



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

Luana de Souza Futigami

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA COM  
APLICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FASES SÓLIDAS  
ALTERNATIVAS NA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS EM PESCADO**

[Florianópolis]

[2023]

Luana de Souza Futigami

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA COM  
APLICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FASES SÓLIDAS  
ALTERNATIVAS NA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS EM PESCADO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Vivian Maria Burin.

Coorientador: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff.

[Florianópolis]

[2023]

[2023]

Ficha de identificação da obra

Futigami, Luana de Souza

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA COM APLICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FASES SÓLIDAS ALTERNATIVAS NA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM PESCADO / Luana de Souza Futigami ; orientador, Vívian Maria Burin, coorientador, Rodrigo Barcellos Hoff, 2023.

133 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Dispersão de matriz em fase sólida. 3. Extração por líquido pressurizado. 4. Cromatografia gasosa. 5. Química analítica verde. I. Burin, Vívian Maria . II. Hoff, Rodrigo Barcellos . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Luana de Souza Futigami

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA COM  
APLICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FASES SÓLIDAS ALTERNATIVAS NA  
ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM PESCADO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Luciano Vitali, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Alicia de Francisco de Casas Dr.(a)  
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 mestre em Ciência dos alimentos.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Vívian Maria Burin, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Dedico a minha família, meus amigos e a todos que  
contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À orientadora, Profa. Dra. Vivian Maria Burin, por todos os anos de direcionamentos, por todo tempo e conhecimentos compartilhados. Obrigada por me incentivar e acreditar na minha capacidade.

Ao coorientador, Dr. Rodrigo Barcellos Hoff. Obrigada pela oportunidade, pelo seu tempo, paciência, dedicação, por todos os ensinamentos e principalmente pela tranquilidade e respeito com que você ensina e direciona aqueles que trabalham ao seu lado.

A banca examinadora, pelo tempo, conhecimentos compartilhados e considerações úteis para a melhoria deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, por me proporcionar uma formação de excelência. A todos os professores que fizeram parte da minha formação até o momento, pelo privilégio de ouvi-los.

À Profa. Dra. Alícia de Francisco, pelo seu tempo e ensinamentos compartilhados nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Carolina Deolindo da SLAV-SC-MAPA, pela paciência, dedicação, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados comigo. Ao Cristian Kleemann, que juntamente à Carolina, foi essencial e parte importante ao longo de todo desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A SLAV-SC- MAPA, por proporcionar a realização desta pesquisa. A todos que fazem parte da SLAV-SC-MAPA, em especial ao Luan Valdomiro e ao Luciano Molognoni, por estarem dispostos a ajudar no que se fizesse necessário.

A todos do laboratório de bioquímica de alimentos, Maiara, Grez, Luiza, Thalita, Gustavo e Pedro, por todos os momentos compartilhados. Em especial agradeço a Grez Roberta e Maiara Bredun pela ajuda e a Luiza Mazon, pela parceria e ajuda neste período de mestrado.

A CAPES pela bolsa de pesquisa.

A Deus e a meus pais pela vida. As minhas filhas e amigos pelo carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente para a conclusão deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*“N3o h3a nada a temer na vida, apenas tratar de compreender.”*

