sep+ d-SPE. Sobrenadante evaporado e reconstituído em tolueno.</p>			
Peixe (5 g)	24 HPAs Para mais informações consultar referência	<p>Extração/limpeza do extrato: QuEChERS (PSA, MgSO₄ e C₁₈) e LTP. Concentração: Fluxo de nitrogênio. Fator de concentração: 1,25. Amostra homogeneizada com acetonitrila e MgSO₄. Sobrenadante congelado. Extrato descongelado transferido para tubo QuEChERS. Hexano adicionado. Extrato concentrado.</p>	<p>GC-QTOF-MS Coluna: DB-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 μm) Ionização: APCI</p>	LOD: 5,00 – 50,0 μg kg ⁻¹	(NÁCHER-MESTRE et al., 2014)

APCI: Ionização química à pressão atmosférica. APPI: Fotoionização à pressão atmosférica. C₁₈: Octadecilsilano. EI: Impacto de elétrons. Florisil®: Silicato de magnésio ativado. GC-HRMS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. GC-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em *tandem*. GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. GC-QTOF-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo. GPC: Cromatografia de permeação em gel. HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. HPLC-DAD-LFD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e fluorescência. HPLC-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. HPLC-UV-VIS/FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores ultravioleta e de fluorescência. LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*. LLE: Extração líquido-líquido. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação. LTP: Partição a baixa temperatura. MAE: Extração assistida por micro-ondas. PLE: Extração por líquido pressurizado. PSA: Amina primária secundária (sorbente). QuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*. SPE: Extração em fase sólida. d-SPE: Extração em fase sólida dispersiva. μ-SPE: Micro extração em fase sólida. UAE: Extração assistida por ultrassom. UPLC-DAD-MS: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas. 4HPAs: Soma de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno e criseno. 8HPAs: Soma de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno. 16 US EPA HPAs: Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno, naftaleno e pireno. Fonte: de Melo et al. (2022b).

A técnica clássica para extração de HPAs em alimentos é a extração por Soxhlet. Desenvolvida há mais de um século, a técnica é baseada em sucessivos ciclos de refluxo de solvente à quente (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Sun et al. (2020) obtiveram recuperações satisfatórias (78 – 112%) ao usar a extração por Soxhlet (acetona e diclorometano, durante 18 h) para extrair 16 US EPA HPAs de mexilhões provenientes de baías localizadas em torno de portos, estaleiros e indústrias de produtos químicos na China. Embora a extração por Soxhlet forneça eficiências de extração satisfatórias e seja de fácil execução, por outro lado, exige muito tempo e grande quantidade de solventes orgânicos (WU et al., 2019).

As vantagens e desvantagens da extração por Soxhlet são utilizadas como ponto de partida para o desenvolvimento de novos métodos de preparo de amostra. Um exemplo disso é a PLE. A PLE, também conhecida como extração acelerada por solvente (ASE) ou extração com solvente pressurizado (PSE), tem sido reportada como a metodologia alternativa para a extração por Soxhlet, especialmente devido à rapidez e menor consumo de solvente (KIM et al., 2019). Essa abordagem executa a extração de amostras de forma automatizada baseada na combinação de alta pressão e temperatura, fazendo com que os analitos sejam facilmente desorvidos na matriz (HOFF; PIZZOLATO, 2018). A técnica ganhou notoriedade após a inclusão da PLE como método oficial de extração da US EPA. Uma das abordagens recomendadas pela US EPA e FDA para avaliar a interdição ou liberação de locais de pesca após o derrame de petróleo *Deepwater Horizon* foi baseada em PLE para extração de HPAs nas amostras de pescado (FDA, 2010; NOAA, 2004). Apesar das inúmeras vantagens da PLE, os sistemas comerciais apresentam custo elevado de aquisição. Recentemente, o uso de uma máquina de café *espresso* doméstica de baixo custo, com base nos mesmos princípios de extração por PLE, foi proposta como uma alternativa bem-sucedida aos sistemas comercialmente disponíveis (ARMENTA; DE LA GUARDIA; ESTEVE-TURRILLAS, 2016; MERLO et al., 2020). A PLE usando uma máquina de café *espresso* doméstica foi a abordagem utilizada pelas autoridades brasileiras para avaliar a contaminação de pescado após o derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do Brasil (de MELO et al., 2022a).

Outra abordagem recomendada pela US EPA e FDA em resposta ao derramamento de petróleo *Deepwater Horizon*, usou a extração por QuEChERS para avaliar a contaminação de pescado com HPAs (número do método: C-002.01) (FDA, 2011). A abordagem QuEChERS é baseada na extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). No método original, acetonitrila é usada como solvente, ao passo que sulfato de magnésio e cloreto de sódio são usados para a etapa de partição líquido-líquido, e finalmente, sulfato de magnésio e amina primária secundária (PSA) são usados na etapa de d-SPE (ANASTASSIADES et al., 2003). Nenhuma etapa adicional de

limpeza do extrato é necessária e os extratos podem ser diretamente analisados. Diversas modificações do método foram relatadas para extração de HPAs em pescado, incluindo seleção de solventes (acetato de etila, acetona e hexano), sais (acetato de sódio e sulfato de sódio) e sorbentes (C₁₈, carvão ativado e Z-Sep – zircônia ligada à sílica) (CHIESA et al., 2018; CLOUTIER et al., 2017; HAN; SAPOZHNIKOVA, 2020).

Os extratos obtidos por extração por Soxhlet e PLE geralmente requerem um procedimento de limpeza do extrato devido à complexidade das matrizes de pescado. Os procedimentos de limpeza do extrato comumente utilizados incluem GPC, SPE (Florisorb®, PSA, sílica e sulfato de sódio) e cromatografia em coluna de sílica gel e alumina, eluídos principalmente com hexano e diclorometano (DUEDAHL-OLESEN et al., 2020a; PIE; HEYES; MITCHELMORE, 2015; SUN et al., 2020b). Embora QuEChERS não necessite de etapas adicionais de limpeza do extrato, a partição à baixa temperatura (LTP) e GPC foram frequentemente relatadas para limpeza de extratos de matrizes de pescado (NÁCHERMESTRE et al., 2014; PORTOLÉS et al., 2017).

Seguindo as tendências atuais de preparo de amostra, um recente método tem chamado atenção dos pesquisadores por apresentar características bastante atrativas como, maior simplicidade comparado a outros sistemas de extração por solventes, maior potencial de automatização em comparação ao QuEChERS, maior rapidez que a extração por Soxhlet e sem necessidade de etapas adicionais de limpeza dos extratos. A extração dispersiva guiada energizada (EDGE) combina d-SPE e PLE em um único instrumento automatizado. À medida que as paredes da câmara de extração são aquecidas (até 200 °C), a pressão aumenta (até 200 psi) forçando a dispersão do solvente pela amostra, criando o efeito dispersivo guiado energizado. O resultado da extração são extratos límpidos que podem ser diretamente analisados por cromatografia líquida ou gasosa, dependendo do propósito (CEM CORPORATION, 2020; KINROSS et al., 2020).

Além do constante progresso de abordagens de preparo de amostra, a instrumentação analítica também segue em evolução. Cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC) são as técnicas usadas para analisar HPAs em pescado. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a técnica preferida devido à alta sensibilidade, além de ser utilizada como método oficial da AOAC *International* 2014.08 e da FDA (C-002.01) (MASTOVSKA et al., 2015). Problemas de co-eluição de isômeros, como benzo[*a*]antraceno e criseno; benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno e benzo[*k*]fluoranteno; benzo[*ghi*]perileno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno, dentre outros, são frequentes (GÓMEZ-RUIZ; WENZL, 2009; HAN; SAPOZHNIKOVA, 2020). A distinção de isômeros é uma tarefa difícil e muito importante para

confiabilidade do método devido às diferenças de toxicidade e limites regulatórios disponíveis para HPAs. Portanto, a seleção de uma fase estacionária adequada é essencial. Normalmente, colunas capilares apolares com 5% fenil metil polisiloxano como, DB-5MS e HP5MS, são preferidas para separação de HPAs (DUEDAHL-OLESEN et al., 2020b; GUIFFARD et al., 2020; KUCUKSEZGIN et al., 2020; STORELLI et al., 2013). Por outro lado, colunas de polaridade média com 50% fenil metil polisiloxano como, DB-17MS, fornecem uma maior seletividade e resolução, além de distinguir adequadamente diversos isômeros do grupo dos HPAs (GÓMEZ-RUIZ; WENZL, 2009; PORTOLÉS et al., 2017).

Para a análise de HPAs em pescado por LC, os detectores ultravioleta (UV) e de arranjo de diodos (DAD) são frequentemente utilizados, apesar da falta de seletividade e sensibilidade (EFSA, 2008). Embora o detector de fluorescência (FLD) seja suficientemente sensível, alguns HPAs apresentam fluorescência limitada, podendo fornecer falsos resultados (PURCARO; MORET; CONTE, 2013; SUN et al., 2020a). A cromatografia líquida de alta eficiência com detectores em série como ultravioleta e fluorescência (HPLC-UV-VIS/FLD), e arranjo de diodos e fluorescência (HPLC-DAD/FLD), foi usada para minimizar as limitações de cada uma das técnicas (FASANO et al., 2018; RAMALHOSA et al., 2012). Colunas cromatográficas específicas para HPAs, como Zorbax Eclipse PAH, Eclipse PAH C₁₈ e Pinnacle II PAH são geralmente necessárias para distinguir isômeros (de Melo et al., 2022a; FASANO et al., 2018; GRATZ et al., 2011; RAMALHOSA et al., 2012; SAID; IDRIS; SAHLABJI, 2020; SMOKER; TRAN; SMITH, 2010).

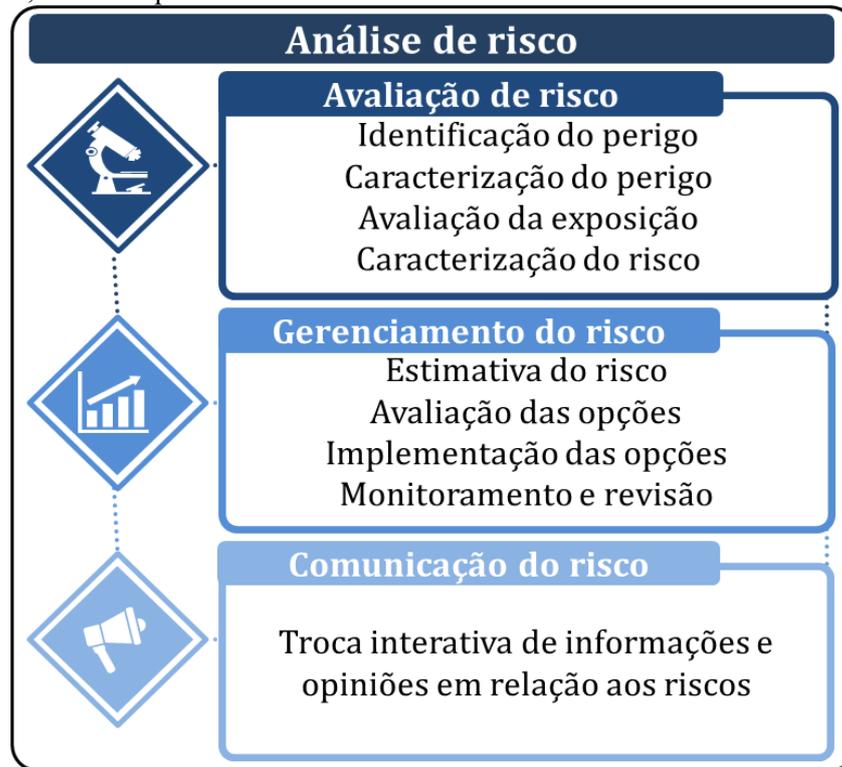
Métodos hifenados baseados em espectrometria de massas em modo *tandem*, precedida de separação por cromatografia líquida (LC-MS/MS) e gasosa (GC-MS/MS) são capazes de identificar diversos compostos de maneira inequívoca, mesmo em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Embora GC-MS e GC-MS/MS estejam bem estabelecidos para análise de HPAs (GALMICHE et al., 2021a), por outro lado, LC-MS/MS é capaz de identificar simultaneamente centenas de compostos com propriedades químicas variadas, contribuindo para o aumento da frequência analítica nos laboratórios de controle (MOLOGNONI; DAGUER; HOFF, 2021). Nessas técnicas, a escolha da fonte de ionização é determinante para a sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade do método. A ionização por impacto de elétrons (EI) é a técnica amplamente utilizada em GC para HPAs, apesar da extensa fragmentação dos íons na fonte, resultando em baixa abundância de íons moleculares e perda de sensibilidade. Alternativamente, em LC-MS/MS, a fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI) são técnicas de ionização suaves que preservam os íons moleculares, garantindo melhor sensibilidade ao método (FANG et al., 2020).

É essencial que métodos analíticos sensíveis e modernos, capazes de fornecer dados metroológicos confiáveis e que atendam ao propósito, estejam disponíveis para determinar a toxicidade potencial de um derramamento de petróleo no oceano, além de orientar uma resposta rápida, fornecendo às autoridades reguladoras respaldo científico nas ações de enfrentamento ao desastre. Deste modo, as medições químicas laboratoriais fornecem dados essenciais para avaliar os potenciais riscos à saúde humana associados à exposição dietética aos HPAs.

5 ANÁLISE DE RISCO

A análise de risco é uma abordagem estruturada composta por três elementos interligados: (I) avaliação de risco; (II) gerenciamento do risco e (III) comunicação do risco (Figura 6). É usada para controlar situações em que uma população é exposta a um perigo (FAO; WHO, 2019; WHO; IPCS, 2004). Abordagens de análise de risco podem ser usadas para obter informações e evidências sobre o risco de um contaminante na cadeia de abastecimento de alimentos e definir quais ações devem ser executadas, como revisar ou definir limites regulatórios, avaliar a frequência de testes laboratoriais, fornecer aconselhamento a um subgrupo populacional, emitir *recall* e/ou proibir o comércio de produtos, entre outros (WHO; FAO, 2006). Por exemplo, padrões regulatórios foram definidos baseados em análises de risco quando metil mercúrio foi identificado em peixes no Japão e encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca) identificada pela primeira vez como perigo de origem alimentar no Reino Unido (WHO; FAO, 2006).

Figura 6 – Estrutura da análise de risco, composta por: avaliação de risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco, e suas etapas.



Fonte: Adaptado de Melo et al. (2022b).

As autoridades nacionais de segurança dos alimentos geralmente são as responsáveis pela execução de análises de risco. Além disso, governos com menos recursos disponíveis podem utilizar abordagens de análise de risco executadas em nível internacional para aplicação no âmbito nacional (WHO; FAO, 2006).

Diante de um contexto de emergência de saúde pública, como derramamentos de petróleo nos oceanos, a segurança dos alimentos é uma questão de interesse coletivo. Portanto, é necessário assegurar que os reais impactos associados ao consumo de pescado contaminado com petróleo sejam disponibilizados pelos governos e compreendidos por toda a população afetada. Com esse propósito, abordagens de análise de risco são aplicadas.

Antes de fundamentar os principais elementos relacionados à análise de risco, é importante definir os termos perigo e risco, diante da ambiguidade de compreensão desses conceitos. O perigo é definido como a propriedade inerente de um agente, como os HPAs, ou situação, como derramamentos de petróleo nos oceanos, com potencial de causar efeitos adversos quando uma população é exposta a esse agente. Por outro lado, sob o viés da contaminação química de alimentos, o risco é definido como a probabilidade de ocorrer um efeito adverso em uma população causada pela exposição a um contaminante, como os HPAs (WHO; IPCS, 2004).

A avaliação de risco à saúde humana associada ao consumo de pescado contaminado com petróleo é o primeiro elemento do processo de análise de risco, e tem como objetivo calcular ou estimar o risco com abrangência, de uma população após a exposição a um contaminante (WHO; IPCS, 2004, 2009a). Portanto, o texto será direcionado a fornecer uma ferramenta esclarecedora e orientativa sobre cada uma das etapas da estrutura de avaliação de risco.

5.1 AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA ASSOCIADA AO CONSUMO DE PESCADO CONTAMINADO COM HPAs

O processo de avaliação de risco é composto por quatro etapas: (I) identificação do perigo; (II) caracterização do perigo; (III) avaliação da exposição ou da dose-resposta e (IV) caracterização do risco (FAO; WHO, 2019; US EPA, 2019).

A identificação do perigo tem como objetivo avaliar com base em estudos toxicológicos e de modo de ação, as possíveis evidências dos efeitos adversos dos HPAs à saúde humana. Esses dados podem ser provenientes de estudos *in vitro*, induzidos em animais, relações estrutura-atividade e observações em humanos (WHO; IPCS, 2009a).

Após a etapa de identificação do perigo, a relação entre a dose administrada, ou a exposição aos HPAs, e a incidência de efeitos adversos à saúde humana é avaliada (relação dose-resposta), e, portanto, o perigo é caracterizado de forma qualitativa ou quantitativa (preferencialmente) (WHO; IPCS, 2004, 2009a). Nessa etapa, estudos *in vitro* e *in vivo* são as principais fontes de informação (WHO; IPCS, 2009b).

Como os HPAs são compostos carcinogênicos e genotóxicos, não apresentam dose limiar para efeito adverso à saúde humana, ou seja, não há um nível de exposição aos HPAs no qual há risco zero de danificar informação genética e induzir câncer, qualquer exposição aos HPAs pode gerar uma resposta adversa no organismo (EU, 2011; SCF, 2002). Por esse motivo, a modelagem quantitativa de dose-resposta usando o limite mais baixo de referência (do inglês *benchmark dose lower confidence limit* – BMDL) é usado para configurar o ponto de referência toxicológico, pois considera as incertezas expandidas associadas ao estudo e garante com nível de confiança de 95% que a resposta de referência toxicológica escolhida não seja excedida (EFSA, 2008; SCF, 2002; WHO; IPCS, 2020a). O uso da dose mais baixa de referência para um aumento de 10% da incidência de tumores em animais, com 95% de probabilidade de acerto (do inglês *95% lower confidence limit on the benchmark dose for a 10% response* – BMDL₁₀) é considerado um ponto de referência toxicológico apropriado para HPAs, pois representa

estatisticamente a dose de referência mais baixa que pode ser mensurada na maioria dos estudos (EFSA, 2008; JECFA, 2006). Portanto, foi estabelecido BMDL₁₀ para exposição dietética de B[a]P (0,07 mg kg⁻¹ peso corporal por dia), 4HPAs (0,34 mg kg⁻¹ peso corporal por dia) e 8HPAs (0,49 mg kg⁻¹ peso corporal por dia) (EFSA, 2008).

Definido o ponto de referência toxicológico, a próxima etapa é a avaliação da exposição humana aos HPAs associada ao consumo de pescado contaminado com petróleo. A avaliação da exposição dietética relaciona dados de consumo alimentar com dados de ocorrência (concentração de HPAs em pescado obtida por medições químicas) (WHO; IPCS, 2020b).

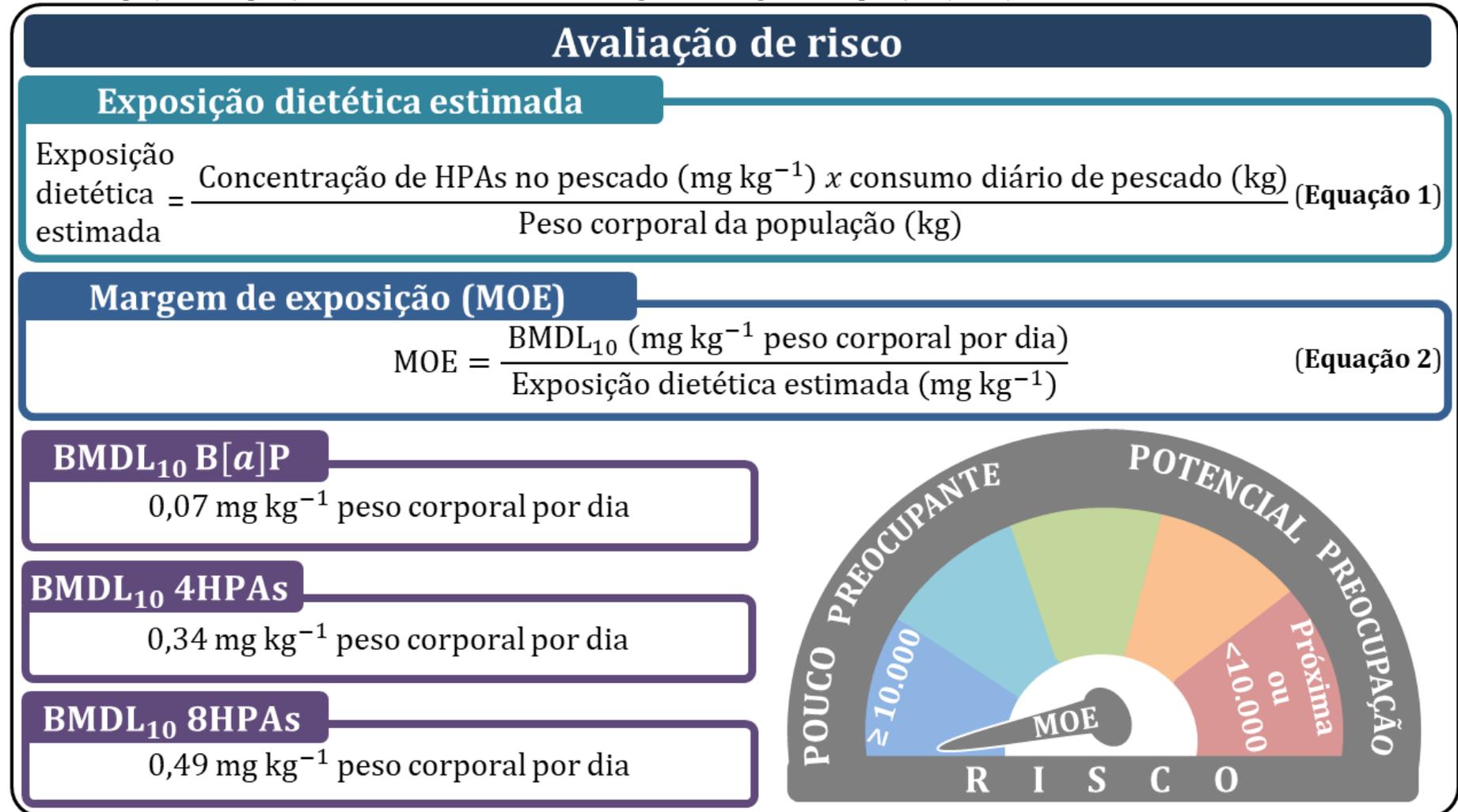
Para a avaliação da exposição dietética, geralmente são usados dados de consumo de pescado provenientes de estudos em uma parcela estatisticamente representativa da população, geralmente conduzido em nível nacional, através de inquéritos recordatórios (consumo de pescado em 24 horas) (WHO; IPCS, 2020b). Nessa etapa, grupos e subgrupos populacionais são identificados, como por exemplo, adultos, idosos, bebês, crianças e mulheres grávidas. A preocupação toxicológica também é definida, ou seja, aguda (exposição por um período de 24 horas ou uma única refeição), crônica ao longo da vida (repetidas exposições durante um longo período) ou crônica por um período curto da vida (repetidas exposições durante um período curto da vida maior que 24 horas) (WHO; IPCS, 2020b). Devido aos efeitos carcinogênicos e genotóxicos dos HPAs e a permanência incerta desses contaminantes no oceano após derramamentos de petróleo, estudos toxicológicos de exposição crônica demonstram ser a abordagem mais adequada.

Ademais, três diferentes modelos de exposição dietética crônica podem ser usados: (I) determinística; (II) determinística refinada ou (III) probabilística ou estocástica, sendo que a escolha da abordagem irá depender dos dados disponíveis e do propósito do estudo (WHO; IPCS, 2020b).

Na abordagem (I) determinística, valores fixos de concentração de HPAs e de consumo de pescado são usados para estimar a exposição dietética de uma população ou subgrupo populacional (US EPA, 2019). Enquanto na abordagem (II) determinística refinada são usados valores de uma distribuição de dados de duas formas: (I) uma distribuição de dados para consumo de pescado e valores fixos para concentração de HPAs, ou (II) uma distribuição de concentração de HPAs e valores fixos para consumo de pescado (WHO; IPCS, 2020b). É importante destacar que os valores fixos no cálculo da exposição dietética crônica podem ser a média, mediana ou valor máximo observado, dependendo do propósito do estudo (WHO; IPCS, 2020b). A principal vantagem do uso da abordagem determinística é a simplicidade de

implementação. Essa abordagem é uma ferramenta útil em um diagnóstico inicial em um cenário de risco, como derramamentos de petróleo nos oceanos. Diversos programas de monitoramento da US EPA usam modelos determinísticos para avaliar exposições dietéticas com eficiência e rapidez (US EPA, 2019). A equação para estimar a exposição dietética aos HPAs associada ao consumo de pescado contaminado com petróleo é ilustrada na Figura 7, Equação 1.

Figura 7 – Avaliação de risco à saúde humana associada ao consumo de pescado contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) através da equação de exposição dietética estimada e da abordagem de margem de exposição (MOE).



B[a]P: Benzo[a]pireno. BMDL₁₀: dose mais baixa de referência para um aumento de 10% da incidência de tumores em animais, com 95% de probabilidade de acerto. HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. MOE: Margem de exposição. 4HPAs: Soma de benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno e criseno. 8HPAs: Soma de benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno. Fonte: de Melo et al. (2022b).

A abordagem (III) probabilística ou estocástica é semelhante aos modelos determinísticos explicados anteriormente (baseada na Equação 1 da Figura 7), sendo que a principal diferença é que os dados de entrada no cálculo da exposição dietética são representados por uma distribuição estatística de consumo de pescado e de concentração de HPAs, resultando em uma gama de distribuições de exposições dietéticas (WHO; IPCS, 2020b). Essa abordagem fornece resultados mais realistas quando comparada à abordagem determinística, pois considera a variabilidade dos resultados. Por outro lado, o uso dessa ferramenta exige mais recursos, tempo, *softwares* de computação e experiência dos avaliadores para lidar com a variabilidade das estimativas (US EPA, 2019; WHO; IPCS, 2020b).

Uma questão chave na avaliação de exposição dietética é como tratar as amostras com resultados de concentração de HPAs abaixo do limite de detecção (<LOD) e limite de quantificação (<LOQ). Nesses casos, o avaliador de risco decidirá qual concentração atribuir às amostras considerando três opções: (I) atribuir o valor zero (estimativa inferior); (II) atribuir o LOD ou LOQ (estimativa no limite superior) ou (III) atribuir metade do LOD ou LOQ (estimativa no limite médio), ou ainda, avaliar todas as opções e determinar o impacto de cada uma delas na estimativa final de exposição dietética (WHO; IPCS, 2020b).

Estimada a exposição dietética, a quarta e última etapa da avaliação de risco é a caracterização do risco (WHO; IPCS, 2009b). A abordagem de margem de exposição (MOE) foi proposta pela EFSA como uma metodologia harmonizada para caracterização dos riscos à saúde humana devido a exposição à compostos carcinogênicos e genotóxicos, como os HPAs (EFSA, 2005, 2012). Essa abordagem considera as probabilidades de diferentes moléculas do grupo dos HPAs de induzir reações adversas em humanos (EFSA, 2012; WHO; IPCS, 2009b). A MOE fornece aconselhamento aos gerentes de risco em relação ao risco iminente à saúde pública, no entanto, não fornece uma quantificação do risco, mas uma indicação do nível de preocupação (Equação 2 da Figura 7) (EFSA, 2008; JECFA, 2006; WHO; IPCS, 2009b).

Para HPAs, MOE maior ou igual a 10.000 com base no BMDL₁₀, indica baixa preocupação à saúde pública, enquanto MOE inferior a 10.000 indica potencial preocupação (EFSA, 2008). É importante destacar que resultados de baixa preocupação à saúde não devem impedir a aplicação de medidas de gerenciamento do risco, bem como as decisões de reabertura e interdição de locais de pesca, uma vez que a exposição dietética aos HPAs deve ser tão baixa quanto razoavelmente possível (EU, 2011; WHO; IPCS, 2009b).

Embora tenha passado mais de uma década desde a recomendação da União Europeia para harmonizar a abordagem MOE para avaliar os riscos à saúde humana para HPAs, existem poucos estudos que usaram essa abordagem para avaliar os riscos após desastres com

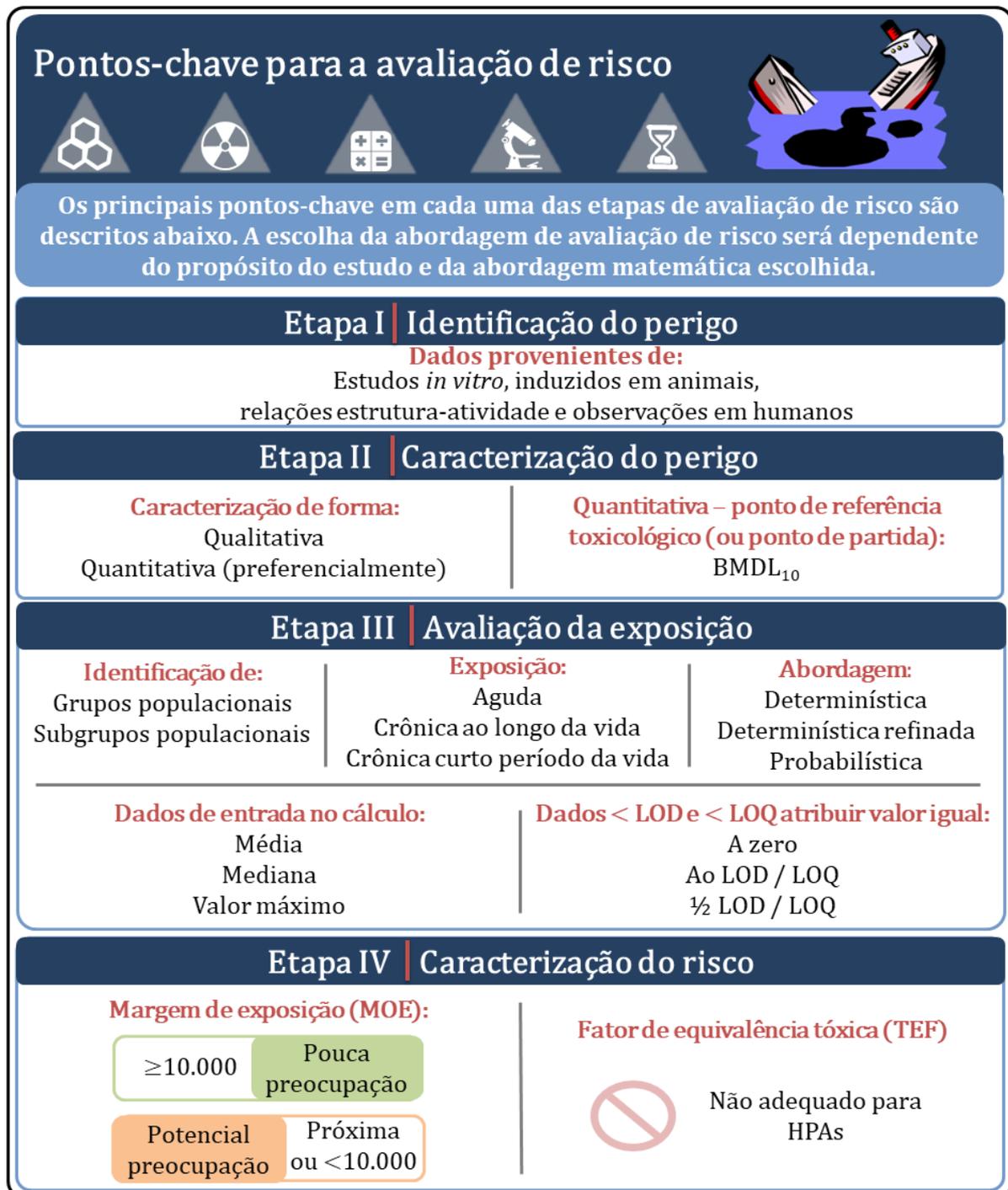
derramamentos de petróleo. No estudo de Effiong et al. (2016) foi usada a abordagem MOE para avaliar os riscos de consumidores de diferentes espécies de peixes do Delta Níger (um dos principais locais de exploração e transporte de petróleo do mundo). Valores de MOE para B[a]P, 4HPAs e 8HPAs estavam entre 4.070 – 102.000, indicando potencial preocupação para saúde de consumidores de peixe desta região.

A abordagem de fator de equivalência tóxica (TEF) também foi proposta para caracterização do risco. Essa abordagem contempla um conjunto de cálculos que considera: nível de risco carcinogênico durante a vida, tempo médio de vida, peso corporal, duração da exposição, taxa de consumo de pescado e probabilidade de desenvolver câncer baseada em investigações epidemiológicas e estudos toxicológicos induzidos em animais (BRASIL, 2019a; FDA, 2010). Tal abordagem tem como objetivo dimensionar a exposição de cada componente de uma mistura em relação à sua potência química, no caso dos HPAs, sempre considerando B[a]P como marcador de exposição (EFSA, 2008; WHO; IPCS, 2009b).

Os valores de TEF foram sugeridos para HPAs baseados em estudos de exposição pulmonar, cutânea, subcutânea e intraperitoneais. No entanto, não há qualquer menção em relação à exposição dietética, não justificando a extrapolação dessas exposições para a via oral (SCF, 2002). Essa abordagem é usada para produtos químicos que apresentam o mesmo mecanismo de ação e diferem apenas na sua potência, o que não é o caso dos HPAs, que são ativados por diferentes vias metabólicas, causando diferentes efeitos nos órgãos-alvo (EFSA, 2008; SCF, 2002). Além disso, B[a]P não deve ser considerado um marcador adequado para exposição aos HPAs, como explicado anteriormente (EFSA, 2008). Portanto, de acordo com a União Europeia, a abordagem TEF não é considerada adequada para avaliar o risco à saúde humana associado à exposição dietética aos HPAs (EFSA, 2008; JECFA, 2006). Apesar disso, a TEF foi usada pela FDA no protocolo de interdição e liberação de locais de pesca após o derramamento de petróleo *Deepwater Horizon* e pela ANVISA após o derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do Brasil (BRASIL, 2019a; FDA, 2010).

É importante destacar, que os resultados da avaliação de risco são extremamente dependentes do propósito do estudo e da abordagem matemática escolhida. Com o objetivo de auxiliar o leitor a avaliar os riscos à saúde humana associados ao consumo de pescado contaminado com HPAs, uma ilustração com os principais pontos-chave de cada uma das etapas de avaliação de risco à saúde humana é ilustrada na Figura 8.

Figura 8 – Principais pontos-chave de cada uma das etapas de avaliação de risco à saúde humana pela exposição dietética aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) após derramamentos de petróleo no oceano.



6 CONCLUSÃO

Derramamentos de petróleo nos oceanos como os ocorridos durante a Guerra do Golfo, *Exxon Valdez*, *Deepwater Horizon* e mais recentemente, no Brasil e Ilhas Maurício, contaminaram o pescado com HPAs, levando à interdição das atividades pesqueiras e comércio de pescado.

Os HPAs são utilizados como marcadores químicos de contaminação petrôgenica. O conjunto de 4HPAs ou o conjunto de 8HPAs devem ser usados como marcadores de contaminação de alimentos com HPAs. Embora o consumo de alimentos contaminados com HPAs implique na promoção de efeitos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos em humanos, poucos países apresentam programas oficiais de monitoramento e limites regulatórios estabelecidos para HPAs em pescado, representando um problema de saúde pública.

Contudo, é essencial que métodos analíticos adequados estejam disponíveis para monitorar HPAs em pescado e orientar uma resposta rápida e confiável em um cenário de derramamento de petróleo no oceano. Isso reflete no constante progresso tanto dos métodos de preparo de amostra quanto da instrumentação analítica. Métodos hifenados que combinam cromatografia líquida ou gasosa com subsequente detecção por espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS e GC-MS/MS, respectivamente) são capazes de fornecer a identificação inequívoca de HPAs em pescado em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$). A reprodutibilidade dessas técnicas demonstra ser favorecida quando combinadas a métodos de preparos de amostra modernos, como a extração dispersiva guiada energizada.

Embora a abordagem de margem de exposição (MOE) tenha sido proposta pela EFSA como uma metodologia harmonizada para caracterização dos riscos à saúde humana devido à exposição dietética aos HPAs, outras abordagens não adequadas para HPAs como, fator de equivalência tóxica (TEF), têm sido utilizadas por alguns países para avaliações de risco à saúde humana após derramamentos de petróleo nos oceanos. Portanto, um esforço conjunto de pesquisadores e agências reguladoras é necessário para harmonizar programas de monitoramento, orientar sobre métodos analíticos de controle, abordagens de avaliação de risco e limites regulatórios para HPAs em pescado.

Finalmente, a definição de instrumentos legais, no que se refere à segurança sanitária do pescado, não deve embasar-se apenas em experiências pós-derramamento de petróleo, mas em antecipar a determinação de normas para evitar danos à economia pesqueira e preservar a saúde pública.

7 REFERÊNCIAS

- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1–2, p. 185–198, 2003.
- AREKHI, M. et al. Environmental fate of petroleum biomarkers in Deepwater Horizon oil spill residues over the past 10 years. **Science of The Total Environment**, v. 791, p. 148056, 2021.
- ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A. Hard Cap Espresso Machines in Analytical Chemistry: What Else? **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 6570–6576, 2016.
- BAAWAIN, M. S. et al. **Oil and chemical spills**. Encyclopedia of Environmental Health, 2 ed., Elsevier Inc., 2019.
- BARMANIA, S. Questions over health response to Mauritius oil spill. **Lancet Public Health**, v. 396, n. 10251, p. 592, 2020.
- BEJARANO, A. C.; MICHEL, J. Large-scale risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in shoreline sediments from Saudi Arabia: Environmental legacy after twelve years of the Gulf war oil spill. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1561–1569, 2010.
- BEYER, J. et al. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, 28–51, 2016.
- BINELLO, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee samples: Enquiry into processes and analytical methods. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128631, 2021.
- BJØRKLUND, G. et al. Depleted uranium and Gulf War Illness: Updates and comments on possible mechanisms behind the syndrome. **Environmental Research**, v. 181, 2020.
- BOGDANOVIĆ, T. et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 75, p. 49–60, 2019.
- BOLDEN, A. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 61–74, 2017.
- BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 42, de 29 de agosto de 2013 - Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. **Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 1–11, 2013.
- BRASIL. **Informações sobre o óleo**. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/manchasdeoleo/sobre>>. Acesso em: 30 jun. 2020a.
- BRASIL. Instrução Normativa N° 52, de 25 de outubro de 2019 - Estabelece excepcionalmente períodos de defeso adicionais para o ano de 2019, em decorrência da grave situação ambiental resultante de provável contaminação química por derramamento de óleo no litoral. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, p. 1, 2019b.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 55, de 30 de outubro de 2019 - Revoga a Instrução Normativa MAPA nº 52, de 25 de outubro de 2019. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, p. 1, 2019c.

BRASIL. Nota Técnica Nº 27/2019/SEI/GGALI/DIRE2/ANVISA - Riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, p. 2–6, 2019d.

BRASIL. **Agricultura divulga novos resultados da análise de pescado da área atingida por óleo.** Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/meio-ambiente-e-clima/2019/11/agricultura-divulga-novos-resultados-da-analise-de-pescado-da-area-atingida-por-oleo>>. Acesso em: 22 jun. 2021e.

BRASIL. **Polícia Federal - Operação Mácula.** Disponível em: <<http://www.pf.gov.br/imprensa/noticias/2019/11/policia-federal-deflagra-operacao-que-visa-esclarecer-derramamento-de-oleo-no-litoral-brasileiro>>. Acesso em: 30 jun. 2020f.

BRASIL. Nota Técnica Nº1/2020/CAQ/CGSA/DSAIP_2/SDA/MAPA - Contaminantes analisados em animais aquáticos de estabelecimentos de aquicultura e áreas de extrativismo em decorrência do derramamento de óleo ocorrido no litoral brasileiro em 2019. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, p. 1–16, 2020a.

BRASIL. **Ressurgimento de vestígios de óleo.** Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/sites/default/files/nota_a_imprensa_oleo_pe_al.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020b.

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

CAVALIERI, E.; ROGAN, E. The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers *Ockham's Razor: Pluralitas non est ponenda sine necessitate. Plurality should not be posited without necessity.* **Molecular Aspects of Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–55, 2014.

CEM CORPORATION. **Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE®) - Automated Extraction System.** Disponível em: <https://cem.com/media/contenttype/media/literature/Broch_EDGE_B140_English_3.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2022.

CHEN, L. et al. Association of PAHs and BTEX exposure with lung function and respiratory symptoms among a nonoccupational population near the coal chemical industry in Northern China. **Environment International**, v. 120, p. 480–488, 2018.

CHIESA, L. M. et al. Food safety traits of mussels and clams: distribution of PCBs, PBDEs, OCPs, PAHs and PFASs in sample from different areas using HRMS-Orbitrap® and modified QuEChERS extraction followed by GC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 35, n. 5, p. 959–971, 2018.

CLOUTIER, P. L. et al. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. **Talanta**, v. 165, p. 332–338, 2017.

COLVIN, K. A.; LEWIS, C.; GALLOWAY, T. S. Chemosphere Current issues confounding

the rapid toxicological assessment of oil spills. **Chemosphere**, v. 245, p. 125585, 2020.

DAGUER, H. et al. Outbreaks, toxicology, and analytical methods of marine toxins in seafood. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 43–55, 2018.

DE MELO, A. P. Z. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill. **Food Analytical Methods**, n. 0123456789, 2022a.

DE MELO, A. P. Z. et al. Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, n. 157, p. 111366, 2022b.

DE OLIVEIRA ESTEVO, M. et al. Immediate social and economic impacts of a major oil spill on Brazilian coastal fishing communities. **Marine Pollution Bulletin**, v. 164, p. 111984, 2021.

DE OLIVEIRA, O. M. C. et al. Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111597, 2020.

DICKEY, R.; HUETTEL, M. Seafood and beach safety in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill. **Oceanography**, v. 29, n. 3, p. 196–203, 2016.

DUEDAHL-OLESEN, L. et al. Dietary exposure to selected chemical contaminants in fish for the Danish population. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 37, n. 6, p. 1027–1039, 2020a.

DUEDAHL-OLESEN, L. et al. Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt. **Food Control**, v. 108, p. 106434, 2020b.

EFFIONG, I. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in three commercially available fish species from the Bonny and Cross River estuaries in the Niger Delta, Nigeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 9, 2016.

EFSA. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. **European Food Safety Authority Journal**, v. 3, n. 10, p. 1–31, 2005.

EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **European Food Safety Authority Journal**, v. 724, p. 1–114, 2008.

EFSA. Risk assessment of contaminants in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2012.

EL-BAZ, F. Gulf War, Environmental Impact of. **Encyclopedia of Energy**, v. 3, p. 107–117, 2004.

EU. Regulation (EC) N° 835/2011 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, n. L 215/4, p. 4–8, 2011.

FANG, J. et al. Trends in environmental analytical chemistry atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of persistent organic

pollutants. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, p. e00076, 2020.

FAO; WHO. **Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual twenty-seventh edition**. 27. ed. Roma: World Health Organization, 2019.

FASANO, E. et al. Evaluation of the impact of anthropogenic activities on arsenic, cadmium, chromium, mercury, lead, and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in seafood from the Gulf of Naples, Italy. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 53, n. 9, p. 786–792, 2018.

FDA. Protocol for Interpretation and Use of Sensory Testing and Analytical Chemistry Results for Re-Opening Oil-Impacted Areas Closed to Seafood Harvesting Due to The Deepwater Horizon Oil Spill. Food and Drug Administration. **Food and Drug Administration**, 2010.

FDA. Screening and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafoods Using QuEChERS-Based Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Food and Drug Administration Food Program Compendium of Analytical Laboratory Methods: Chemical Analytical Manual**, p. 1–16, 2011.

FERNANDO, H. et al. Distribution of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seafood following Deepwater Horizon oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 145, p. 200–207, 2019.

FINGAS, M. Oil spills and response. In: **Handbook of Ocean Engineering**. New York: Springer, 2016. p. 1067–1093.

GALIERIKOVÁ, A.; MATERNA, M. World Seaborne Trade with Oil: One of Main Cause for Oil Spills? **Transportation Research Procedia**, v. 44, n. 1, p. 297–304, 2020.

GALMICHE, M. et al. Environmental analysis of polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter, settled dust and soot: Part II: Instrumental analysis and occurrence. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, p. 116146, 2021a.

GALMICHE, M. et al. Environmental analysis of polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter, settled dust and soot: Part I: Sampling and sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, p. 116099, 2021b.

GAO, P. et al. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. **Environment International**, v. 119, p. 466–477, 2018.

GOHLKE, J. M. et al. A review of seafood safety after the Deepwater Horizon blowout. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 8, p. 1062–1069, 2011.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; WENZL, T. Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 6–7, p. 1697–1707, 2009.

GRATZ, S. R. et al. Screening and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafoods using QuEChERS-based extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 5, p. 1601–1616, 2011.

GUIFFARD, I. et al. Quantification of light polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood

samples using on-line dynamic headspace extraction, thermodesorption, gas chromatography tandem mass spectrometry, based on an isotope dilution approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1619, p. 460906, 2020.

HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y. Semi-automated high-throughput method for residual analysis of 302 pesticides and environmental contaminants in catfish by fast low-pressure GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 319, p. 126592, 2020.

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

IARC. **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Some Related Exposures**. 92. ed. Lyon: WHO Press, 2010.

IARC. Chemical agents and related occupations. In: **International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. 100F. ed. Lyon: WHO Press, 2012.

IARC. **Red Meat and Processed Meat**. 114. ed. Lyon: WHO Press, 2018.

IBAMA. Manchas de óleo - Litoral brasileiro - Desmobilização. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis** p. 1–6, 2020a.

IBAMA. Manchas e óleo - Litoral brasileiro - Localidades Afetadas - Boletim 19/03/2020. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/2020-03-19_LOCALIDADES_AFETADAS.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020b.

IFEGWU, O. C.; ANYAKORA, C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I, Exposure. In: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. New York: Academic Press, 2015. v. 72p. 277–304.

IFEGWU, O. C.; ANYAKORA, C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part II, Urine Markers. In: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. New York: Academic Press, 2016. v. 75p. 159–183.

ITOPF. **Oil Tanker Spill Statistics: 2020**. Disponível em: <<https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/#:~:text=Quantity of oil spilt in,in the last five decades>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

ITOPF. **Oil Tanker Spill Statistics: 2022**. International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Disponível em: <https://www.itopf.org/news-events/news/tanker-spill-statistics-2022/>. Acesso em: 23 jan. 2022.

JECFA. **Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. 930. ed. Geneva: World Health Organization, 2006.

JOYCE, M. R.; HOLTON, K. F. Neurotoxicity in Gulf War Illness and the potential role of glutamate. **Neurotoxicology**, v. 80, p. 60–70, 2020.

KIM, L. et al. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p. e00063, 2019.

KIM, Y.; PATRA, J.; SHIN, H. Evaluation of analytical method and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons for fishery products in Korea. **Food Control**, v. 131, p. 108421, 2022.

KIMBROUGH, K. L. et al. **An assessment of two decades of contamination monitoring in the nations coastal zone**. 1. ed. Silver Spring: National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), 2008.

KINROSS, A. D. et al. Comparison of Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE) for the analysis of pesticides in leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1627, 2020.

KUCUKSEZGIN, F. et al. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and sediments in the coastal region of Nemrut Bay (Eastern Aegean Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 111358, 2020.

KUJAWINSKI, E. B. et al. The first decade of scientific insights from the Deepwater Horizon oil release. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 1, n. 5, p. 237–250, 2020.

LINDEBERG, M. R. et al. Conditions of persistent oil on beaches in Prince William Sound 26 years after the Exxon Valdez spill. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 147, p. 9–19, 2018.

LOH, A. et al. A preliminary study on the role of suspended particulate matter in the bioavailability of oil-derived polycyclic aromatic hydrocarbons to oysters. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 1084–1090, 2018.

LOURENÇO, R. A. et al. Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, p. 111219, 2020.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

MASTOVSKA, K. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in seafood using gas chromatography-mass spectrometry: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 2, p. 477–505, 2015.

MERLO, T. C. et al. Alternative pressurized liquid extraction using a hard cap espresso machine for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bacon. **Food Control**, p. 107565, 2020.

MOLDOVEANU, S. C. Toxicological and Environmental Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Related Compounds. In: **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. 28. ed. Elsevier B.V., 2010. p. 693–699.