Marie Curie

## RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são contaminantes orgânicos com potencial carcinogênico, capazes de contaminar vários ambientes, incluindo o ambiente aquático, o pescado e seus consumidores, colocando em risco a saúde humana. As metodologias para determinação desses contaminantes em alimentos apresentam diversas etapas de preparo de amostras e consumo elevado de reagentes e outros consumíveis. Assim, a busca por fases sólidas a partir de materiais naturais e renováveis para uso em técnica de dispersão de matriz em fase sólida, tem sido proposta na busca de um preparo de amostra mais verde. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar método de preparo de amostra de pescado, utilizando materiais naturais como novas fases sólidas alternativas para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Dez fases sólidas naturais foram avaliadas e comparadas à fase comercial de referência. A metodologia utilizada foi a dispersão de matriz em fase sólida, seguida de extração por líquido pressurizado e detecção inicial por cromatografia líquida, onde as fases alternativas perlita, polvilho doce e cevada apresentaram melhor desempenho analítico, comparadas a fase de referência. Estas três fases e a fase de referência foram avaliadas em detecção por cromatografia gasosa, onde a fase perlita apresentou melhor desempenho analítico dentre todas as fases avaliadas, em termos de área de pico dos analitos, efeito de matriz, recuperação e limpeza do extrato. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a dispersão da matriz foi mais efetiva utilizando a fase alternativa perlita, quando comparada a fase de referência. Assim, a perlita foi utilizada para a validação do método de determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em pescado, em técnica de dispersão de matriz em fase sólida, seguida de extração por líquido pressurizado e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem*. O método validado atendeu a todos os critérios de validação preconizados pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e do Regulamento 2021/808/CE da Comunidade Europeia, considerando linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, seletividade, recuperação, veracidade, repetibilidade, precisão intermediária, estabilidade, efeito de matriz, robustez e incerteza da medição. A metodologia utilizando perlita e determinação por cromatografia gasosa foi considerada superior quando comparada a fase sólida de referência e a determinação por cromatografia líquida em termos de custo, caráter verde, limpeza do extrato e performance analítica. Desta forma, o método validado foi adotado como ensaio oficial do MAPA para a determinação de HPAs em pescado, sendo aplicado na rotina de análises do laboratório. A confiabilidade do método foi demonstrada através de participação em análise de proficiência, com valores de z-score entre 0,0 e -0,8 para os HPAs avaliados. O caráter verde foi avaliado através das ferramentas AGREE e AGREEprep, e os resultados demonstraram que mais de 50% da metodologia desenvolvida e validada está de acordo com os princípios da química analítica verde e do preparo de amostra verde, enquanto a metodologia de comparação, anteriormente utilizada como metodologia oficial do MAPA, apresentou entre 26% e 0,4% de práticas consideradas verdes.

**Palavras-chave:** Dispersão de matriz em fase sólida. Extração por líquido pressurizado. Cromatografia gasosa. Química analítica verde.



## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons are organic contaminants with carcinogenic potential, capable of contaminating various environments, including aquatic ecosystems, fish, and the food chain, posing a risk to human health. Methodologies for determining these contaminants in foods typically require several sample preparation stages and significant consumption of reagents and other consumables. To address these concerns, researchers have been exploring the use of solid phases derived from natural and renewable materials in the matrix solid phase dispersion (MSPD) technique as a more environmentally friendly approach to sample preparation. The aim of this work was to develop, optimize, and validate a seafood sample preparation method, using natural materials as new alternative solid phases for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ten natural solid phases were evaluated and compared against a commercial reference phase. The methodology involved matrix solid phase dispersion, followed by pressurized liquid extraction, and initial detection by liquid chromatography. Among the alternative phases tested, perlite, sweet manioc starch, and barley demonstrated better analytical performance compared to the reference phase. Subsequently, the three best-performing phases and the reference phase were further evaluated using gas chromatography detection, where the perlite phase exhibited the best analytical performance overall, surpassing the reference phase in terms of analyte peak area, matrix effect, recovery, and extract cleanliness. Scanning electron microscopy supported the finding that the alternative phase perlite was more effective in matrix dispersion compared to the reference phase. As a result, perlite was used to validate the method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in fish, using a matrix solid phase dispersion technique, followed by pressurized liquid extraction and determination by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The validated method achieved all the validation criteria recommended by the Manual de Garantia da Qualidade Analítica MAPA and Regulation 2021/808/EC of the European Community, regarding linearity, limit of detection, limit of quantification, decision limit, selectivity, recovery, trueness, repeatability, intermediate precision, stability, matrix effect, robustness and measurement uncertainty. Compared to the reference solid phase and determination by liquid chromatography, the methodology employing perlite and determination by gas chromatography was considered superior in terms of cost, environmental impact assessment (greenness), extract cleanliness, and analytical performance. Consequently, the validated method was adopted as the official MAPA assay for the determination of PAHs in fish, to be applied in routine laboratory analysis. The reliability of the method was demonstrated through participation in proficiency analysis, obtaining z-score values between 0.0 and -0.8 for the evaluated PAHs. The greenness assessment was evaluated using the AGREE and AGREEprep tools, and the results showed that more than 50% of the developed and validated methodology is in accordance with the principles of green analytical chemistry and green sample preparation. In contrast, the comparison methodology, previously employed as the official MAPA methodology, only demonstrated between 26% and 0.4% compliance with green practices.