MOLOGNONI, L. et al. Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. **Talanta**, v. 185, p. 151–159,

2018.

MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; HOFF, R. B. Analysis of nitrofurans residues in foods of animal origin. In: **Food Toxicology and Forensics**. 1. ed. London: Academic Press, 2021. p. 379–419.

MURRAY, J. R.; PENNING, T. M. Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: MCQUEEN, C. A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology**. 3. ed. Elsevier Ltd., 2018. p. 87–153.

NÁCHER-MESTRE, J. et al. Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2165–2174, 2014.

NOAA. Extraction, Cleanup, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Sediments and Tissues for Organic Contaminants. **National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NMFS-NWFSC-59**, p. 1–63, 2004.

NOAA. (2017). Assessing the Impacts from *Deepwater Horizon*. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. Disponível em: <https://response.restoration.noaa.gov/about/media/assessing-impacts-deepwater-horizon.html>. Acesso em: 21 jul. 2020.

OLIVEIRA, L. G. et al. Applications of chemometrics in oil spill studies. **Microchemical Journal**, v. 166, p. 106216, 2021.

ORISAKWE, O. E. Crude oil and public health issues in Niger Delta, Nigeria: Much ado about the inevitable. **Environmental Research**, v. 194, p. 110725, 2021.

PATEL, J. et al. Maternal Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Risk of Isolated Congenital Heart Defects among Offspring. **Environmental Research**, v. 186, p. 109550, 2020.

PENA, P. G. L. et al. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. e00231019, 2020.

PETERSON, C. H. et al. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2082–2086, 2003.

PETROBRAS. **Recolhemos mais de 200 toneladas de resíduos de óleo nas praias do Nordeste, que não tem origem em nossas operações**. Disponível em: <<https://www.petrobras.com.br/fatos-e-dados/recolhemos-mais-de-200-toneladas-de-residuos-de-oleo-nas-praias-do-nordeste.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PIE, H. V.; HEYES, A.; MITCHELMORE, C. L. Investigating the use of oil platform marine fouling invertebrates as monitors of oil exposure in the Northern Gulf of Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 553–565, 2015.

PORTOLÉS, T. et al. Multi-class determination of undesirables in aquaculture samples by gas chromatography/tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization: A novel approach for polycyclic aromatic hydrocarbons. **Talanta**, v. 172, p. 109–119, 2017.

PULSTER, E. L. et al. A First Comprehensive Baseline of Hydrocarbon Pollution in Gulf of Mexico Fishes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6437, 2020.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. **Talanta**, v. 105, p. 292–305, 2013.

RAMALHOSA, M. J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: Inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 162–167, 2012.

ROSLUND, M. I. et al. Endocrine disruption and commensal bacteria alteration associated with gaseous and soil PAH contamination among daycare children. **Environment International**, v. 130, p. 104894, 2019.

ROTKIN-ELLMAN, M.; WONG, K. K.; SOLOMON, G. M. Seafood contamination after the BP gulf oil spill and risks to vulnerable populations: A critique of the FDA risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 2, p. 157–161, 2012.

SAID, T. O.; IDRIS, A. M.; SAHLABJI, T. Combining relationship indices, human risk indices, multivariate statistical analysis and international guidelines for assessing the residue levels of USEPA-PAHs in seafood. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 40, n. 3, p. 758–773, 2020.

SCF. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. **European Commission**, p. 1–84, 2002.

SEN, S.; FIELD, J. M. Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites: Radical Cations and Ketones. In: **Advances in Molecular Toxicology**. 1. ed. Elsevier B.V., 2013. v. 7, p. 83–127.

SFORZINI, S. et al. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 319–328, 2018.

SIMON-FRIEDT, B. R. et al. Louisiana residents' self-reported lack of information following the Deepwater Horizon oil spill: Affects on seafood consumption and risk perception. **Journal of Environmental Management**, v. 180, p. 526–537, 2016.

SMALLING, K. L. et al. Regional assessment of persistent organic pollutants in resident mussels from New Jersey and New York estuaries following Hurricane Sandy. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 2, p. 432–441, 2016.

SMOKER, M.; TRAN, K.; SMITH, R. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12101–12104, 2010.

SOLTANI, N. et al. Potentially toxic elements (PTEs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish and prawn in the Persian Gulf, Iran. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 251–265, 2019.

STORELLI, M. M. et al. Risk characterization for polycyclic aromatic hydrocarbons and toxic

metals associated with fish consumption. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 115–119, 2013.

SUN, C. et al. Advances in analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in various matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 127, p. 115878, 2020a.

SUN, J. et al. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Laizhou, Rushan and Jiaozhou, bays of China, and investigation of its relationship with human carcinogenic risk. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111556, 2020b.

SUN, K. et al. A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. **Science of The Total Environment**, v. 773, p. 145403, 2021.

SUN, R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and marine organisms: Implications of anthropogenic effects on the coastal environment. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 264–272, 2018.

SUN, Y.; WU, S. Analysis of PAHs in oily systems using modified QuEChERS with EMR-Lipid clean-up followed by GC-QqQ-MS. **Food Control**, v. 109, p. 106950, 2020.

US EPA. EPA's priority pollutants List. **United States Environmental Protection Agency**, p. 2, 2014.

US EPA. **Guidelines for Human Exposure Assessment: Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency**. EPA/100/B ed. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2019.

USA. **Oil Pollution Act of 1990 - Public Law 101-380**, August 18, 1990. United States of America. p. 484–575, 1990.

WANG, H. et al. Occurrence and potential health risks assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different tissues of bivalves from Hainan Island, China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111108, 2020.

WHO; FAO. **Sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. 930. ed. Geneva: World Health Organization, 2006.

WHO; IPCS. **IPCS Risk Assessment Terminology**. Geneva: World Health Organization, 2004.

WHO; IPCS. Risk assesment and its role in risk analysis. In: **Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. Geneva: World Health Organization, 2009a. p. 2–1; 2–16.

WHO; IPCS. Risk Characterization. In: **Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 2009b. p. 7–1; 7–18.

WHO; IPCS. Dose – response assessment and derivation of health-based guidance values. In: **Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2020a. p. 5–3; 5–36.

WHO; IPCS. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. In: **Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2020b. p. 6–6; 6–27.

WILSON, M. J. et al. A targeted health risk assessment following the Deepwater Horizon oil spill: Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in Vietnamese-American shrimp consumers. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 2, p. 152–159, 2015.

WU, L. et al. Trends in Environmental Analytical Chemistry Sample preparation and analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, p. e00074, 2019.

XIA, K. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mississippi seafood from areas affected by the deepwater horizon oil spill. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 10, p. 5310–5318, 2012.

YLITALO, G. M. et al. Federal seafood safety response to the Deepwater Horizon oil spill. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20274–20279, 2012.

CAPÍTULO II

**Determinação de HPAs em pescado por PLE-LC-APCI-MS/MS após o
derramamento de petróleo no Nordeste e Sudeste do Brasil**

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo, foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação de HPAs em pescado. Pela primeira vez, a extração por líquido pressurizado usando uma máquina de cápsula de café *espresso* e posterior quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS) foi aplicada para a determinação de HPAs em amostras de pescado. O método desenvolvido auxiliou as autoridades reguladoras a garantir a segurança sanitária do pescado. Os dados analíticos resultantes fizeram parte do primeiro relatório oficial sobre a contaminação de pescado com HPAs após o desastre. Este capítulo foi publicado no periódico *Food Analytical Methods*.

Artigo publicado (Apêndice A):

DE MELO, A. P. Z. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill.

Food Analytical Methods, n. 0123456789, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s12161-022-02252-z>

RESUMO

Em 2019, um extenso derramamento de petróleo atingiu mais de 4.000 km da costa brasileira, levando a uma ação urgente, que incluiu a avaliação da segurança do pescado proveniente das áreas afetadas. O objetivo deste estudo foi desenvolver, otimizar, validar e aplicar um método rápido, sensível e confiável para determinar oito hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado. O preparo de amostra foi baseado em extração por líquido pressurizado usando uma máquina de cápsula de café *espresso* e subsequente quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (PLE-LC-APCI-MS/MS). O desempenho do método foi verificado de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/EC da União Europeia em termos de seletividade, linearidade ($R^2 > 0.95$), precisão ($CV < 21\%$), exatidão em termos de taxa de recuperação (75 – 115%), limite de decisão e capacidade de detecção. Os limites analíticos foram definidos nas faixas entre 0,9 e 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (limites de detecção, LOD) e 1,25 a 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (limites de quantificação, LOQ). O método foi aplicado em mais de cem de amostras de pescado ($n = 139$). Concentrações de benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno, benzo[*ghi*]perileno, e indeno[1,2,3-*cd*]pireno variaram entre <LOQ a 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Benzo[*a*]antraceno (41,7%), benzo[*a*]pireno (41,7%), e benzo[*b*]fluoranteno (37,5%) foram os HPAs mais frequentes variando entre <LOQ a 113 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras analisadas apresentaram concentrações de HPAs abaixo dos níveis de preocupação estabelecidos pela autoridade reguladora brasileira e abaixo dos limites regulatórios estabelecidos pela União Europeia.

Palavras-chave: Carcinogênico; Extração por líquido pressurizado; Segurança de alimentos; Validação de método.

ABSTRACT

In 2019, a vast oil spill reached more than 4,000 km of the Brazilian coast, leading to an urgent action, which included the assessment of seafood safety from the affected areas. The aim of this study was the development, optimization, validation, and application of a fast, sensible, and reliable method to determine eight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seafood. The sample preparation was based on pressurized liquid extraction using a hard cap coffee *espresso* machine and subsequent quantitation by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization source (LC-APCI-MS/MS). The method performance was verified in accordance to the Commission Decision 2002/657/EC in terms of selectivity, linearity ($R^2 > 0.95$), precision ($CV < 21\%$), accuracy (75 – 115%), decision limit, and detection capability. The analytical limits were set between 0.9 and 1.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (limits of detection, LOD) and between 1.25 and 5.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (limits of quantitation, LOQ). The method was applied to more than a hundred of seafood samples ($n = 139$). Concentrations of benzo[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene, benzo[*ghi*]perylene, and indene[1,2,3-*cd*]pyrene ranged <LOQ to 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Benzo[*a*]anthracene (41.7%), benzo[*a*]pyrene (41.7%), and benzo[*b*]fluoranthene (37.5%) were the most frequent PAH, ranging from <LOQ to 113 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The analyzed samples showed PAH concentrations below the concern levels established by the Brazilian regulatory agency and below the limits established by European Union.

Keywords: Carcinogenic; Food safety; Method validation; Pressurized liquid extraction.

1 INTRODUÇÃO

Após diversos desastres com derramamentos de petróleo nos oceanos, a segurança sanitária do pescado se torna duvidosa devido ao risco de contaminação química. Historicamente, acidentes com derramamento de petróleo causaram a contaminação de ecossistemas aquáticos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como os ocorridos no Alasca em 1989 e no Golfo do México em 1979 e em 2010 (POLLI et al., 2020; PULSTER et al., 2020a; SNYDER et al., 2020).

O óleo cru (petróleo) é uma mistura complexa de compostos orgânicos com menor percentual de outros elementos (como oxigênio, nitrogênio, enxofre, metais, entre outros). Os HPAs podem representar 0,2 – 7% da composição química dos óleos minerais à base de petróleo (SPARLING, 2016). Devido à alta estabilidade dessas moléculas no ambiente associada à sua conhecida atividade carcinogênica (IARC, 2010, 2018), os HPAs são considerados um dos contaminantes petrogênicos de maior preocupação (FARRINGTON, 2020).

Em 2019, um extenso derramamento de petróleo foi identificado na costa brasileira. O desastre foi considerado o pior derramamento de petróleo da história do Brasil e um dos maiores já registrados no mundo. O acidente atingiu mais de 4.000 km de litoral em onze estados das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil e mais de 5.000 toneladas de resíduos oleosos foram removidos manualmente dos locais costeiros afetados (LOURENÇO et al., 2020; PENA et al., 2020).

O governo brasileiro lançou uma força-tarefa para gerenciar as consequências do desastre e elucidar a origem do petróleo. Uma das principais tarefas era garantir a segurança do pescado produzido nas áreas afetadas. Os dados fornecidos por medições químicas são a principal fonte para apoiar corretamente o diagnóstico sobre a extensão dos danos ambientais e da cadeia alimentar (PIE; HEYES; MITCHELMORE, 2015; PULSTER et al., 2020a, 2020b). De fato, a colaboração de laboratórios oficiais de controle, dotados de métodos analíticos modernos e sensíveis, é essencial para apoiar as ações governamentais (MOLOGNONI et al., 2018b). No entanto, a tarefa de analisar contaminantes orgânicos que ocorrem em baixas concentrações, como os HPAs, pode ser desafiadora, principalmente no que diz respeito a matrizes biológicas complexas, como pescado (JOHNSON et al., 2018). Além disso, para fornecer dados analíticos confiáveis, esse tipo de levantamento deve ser realizado em laboratórios credenciados, capazes de analisar amostras com alto rendimento e fornecer resultados rápidos com imparcialidade e rastreabilidade (MOLOGNONI; DAGUER; HOFF, 2021).

Várias técnicas analíticas estão disponíveis para a determinação de HPAs, como cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de ultravioleta e fluorescência (HPLC-UV-FLD) (FERRANTE et al., 2018), cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (UPLC-MS/MS) (HAN; SAPOZHNIKOVA, 2020), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (GC-MS/MS) (GUIFFARD et al., 2020) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (GC-QTOF-MS) (IDOWU et al., 2018). Os métodos LC-MS são menos frequentes quando comparados aos GC-MS e a fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) é preferida ao invés da fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) (MERLO et al., 2020). Para atingir a sensibilidade e especificidade necessárias, a maioria dessas técnicas requer protocolos de preparo de amostra extensos, caros e trabalhosos, como a extração por Soxhlet, saponificação, extração assistida por ultrassom, extração em fase sólida, cromatografia de permeação em gel e outros (GADELHA et al., 2019; QIN et al., 2020; SMALLING et al., 2016; SUN et al., 2018; WANG et al., 2020b). Portanto, apesar da grande quantidade de métodos publicados para análise de HPAs, métodos simples e rápidos de preparo de amostras ainda são escassos na literatura, especialmente quando matrizes complexas como peixes, crustáceos e moluscos precisam ser analisadas.

O acidente com derramamento de petróleo no Brasil criou a necessidade urgente de uma ferramenta analítica capaz de determinar HPAs em pescado. O método atenderia aos limites regulatórios atuais ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para benzo[*a*]pireno e $30,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma de benzo[*a*]pireno, benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno e criseno em moluscos bivalves) (EU, 2011), além dos níveis de preocupação provisórios estabelecidos pelas autoridades reguladoras brasileiras ($6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[*a*]pireno para peixes e $18,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[*a*]pireno para moluscos e crustáceos) (BRASIL, 2019a). Considerando essa demanda oficial, o objetivo do presente estudo foi desenvolver, otimizar e validar um método rápido, sensível e confiável para determinar oito HPAs (benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno) em pescado. Além disso, o método foi aplicado à análise de dezenas de amostras reais. Os dados analíticos resultantes auxiliarão as autoridades reguladoras a garantir a segurança do pescado em áreas de produção geograficamente localizadas dentro das zonas afetadas durante a investigação do desastre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PADRÕES E REAGENTES

Todos os solventes usados neste estudo eram de grau LC-MS. A acetonitrila (ACN), o metanol e o *n*-hexano foram fornecidos pela JT Baker Chemical Co. (Phillipsburg, EUA). A água ultrapura (resistividade mínima de 18,2 M Ω cm) foi obtida de um Sistema de purificação Milli-Q® Integral 10 Millipore (Molsheim, França).

O cloreto de sódio (NaCl) e o sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) eram de qualidade analítica e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e Scharlau (Barcelona, Espanha), respectivamente. O polímero sorbente Q-Matrix™ Hydra foi adquirido da CEM Corporation (Charlotte, EUA). A terra diatomácea foi obtida da Honeywell, Fluka (Charlotte, EUA).

Todos os padrões analíticos eram de pureza igual ou superior a 95%. Foi usada uma solução padrão adquirida da Sigma-Aldrich, Supelco (Saint Louis, EUA). Esta solução (CRM 47940) continha 10 mg L⁻¹ em acetonitrila de cada um dos seguintes HPAs: benzo[*a*]antraceno (B[*a*]A) (CAS n° 56-55-3); benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) (CAS n° 50-32-8); benzo[*b*]fluoranteno (B[*b*]F) (CAS n° 205-99-2); benzo[*ghi*]perileno (B[*ghi*]P) (CAS n° 191-24-2); benzo[*k*]fluoranteno (B[*k*]F) (CAS n° 207-08-9); criseno (Cri) (CAS n° 218-01-9); dibenzo[*a,h*]antraceno (DB[*a,h*]A) (CAS n° 53-70-3); e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (I[*cd*]P) (CAS n° 193-39-5). Os padrões internos eram isótopos marcados de HPAs: criseno-d₁₂ (CAS n° 1719-03-5), fluoranteno-d₁₀ (CAS n° 93951-69-0) e pireno-d₁₀ (CAS n° 1718-52-1). Todos os padrões internos foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (Ontário, Canadá).

A solução padrão de trabalho de HPAs foi preparada pela diluição da solução estoque padrão com acetonitrila para obter 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para preparar a solução de trabalho dos padrões internos, cada padrão marcado com isótopo foi pesado separadamente ($0,01 \pm 0,001$ g) e dissolvido em acetona para obter soluções estoque individuais de 1000 mg L⁻¹. Em seguida, uma alíquota de cada solução foi diluída com acetonitrila para obter 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C.

2.2 AMOSTRAS

Para o desenvolvimento e validação do método, foram coletadas amostras ($n = 139$) de camarões (*Penaeus* spp.), ostras (*Crassostrea gigas*), mexilhões (*Perna perna*) e peixes com alto e baixo teor de gordura (*Thunnus* spp. e *Pangasius* spp., respectivamente) coletados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) entre outubro de 2019 e janeiro de 2020. Amostras brancas de ostras, mexilhões, peixes e camarões foram obtidas na análise de rotina do laboratório e foram previamente analisadas para confirmar a ausência dos analitos procurados.

Um material de referência certificado (CRM) do *Food Analysis Performance Assessment Scheme* - FAPAS (T0680QCsale, *shellfish*, FERA Science Ltd., Sand Hutton, GB) foi usado para avaliar a precisão do método, com os seguintes valores atribuídos e número de resultados laboratoriais independentes usados para estimar a concentração, respectivamente: B[a]A ($5,28 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 25$), Cri ($6,96 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 25$), B[b]F ($12,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 24$), B[a]P ($6,90 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 26$), B[ghi]P ($7,08 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 14$) e soma dos 4HPAs (B[a]A, Cri, B[b]F e B[a]P; $31,0 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 22$).

O preparo das amostras foi realizado de acordo com o tipo de matriz. Amostras contendo sujeira como areia, lama, lodo, entre outras, foram limpas com água ultrapura. Para as amostras de moluscos bivalves, as conchas foram removidas junto com o bisso, usando espátula e tesoura. Para as amostras de peixes, camarões, lagostas e polvo apenas porções de tecido muscular foram usadas. Posteriormente, todo o tecido foi homogeneizado em um *mixer* ou processador de alimentos. As amostras foram estocadas em embalagens de alumínio com tampa de papel laminado e armazenadas de -30 a -10 °C até o momento da análise.

2.3 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o método de extração PLE-HCCM (extração por líquido pressurizando usando uma máquina de cápsula de café *espresso*) foram consideradas as seguintes variáveis de processo: proporção de solventes de extração; abordagens de limpeza do extrato; fatores de concentração dos analitos e o solvente de reconstituição. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata, usando o sinal analítico médio e/ou as concentrações calculadas de HPAs.

As amostras foram pesadas ($2,0 \pm 0,1$ g) em tubos de polipropileno de 50 mL. Cada amostra foi fortificada com solução de trabalho de padrão interno para obter uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Os tubos foram agitados em vórtex por 5 – 10 seg e mantidos em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, terra diatomácea foi adicionada a cada tubo ($2,0 \pm 0,5$ g). O

conteúdo do tubo foi vigorosamente misturado usando um vórtex até que a dispersão da amostra na matriz sólida fosse observada. A mistura foi então cuidadosamente transferida para uma cápsula de extração. O material foi suavemente comprimido dentro da cápsula e o espaço vazio restante foi preenchido com terra diatomácea. As cápsulas de extração foram então submetidas à extração por líquido pressurizado utilizando uma máquina de cápsula de café *espresso* (Nespresso, modelo UMilk, Budapeste, Hungria) de acordo com Armenta, De La Guardia, & Esteve-Turrillas (2016) com modificações (HOFF et al., 2020).

O procedimento de extração foi realizado a 75 ± 2 °C e 19 bar, por 10 – 15 seg. O solvente de extração (15 – 20 mL) otimizado foi composto por H₂O:ACN (60:40, v/v). O extrato foi coletado em um tubo de polipropileno de 50 mL contendo aproximadamente 2,0 g de NaCl e 2,0 g de MgSO₄. Os tubos foram misturados em um vórtex por 5 – 10 seg, seguido por 20 min de agitação em um agitador orbital. Posteriormente, os tubos foram centrifugados ($3600\text{-g} \times 10$ min a 4 °C) e uma alíquota de 800 µL da camada superior foi transferida para um tubo de polipropileno limpo de 50 mL. O extrato foi evaporado à secura em banho-maria (40 ± 2 °C) sob fluxo suave de nitrogênio. O resíduo seco foi dissolvido com 200 µL de acetonitrila, obtendo-se um fator de concentração de quatro vezes. O extrato foi transferido para um *vial* de HPLC com *insert* e analisado em sistema LC-MS/MS. As etapas de preparo das amostras são ilustradas na Figura 1.

Figura 1 – Etapas de preparo das amostras para determinar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado usando máquina de cápsula de café *espresso* e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).



HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. LC-APCI-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com ionização química à pressão atmosférica. Fonte: de Melo et al. (2022a).

2.4 ANÁLISES POR LC-APCI-MS/MS

A análise instrumental foi realizada usando um sistema HPLC ExionLC (Sciex, Framingham, Massachusetts, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo-linear híbrido com armadilha de íons modelo 5500 QTrap (Sciex, Framingham, Massachusetts, EUA) com uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) operando em modo positivo. As análises foram realizadas usando o modo de monitoramento de reação selecionada (SRM) com, pelo menos, dois íons de fragmento monitorados para cada HPA. Os parâmetros de espectrometria de massas otimizados da fonte de ionização foram: corrente aplicada à agulha corona, gás de nebulização, gás de cortina e temperatura na fonte. Diferentes distâncias do capilar em relação ao orifício de entrada na fonte foram testadas variando a posição do micrômetro vertical entre 2,5 – 3,5 mm. O nitrogênio foi usado para nebulização e colisão.

Os parâmetros de quadrupolo, potencial de entrada (EP), potencial na fonte (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP) foram otimizados e mostrados na Tabela 1. Os parâmetros de fonte otimizados foram: 600 °C (temperatura da fonte); 3 μ A (corrente aplicada à agulha corona); 20 psi (gás de cortina); 60 psi (gás de nebulização) (GS1). O micrômetro vertical foi ajustado para 3,5 mm.

Tabela 1 – Parâmetros de condições de monitoramento de reação selecionada (SRM) para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).

Analitos (abreviação)	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)*	Íon precursor (APCI ⁺ , <i>m/z</i>)	Transição de quantificação (Q, <i>m/z</i>)	Transição de confirmação (C, <i>m/z</i>)	DP (V) Q/C/C	CE (V) Q/C/C	CXP (V)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	C ₁₈ H ₁₂	5,7	228,1	228,0	226,0 227,1	106/106/141	45/55/55	12
Criseno (Cri)	C ₁₈ H ₁₂	5,9	228,1	226,0	227,1 228,0	106/106/141	45/55/55	12
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	C ₂₀ H ₁₂	6,4	252,1	248,0	250,0 224,1	150/150/150	89/57/77	12
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	C ₂₀ H ₁₂	6,8	252,1	248,0	250,0 224,1	150/150/150	89/57/77	12
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	C ₂₀ H ₁₂	7,1	252,9	250,1	248,0 224,2	161/161/161	73/101/93	12
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	C ₂₂ H ₁₄	7,5	279,2	275,9	262,9	151/151	60/60	12
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	C ₂₂ H ₁₂	8,0	277,2	272,0	274,0 276,0	141/236/246	111/81/47	12
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	C ₂₂ H ₁₂	8,4	277,2	272,0	274,0 276,0	141/236/246	111/81/47	12

EP: Potencial de entrada = 10 V. DP: Potencial na fonte. CE: Energia de colisão. CXP: Potencial de saída da célula de colisão. Q/C/C: Quantificação/Confirmação/Confirmação. APCI⁺: Ionização química à pressão atmosférica operando em modo de ionização positivo. *: Tolerância do tempo de retenção de 2,5%. Fonte: de Melo et al. (2022a).

A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna Zorbax Eclipse PAH Rapid Resolution HT ($2,1 \times 100$ mm, $1,8 \mu\text{m}$, 95 \AA) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EUA). A composição da fase móvel era água (A) e acetonitrila (B), que foi usada no modo de gradiente de eluição da seguinte forma: 0 – 4,90 min 40% de B; 4,90 – 5,20 min 90% de B; 5,20 – 5,25 min 95% de B; 5,25 – 9,50 min 100% de B; 9,50 – 10,0 min 40% de B. O fluxo da fase móvel foi de $500 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura do forno da coluna foi mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção foi ajustado para $7,5 \mu\text{L}$. Todos os dados foram adquiridos e processados nos *softwares* Analyst® 1.7 HotFix 3 e MultiQuant™ 3.0 (Sciex, Framingham, EUA). Outras condições cromatográficas foram testadas considerando os tempos de retenção, resolução entre os picos dos analitos e resolução entre os analitos e os picos interferentes da matriz. As seguintes fases estacionárias também foram avaliadas: Zorbax Poroshell 120 (fase fenil-hexil; $3,0 \times 50$ mm, $4 \mu\text{m}$, 120 \AA , Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) e Nucleodur C₁₈ Gravity ($2,1 \times 50$ mm, $3,5 \mu\text{m}$, 110 \AA , de Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

A padronização interna foi usada para quantificar todas as amostras. As curvas de calibração foram preparadas usando padrões isotópicos marcados em oito níveis de concentração (incluindo zero). Um modelo de regressão linear foi usado. A razão da área de cada HPA para o padrão interno foi calculada e a curva de calibração de oito pontos foi construída a partir da razão da área do pico *versus* a respectiva concentração de cada padrão. A faixa de trabalho foi de $1,25$ a $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2011) e Decisão da Comissão 2002/657/EC da União Europeia (EU, 2002) em termos de seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, taxa de recuperação, limite de decisão (CC_α), capacidade de detecção (CC_β), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Os efeitos de matriz foram avaliados usando a abordagem proposta por (HOFF et al., 2015). A incerteza de medição relativa foi avaliada de acordo com a ISO 21748:2017 (ISO, 2017).

A seletividade foi verificada pela análise de, pelo menos, vinte amostras de matrizes distintas, incluindo crustáceos, moluscos bivalves e peixes. A comparação foi feita entre réplicas da mesma amostra (amostra fortificada *versus* amostra branca).

A linearidade foi avaliada pela preparação de todas as curvas de calibração em triplicata a cada dia de avaliação ($n = 4$), em condições de reprodutibilidade interna. O critério

de aceitabilidade foi o coeficiente de regressão (R^2), cuja média deveria ser maior que 0,98 (curva de calibração em solvente) ou 0,95 (curva de calibração em extrato de matriz branca).

Para avaliar a taxa de recuperação e o efeito de matriz, três tipos de curvas de calibração foram preparadas: (I) padrões analíticos diluídos em solvente puro (acetonitrila); (II) amostras brancas fortificadas antes do procedimento de extração e (III) amostras brancas fortificadas após o procedimento de extração. Neste último caso, a curva preparada com um extrato de matriz branca representou a concentração teórica obtida no processo de extração após a etapa de *salting-out* assumindo uma recuperação de 100%. A avaliação foi realizada comparando-se os coeficientes de inclinação das diferentes curvas analíticas preparadas.

A precisão (em termos de repetibilidade e reprodutibilidade interna) e a exatidão (taxa de recuperação) foram avaliadas considerando variáveis de medição como, analistas ($n = 2$) e dias de análise ($n = 4$). Para esse propósito, 18 amostras brancas fortificadas foram avaliadas em três níveis de concentração Tabela 2.

Tabela 2 – Níveis de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) usados na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) na validação do método.

Analitos (abreviação)	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nível de decisão ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	5,00; 7,50; 10,0	5,00
Criseno (Cri)	5,00; 7,50; 10,0	5,00
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	5,00; 7,50; 10,0	5,00
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	5,00; 7,50; 10,0	5,00
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	1,25; 2,50; 5,00	1,25
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	2,50; 5,00; 7,50	2,50
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	1,25; 2,50; 5,00	5,00
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	1,25; 2,50; 5,00	5,00

Fonte: de Melo et al. (2022a).

O critério de aceitabilidade para precisão foi um coeficiente de variação (CV) inferior a 20%. A taxa de recuperação foi considerada aceitável entre 70 – 110%. A análise de variância (One-Factor ANOVA) com nível de significância de 95% foi realizada para verificar diferenças

na precisão e exatidão entre analistas e dias de análise. O tratamento dos dados foi realizado no *software* Microsoft Excel versão 2010.

A sensibilidade do método foi estudada em termos de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O LOQ foi estabelecido como o nível de decisão para cada analito, para o qual a taxa de recuperação (70 – 110%) e a precisão aceitáveis ($CV < 20\%$) foram alcançadas. O LOD, por outro lado, foi estabelecido como o menor valor de resposta de cada analito usando amostras brancas fortificadas com reprodutibilidade aceitável ($CV_r < 30\%$).

O limite de decisão (CC_α) foi obtido multiplicando-se o desvio padrão da média das fortificações nos níveis de validação propagados com os erros dos resíduos das curvas de calibração pelo fator 1,64. A capacidade de detecção (CC_β) foi obtida multiplicando-se o desvio padrão da média das fortificações nos níveis de validação pelo fator 1,64 e adicionando tal produto ao valor de CC_α . Esses cálculos consideraram erros aleatórios das avaliações de precisão, tendência e resíduos de funções lineares no nível de decisão. *Outliers* foram previamente excluídos dos cálculos, utilizando o teste de Grubbs (nível de significância de 95%).

2.6 APLICABILIDADE DO MÉTODO

Após o estudo de validação, o método foi aplicado à rotina laboratorial ($n = 139$). Amostras de peixes ($n = 86$), camarões ($n = 12$), lagostas ($n = 4$), mexilhões ($n = 5$), ostras ($n = 2$) e polvo ($n = 1$) foram coletadas nas regiões afetadas pelo derramamento de petróleo no Brasil e analisadas em triplicata. Uma das replicatas foi fortificada com a solução de trabalho de HPAs em $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, amostras de pescado do litoral de Santa Catarina foram analisadas para fornecer alguma referência basal, visto que esta região não foi afetada pelo desastre. Essa amostragem local foi feita por 29 amostras, compostas por mexilhões ($n = 21$) e ostras ($n = 8$). A conformidade da amostra foi avaliada levando-se em consideração a atual regulamentação europeia (EU, 2011) e os níveis de preocupação provisórios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019a).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

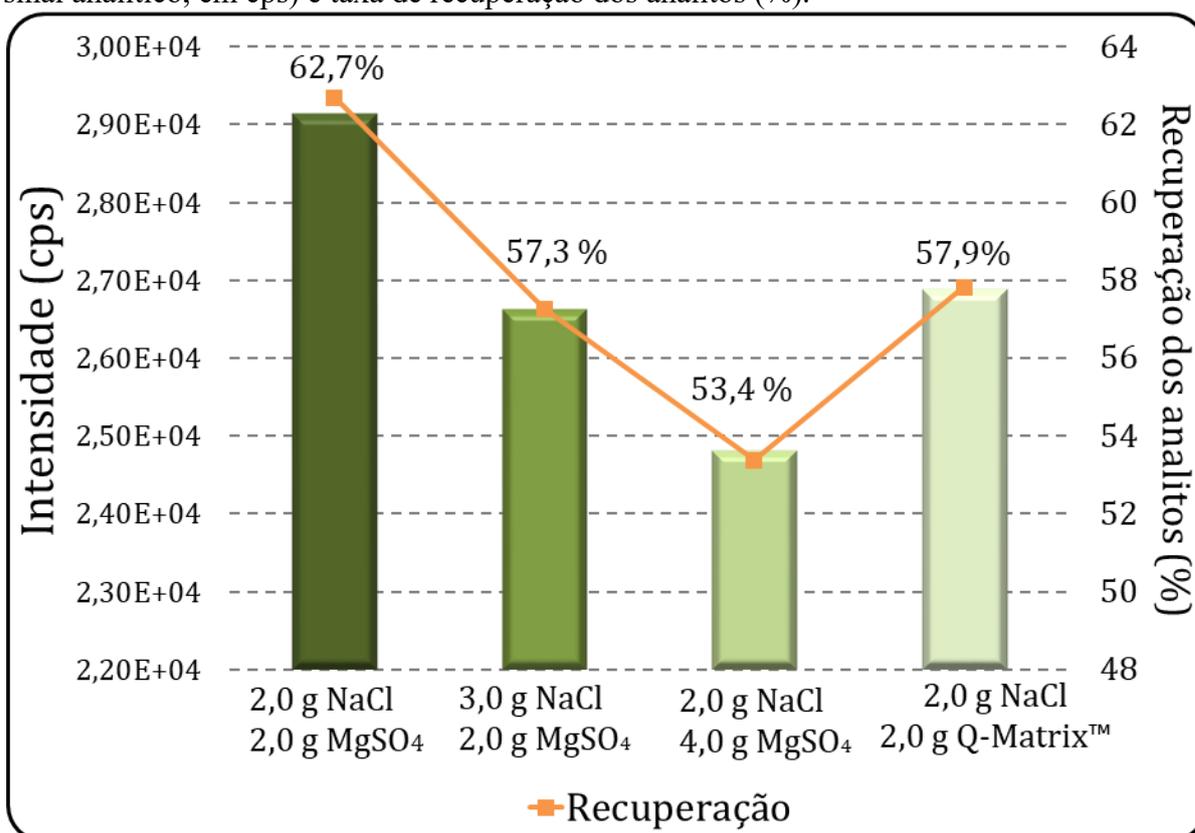
O preparo de amostras biológicas para análise de contaminantes em baixas concentrações é um desafio permanente na Química Analítica, na Ciência dos Alimentos e na Toxicologia. Normalmente, o nível necessário de etapas de extração, concentração e purificação da amostra não corresponde à demanda necessária de análise de muitas amostras em um curto período com dados reprodutíveis e confiáveis. Desde o primeiro momento, o objetivo deste estudo foi encontrar um ponto de equilíbrio entre um processo de preparo de amostra rápido e de baixo custo, e a obtenção de resultados analíticos confiáveis que atendam aos limites regulatórios.

Nas técnicas de PLE, a composição do solvente é um fator determinante para garantir a extração completa dos analitos alvo. No entanto, a HCCM (máquina de cápsula de café *espresso*) restringe a faixa de solventes que podem ser utilizados no procedimento de extração, por se tratar de um equipamento destinado ao uso doméstico, no qual apenas água é recomendada para seu uso. Estudos anteriores (MERLO et al., 2020), bem como o trabalho de Armenta, De la Guardia e Esteve-Turrillas (2016) com a extração de HPAs em solo, mostraram o uso de solventes orgânicos dentro do limite de 40% da composição. A partir deste ponto, as proporções de água e acetonitrila foram usadas como solução de extração. No entanto, a presença de altas concentrações de água pode comprometer a extração de compostos altamente hidrofóbicos, como os HPAs. Por outro lado, para preservar a HCCM de danos químicos, optou-se por não submeter o equipamento a condições severas de extração, como, por exemplo, altas concentrações de solventes orgânicos. Embora a solução de extração fosse principalmente aquosa, a combinação de alta pressão (19 bar) e alta temperatura (75 ± 2 °C) permitiu que a solução de extração penetrasse de maneira eficiente na matriz, o que garantiu a solubilidade dos analitos. Portanto, a solução de extração composta por H₂O:ACN (60:40, v/v) foi escolhida devido à sua capacidade de extrair com eficiência todos os analitos.

Para garantir a transferência adequada da amostra para a cápsula de extração, a amostra precisou ser seca. Assim, a primeira abordagem do estudo foi a liofilização da amostra, no entanto, tornou o método demorado. Em seguida, foi avaliado o uso da técnica de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD). Vários adsorventes foram avaliados, como C₁₈, carvão ativado e terra diatomácea. Os melhores resultados foram obtidos com a terra diatomácea. Sua capacidade de secar rapidamente a amostra e remover interferentes polares da matriz, além da baixa toxicidade e custo, revelou-se adequada para o propósito e foi a escolhida.

Considerando que o extrato obtido (15 – 20 mL) era principalmente aquoso, a seguinte estratégia foi aplicar uma etapa de concentração dos analitos e limpeza do extrato. Uma das primeiras abordagens avaliadas foi a extração líquido-líquido (LLE) usando *n*-hexano. Embora esse procedimento tenha apresentado resultados satisfatórios em outro estudo (MERLO et al., 2020), após a evaporação e reconstituição do extrato com acetonitrila, foi verificada a presença de diversos interferentes. Assim, foi avaliado o uso de *salting-out*, testando diversos tipos e proporções de sais (Figura 2). Foi observado que o aumento da quantidade de sais não melhorou a sensibilidade do método e a taxa de recuperação dos analitos. Ao contrário, o aumento excessivo da força iônica demonstrou efeito negativo na sensibilidade e a taxa recuperação. Portanto, uma abordagem de baixa concentração de sal (2 g de NaCl e 2 g de MgSO₄) foi a escolhida.

Figura 2 – Influência das abordagens de *salting out* na sensibilidade do método (intensidade do sinal analítico, em cps) e taxa de recuperação dos analitos (%).

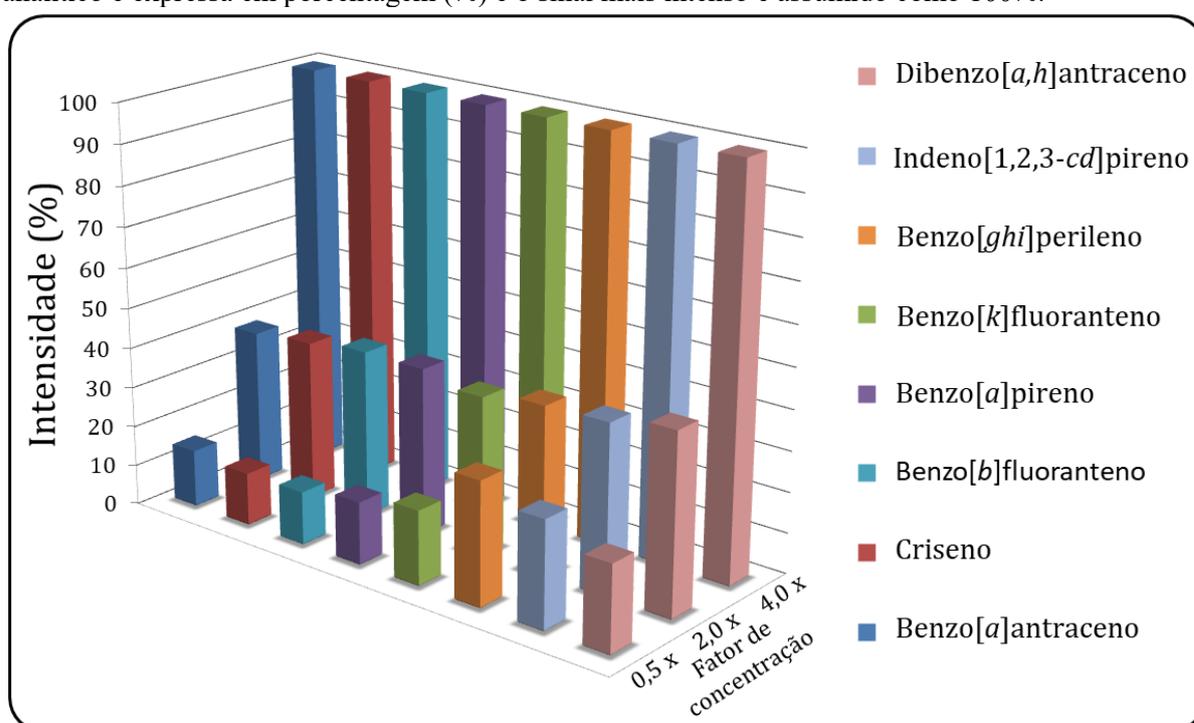


Fonte: de Melo et al. (2022a).

Finalmente, a camada orgânica do extrato foi concentrada e reconstituída. O efeito dos interferentes da matriz mostrou-se crítico para a concentração por evaporação. A otimização desta etapa foi estudada considerando volumes de 100, 400 e 800 µL do extrato submetido à secagem e reconstituído em 200 µL de acetonitrila, obtendo-se fatores de concentração de

metade, duas e quatro vezes. Volumes maiores mostraram efeitos de matriz muito intensos. A reconstituição foi avaliada usando dois solventes: metanol e acetonitrila. Essa etapa se mostrou crucial para a sensibilidade do método. A etapa de concentração produziu um notável aumento de sensibilidade, de até 7,4-vezes na intensidade do sinal analítico, quando o extrato foi concentrado quatro vezes, conforme mostrado na Figura 3. A acetonitrila apresentou melhor sensibilidade comparada ao metanol para todos os analitos, tendo sido escolhida como o solvente de reconstituição.

Figura 3 – Influência do fator de concentração na sensibilidade do método, onde a intensidade do sinal analítico é expressa em porcentagem (%) e o sinal mais intenso é assumido como 100%.



Fonte: de Melo et al. (2022a).

Na abordagem proposta, apenas um ciclo de extração, limpeza e concentração do extrato foi suficiente para a obtenção de extratos limpos (Figura 3). De fato, os resultados demonstraram que a combinação da extração de PLE-HCCM seguida de *salting-out*, concentração por evaporação e reconstituição do extrato resultou em um desempenho bastante satisfatório, evitando as desvantagens dos métodos tradicionais de preparação de amostras, como protocolos caros, complexos e demorados como cromatografia de permeação em gel, saponificação, liofilização, entre outros relatados em outros métodos analíticos (CAPOLUPO et al., 2017; EVARISTE et al., 2018; GUIFFARD et al., 2020; QIN et al., 2020).

As condições finais otimizadas para o preparo das amostras foram: solução extratora composta de H₂O:ACN (60:40, v/v); *salting-out* consistindo em 2 g de NaCl e 2 g de MgSO₄; fator de concentração de quatro vezes e acetonitrila como solvente de reconstituição.

3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES LC-APCI-MS/MS

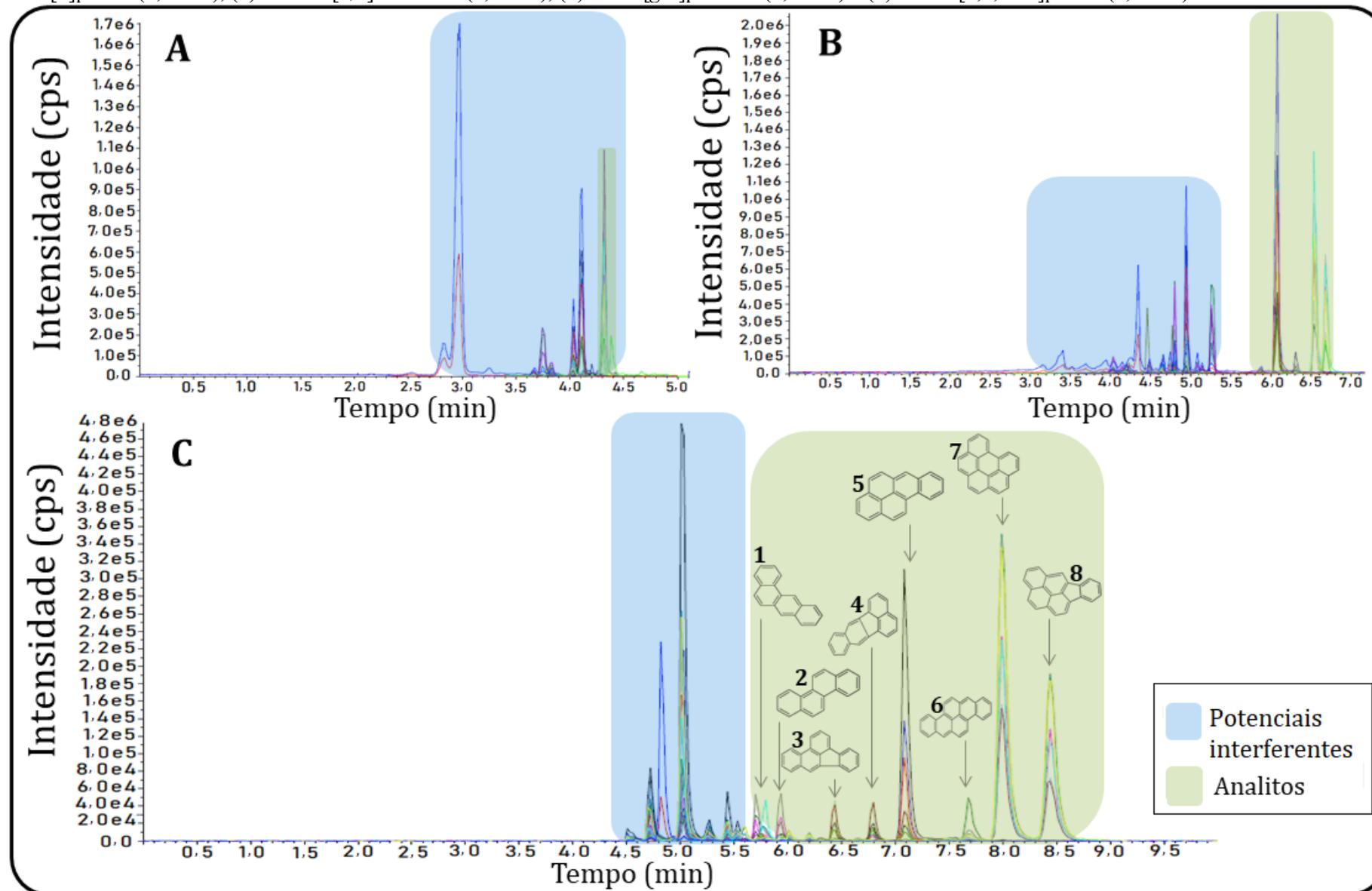
Reproduzir em amostras de pescado o desempenho do método para a determinação de HPAs em bacon foi o primeiro experimento (MERLO et al., 2020). No entanto, devido às diferenças na composição da matriz, a resposta obtida com a fonte ESI (*electrospray ionization source*) foi insatisfatória. Além disso, muitas dificuldades foram enfrentadas para reproduzir totalmente os métodos LC-MS/MS relatados na literatura, especialmente quando era necessário atender às reais condições exigidas em um laboratório oficial de controle e os limites regulatórios atuais para HPAs. Quando comparada à fonte ESI, a otimização APCI apresentou melhor sensibilidade e reprodutibilidade para todos os analitos. Portanto, o método foi otimizado usando uma fonte APCI em modo positivo (APCI⁺).

A separação em fase reversa C₁₈ não foi capaz de resolver adequadamente a separação entre os picos do analito e os picos da matriz. Por outro lado, ao utilizar a fase fenil-hexil, houve uma maior retenção de compostos, devido ao grupamento volumoso ligado à sílica. Nesse caso, os analitos foram separados dos compostos da matriz, permitindo a identificação dos HPAs por espectrometria de massas, porém sem resolução adequada entre os analitos. Além disso, a distinção do tripleto de isômeros B[*a*]P, B[*b*]F e B[*k*]F (cada HPA com massa molar de 252 g mol⁻¹), assim como os dois pares de isômeros B[*a*]A e Cri (cada HPA com massa molar de 228 g mol⁻¹), e B[*ghi*]P e I[*cd*]P (cada HPA com massa molar de 277 g mol⁻¹) foi impraticável usando ambas as fases C₁₈ e fenil-hexil (Figura 4, parte A e B, respectivamente). Assim, buscou-se avaliar uma coluna específica para HPAs, visando a separação dos isômeros. Usando a coluna específica de HPAs, uma resolução satisfatória foi obtida para todos os analitos (Figura 4, parte C). Esse fato foi muito importante para a confiabilidade do método, pois um dos principais parâmetros toxicológicos para a avaliação dos HPAs é a distinção dos isômeros. Os isômeros de HPAs apresentam diferentes toxicidades e limites regulatórios ou níveis de preocupação (BRASIL, 2019a; EU, 2011). Enquanto B[*a*]P é o único HPA regulado individualmente e que apresenta evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos, B[*a*]A, B[*b*]F e Cri são considerados possivelmente carcinogênicos para humanos e regulados como uma soma (4HPAs). Os outros HPAs estudados não apresentam regulamentação e são classificados como provavelmente carcinogênicos para humanos (DB[*a,h*]A), possivelmente

carcinogênicos para humanos (I[*cd*]P e B[*k*]F) e não classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos (B[*ghi*]P) (IARC, 2010, 2018).