**Keywords:** Matrix solid phase dispersion. Pressurized liquid extraction. Gas chromatography. Green analytical chemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema integrado mostrando as interconexões entre os dez princípios do preparo de amostra verde.....	31
Figura 2- Diagrama esquemático das principais etapas do procedimento MSPD.....	36
Figura 3- Esquema representativo de uma célula PLE.....	41
Figura 4- As possíveis rotas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente e consequente contaminação do pescado. ....	46
Figura 5- Fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química. ....	53
Figura 6- Aspecto físico das fases sólidas utilizadas no processo de triagem do estudo. ....	65
Figura 7- Posicionamento dos filtros no tubo Q-Cup® para uso em sistema de extração por líquido pressurizado EDGE para extração de HPAs em pescado. ....	66
Figura 8- Processo de preparo e extração das amostras de pescado usando MSPD e PLE, seguido de análise em um sistema de GC-MS/MS. ....	67
Figura 9- Pictograma com resultado genérico da avaliação (esquerda) e escala de cores correspondente para referência (direita) da ferramenta métrica AGREE.....	83
Figura 10- Pictograma com resultado genérico da avaliação da ferramenta métrica AGREEprep. ....	84
Figura 11- Fluxograma do processo de trabalho desde a triagem das fases sólidas alternativas até a validação do método proposto e análise de proficiência.....	86
Figura 12- Comparação do sinal analítico em termos de área, dos analitos de interesse e dos interferentes cromatográficos correspondentes. ....	90
Figura 13- Sinal/ruído dos analitos de interesse (A) e dos interferentes cromatográficos (B) nas diferentes fases sólidas avaliadas. ....	92
Figura 14-Áreas de pico utilizando 2 e 5 gramas de amostra, com as fases sólidas Q-Matrix (Q-M), polvilho doce (PD), cevada (CE) e perlita (CE).....	101
Figura 15- Cor dos extratos utilizando a fase sólida de referência Q-Matrix e as fases sólidas alternativas perlita, cevada e polvilho doce.....	103
Figura 16- - Amostra de mexilhão puro (A1- aumento de 120x, A2- aumento de 700x), fase sólida perlita pura (B1- aumento de 120x, B2- aumento de 700x), e fase sólida Q-Matrix puro (C1- aumento de 120x, C2- aumento de 700x). ....	105
Figura 17-- Dispersão da matriz de mexilhão com a fase sólida perlita (A1-mexilhão + perlita com aumento de 40X, A2-mexilhão + perlita com aumento de 120X, A3-mexilhão + perlita	

com aumento de 700X) e com a fase sólida Q-matrix (B1-mexilhão + Q-Matrix com aumento de 40X, B2-mexilhão + Q-Matrix com aumento de 12 X, B3- mexilhão + Q-Matrix com aumento de 700X). .....	107
Figura 18- Cromatograma das amostras avaliadas, com destaque (seta azul) para os analitos BaA e Crs, sem a presença de interferentes.....	110
Figura 19- Influência dos parâmetros analíticos avaliados, para cada analito. ....	114
Figura 20- - Avaliação do caráter verde das metodologias para determinação de HPAs em pescado, utilizando as ferramentas AGREE e AGREEprep.....	118