O uso de solvente polar aprótico (acetonitrila) como fase móvel de eluição, permitiu a ionização adequada de todos os analitos e garantiu uma melhor relação sinal/ruído utilizando a fonte APCI. A retenção do analito diminuiu com o aumento da temperatura da coluna. Portanto, as condições de retenção ideais foram obtidas a 25 °C. Um gradiente otimizado foi desenvolvido para garantir a separação adequada dos isômeros (consulte a seção 2.4). A separação cromatográfica de oito HPAs em pescado foi realizada em 10 min. A ordem de retenção de cada analito foi proporcional ao aumento da cadeia aromática. O tempo de retenção de cada HPA e sua respectiva estrutura química é relatado na Figura 4, parte C.

Figura 4 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de amostra branca de mexilhão fortificada em $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ usando as seguintes fases estacionárias: C_{18} (A), fenil-hexil (B), e Zorbax Eclipse PAH (C), onde (1) benzo[*a*]antraceno (5,7 min), (2) criseno (5,9 min), (3) benzo[*b*]fluoranteno (6,4 min), (4) benzo[*k*]fluoranteno (6,8 min), (5) benzo[*a*]pireno (7,1 min), (6) dibenzo[*a,h*]antraceno (7,5 min), (7) benzo[*ghi*]perileno (8,0 min) e (8) indeno[1,2,3-*cd*]pireno (8,4 min).



Contudo, os HPAs são analitos desafiadores a serem determinados por espectrometria de massas, devido às suas características físico-químicas. Sua estrutura molecular apresentou baixo perfil de fragmentação, com baixa especificidade. Devido à sua composição química restrita a carbono e hidrogênio, associada a um peso molecular relativamente baixo, os espectros MS/MS são carentes de informações. Em casos de amostras biológicas e de alimentos, é esperada a presença de um número significativo desses isômeros de massa, considerando a composição orgânica das amostras. Mesmo protocolos de preparo de amostra complexos com várias etapas para análise de HPAs mostram intensa interferência da matriz. No presente método, análises de alto desempenho e seletividade eram um compromisso. Assim, a análise dos cromatogramas exigiu cautela, principalmente para verificar a reprodutibilidade do tempo de retenção.

3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram que o método desenvolvido apresentou confiabilidade para a rotina do laboratório (Tabela 3).

Tabela 3 – Figuras analíticas de mérito obtidas na validação do método de determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).

Análitos (abreviação)	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (CV_r %)	Reprodutibilidade interna (CV_{zi} %)	Taxa de recuperação (%)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Incerteza relativa (%)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	5,00	18		114					
	7,50	15	19	112	5,00	1,25	7,60	7,90	22
	10,0	12		108					
Criseno (Cri)	5,00	10		115					
	7,50	10	15	114	5,00	1,25	6,10	6,80	21
	10,0	14		96					
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	5,00	20		95					
	7,50	18	21	92	5,00	1,25	6,10	6,70	24
	10,0	15		91					
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	5,00	19		81					
	7,50	11	19	86	5,00	1,25	6,30	6,30	31
	10,0	15		87					
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	1,25	21		102					
	2,50	13	17	91	1,25	0,90	1,80	3,00	33
	5,00	12		78					
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	2,50	15		103					
	5,00	11	18	79	2,50	1,00	3,40	4,60	39
	7,50	14		75					
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	1,25	11		104					
	2,50	11	19	88	1,25	1,00	1,60	3,00	32
	5,00	14		91					
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	1,25	16		106					
	2,50	15	17	90	5,00	1,00	1,60	2,90	33
	5,00	10		97					

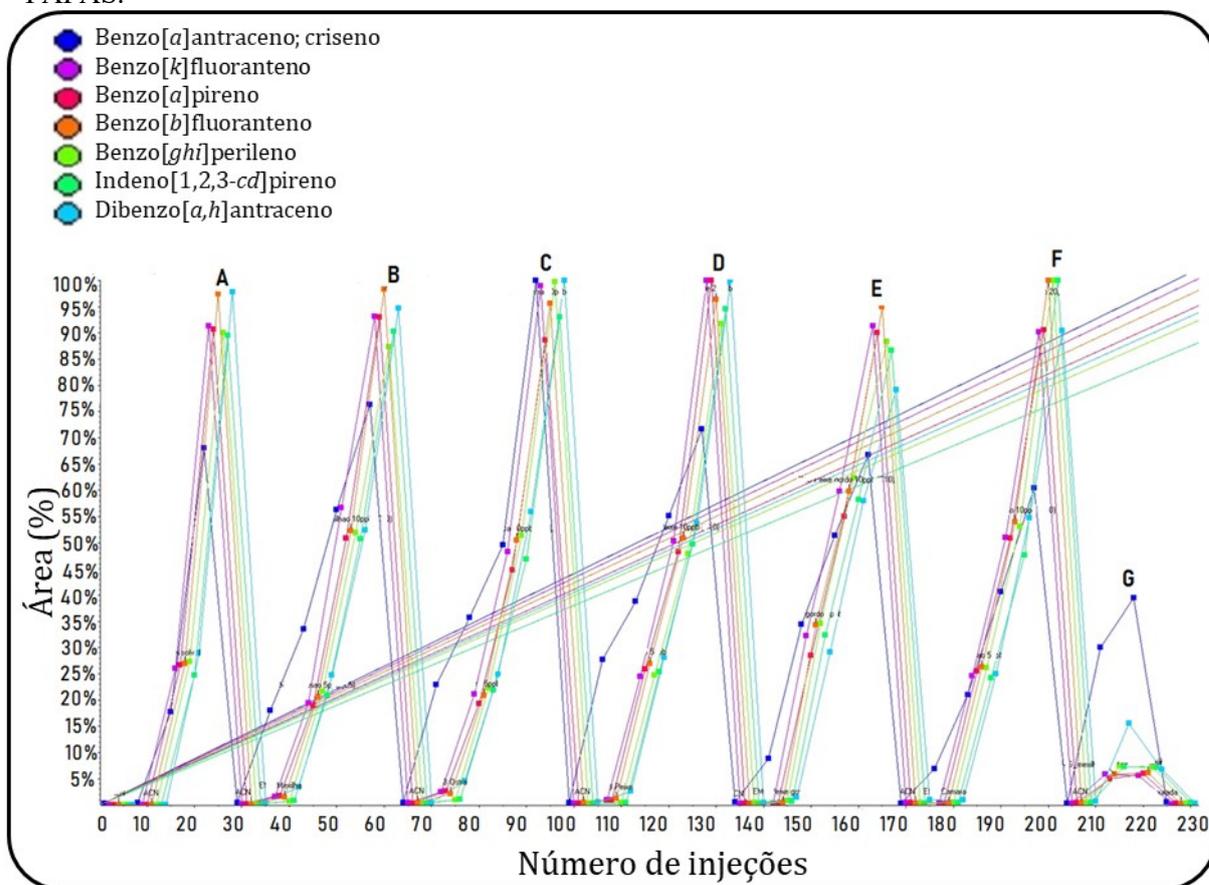
CV_r : Coeficiente de variação para repetibilidade. CV_{zi} : Coeficiente de variação para reprodutibilidade interna. CC_α : Limite de decisão. CC_β : Capacidade de detecção. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação. Fonte: de Melo et al. (2022a).

Em relação à seletividade, as transições monitoradas para cada HPA não apresentaram interferência quando os analitos foram injetados em solvente puro. Além disso, todas as matrizes apresentaram um grande número de picos interferentes, a maioria deles na região do cromatograma antes da eluição dos primeiros HPAs. Para minimizar a interferência do sinal o mais baixo possível, evitou-se o uso de íons precursores baseados no isótopo mais abundante, para o qual foram observadas mais substâncias concomitantes extraídas das matrizes. Com exceção dos isômeros de massa molar com 228 g mol^{-1} (B[a]A e Cri) e 252 g mol^{-1} (B[b]F e B[k]F) que apresentaram problemas de sensibilidade, íons de menor abundância isotópica foram usados para todos os outros analitos. A efetiva diminuição do sinal dos interferentes no cromatograma de íons totais (TIC) em relação aos analitos, aliada à separação dos picos relacionados à matriz, conferiu a seletividade mínima necessária. Ou seja, buscou-se seletividade tanto na separação (tempo, em minutos) quanto na detecção (m/z) para análise de matrizes complexas como pescado.

A seletividade do método também foi satisfatória para os padrões internos. O fluoranteno- d_{10} e pireno- d_{10} coeluíram em 4,8 min. Por outro lado, o mesmo tempo de retenção foi alcançado para o criseno- d_{12} e seu isótopo (5,9 min), separando-se dos concomitantes vindos da matriz. No entanto, todos os padrões internos foram mantidos e avaliados em termos de performance de validação e aplicabilidade com amostras reais.

De acordo com a Figura 5, o efeito de matriz na fonte de ionização foi semelhante para as matrizes de mexilhão, ostra, camarão e peixe. Portanto, foi possível utilizar um único tipo de amostra para representar todas as matrizes relatadas por este estudo.

Figura 5 – Gráfico de injeções de (A) padrão em solvente (B) mexilhão (*Perna perna*), (C) ostra (*Crassostrea gigas*), (D) peixes com baixo teor de gordura (*Pangasius* spp.), (E) peixes com alto teor de gordura (*Thunnus* spp.), (F) camarão (*Penaeus* spp.), (G) material de referência certificado shellfish – FAPAS.



Fonte: de Melo et al. (2022a).

A sensibilidade do método foi satisfatória ao propósito, com LODs que variaram de 0,90 a 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQs entre 1,25 e 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores médios dos coeficientes de regressão (R^2) foram satisfatórios e, em sua maioria, superiores a 0,97. Os testes sobre o efeito de matriz mostraram uma perda de sinal analítico superior a 60% para todos os analitos. Portanto, foi necessário usar uma abordagem de calibração de matriz combinada para minimizar os erros sistemáticos da fonte de ionização. Usando o procedimento para preparar a curva de calibração com um extrato de matriz branca, uma taxa de erro inferior a 40% foi alcançada para todos os analitos. Para corrigir o erro sistemático ainda existente, a comparação do padrão interno entre aquelas amostras fortificadas antes da extração (amostras desconhecidas e amostras de controle de qualidade) e aquelas fortificadas após a extração (ponto da curva de calibração preparado com extrato de matriz branca) forneceu uma maneira útil de compensar os erros em relação à preparação da amostra. O criseno- d_{12} mostrou a melhor performance como padrão interno para calibração e avaliação do fator de resposta. O fluoranteno- d_{10} e pireno- d_{10}

apresentaram dificuldades quanto à seletividade para algumas matrizes e foram descartados. Assim, o criseno-d₁₂ foi inicialmente adotado para calibração como padrão interno. Considerando as perdas com o processo de extração, todos os lotes foram acompanhados de amostras de recuperação ($n = 3$), utilizadas para corrigir os resultados das amostras desconhecidas. Assim, cada lote deve ser acompanhado de, pelo menos, quatro amostras de controle de qualidade: uma amostra branca usada como controle negativo e três amostras fortificadas para calcular a taxa de recuperação intra-lote.

A complexidade de analisar simultaneamente vários compostos em baixas concentrações em matrizes complexas usando LC-APCI-MS/MS foi claramente demonstrada quando o método foi submetido a testes de precisão e exatidão. O estudo de precisão em termos de repetibilidade e reprodutibilidade interna forneceram coeficientes de variação (CV) em sua maioria abaixo de 20%, exceto para B[a]P e B[b]F, cujos CV foram 21% para repetibilidade e 21% para reprodutibilidade interna, respectivamente. As taxas de recuperação ficaram entre 75 e 115%. Os melhores valores de taxa de recuperação foram considerados para I[cd]P e B[b]F (90 a 106%). Em termos de variabilidade, o melhor desempenho foi alcançado para o analito B[ghi]P, cujos valores de CV foram inferiores a 14%. Embora algumas recuperações não atendessem aos critérios de validação adotados (70 a 110%), os resultados foram considerados aceitáveis, uma vez que as amostras foram analisadas juntamente com controles de qualidade.

3.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO

A avaliação da aplicabilidade do método apresentou resultados satisfatórios, exceto para Cri. Neste caso, o analito não produziu recuperações aceitáveis. Os resultados do *z-score* da avaliação de exatidão externa (material FAPAS) foram satisfatórios (intervalo de *z-score* $\leq 2,0$), exceto para Cri cujo resultado ficou abaixo do LOQ ($5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$). Ao considerar a soma de 4HPAs (B[a]A, B[a]P, B[b]F e Cri), foi obtido um valor de $18,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, que estava dentro da faixa de $17,3$ e $44,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ designado pelo fornecedor do material de referência, mesmo adicionando valor zero à concentração de Cri. Ao considerar as taxas de recuperação usando o valor médio relatado, elas variaram de 72 a 85%. Os outros analitos que não estavam presentes no material (B[ghi]P, B[k]F, DB[a,h]A e I[cd]P) tiveram recuperações entre 70 e 120%, fortificando as amostras antes do procedimento de extração.

O método também foi avaliado em uma rodada de testes de proficiência (57 laboratórios participantes) fornecidos pela FAPAS (*Food Chemistry Proficiency Test Report 0693*), com amostra de peixe defumado. Embora esta matriz específica não faça parte do escopo

do método, o mesmo procedimento analítico foi utilizado para esta avaliação interlaboratorial. Os resultados do estudo interlaboratorial colaborativo atenderam ao valor designado pelo provedor para 4HPAs ($97,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 46$). O desempenho do método foi satisfatório (intervalo de $z\text{-score} \leq 2,0$) para a soma de 4HPAs ($63,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 6$).

Em relação às amostras coletadas ao longo da costa brasileira, não foram quantificados HPAs em amostras de regiões não afetadas (estado de Santa Catarina). Das 110 amostras das regiões afetadas pelo derramamento de petróleo, 43,6% ($n = 48$) das amostras continham níveis mensuráveis de HPAs: B[a]A (41,7%, $n = 20$), Cri (29,2%, $n = 14$), B[b]F (37,5%, $n = 18$), B[k]F (2,1%, $n = 1$), B[a]P (41,7%, $n = 20$), B[ghi]P (6,3%, $n = 3$), I[cd]P (2,1%, $n = 1$) e DB[a,h]A (6,3%, $n = 3$). Em relação às matrizes relatadas, peixes (39,5%, $n = 34$), camarões (58,3%, $n = 7$), lagostas (50,0%, $n = 2$), mexilhões (60,0%, $n = 3$), ostras (50,0%, $n = 1$) e polvo (100%, $n = 1$) estavam contaminados com, pelo menos, um dos oito analitos estudados (Tabela 4).

Tabela 4 – Faixas de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) em pescado coletado na costa brasileira.

Analito (abreviação, $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Peixe ($n = 86$)	Camarão ($n = 12$)	Lagosta ($n = 4$)	Mexilhão ($n = 26$)	Ostra ($n = 10$)	Polvo ($n = 1$)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	< LOQ – 27,8	< LOQ – 11,9	< LOQ	< LOQ – 7,39	< LOQ	64,2
Criseno (Cri)	< LOQ – 85,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ – 7,79	< LOQ	48,3
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	< LOQ – 105	< LOQ – 113	< LOQ – 83,2	< LOQ	< LOQ	26,3
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	< LOQ – 5,14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	<5,00
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	< LOQ – 4,10	< LOQ – 2,00	< LOQ – 1,50	< LOQ	< LOQ	<1,25
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	4,45
Benzo[<i>ghi</i>]perileno B[<i>ghi</i>]P	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,15
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5,35
4HPAs	< LOQ – 98,7	< LOQ – 115	< LOQ – 83,2	< LOQ – 12,9	< LOQ – 4,60	139
8HPAs	< LOQ – 98,7	< LOQ – 115	< LOQ – 83,2	< LOQ – 12,9	< LOQ – 4,60	156

4HPAs: Soma de B[*a*]P, Cri, B[*a*]A e B[*b*]F. 8HPAs: Soma de B[*a*]P, Cri, B[*a*]A, B[*b*]F, B[*k*]F, B[*ghi*]P, D[*a,h*]A e I[*cd*]P. LOQ: Limite de quantificação, onde benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno = 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$; benzo[*a*]pireno = 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$; dibenzo[*a,h*]antraceno = 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Fonte: de Melo et al. (2022a).

4 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relatório oficial sobre os níveis de contaminação de HPAs em pescado das regiões afetadas pelo derramamento de petróleo de 2019 na costa brasileira. Foi desenvolvido, otimizado e validado com sucesso um método rápido, sensível e confiável para determinar HPAs em pescado. Pela primeira vez, a extração por líquido pressurizado (PLE) usando uma máquina de cápsula de café *espresso* e posterior a quantificação por LC-APCI-MS/MS foi aplicada para a determinação de HPAs em amostras de pescado.

A preparação completa de um lote com 45 amostras, mais amostras de controle de qualidade, incluindo curva de calibração, foi realizada em aproximadamente 3 horas. O procedimento de extração das amostras na máquina de cápsula de café *espresso* levou de 10 – 15 seg para cada amostra. A separação cromatográfica subsequente foi alcançada em 10 min. Portanto, o método PLE-LC-APCI-MS/MS desenvolvido foi adequado ao propósito.

Concentrações mensuráveis de HPAs estavam presentes em 43,6% das amostras de pescado das regiões afetadas pelo derramamento de petróleo no Brasil. B[a]A (41,7%), B[a]P (41,7%) e B[b]F (37,5%) foram os HPAs mais frequentes, variando de abaixo do LOQ a 113 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras analisadas apresentaram concentrações de HPAs abaixo dos níveis de preocupação estabelecidos pela autoridade reguladora brasileira e abaixo dos limites regulatórios estabelecidos pela União Europeia. No entanto, as opiniões sobre a segurança do pescado nas regiões de derramamento de petróleo ainda são prematuras, em comparação com outros acidentes semelhantes. Apesar de o acidente ter ocorrido há mais de um ano, seus efeitos na saúde humana podem não ter sido totalmente percebidos, uma vez que os resíduos de HPAs petrogênicos podem durar décadas. Portanto, o monitoramento de pescado deve ser realizado de maneira constante para medir os impactos na saúde humana.

5 REFERÊNCIAS

ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A. Hard Cap Espresso Machines in Analytical Chemistry: What Else? **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 6570–6576, 2016.

BADUEL, C. et al. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 33–47, 2015.

BRASIL. **Manual de Garantia de Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. 1. ed. Brasília: ACS/MAPA, 2011.

BRASIL. **Nota Técnica Nº 27/2019/SEI/GGALI/DIRE2/ANVISA - Riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil**, 2019a.

BRASIL. **Informações sobre o óleo**. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/manchasdeoleo/sobre>>. Acesso em: 30 jun. 2020b.

CAPOLUPO, M. et al. A comprehensive evaluation of the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy): Integrating chemical and physiological analyses in mussels as a biomonitoring strategy. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 146–159, 2017.

CHATTERJEE, N. S. et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1–8, 2016.

CORELL, L. et al. Flavonoid determination in onion, chili and leek by hard cap espresso extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Microchemical Journal**, v. 140, n. March, p. 74–79, 2018.

EU. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official journal of the European Communities**, n. L 221/8, p. 8–36, 2002.

EU. Regulation (EC) Nº 835/2011 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, n. L 215/4, p. 4–8, 2011.

EVARISTE, L. et al. Field biomonitoring using the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the quagga mussel *Dreissena bugensis* following immunotoxic responses. Is there a need to separate the two species? **Environmental Pollution**, v. 238, p. 706–716, 2018.

FARRINGTON, J. W. Need to update human health risk assessment protocols for polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood after oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, p. 110744, 2020.

FERRANTE, M. et al. PAHs in seafood from the Mediterranean Sea: An exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 385–390, 2018.

GADELHA, J. R. et al. Persistent and emerging pollutants assessment on aquaculture oysters (*Crassostrea gigas*) from NW Portuguese coast (Ria De Aveiro). **Science of the Total**

Environment, v. 666, p. 731–742, 2019.

GALLART-MATEU, D. et al. Hard cap espresso extraction-stir bar preconcentration of polychlorinated biphenyls in soil and sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 952, p. 41–49, 2017.

GUIFFARD, I. et al. Quantification of light polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood samples using on-line dynamic headspace extraction, thermodesorption, gas chromatography tandem mass spectrometry, based on an isotope dilution approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1619, p. 460906, 2020.

HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y. Semi-automated high-throughput method for residual analysis of 302 pesticides and environmental contaminants in catfish by fast low-pressure GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 319, p. 126592, 2020.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 2015.

HOFF, R. B. et al. Determination of 62 veterinary drugs in feedingstuffs by novel pressurized liquid extraction methods and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1152, p. 122232, 2020.

IARC. **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Some Related Exposures**. 92. ed. Lyon: WHO Press, 2010.

IARC. **Red Meat and Processed Meat**. 114. ed. Lyon: WHO Press, 2018.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Manchas de Óleo - Litoral brasileiro**. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/manchasdeoleo-faq>>. Acesso em: 30 jun. 2020a.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Manchas e óleo - Litoral brasileiro - Localidades Afetadas - Boletim 19/03/2020**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/2020-03-19_LOCALIDADES_AFETADAS.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020b.

ISO. **ISO 21748:2017 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation**. 2. ed. Vernier, Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2017.

JOHNSON, W. et al. Enumeration of the constitutional isomers of environmentally relevant substituted polycyclic aromatic compounds. **Chemosphere**, v. 202, p. 9–16, 2018.

LACROIX, C. et al. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 1–10, 2014.

LEIMAN, K. et al. Fast extraction of cannabinoids in marijuana samples by using hard-cap espresso machines. **Talanta**, v. 190, p. 321–326, 2018.

LÓPEZ, A. et al. Comprehensive analysis of airborne pesticides using hard cap espresso extraction-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1506, p. 27–36, 2017.

LOURENÇO, R. A. et al. Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, p. 111219, 2020.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MERLO, T. C. et al. Alternative pressurized liquid extraction using a hard cap espresso machine for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bacon. **Food Control**, p. 107565, 2020.

MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. **Talanta**, v. 178, p. 1053–1066, 2018.

MOLOGNONI, L. et al. Assessing the mutagens ethylnitrolic acid and 2-methyl-1,4-dinitropyrrrole in meat products: Sample preparation and simultaneous analysis by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1609, p. 460512, 2020.

MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; HOFF, R. B. Analysis of nitrofurans residues in foods of animal origin. In: **Food Toxicology and Forensics**. 1. ed. London: Academic Press, 2021. p. 379–419.

PENA, P. G. L. et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de saúde pública**, v. 36, n. 2, p. e00231019, 2020.

PIE, H. V.; HEYES, A.; MITCHELMORE, C. L. Investigating the use of oil platform marine fouling invertebrates as monitors of oil exposure in the Northern Gulf of Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 553–565, 2015.

POLLI, J. R. et al. Quantitative analysis of PAH compounds in DWH crude oil and their effects on *Caenorhabditis elegans* germ cell apoptosis, associated with CYP450s upregulation. **Science of the Total Environment**, v. In Press, p. 107303, 2020.

PULSTER, E. L. et al. Chronic PAH exposures and associated declines in fish health indices observed for ten grouper species in the Gulf of Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 135551, 2020a.

PULSTER, E. L. et al. A First Comprehensive Baseline of Hydrocarbon Pollution in Gulf of Mexico Fishes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6437, 2020b.

QIN, N. et al. Tissue distribution, bioaccumulation, and carcinogenic risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms from Lake Chaohu, China. **Science of the Total Environment**, v. 749, p. 141577, 2020.

SANTANA, A. et al. Instrumental improvements for the trace analysis of structural isomers of polycyclic aromatic hydrocarbons with molecular mass 302 Da. **Analytica Chimica Acta**, v.

1100, p. 163–173, 2020.

SMALLING, K. L. et al. Regional assessment of persistent organic pollutants in resident mussels from New Jersey and New York estuaries following Hurricane Sandy. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 2, p. 432–441, 2016.