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Os doze princípios da química verde. ....	28
Quadro 2- Os doze princípios da química analítica verde. ....	29
Quadro 3- Os dez princípios do preparo de amostra verde. ....	30
Quadro 4- Ferramentas para avaliação do caráter verde de metodologias analíticas. ....	33
Quadro 5- Possibilidades a serem adotadas, na presença de efeito de matriz. ....	55
Quadro 6- Avaliação da seletividade. ....	56
Quadro 7-Dados necessários para a avaliação da linearidade. ....	57
Quadro 8- Marca e preço médio das fases sólidas alternativas e comercial, utilizadas no estudo. .....	64
Quadro 9- Parâmetros avaliados no teste de Youden em condição nominal e condição alterada. .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura química, número de anéis, massa molecular, solubilidade e N° CAS dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) listados como poluentes prioritários pela US-EPA.....	44
Tabela 2- Grau de carcinogenicidade segundo a IARC, avaliação JECFA e potência relativa em comparação ao BaP, dos oito HPAs de prioridade em alimentos. ....	49
Tabela 3- Configurações de extração de HPAs em pescado em extrator por líquido pressurizado EDGE. ....	66
Tabela 4- Configurações do programa de lavagem do extrator por líquido pressurizado EDGE.. ..	67
Tabela 5- Tempo de retenção dos analitos e de seus respectivos interferentes.....	70
Tabela 6- Critérios de avaliação e pesos estabelecidos para triagem das fases sólidas mais adequadas ao método.....	71
Tabela 7- Condições instrumentais do método para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS. ....	73
Tabela 8- Parâmetros instrumentais da fonte de ionização APCI. ....	74
Tabela 9- Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS.....	74
Tabela 10- Condições instrumentais do método para a determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS. ....	75
Tabela 11- Parâmetros instrumentais da multimode inlet (MMI). ....	76
Tabela 12- Parâmetros instrumentais da limpeza do sistema de injeção.....	76
Tabela 13-Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS. ....	76
Tabela 14- Instruções para preparar a curva analítica em uma matriz branca fortificada. ....	78
Tabela 15- Matrizes de pescado utilizadas para o estudo de seletividade.....	80
Tabela 16- Efeito de matriz e recuperação relativa dos analitos de interesse nas diferentes fases avaliadas. ....	88
Tabela 17- - Razão analito/interferente (área de pico) e a média dos valores estabelecidos para cada analito nas diferentes fases sólidas avaliadas. ....	94
Tabela 18- Razão analito/interferente (sinal/ruído) e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas. ....	95

Tabela 19- Incerteza de medição (U(y)), expressa como incerteza padrão expandida em área de pico (sinal analítico) e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas. ....	96
Tabela 20- Recuperação absoluta e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas. ....	97
Tabela 21- Média ponderada dos critérios estabelecidos e colocação final da triagem das fases sólidas mais adequadas ao método. ....	99
Tabela 22- Efeito de matriz e recuperação utilizando 2 e 5 gramas de amostra, com as fases sólidas perlita, cevada, polvilho doce e Q-Matrix em sistema de GC-MS/MS.....	100
Tabela 23- Efeito de matriz calculado em porcentagem para cada analito. ....	108
Tabela 24- Recuperação relativa e veracidade calculada para cada analito no nível central de estudo da validação (2,50 µg kg <sup>-1</sup> ). ....	109
Tabela 25- Amostras utilizadas no estudo de seletividade e resposta quanto a presença de picos interferentes. ....	110
Tabela 26- Valores de intercepto e inclinação, coeficientes de correlação e determinação de cada analito. ....	111
Tabela 27- Resultados da repetitividade e precisão intermediária, nos três níveis de concentração estabelecidos (1,25; 2,50 e 5,00 µg kg <sup>-1</sup> ). ....	112
Tabela 28- Limite de decisão (CC <sub>α</sub> ) calculado para cada analito. ....	113
Tabela 29- Incerteza de medição calculada para cada analito. ....	114
Tabela 30 Resultados da estabilidade em termos de reprodutibilidade interna da recuperação dos analitos na concentração de 2,50 µg kg <sup>-1</sup> .....	117
Tabela 31 - Pontuação z (z-score) obtido na análise de proficiência, utilizando a metodologia desenvolvida e validada. ....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*)

ASE - extração acelerada por solvente (do inglês, *accelerated solvent extraction*)