SNYDER, S. M. et al. Spatial contrasts in hepatic and biliary PAHs in Tilefish (*Lopholatilus chamaeleonticeps*) throughout the Gulf of Mexico, with comparison to the Northwest Atlantic. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113775, 2020.

SPARLING, D. W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: **Ecotoxicology Essentials Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants**. 1. ed. London: Academic Press, 2016. p. 193–223.

WHO; IPCS. Risk assesment and its role in risk analysis. In: **Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. Geneva: World Health Organization, 2009. p. 2–1; 2–16.

CAPÍTULO III

Rápida extração dispersiva guiada energizada de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos para análise de evidências do derramamento de petróleo e monitoramento pescado baseado em risco

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo, foi desenvolvido um método avançado de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) para a quantificação de HPAs em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS). O método desenvolvido foi aplicado a amostras de pescado e material biológico de aves, mamíferos e répteis para analisar as evidências criminais do desastre de derramamento de petróleo no Brasil em 2019 e consolidar os dados do primeiro monitoramento oficial de HPAs em pescado do país. Além disso, o risco da exposição à saúde dos consumidores de pescado do Brasil foi avaliado. Parte deste capítulo foi apresentado no Simpósio Internacional da Associação Brasileira para a proteção dos Alimentos (ABRAPA) 2023, cujo mérito foi considerado digno de menção honrosa. Além disso, também foi submetido ao periódico *Microchemical Journal*.

Menção honrosa (Apêndice A):

Ana Paula Zapelini de Melo et al. (2023). Primeiro monitoramento oficial de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em pescado (6416917). **Menção Honrosa no Simpósio Internacional ABRAPA 2023.**

RESUMO

Após o desastre com derramamento de petróleo em 2019 na costa brasileira, a demanda por análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de peixes aumentou. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método avançado de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com fonte de ionização química a pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS). O método desenvolvido foi validado em termos de seletividade, faixa de trabalho, efeito da matriz, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e limite de decisão. Este método foi aplicado a 238 amostras para consolidar o primeiro monitoramento oficial brasileiro de HPAs em pescado. Os HPAs foram quantificados em 15% das amostras de pescado, com concentrações de até 69,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O risco à saúde dos consumidores de pescado foi avaliado usando a abordagem de margem de exposição (MOE). Além disso, o método analítico foi aplicado à análise forense de amostras de órgãos e tecidos de várias espécies animais ($n = 24$) coletadas como evidência criminal do desastre. O B[a]P foi quantificado em 83% das amostras, com concentrações de até 39.400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, confirmando a contaminação com petróleo. Apesar disso, a avaliação dos riscos indicou que a catástrofe era pouco preocupante para a saúde humana. Este novo método aumentou o rendimento laboratorial e foi aplicado com sucesso a diferentes tipos de amostras, apoiando tanto a investigação forense como a monitorização de peixes após o desastre.

Palavras-chave: Avaliação de risco; Carcinogênico; Segurança de alimentos; Validação de método.

ABSTRACT

After the 2019 oil spill disaster in the Brazilian coast, the demand for PAH analysis in fish samples increased. The aim of this study was to develop an advanced method of energized guided dispersive extraction (EDGE) and quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization source (LC-APCI-MS/MS). The developed method was validated in terms of selectivity, working range, matrix effect, precision, accuracy, limits of detection and quantification, and decision limit. This method was applied to 238 samples to consolidate the first official Brazilian monitoring of PAH in seafood. PAHs were quantified in 15% of fish samples, with concentrations up to 69.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The health risk of fish consumers was assessed using the margin of exposure (MOE) approach. In addition, the analytical method was applied to forensic analysis of organ and tissue samples from several animal species ($n = 24$) collected as criminal evidence of the disaster. B[a]P was quantified in 83% of the samples at concentrations of up to 39,400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, confirming oil contamination. Despite this, the risk assessment indicated that the disaster was of low concern to human health. This new method increased laboratory throughput and was successfully applied to different types of samples, supporting both forensic investigation and monitoring of fish after the disaster.

Keywords: Carcinogenic; Food safety; Method validation; Public health; Risk assessment.

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) fazem parte da composição do óleo mineral à base de petróleo e, portanto, são marcadores úteis de contaminação petrogênica. O apoio laboratorial fornecido pelos métodos de quantificação de HPAs torna-se fundamental para as investigações de derramamento de petróleo no que diz respeito ao risco para a saúde dos consumidores. As exposições dietéticas e ambientais aos HPAs aumentam a incidência de câncer (IARC, 2010). Os dados de HPAs também apoiam decisões importantes, como a liberação ou interdição de regiões de pesca, locais de cultivo e comércio de pescado. Independentemente da ocorrência de derrames de petróleo, os programas de monitoramento, avaliação de risco e limites regulatórios para HPAs em pescado são passos essenciais para preservar a saúde pública e devem ser definidos à luz de dados laboratoriais confiáveis (DE MELO et al., 2022a). Após o derramamento de petróleo na costa brasileira em 2019, as atividades balneares e pesqueiras foram proibidas para avaliar toda a extensão dos impactos ambientais e sociais. O derramamento causou danos à vida selvagem, áreas costeiras e manguezais. Para investigar o acidente, agências reguladoras e militares formaram uma força-tarefa interdisciplinar para investigar seu desdobramento. A Marinha do Brasil e a Polícia Federal coletaram animais mortos como provas criminais relacionadas ao derramamento de petróleo, enquanto o Serviço de Inspeção Federal do Brasil coletou amostras de pescado provenientes das regiões afetadas (BRASIL, 2019; DE MELO et al., 2022a).

Várias técnicas analíticas que têm sido usadas para mensurar HPAs em pescado, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) auxiliou com sucesso na investigação inicial do desastre brasileiro de 2019 (DE MELO et al., 2022b). Além da detecção específica fornecida pela espectrometria de massas, os procedimentos de preparo de amostra também são cruciais para a obtenção de muitos parâmetros de mérito durante a validação analítica. Atualmente, técnicas clássicas como Soxhlet ainda são utilizadas para extração de HPAs em alimentos (SUN et al., 2020). Esses procedimentos de extração geralmente levam muito tempo para serem executados, requerem grandes volumes de solventes orgânicos e etapas adicionais para limpeza. Técnicas mais sofisticadas, como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) e extração em fase sólida (SPE), micro-extração em fase sólida (SPME) e extração líquido-líquido (LLE) têm sido usadas como métodos padrão para a extração de HPAs de matrizes alimentares (DE MELO et al., 2022a; NAGHASHAN et al., 2023). Esses procedimentos de preparo de amostras, combinados com a detecção por espectrometria de

massas, aumentaram o desempenho analítico dos métodos de controle de HPAs, atingindo limites de detecção inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (AOAC *Official Method* 2014.08; FDA *method* C-002.01). Portanto, os recentes avanços nas técnicas de extração levaram o campo da Metrologia Química moderna à inovação química e grande progresso, como evidenciado por inúmeras publicações de alto impacto na literatura científica (DE MELO et al., 2022a).

A extração dispersiva guiada energizada (EDGE) é uma técnica avançada que combina extração por líquido pressurizado (PLE) e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) para melhorar o desempenho analítico. O processo de extração para preparação da amostra (incluindo filtração, resfriamento e lavagem) é mais rápido do que outros extratores por líquido pressurizado (KINROSS et al., 2020). A transferência de massa eficaz, a capacidade de limpeza do extrato e a tecnologia moderna tem expandido o escopo de aplicações, trazendo inovação química a diversos métodos analíticos. No entanto, os estudos que aplicaram EDGE no campo da análise de alimentos ainda são escassos (ANDREAS et al., 2021; DÍAZ-GALIANO et al., 2021; HOFF et al., 2020).

Devido ao seu papel fundamental na segurança dos alimentos, a análise de risco tem experimentado um aumento de popularidade entre os governos e empresas privadas. A análise de risco utiliza modelos matemáticos que apoiam objetivamente a tomada de decisão e otimiza o controle do processo, absorvendo sua incerteza e variabilidade (FEIJÓ et al., 2013). A análise de risco auxilia na definição de metas e estratégias de controle sistemático e monitoramento nas avaliações de conformidade necessárias para a segurança alimentar. A avaliação de risco, um dos componentes da análise de risco, tem como objetivo fornecer aos gestores de risco dados científicos colaborativos e multidisciplinares que esclareçam a natureza e a extensão do risco. A avaliação de risco também auxilia nas ações de mitigação, controle e prevenção da segurança alimentar, incluindo limites regulatórios e medições laboratoriais (WHO; FAO, 2006). O fator de equivalência tóxica (TEF) é uma abordagem possível de avaliação de risco que tem sido aplicada à ocorrência de HPAs em alimentos, como carne, aves, peixes, suco de frutas e alimentos infantis, bem como em vários desastres de derramamento de petróleo (FDA, 2010; KHALILI et al., 2023; MAGALHÃES et al., 2022; MASSONE et al., 2021; MOAZZEN et al., 2022; NAGHASHAN et al., 2023). No entanto, a margem de exposição (MOE) tem sido considerada a abordagem mais apropriada para a avaliação de risco na exposição dietética a PAH (EFSA, 2008).

Em derramamentos de petróleo, a demanda por medições de HPAs geralmente aumenta, exigindo um rápido tempo de resposta para obter resultados analíticos. Além disso, pequenas quantidades recorrentes de petróleo bruto podem atingir a costa por muitos anos após

um derramamento de óleo (MAGALHÃES et al., 2022). Portanto, é crucial que os laboratórios de controle empreguem métodos modernos e reprodutíveis para atender a esses requisitos.

Este estudo teve como objetivo o desenvolver um método avançado EDGE para quantificação de HPAs por LC-APCI-MS/MS para consolidar o primeiro monitoramento oficial brasileiro de pescado. Para avaliar o risco da exposição dietética para a saúde dos consumidores de pescado, foram empregados o modelo determinístico de exposição dietética crônica e a abordagem da margem de exposição. Além disso, diversas amostras de órgãos e tecidos de animais mortos coletadas como prova criminal do desastre brasileiro com derramamento de petróleo ocorrido em 2019 foram analisadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PADRÕES E REAGENTES

Toda água utilizada foi de grau ultrapuro, fornecida pelo sistema de purificação Milli-Q® Integral Millipore (Molsheim, França). A acetonitrila de grau LC-MS foi adquirida da JT Baker Chemical Co. (Phillipsburg, EUA).

O mix de padrões de HPAs (CRM47940) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), sendo constituído de 10 mg L⁻¹ de benzo[*a*]antraceno (B[*a*]A), criseno (Cri), benzo[*b*]fluoranteno (B[*b*]F), benzo[*k*]fluoranteno (B[*k*]F), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), dibenzo[*a,h*]antraceno (DB[*a,h*]A), benzo[*ghi*]perileno (B[*ghi*]P) e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (I[*cd*]P) em acetonitrila. Padrão interno criseno-d₁₂ foi adquirido da Toronto Research Chemicals (Ontário, Canadá). As soluções-padrão de trabalho foram preparadas em acetonitrila contendo 100 µg L⁻¹ dos HPAs e 800 µg L⁻¹ do criseno-d₁₂. As soluções foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C.

2.2 AMOSTRAS

No total 262 amostras de pescado e material biológico foram analisadas. Amostras de peixes ($n = 183$), camarões ($n = 53$) e lagostas ($n = 2$) foram coletadas entre agosto de 2021 e setembro de 2022 em estabelecimentos produtores de pescado sob fiscalização do SIF provenientes de toda extensão do litoral brasileiro. Para o monitoramento oficial, a amostragem aleatória seguiu o modelo estatístico de distribuição binomial. Amostras de órgãos e tecidos de animais mortos encontrados nas regiões atingidas pelo derramamento de petróleo foram coletadas pela Polícia Federal e Marinha do Brasil para análise forense. Foram analisados

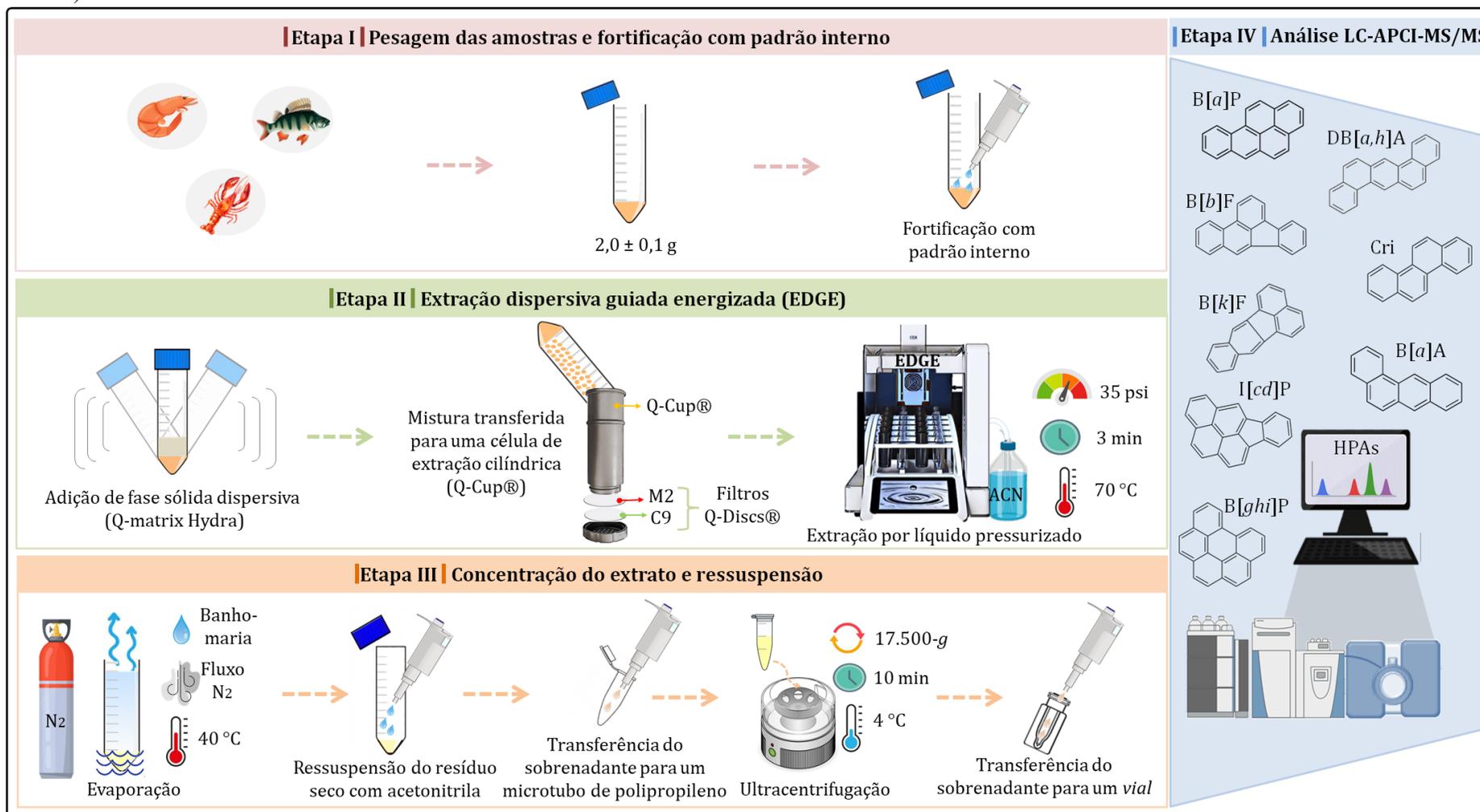
pássaros (fígado $n = 3$; pena $n = 1$; estômago $n = 1$), golfinhos (fígado $n = 4$; pele $n = 1$; coágulo hepático $n = 1$), cágados (fígado $n = 3$) e tartarugas (fígado $n = 6$; rim $n = 4$).

Para o preparo das amostras de pescado, apenas porções de musculo foram usadas. Para o preparo das amostras de órgãos e tecidos de animais mortos, todo o conteúdo foi utilizado. As amostras foram homogeneizadas em um processador de alimentos e acondicionadas em embalagens de alumínio com tampa de papel laminado. Foram mantidas sob refrigeração entre -20 e -10 °C até a análise.

2.3 EXTRAÇÃO DISPERSIVA GUIADA ENERGIZADA (EDGE)

Um instrumento EDGE® fornecido por CEM Corporation (Matthews, EUA) foi usado para o método de extração dos analitos (Figura 1). As amostras foram pesadas ($2,0 \pm 0,1$ g) diretamente em tubos de polipropileno de 50 mL. Foram adicionados o padrão interno ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 2 g do sorbente Q-Matrix Hydra® (CEM Corporation, EUA). Todo o conteúdo foi homogeneizado no tubo com o auxílio de uma espátula. A mistura foi então transferida para uma célula de extração cilíndrica de alumínio (Q-Cup®, CEM Corporation, Matthews, EUA) com duas membranas filtrantes. O Q-Disc® C9 (celulose com $40 \mu\text{m}$ de porosidade) foi colocado abaixo do M2 (politetrafluoretileno com $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade).

Figura 1 – Etapas do método de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado utilizando extração dispersiva guiada energizada (EDGE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).



ACN: Acetonitrila. C9: Celulose com 40 µm de porosidade. M2: Politetrafluoretileno com 0,22 µm de porosidade. LC-APCI-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica. B[a]A: Benzo[a]antraceno. B[b]F: Benzo[b]fluoranteno. B[k]F: Benzo[k]fluoranteno. B[a]P: Benzo[a]pireno. B[ghi]P: Benzo[ghi]perileno. Cri: Criseno. D[a,h]A: Dibenzo[a,h]antraceno. I[cd]P: Indeno[1,2,3-*cd*]pireno.

O solvente de extração (acetonitrila) foi impulsionado pela parte inferior (10 mL) e pulverizado na parte superior (25 mL) de cada célula de extração. A temperatura de extração e a pressão foram definidos em 70 °C e 35 psi, respectivamente. A célula de extração foi mantida nessas condições durante 3 min. Em seguida, todo o extrato foi evaporado em banho-maria (40 °C), sob fluxo de nitrogênio. O resíduo seco resultante foi ressuscitado com 0,5 mL de acetonitrila e transferido para microtubo de polipropileno de capacidade 1,5 mL. Finalmente, os microtubos foram submetidos a ultracentrifugação a 17.300-g por 10 min a 4 °C. Uma alíquota da solução resultante foi transferida para um *vial* e analisado em sistema LC-APCI-MS/MS (Figura 1).

2.4 ANÁLISES POR LC-APCI-MS/MS

Dois espectrômetros de massa híbridos do tipo triplo quadrupolo-linear com armadilha de íons QTrap 5500 da Sciex (Framingham, EUA) foram usados para a análise de HPAs. A fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) operando em modo positivo foi usada em ambos instrumentos. Foi usado o modo de monitoramento de reação selecionada (SRM) com, pelo menos, um íon precursor e dois íons produto de fragmentação monitorados para cada analito. Os espectrômetros foram acoplados aos sistemas de cromatografia líquida 1290 Infinity da Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG (Waldbronn, Alemanha) e ExionLC da Sciex (Framingham, EUA). Os parâmetros da fonte APCI foram: 3 µA (corrente aplicada à agulha corona), 600 °C (temperatura), 20 psi (gás de cortina) e 60 psi (gás de nebulização). O capilar foi ajustado a uma distância de 3,5 mm do orifício de entrada da fonte APCI. Os parâmetros de SRM estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros do monitoramento de reação selecionada (SRM) para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).

Analitos (abreviação)	Número CAS	Íon precursor (APCI ⁺ , <i>m/z</i>)	Transição de quantificação (Q, <i>m/z</i>)	Transição de confirmação (C, <i>m/z</i>)	DP (V) Q/C/C	CE (V) Q/C/C
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	56-55-3	228,1	228,0	226,0 227,1	106/106/141	45/55/55
Criseno (Cri)	218-01-9	228,1	226,0	227,1 228,0	106/106/141	45/55/55
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	205-99-2	252,1	248,0	250,0 224,1	150/150/150	89/57/77
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	207-08-9	252,1	248,0	250,0 224,1	150/150/150	89/57/77
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	50-32-8	252,9	250,1	248,0 224,2	161/161/161	73/101/93
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	53-70-3	279,2	275,9	262,9	151/151	60/60
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	191-24-2	277,2	272,0	274,0 276,0	141/236/246	111/81/47
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	193-39-5	277,2	272,0	274,0 276,0	141/236/246	111/81/47
Criseno-d ₁₂ (Cri-d ₁₂)	1719-03-5	240,0	236,1	226	10	59

EP: Potencial de entrada = 10 V. APCI⁺: Ionização química à pressão atmosférica operando em modo de ionização positivo. DP: Potencial na fonte. CE: Energia de colisão. Q/C/C: Quantificação/Confirmação/Confirmação. Fonte: Adaptado de Melo et al. (2022b).

A cromatografia líquida em fase reversa empregou a fase estacionária Zorbax Eclipse PAH Rapid Resolution HT (2,1 × 100 mm, 1,8 μm, 95 Å) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EUA), mantida a 25 °C. Água (A) e acetonitrila (B) foram usadas como fases móveis, empregando gradiente de eluição do seguinte modo: 85% de B (0 – 1,0 min); 100% de B (1,0 – 11,5 min); 85% de B (11,5 – 12,0 min) e 4,0 min para auto equilíbrio do sistema. O fluxo e o volume de injeção foram definidos como 250 μL min⁻¹ e 10 μL, respectivamente. Os *softwares* Analyst® 1.7 HotFix 3 e MultiQuant™ 3.0 (Sciex, Framingham, EUA) foram utilizados para o controle do sistema e análise dos dados, respectivamente.

2.5 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DO MÉTODO

A performance do método foi avaliada de acordo com as orientações do manual do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2011) e Regulamento de Execução (EU) 2021/808 da União Europeia (EU, 2021) em termos de seletividade, faixa de trabalho, efeito de matriz, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade interna), exatidão (taxa de recuperação e veracidade), sensibilidade em termos de limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e limite de decisão (CC_α).

A seletividade foi verificada pela análise de amostras brancas (peixes), visando avaliar os possíveis interferentes endógenos e exógenos das matrizes, contaminações entre corridas e perfil de fragmentação dos analitos. Os resultados foram avaliados pela presença de picos interferentes em torno dos tempos de retenção dos analitos. Os cromatogramas de amostras brancas foram comparados antes e após serem fortificadas na concentração correspondente ao ponto central (5 μg kg⁻¹) da curva de calibração para cada analito.

As faixas de trabalho foram avaliadas através do preparo de curvas de calibração em matriz branca com padronização interna (criseno-d₁₂ em 20 μg kg⁻¹) na faixa de 5,00 a 20,0 μg kg⁻¹, exceto para B[a]P, cuja faixa variou de 1,25 a 20,0 μg kg⁻¹. Todas as curvas foram preparadas em triplicata.

A supressão ou aumento do sinal analítico na presença da matriz foi avaliada a partir de três tipos de curvas de calibração preparadas em triplicata: (I) padrão em solvente; (II) matriz branca; (III) extrato de matriz branca fortificada com padrão após o procedimento de extração. O efeito de matriz (%) e a taxa de recuperação (%) do procedimento de extração foram estimadas de acordo com Matuszewski et al. (2003).

A precisão (repetibilidade e reprodutibilidade interna) e a taxa de recuperação foram determinadas a partir da análise de seis réplicas de matriz branca fortificada em diferentes

concentrações dos analitos. Para todos os analitos, exceto B[a]P, os níveis de fortificação foram 1,25; 2,5; 5,00; 7,50 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para B[a]P, os níveis de fortificação 1,25; 2,5; 5,00; 7,50 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados quantitativos de HPAs foram obtidos por interpolação dos sinais analíticos em curvas de calibração preparadas em matriz no mesmo dia do experimento. O critério de aceitabilidade para a taxa de recuperação foi de 70 – 120% e para a precisão o coeficiente de variação (CV) < 30%.

A sensibilidade em termos de LOD foi estabelecido como o mais baixo nível de fortificação detectado com reprodutibilidade aceitável (CV < 30%). O LOQ foi estabelecido como o mais baixo nível de fortificação quantificado com recuperação aceitável (70 – 120 %) e veracidade (CV < 30%). Cada CC α foi obtido pela multiplicação do desvio-padrão da média das concentrações dos analitos nas amostras fortificadas e na amostra de referência pelo fator 1,64, ponderado na média global. Esse parâmetro foi calculado para o nível de fortificação de 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos, exceto B[a]P, que foi 2,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de CC α também foram estimados para os níveis de preocupação estabelecidos (6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes e 18,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para crustáceos) (BRASIL, 2019) com o objetivo de aumentar a confiabilidade na tomada de decisão.

A performance do método aplicado a matrizes biológicas foi avaliada em termos de seletividade conforme descrito acima. Além disso, o efeito de matriz e a recuperação foram avaliados de acordo com Matuszewski et al. (2003). A veracidade foi avaliada utilizando uma amostra de material de referência certificado (CRM) fornecido pela FAPAS (*Proficiency testing from Fera Science*, Londres, Reino Unido). O CRM consistia aproximadamente 50 g de peixe defumado (número do item 0693, código do produto FCCE₂-SEA₂₅) com os seguintes valores designados e respectivos desvios-alvo: 33 \pm 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[a]A), 34 \pm 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Cri), 18 \pm 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[b]F), 10 \pm 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[a]P), 5 \pm 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[ghi]P) e 98 \pm 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (4HPAs). O *z-score* foi calculado para cada HPA contido no CRM. A performance do método foi considerada satisfatória quando valores de *z-score* \leq |2,0|.

2.6 AVALIAÇÃO DE RISCO

Estatísticas paramétricas e não paramétricas foram utilizadas no pré-tratamento dos dados. Foram aplicados teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) e estatística básica (média, mediana, desvio padrão, variação e percentil). O modelo determinístico de exposição alimentar crônica e a abordagem da margem de exposição (MOE) foram utilizados para a avaliação de risco para consumidores de peixe, camarão e lagosta de ambos os sexos. Os

consumidores foram estratificados nas cinco regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul).

A equação 1 foi usada para estimar a exposição dietética em três cenários diferentes cenários. No primeiro cenário, foram consideradas as concentrações médias encontradas experimentalmente de B[a]P, 4HPAs e 8HPAs. No cenário hipotético de “piores caso” (cenário 2), as concentrações mais altas quantificadas experimentalmente de B[a]P, 4HPAs e 8HPAs foram utilizadas para cálculo. Quando as concentrações do analito foram inferiores ao respectivo LOQ, os valores do LOQ foram divididos pela metade: 2,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[a]A, Chry, B[b]F, B[k]F, DB[a,h]A, B[ghi]P e I[cd]P) e 0,62 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B[a]P). No terceiro cenário, o risco foi avaliado nos níveis de preocupação estabelecidos para B[a]P pela Agência Nacional de Saúde: 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes e 18,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para outros tipos de pescado (BRASIL, 2010). Os dados de consumo diário (kg) e peso corporal da população (kg) foram obtidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Tabela 2) (IBGE, 2020a, 2020b).

$$\text{Exposição dietética estimada (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração do HPA (mg kg}^{-1}\text{)} \times \text{consumo médio diário (kg)}}{\text{Massa corporal média da população (kg)}} \quad (1)$$

Tabela 2 – Valores médios para consumo diário de pescado (kg) e massa corporal (kg) da população brasileira, estratificados por regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) e sexo (feminino e masculino).

Estratificação	Consumo médio diário de pescado (kg) ^a		Massa corporal média (kg) ^b		
	Peixe	Outros tipos de pescado	Sexo	Sexo	
			feminino	masculino	
Regiões geográficas	Norte	0,0450	0,0012		
	Nordeste	0,0190	0,0007		
	Centro-Oeste	0,0092	0,0000	66	76
	Sudeste	0,0061	0,0002		
	Sul	0,0074	0,0002		

^a: Dados extraídos de inquéritos recordatórios registrados durante dois dias não consecutivos ($n = 38.854$) (IBGE, 2020a). ^b: Dados extraídos de questionários antropométricos respondidos por indivíduos do sexo feminino ($n = 89.180$) e masculino ($n = 79.247$) com idade ≥ 15 anos (IBGE, 2020b).

Os valores estimados da exposição dietética foram aplicados na abordagem MOE (Equação 2). De acordo com a *European Food Safety* (EFSA, 2008), Valores de MOE próximos

ou inferiores a 10.000 indicam potencial preocupação à saúde pública. Por outro lado, valores de MOE maiores ou iguais a 10.000 indicam baixa preocupação à saúde pública. Foram considerados os seguintes valores de referência para um aumento de 10% da incidência de tumores em animais, com 95% de probabilidade de acerto (BMDL₁₀): 0,07 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia para B[a]P, 0,34 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia para 4HPAs e 0,49 mg kg⁻¹ peso corporal por dia para 8HPAs (EFSA, 2008).

$$\text{Margem de exposição (MOE)} = \frac{\text{BMDL}_{10} \text{ (mg kg}^{-1} \text{ massa corporal por dia)}}{\text{Exposição dietética estimada (mg kg}^{-1})} \quad (2)$$

Onde BMDL₁₀: Dose mais baixa (de referência) que aumentou em 10% a incidência de câncer em animais, com 95% probabilidade de acerto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DISPERSIVA GUIADA ENERGIZADA (EDGE)

Com o uso do sistema automatizado EDGE foi possível extrair oito HPAs de um amplo escopo de matrizes (peixes, peixe defumado, crustáceos, órgãos e tecidos de animais), dentro de uma faixa de medição (1,25 µg kg⁻¹ – 39,4 mg kg⁻¹). Após o desastre com derramamento de petróleo, os desdobramentos das ações regulatórias investigativas demandaram o aumento da frequência analítica e da reprodutibilidade do método inicialmente desenvolvido por de Melo et al. (2022b). O novo método de extração teve como objetivo superar as limitações previamente reportadas, como a restrição do uso de solventes e reagentes, baixa frequência analítica e elevada incerteza (14%, k = 2,00) no procedimento de dispensar o volume do solvente de extração (MOLOGNONI et al., 2020; HOFF et al., 2020). Com o EDGE foi possível utilizar maior proporção de acetonitrila para favorecer a extração de compostos hidrofóbicos, como os HPAs. Nesse sentido, a automatização proporcionada pelo instrumento de extração, específico para uso laboratorial, tornou desnecessário testar diferentes proporções de água e acetonitrila, por ser mais resistente a danos químicos do que a máquina de cápsula de café *espresso* utilizada para extrair HPAs em nosso estudo anterior (De Melo et al., 2022b).

Cada extração EDGE levou apenas 3,5 min, incluindo o tempo de operação do auto-amostrador. Como a capacidade do instrumento é de 12 pontos por batelada de extração, o tempo total da operação foi pouco mais de uma hora. A reprodutibilidade conferida pela automação ao procedimento analítico viabilizou o aumento do número de replicatas por amostra

($n \geq 3$), diminuindo os erros randômicos ($CV < 5\%$). A automação do sistema EDGE também reduziu a propagação de erros grosseiros em relação a outros métodos de extração manuais. A incerteza relativa do procedimento de dispensar o solvente de extração para volumes de 30 mL foi de 1%. A otimização do tempo de residência do solvente durante a extração (3 min), proporcionou efetiva transferência de massa (analito - solvente), cujas taxas de recuperação variaram de 86 a 118%. O agente dispersor (Q-Matrix Hydra) promoveu a limpeza do extrato, removendo boa parte da carga matricial co-extraída. Nenhuma etapa adicional de limpeza do extrato foi necessária. Finalmente, a análise da amostra de referência de peixe fumado conduziu a uma recuperação de 103% para 4HPAs. Portanto, este método foi desenvolvido e validado com sucesso, apresentando bom desempenho mesmo para os resultados de B[a]A, Cri, B[b]F e B[a]P, aos quais está relacionada a propagação da soma dos erros (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados analíticos de um material de referência (peixe defumado) submetido à quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS).

Analito (abreviação)	Valor alvo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Desvio padrão alvo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média experimental ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Desvio padrão experimental ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (CV_r %, $n = 3$)	z -score ^b	Taxa de recuperação (%)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	33	7	36,9	0,7	2	0,6	113
Criseno (Cri)	34	7	21,5	0,2	1	-1,7	63
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	18	4	20	3	17	0,6	114
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	10	2	11,4	0,5	4	0,5	111
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	5	1	5,1	0,2	4	0,4	108
4HPAs	98	21	99	–	3	0,1	103

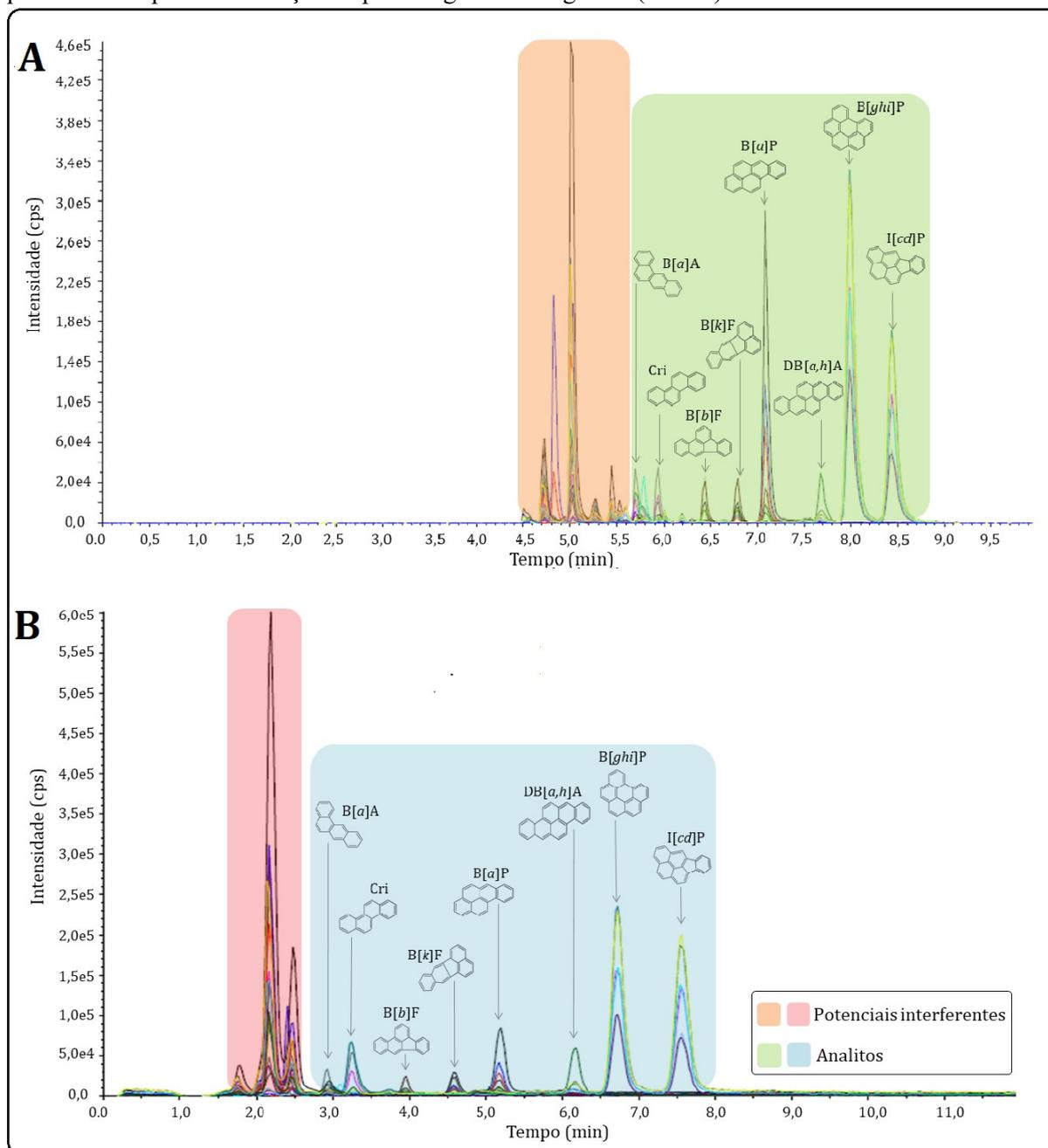
CV_r : Coeficiente de variação para repetibilidade. HPAs: Some de benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno e benzo[*a*]pireno. ^a: $n = 3$. ^b: Valores satisfatórios z -score $\leq |2,0|$.

3.2 ANÁLISE POR LC-APCI-MS/MS

A melhora da separação de B[a]A, Cri, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[ghi]P, e I[cd]P foi proporcionada pela cromatografia líquida em fase reversa. O novo gradiente de eluição, com maior proporção de solvente orgânico (Item 2.4), associado à redução do fluxo para 250 $\mu\text{L min}^{-1}$, aumentou a resolução dos picos (Figura 2). O fator de separação dos isômeros B[a]A e Cri, B[b]F e B[k]F, B[k]F e B[a]P, e B[ghi]P e I[cd]P aumentou em 20%. Essas melhorias também facilitaram o processamento dos cromatogramas, permitindo a utilização de integração automática, o que antes não era possível. As etapas de co-cromatografia para confirmar os resultados de B[a]A (LOQ = 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) não foram mais necessárias. O tempo de retenção relativo de B[a]A na presença de interferentes de matriz foi 30% maior, aumentando a seletividade do novo método LC-APCI-MS/MS.

Por outro lado, a redução do fluxo não afetou a ionização na fonte APCI. Kolakowski et al. (2004) estudaram a performance da ionização APCI de HPAs com diferentes solventes na fase móvel. A acetonitrila proporcionou a maior capacidade de ionização por transferência de prótons, seguida de suas soluções preparadas em baixa proporção aquosa. O sinal analítico permaneceu intenso mesmo com as condições previamente otimizadas definidas para APCI. A ionização dos analitos permaneceu robusta, mesmo após as alterações dos parâmetros cromatográficos definidos para o novo método. Como o SRM não trouxe nenhuma melhoria à análise dos HPAs, as configurações da espectrometria de massa não precisaram de nenhuma alteração. Portanto, concluiu-se que a cromatografia líquida foi fundamental para garantir a seletividade do método.

Figura 2 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de uma amostra de peixe fortificada com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em $5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, onde a parte A corresponde a extração dos analitos usando o método descrito por de Melo et al. (2022b) e a parte B corresponde a extração dispersiva guiada energizada (EDGE).



B[a]A: Benzo[a]antraceno. Cri: Criseno. B[b]F: Benzo[b]fluoranteno. B[k]F: Benzo[k]fluoranteno. B[a]P: Benzo[a]pireno. DB[a,h]A: Dibenzo[a,h]antraceno. B[ghi]P: Benzo[ghi]perileno. I[cd]P: Indeno[1,2,3-*cd*]pireno. Part A: B[a]A (5,7 min); Cri (5,9 min); B[b]F (6,4 min); B[k]F (6,8 min); B[a]P (7,1 min); DB[a,h]A (7,5 min); B[ghi]P (8,0 min); I[cd]P (8,4 min). Part B: B[a]A (3,0 min); Cri (3,5 min); B[b]F (4,0 min); B[k]F (4,8 min); B[a]P (5,4 min); DB[a,h]A (6,3 min); B[ghi]P (6,9 min); I[cd]P: (7,8 min).

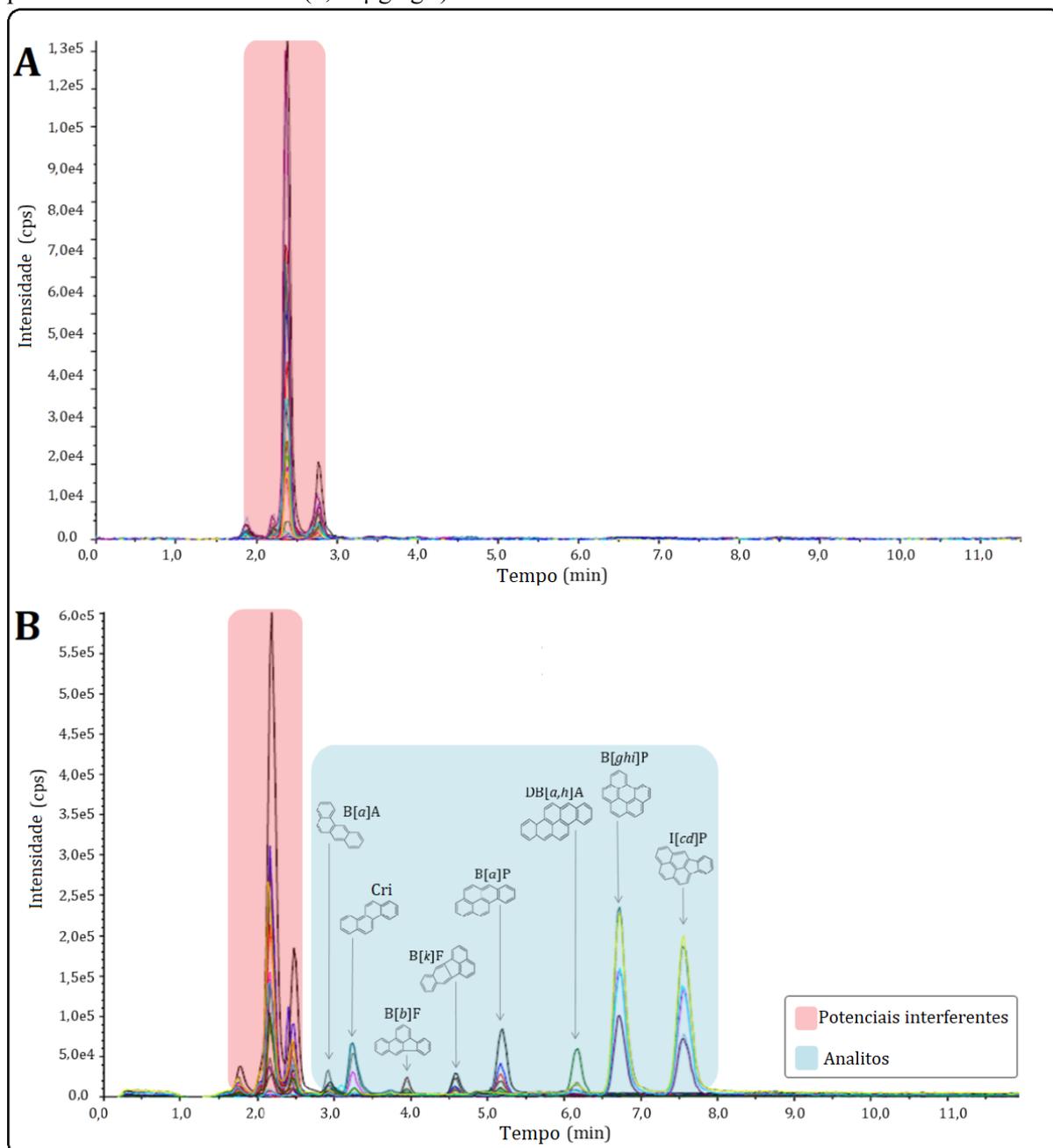
3.3 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DO MÉTODO

A ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno (Figura 3) confirmou a seletividade do método. O tempo de auto equilíbrio do sistema de 5 min foi suficiente para garantir a limpeza do sistema entre as corridas.

A calibração em matriz foi usada para a quantificação dos HPAs, pois o efeito de matriz levou à supressão de íons que produziu erros relativos superiores a 20% para todos os analitos. A calibração em matriz com padronização interna foi linear nas faixas de trabalho definidas para a validação do método, produzindo coeficientes de regressão médios (R^2 , $n = 3$) superiores a 0,96. Este era um achado já esperado, uma vez que a ionização APCI é menos suscetível a erros sistemáticos produzidos por compostos co-extraídos da matriz (FUREY et al., 2013).

Mesmo sendo aplicado a matrizes complexas, o método LC-APCI-MS/MS se mostrou adequado para quantificar isômeros em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$), o que foi confirmado pela precisão e exatidão satisfatórias. A repetibilidade (CV_r) e reprodutibilidade interna (CV_{zi}) do método foram satisfatórias, com valores de $CV < 30\%$ (Tabela 4). As taxas de recuperação ficaram de acordo com critérios de aceitabilidade de 70 – 120%, exceto para B[a]A (128%), Cri (122%) e DB[a,h]A (126%). No entanto, como os resultados da análise da amostra de referência de peixe defumado foram satisfatórios para todos os analitos ($z\text{-score} \leq |2,0|$), as taxas de recuperação foram consideradas adequadas.

Figura 3 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de uma amostra de peixe fortificada com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em $5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, onde a parte A corresponde a uma amostra branca de peixe e a parte B corresponde a uma amostra branca de peixe fortificada com HPAs ($5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$).



B[a]A: Benzo[a]antraceno (3,0 min). Cri: Criseno (3,5 min). B[b]F: Benzo[b]fluoranteno (4,0 min); B[k]F: Benzo[k]fluoranteno (4,8 min). B[a]P: Benzo[a]pireno (5,4 min). DB[a,h]A: Dibenzo[a,h]antraceno (6,3 min). B[ghi]P: Benzo[ghi]perileno (6,9 min). I[cd]P: Indeno[1,2,3-cd]pireno (7,8 min).

Tabela 4 – Performance de validação do método de extração dispersiva guiada energizada (EDGE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de pescado.

Analito (abreviação)	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade (CV_r , %)	Reprodutibilidade interna (CV_{zi} , %)	Taxa de recuperação (%)	CC_α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	5,00	20	24	113	7,1
	7,50	6		128	
	10,0	5		112	
Criseno (Cri)	5,00	20	26	122	7,6
	7,50	13		95	
	10,0	14		79	
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	5,00	7	16	97	6,3
	7,50	5		94	
	10,0	6		94	
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	5,00	20	23	112	7,1
	7,50	14		104	
	10,0	9		97	
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	1,25	16	25	114	2,9
	2,50	13		101	
	5,00	9		94	
	7,50	10		96	
	10,0	9		88	
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	5,00	19	28	126	7,8
	7,50	6		103	
	10,0	9		95	
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (B[<i>ghi</i>]P)	5,00	10	12	107	6,8
	7,50	9		94	
	10,0	3		77	
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	5,00	10	14	115	7,2
	7,50	11		91	
	10,0	4		83	

CV_r : Coeficiente de variação para repetibilidade. CV_{zi} : Coeficiente de variação para reprodutibilidade interna. CC_α : Limite de decisão, calculado em $5,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos, exceto B[*a*]P, que foi $2,50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A sensibilidade do método foi satisfatória ao propósito, com LODs que variaram de 0,90 a 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQs entre 1,25 e 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para B[a], reconhecido pela IARC como carcinogênico para humanos, os limites foram ainda mais baixos para este novo método (LOD = 0,90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ = 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os valores de CC_a ficaram entre 2,9 e 7,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando os níveis de preocupação definidos pela agência regulatória de saúde brasileira (ANVISA) após o desastre (BRASIL, 2019) para B[a]P em amostras de peixe (6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e crustáceos (18,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), uma amostra será considerada não conforme se a concentração de B[a]P quantificada pelo novo método for superior a 7,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peixes) ou 20,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (crustáceos).

3.4 PRIMEIRO MONITORAMENTO OFICIAL BRASILEIRO DE HPAS EM PESCADO

O novo método EDGE-LC-APCI-MS/MS foi aplicado a 238 amostras coletadas pelo primeiro programa oficial brasileiro de monitoramento de HPAs em pescado baseado em risco (Tabela 5). A faixa de concentração de HPAs compreendeu valores de até 69,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Pelo menos um HPA foi quantificado em 15% das amostras ($n = 37$), com exceção dos compostos I[cd]P e B[ghi]P, que não foram quantificados em nenhuma amostra. O composto carcinogênico B[a]P estava presente em apenas 4% das amostras ($n = 9$), em concentrações entre <LOQ a 42,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os HPAs classificados pela IARC (2010, 2018) como provavelmente carcinogênicos também foram quantificados, em concentrações entre <LOQ a 69,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o B[a]A (6%, $n = 15$); de <LOQ a 15,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o B[b]F (4%, $n = 9$) e de <LOQ a 24,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o Cri (4%, $n = 9$). O composto B[k]F, classificado pela IARC como possivelmente carcinogênico, foi também quantificado em 6% das amostras ($n = 15$), com concentrações que variaram de <LOQ até 13,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 5 – Faixa de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de pescado pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil (SIF) em toda a costa brasileira.

Analito (abreviação)	Peixe ($n = 183$; $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Camarão ($n = 53$; $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Lagosta ($n = 2$; $\mu\text{g kg}^{-1}$)
Benzo[a]antraceno (B[a]A)	< LOQ – 69,3	< LOQ – 28,9	< LOQ
Criseno (Cri)	< LOQ – 24,6	< LOQ – 5,77	< LOQ
Benzo[b]fluoranteno (B[b]F)	< LOQ – 15,7	< LOQ – 16,7	< LOQ

Análito (abreviação)	Peixe (n = 183; µg kg⁻¹)	Camarão (n = 53; µg kg⁻¹)	Lagosta (n = 2; µg kg⁻¹)
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	< LOQ – 13,8	< LOQ – 9,65	< LOQ
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	< LOQ – 42,7	< LOQ – 42,0	< LOQ
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	< LOQ – 13,5	< LOQ – 12,5	< LOQ
Benzo[<i>ghi</i>]perileno B[<i>ghi</i>]P	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4HPAs	< LOQ – 117	< LOQ – 50,2	< LOQ
8HPAs	< LOQ – 138	< LOQ – 71,2	< LOQ

4HPAs: Soma de benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno e benzo[*a*]pireno. 8HPAs: Soma de benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno. LOQ: Limite de quantificação, onde benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno = 5,00 µg kg⁻¹; benzo[*a*]pireno = 1,25 µg kg⁻¹.

A taxa de amostras não conforme foi baixa (< 2%) em relação aos níveis de preocupação estabelecidos pela ANVISA após o desastre para B[*a*]P: 6 µg kg⁻¹ para peixes; 18 µg kg⁻¹ para moluscos e crustáceos (BRASIL, 2019). No entanto, a EFSA demonstrou que em 30% de aproximadamente 10.000 amostras de alimentos continham outros HPAs genotóxicos e carcinogênicos, mesmo quando o B[*a*]P não foi quantificado (EFSA, 2008). Os conjuntos 4HPAs ou 8HPAs são os marcadores mais adequados de contaminação de alimentos com HPAs pois foram mensurados em 80% das amostras do estudo da EFSA. Em nosso estudo, a concentração de 4HPAs em peixes foi de até 117 µg kg⁻¹, enquanto para 8HPAs foi de até 138 µg kg⁻¹. As maiores concentrações em peixes foram encontradas em amostras do estado do Espírito Santo. A concentração de 4HPAs em camarão e lagosta foi de até 50,2 µg kg⁻¹ enquanto para 8HPAs foi de até 71,2 µg kg⁻¹. As maiores concentrações em lagosta e camarão foram encontradas em amostras do estado do Ceará. Os estados do Ceará e do Espírito Santo possuem extensos litorais e, portanto, foram severamente impactados pelo desastre.

A extração e quantificação de HPAs atendeu à demanda de monitoramento de alto rendimento imposta após o derramamento de petróleo. O padrão de HPAs do monitoramento oficial apresentou algumas diferenças em relação ao nosso estudo anterior (DE MELO et al.,

2022b). A porcentagem de amostras em que foi quantificado pelo menos um HPA foi inferior (15%) à das amostras de pescado colhidas logo após o desastre de 2019 (43,6%). No entanto, os resultados do monitoramento evidenciaram um maior número de amostras não conformes (2%). Antes do monitoramento, pelo menos um HPA foi quantificado em 43,6% das amostras ($n = 48$), embora todas estivessem em conformidade com os níveis de preocupação (DE MELO et al., 2022b). Esses padrões diferenciados já eram esperados, devido ao aumento do número de amostras coletadas para monitoramento em relação ao início da investigação do derramamento de petróleo ($n = 139$).

As amostras de monitoramento apresentaram padrão de concentração de HPAs semelhante ao encontrado por Magalhães et al. (2022) quando 194 amostras de pescado foram analisadas após o mesmo desastre. Embora o escopo dos analitos naquela investigação fosse mais amplo, a amostragem foi limitada a um único estado brasileiro (Pernambuco). A amostragem do monitoramento oficial deste estudo abrangeu mais de 20 estados, superando tal limitação. Não obstante, Magalhães et al. (2022) também concluíram que pescado local era seguro para consumo, pois menos de 3% das amostras representavam um risco para a saúde humana.

3.5 AVALIAÇÃO DE RISCO

Quando as concentrações médias de B[a]P, 4HPAs e 8HPAs em peixes ($0,92 \mu\text{g kg}^{-1}$, $9,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) e outros tipos de pescado ($4,23 \mu\text{g kg}^{-1}$, $21 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $42 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) foram consideradas, o risco foi de baixa preocupação à saúde dos consumidores de pescado no Brasil, com valores de MOE superiores a 10.000 (Tabela 6). No cenário hipotético de “piores caso”, onde o risco foi avaliado sob condições extremas, foram consideradas as concentrações quantificadas mais altas de B[a]P, 4HPAs e 8HPAs em peixes ($42,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, $117 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $138 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) e outros tipos de pescado ($42,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, $50,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $71,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Nesse cenário, a avaliação de risco destacou a potencial preocupação para os consumidores das regiões Norte e Nordeste do Brasil, com valores de MOE inferiores a 10.000. Esse fato foi associado ao elevado consumo de pescado nessas regiões (45 g dia^{-1} e 19 g dia^{-1} , respectivamente). Em outras regiões brasileiras, onde o consumo de pescado é menor, os valores do MOE indicaram baixa preocupação à saúde. No terceiro cenário, quando considerados os níveis de preocupação estabelecidos pelo governo brasileiro (BRASIL, 2019), o risco também foi de baixa preocupação. O fato de ter sido estabelecido um nível de preocupação para um único HPA (B[a]P) limitou este terceiro cenário.

Além disso, não é apropriado considerar o B[a]P como único marcador para avaliar a contaminação de alimentos com HPAs (EFSA, 2008).

Algumas limitações da abordagem de MOE ficaram evidentes neste estudo. Esta abordagem baseia-se em dados demográficos atualizados sobre a população exposta ao risco, que inclui o consumo de pescado, faixa etária, sexo e peso corporal médio da população. A abordagem MOE considerou os resultados de HPAs de amostras recolhidas entre 2021 e 2022. Assim, houve uma defasagem temporal, uma vez que os dados demográficos mais recentes se referiam ao censo populacional de 2017 – 2018. Além disso, divergências na estratificação desses dados por faixa etária impediram a estimativa do risco para crianças e idosos. Também não existiam dados sobre o consumo de pescado por mulheres grávidas, o que também comprometeu a avaliação de risco para subgrupos vulneráveis. Como estes subgrupos incluem indivíduos mais suscetíveis à exposição a substâncias tóxicas, pode-se concluir que a disponibilidade de dados demográficos coerentes é essencial para melhorar a avaliação de risco e, assim, promover uma proteção mais eficaz da saúde pública.

Tabela 6 – Valores de margem de exposição (MOE) obtidos pela avaliação de risco pela exposição dietética aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de consumidores de pescado no Brasil, estratificado por sexo (feminino e masculino) e regiões geográficas (Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste).

MOE	Peixe						Outros tipos de pescado						
	B[a]P	HPAs	8HPAs	B[a]P	4HPAs	8HPAs	B[a]P	4HPAs	8HPAs	B[a]P	4HPAs	8HPAs	
Sexo	Feminino			Masculino			Feminino			Masculino			
Regiões geográficas	Norte	111.521	52.496	36.044	128.419	60.450	41.505	907.121	894.404	642.613	1.044.564	1.029.920	739.979
	Nordeste	266.939	125.656	86.274	307.385	144.695	99.346	1.555.065	1.533.265	1.101.623	1.790.681	1.765.578	1.268.535
	Centro-Oeste	545.485	256.775	176.300	628.134	295.681	203.012	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	Sudeste	822.698	387.268	265.895	947.350	445.945	306.182	5.442.726	5.366.427	3.855.680	6.267.382	6.179.521	4.439.874
	Sul	678.170	319.234	219.184	780.923	367.603	252.393	5.442.726	5.366.427	3.855.680	6.267.382	6.179.521	4.439.874

Os cálculos consideraram a concentração média mensurada de B[a]P: benzo[a]pireno (0,92 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixe e 4,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para outros tipos de pescado). 4HPAs: Soma de benzo[a]pireno, criseno, benzo[a]antraceno, e benzo[b]fluoranteno (9,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixe e 21,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para outros tipos de pescado). 8HPAs: Soma de benzo[a]pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, e indeno[1,2,3-cd]pireno (20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixe e 42,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para outros tipos de pescado). NE: Não estimado.

3.6 APOIO LABORATORIAL À INVESTIGAÇÃO FORENSE

Pelo menos um HPA foi quantificado nas amostras ($n = 24$) de investigação forense do desastre (Tabela 7). O B[a]P foi o HPA mais frequente, quantificado em 20 amostras (83%), em concentrações que variaram de 4,46 a 9.860 $\mu\text{g kg}^{-1}$. B[b]F, presente em 7 amostras (30%), foi o HPA com a maior concentração mensurada (39.456 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em fígado de tartaruga). B[a]A e B[k]F foram quantificados em 13 amostras (54%), com concentrações que variaram de <LOQ a 15.836 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de <LOQ a 39.400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Cri estava presente em 50% das amostras ($n = 12$), com resultados entre <LOQ e 13.738 $\mu\text{g kg}^{-1}$. B[ghi]P e I[cd]P estavam presentes em 21% das amostras ($n = 5$), com resultados entre <LOQ a 4.640 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e <LOQ a 873 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. DB[a,h]A foi o HPA com menor frequência quantificado, com concentrações entre <LOQ e 724 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 12,5% das amostras ($n = 3$). As maiores concentrações de HPAs foram mensuradas em tartarugas. Isso já era esperado, uma vez que as tartarugas foram as espécies da fauna mais impactadas pelo derramamento de petróleo, segundo o relatório brasileiro (BRASIL, 2020).

Tabela 7 – Faixas de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* com ionização química a pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS) em amostras forenses do derramamento de petróleo.

Analito (abreviação; $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pássaros			Golfinhos			Cágados	Tartarugas	
	Fígado (<i>n</i> = 3)	Pena (<i>n</i> = 1)	Estômago (<i>n</i> = 1)	Fígado (<i>n</i> = 4)	Pele (<i>n</i> = 1)	Coágulo hepático (<i>n</i> = 1)	Fígado (<i>n</i> = 3)	Fígado (<i>n</i> = 6)	Rim (<i>n</i> = 4)
Benzo[<i>a</i>]antraceno (B[<i>a</i>]A)	< LOQ	107	< LOQ	< LOQ – 998	450	267	30,2 – 1.589	< LOQ – 15.836	< LOQ – 176
Criseno (Cri)	< LOQ	87,6	< LOQ	< LOQ – 19,0	< LOQ	< LOQ	< LOQ – 306	< LOQ – 13.738	< LOQ – 169
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (B[<i>b</i>]F)	< LOQ	390	< LOQ	< LOQ	21,6	20,8	< LOQ – 68,3	< LOQ – 39.456	< LOQ – 473
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (B[<i>k</i>]F)	< LOQ – 673	92,7	< LOQ	< LOQ – 1.432	519	< LOQ	< LOQ – 1.995	< LOQ – 39.400	< LOQ – 844
Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	< LOQ – 67,1	133	4,46	< LOQ – 284	147	64,6	42,6 – 92,1	< LOQ – 9.860	9.86 – 116
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno (DB[<i>a,h</i>]A)	< LOQ	11,74	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ – 724	< LOQ – 10,4
Benzo[<i>ghi</i>]perileno B[<i>ghi</i>]P	< LOQ	64,7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ – 99,3	< LOQ – 4.640	< LOQ – 67,5
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno (I[<i>cd</i>]P)	< LOQ	19,8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	6,47	< LOQ – 28,4	< LOQ – 873	< LOQ – 14,6

LOQ: Limite de quantificação, onde benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, dibenzo[*a,h*]antraceno, e indeno[1,2,3-*cd*]pireno = 5,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$; benzo[*a*]pireno = 1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A versatilidade deste método foi demonstrada pela análise de outras matrizes complexas como amostras de órgãos e tecidos. Essas amostras foram analisadas para atender à demanda emergencial da investigação forense conduzida pela Polícia Federal brasileira. Devido à grande diversidade desses materiais, alguns dos quais disponíveis em quantidade limitada (0,5 – 2,0 g), foi impossível validar um método analítico para cada matriz. Essas amostras eram ocasionais, portanto, não faziam parte da rotina do laboratório. Por outro lado, foi realizada a validação completa para as matrizes alimentares destinadas à análise de rotina e que apresentam maior impacto na saúde pública. Não obstante, a validade dos resultados foi garantida pela ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos, cujas intensidades relativas (em cps) entre as transições de confirmação/quantificação foram superiores a 20%. A veracidade e a precisão (repetibilidade) foram demonstradas pela análise da amostra de referência de peixe defumado, cujos resultados experimentais concordaram com os valores atribuídos ($z\text{-score} \leq |2,0|$) para todos os analitos, incluindo o conjunto de marcadores 4HPAs (Tabela 3). Apesar de originalmente destinado à análise de pescado, o método LC-APCI-MS/MS também se mostrou adequado para a análise de órgãos e tecidos, desempenhando um papel fundamental na investigação forense e revelando novas faixas de medição. As altas concentrações de HPAs corroboraram a contaminação de aves, mamíferos e répteis com petróleo, servindo como elementos de condenação para indiciar um petroleiro por crime de poluição, danos às unidades de conservação e descumprimento de política de proteção ambiental.

4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido atendeu ao propósito de produzir resultados confiáveis tanto para análises de rotina de HPAs em pescado quanto para as amostras coletadas como prova criminal do derramamento de petróleo. A extração rápida e reprodutível de HPAs foi aplicada a diversas matrizes biológicas, aumentando o rendimento analítico. Dados metrológicos confiáveis foram produzidos para o primeiro plano oficial brasileiro de monitoramento de HPAs em pescado. Apesar da baixa ocorrência de amostras não conformes, foram quantificados HPAs com potencial carcinogênico. O derramamento de petróleo foi de baixa preocupação para a saúde dos consumidores de pescado, mesmo com a disponibilidade limitada de dados demográficos relativos a subgrupos vulneráveis. Esse método também foi útil para a investigação forense do desastre brasileiro de 2019, uma vez que confirmou a contaminação dos animais mortos. Com a recorrência de pequenas quantidades de petróleo bruto na costa

brasileira, mais de quatro anos após o desastre, é importante continuar monitorando os HPAs em pescado. Além disso, a exposição dos consumidores aos HPAs deverá ser mantida tão baixa quanto razoavelmente possível.

5 REFERÊNCIAS

- ANDREAS et al. Microplastic contamination in the Skipjack Tuna (*Euthynnus affinis*) collected from Southern Coast of Java, Indonesia. **Chemosphere**, v. 276, p. 130185, 2021.
- BRASIL. **Manual de Garantia de Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. 1. ed. Brasília: ACS/MAPA, 2011.
- BRASIL. **Nota Técnica Nº 27/2019/SEI/GGALI/DIRE2/ANVISA - Riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil**, 2019a.
- BRASIL. **Nota Técnica Nº 27/2019/SEI/GGALI/DIRE2/ANVISA - Riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil**, 2019a.
- BRASIL. **Incidente de Poluição por Óleo na Costa Brasileira - Relatório Final**, 2020.
- DE MELO, A. P. Z. et al. Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, v. 157, p. 111366, 2022a.
- DE MELO, A. P. Z. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill. **Food Analytical Methods**, n. 0123456789, 2022b.
- DÍAZ-GALIANO, F. J. et al. Presence of anthraquinone in coffee and tea samples. An improved methodology based on mass spectrometry and a pilot monitoring programme. **Analytical Methods**, v. 13, p. 99 – 109, 2021.
- EÇA, G. F et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and shellfish from Todos os Santos bay, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 173, p. 112944, 2021.
- EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **European Food Safety Authority Journal**, v. 724, p. 1–114, 2008.
- EU. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. **Official Journal of the European Communities**, p. L180/84 - L180/109, 2021.
- FDA. Protocol for Interpretation and Use of Sensory Testing and Analytical Chemistry Results for Re-Opening Oil-Impacted Areas Closed to Seafood Harvesting Due to The Deepwater Horizon Oil Spill Food and Drug Administration. **Food and Drug Administration**, 2010.
- FEIJÓ, L. D.; COSTA, H. B. A.; DANTAS, R. M. Análise de risco e segurança dos alimentos. In: **Elementos de defesa agropecuária: sistema normativo, invasões biológicas, comunicação, história, risco e segurança dos alimentos, conformidade e rastreabilidade**. Edição de Evaldo Ferreira Vilela e Geraldo M. Callegaro. Piracicaba: FEALQ, p.133-160, 2013.

HOFF, R. B. et al. Determination of 62 veterinary drugs in feedingstuffs by novel pressurized liquid extraction methods and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1152, p. 122232, 2020.

IARC. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Some Related Exposures**. 92. ed. Lyon: WHO Press, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Red Meat and Processed Meat**. 114 ed. Lyon: WHO Press, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: Análise de consumo alimentar pessoal no Brasil**, p. 1 – 125, 2020a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019: Informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde**, p. 1 – 85, 2020b.

KHALILI, F. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat, poultry, fish and related product samples of Iran: a risk assessment study. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 21, n. 1, p. 215-224, 2023.

KOLAKOWSKI, B. M. et al. The importance of both charge exchange and proton transfer in the analysis of polycyclic aromatic compounds using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, p. 301 – 310, 2004.

MAGALHÃES, K. M et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, p. 113334, 2022.

MASSONE, C. G et al. A baseline evaluation of PAH body burden in sardines from the southern Brazilian shelf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 163, p. 111949, 2021.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 293 – 300, 2006.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019 – 3030, 2003.

MOLOGNONI, L. et al. Assessing the mutagens ethylnitrolic acid and 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products: Sample preparation and simultaneous analysis by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1609, p. 460512, 2020.

MOAZZEN, M. et al. Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food samples in Tehran, Iran with magnetic-solid-phase-extraction and gas-chromatography/mass-spectrometry method: a health risk assessment. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 833158, 2022.

NAGHASHAN, M. et al. Health risk assessment of PAHs in fruit juice samples marketed in city of Tehran, Iran. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 8, p. 20077-20088, 2023.

SUN, J. et al. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Laizhou, Rushan and Jiaozhou, bays of China, and investigation of its relationship with human carcinogenic risk. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111556, 2020b.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objeto de estudo desta tese foi avaliar a contaminação de pescado com HPAs devido ao derramamento de petróleo no litoral do Brasil. Para isso, foram abordados conteúdos científicos de caráter interdisciplinar, abrangendo importantes áreas como Ciência dos Alimentos, Química Analítica, Toxicologia, Estatística, Saúde Pública, entre outras.

Foram desenvolvidos métodos analíticos de forma rápida e com confiabilidade metrológica dos resultados para apoiar as autoridades reguladoras no enfrentamento do desastre com petróleo. Com a implementação dos métodos, foi possível analisar mais de 400 amostras e consolidar o primeiro programa oficial brasileiro de monitoramento de HPAs em pescado. Apesar do baixo índice de amostras não conformes (< 1%), os HPAs foram mensurados em 23% das amostras de pescado ($n = 85$), demonstrando a importância de monitorar esses compostos em âmbito nacional.

Com os dados do monitoramento foi possível avaliar o risco à saúde dos consumidores de pescado. Os resultados da avaliação de risco indicaram baixa preocupação à saúde. No entanto, a divergência de informação quanto à faixa etária do censo populacional brasileiro limitou a avaliação de importantes subgrupos vulneráveis como crianças, idosos e mulheres grávidas. Os resultados obtidos neste estudo podem fornecer respaldo científico às autoridades reguladoras para a definição de limites regulatórios para HPAs em pescado, ao invés de herdar limites de outros países.

A importância da produção científica desta tese foi reconhecida através de publicações em periódicos internacionais de alto fator de impacto e menção honrosa em simpósio internacional (Apêndice A). O conhecimento adquirido durante a fundamentação teórica gerou contribuições em trabalhos apresentados em simpósios/conferências nacionais e internacionais. Até o momento, foram contabilizadas 18 citações aos artigos produzidos com esta tese na base de dados *Scopus*, com impacto de citação ponderado por campo (FWCI) acima de 5. Os produtos deste estudo também foram citados por agências e órgãos internacionais como a *United States Departamento of Agriculture (USDA)* e a *International Spill Control Organization*. Portanto, esta tese demonstrou a importância do esforço conjunto de pesquisadores e agências reguladoras no enfrentamento de um dos maiores desastres com petróleo do mundo para evitar prejuízos à economia pesqueira e garantir a segurança de milhares de consumidores de pescado do Brasil.

APÊNDICE A: PRODUTOS DA TESE

Publicação no periódico *Food Research International* (Editora Elsevier).

Food Research International 157 (2022) 111366



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Review 

Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods

Ana Paula Zapelini de Melo^a, Rodrigo Barcellos Hoff^{b,*}, Luciano Molognoni^{b,c},
Thais de Oliveira^{a,b}, Heitor Daguer^b, Pedro Luiz Manique Barreto^a

^a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, SC 88034-100, Brazil
^b Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada em Santa Catarina (SLAV/SC/LFDA/RS), São José, SC 88102-600, Brazil
^c Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária (ICASA), Florianópolis, SC 88034-100, Brazil

Publicação no periódico *Food Analytical Methods* (Editora Springer Nature).

Food Analytical Methods
<https://doi.org/10.1007/s12161-022-02252-z>



Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill

Ana Paula Zapelini de Melo¹ · Rodrigo Barcellos Hoff² · Luciano Molognoni^{2,3} · Cristian Rafael Kleemann^{2,3} ·
Thais de Oliveira² · Luan Valdemiro Alves de Oliveira^{1,2} · Heitor Daguer² · Pedro Luiz Manique Barreto¹

Received: 23 July 2021 / Accepted: 3 March 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Certificado de Menção Honrosa no Simpósio Internacional da Associação Brasileira para a Proteção dos Alimentos (ABRAPA) 2023.



POSTER P51

**USE OF PLACKETT-BURMANN DESIGN TO OPTIMIZE ANALYTICAL METHODS OF VETERINARY DRUGS AND FOOD CONTAMINANTS**Heitor Daguer¹, Cristina Bosch Orea², Ana Paula Z de Melo³, Carolina T P Deolindo^{1,3} and Rodrigo Hoff¹¹Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, Federal Laboratory of Animal and Plant Health and Inspection - LFDA/RS, SLAV/SC, Rua João Grumiche, 117, São José, SC, Brazil²Water and Soil Quality Research Group, Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, C/Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Spain.³Federal University of Santa Catarina (UFSC), Centre of Agrarian Sciences (CCA), Food Science Postgraduate Program (PPGCA), Av. Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC, Brazil**Abstract**

Experimental design is a way to optimize analytical process minimizing time and the number of experiments to be

performed. However, when a high number of critical factors is involved, it is necessary a previous study to select the

main factors that impact method efficiency. The Plackett –Burman (PB) designs are a useful tool to this purpose.

Herein, we describe the assembly of a simple PB spreadsheet to be used for factors selection before the use of complete factorial designs. In the two described cases, PB was followed by Box-Behnken design, once the main impacting factors were set. The workflow was used for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and

pharmaceuticals in mussels, using matrix solid phase dispersion followed by pressurized liquid extraction (PLE) as

sample preparation techniques. In both cases, the critical factors were extraction solvent volume, amount of organic

solvent in the extraction solvent, sample mass, holding time in PLE, temperature (PLE), amount of solid phase (MSPD) and ratio of extraction solvent in the PLE system. The PB data analysis facilitated the observation of factors

with major influence under the analytes response before method optimization by Box-Behnken design.

Trabalho completo aprovado no I Simpósio Online Sulamericano de Tecnologia, Engenharia e Ciência de Alimentos (I TECALI).



Trabalho completo aprovado no I Simpósio Online Sulamericano de Tecnologia, Engenharia e Ciência de Alimentos (I TECALI).



Citação na United States Department of Agriculture (USDA).



DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA

Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Frutos do Mar por PLE-LC-APCI-MS/MS e Avaliação Preliminar de Risco do Derramamento de Óleo no Nordeste do Brasil

Autor: Ana Paula Zapelini de Melo , Rodrigo Barcellos Hoff , Luciano Molognoni , Cristian Rafael Kleemann Thais de Oliveira , Luan Valdemiro Alves de Oliveira , Heitor Daguer , Pedro Luiz Manique Barreto

Citação na *International Spill Control Organization*.



THE NEWSLETTER OF THE INTERNATIONAL
SPILL RESPONSE COMMUNITY
info@spillcontrol.org | www.spillcontrol.org

ISSUE 861 | 24 OCTOBER 2022

185 Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill

de Melo, A.P.Z., Hoff, R.B., Molognoni, L., Kleemann, C.R., de Oliveira, T., de Oliveira, L.V.A., Daguer, H., Barreto, P.L.M.
(2022) Food Analytical Methods, 15 (7), pp. 1826-1842.
DOI: 10.1007/s12161-022-02252-z