BaP - benzo(a)pireno

cps- contagem por segundo

CSPE - extração em fase sólida com cartucho (do inglês, *Cartridge solid phase extraction*)

DSPE - extração em fase sólida dispersiva (do inglês, *Dispersive solid phase extraction*)

EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (do inglês, *European Food Safety Authority*)

EPA - Agência de Proteção Ambiental ((do inglês, *Environmental Protection Agency*)

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization*)

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

FFAs - ácidos graxos livres (do inglês, *free fatty acids*)

GAC - química analítica verde (do inglês, *green analytical chemistry*)

GC - cromatografia gasosa (do inglês, *gas chromatography*)

GC-MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *Gas chromatography coupled to mass spectrometry*)

GC-MS/MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem (do inglês, *Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*)

GUM - Guia para a Expressão de Incerteza na Medição (do inglês, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*)

HMW - alto peso molecular (do inglês, *high molecular weigh*)

HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês, *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência equipada com um detector de diodos (do inglês, *high performance liquid chromatography - diodearray detector*)

HS-SPME - microextração em fase sólida de *headspace* (do inglês, *Headspace-solid phase microextraction*)

IARC - Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*).

IEC - Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, *International Electrotechnical Commission*)

ISSO - Organização Internacional para Padronização (do inglês, *International Organization for Standardization*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

JECFA - Comitê Misto de Especialistas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e da Organização Mundial da Saúde (do inglês, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

LC – cromatografia líquida (do inglês, *liquid chromatography*)

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (do inglês, *liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

LD - limite de detecção

LMW - baixo peso molecular (do inglês, *low molecular weight*)

LQ - limite de quantificação

MAE - extração assistida por micro-ondas (do inglês, *Microwave assisted extraction*)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRC - material de referência certificado

MSPD - dispersão de matriz em fase sólida (do inglês, *matrix solid phase dispersion*)

MSPE - extração magnética em fase sólida (do inglês, *Magnetic Solid-Phase Extraction*)

NOAA - Administração Nacional Oceânica e Atmosférica (do inglês, *National Oceanic and Atmospheric Administration*)

ODS - objetivos do desenvolvimento sustentável

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAH4 - (benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno)

PAH8 - (benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, criseno, dibenz[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno)

PLE - extração por líquido pressurizado (do inglês: *pressurized liquid extraction*)

APCI - ionização química de pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*)



PT-SPE -extração em fase sólida com ponta de pipeta (do inglês, *Pipette tip solid-phase extraction*)

QuEChERS -rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

SBSE - extração por sorção com barra de agitação (do inglês, *Stir bar sorption extraction*)

SCF - Comitê Científico de Alimentos (do inglês, *Scientific Committee on Food*)

SFE - extração com fluido supercrítico (do inglês, *supercritical fluid extraction*)

SLAV-SC - Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina

SPE - extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*)

SPME - microextração em fase sólida (do inglês, *solid-phase microextraction*)

UE - União Europeia

UHPLC-Q-TOF/MS - cromatografia líquida de ultra alta performance com espectrometria de massa com tempo de voo quadrupolo (do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry*)

VIM -Vocabulário Internacional de Metrologia

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

° C - escala de grau Celsius

$CC\alpha$  - limite de decisão

Kg - quilograma

% - porcentagem

g - grama

mL - mililitro

U - incerteza de medição

$\mu$  - micro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	OBJETIVOS .....	24
1.1.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>24</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>25</b>
2.1	PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS .....	25
2.1.1	<b>Preparo de amostra e a química verde .....</b>	<b>27</b>
2.1.2	<b>Dispersão de matriz em fase sólida .....</b>	<b>35</b>
2.1.2.1	<i>Fases sólidas naturais alternativas .....</i>	<i>38</i>
2.1.3	<b>Extração por líquido pressurizado.....</b>	<b>40</b>
2.2	PESCADO.....	42
2.2.1	<b>Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em pescado .....</b>	<b>43</b>
2.3	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	52
2.3.1	<b>Efeito de matriz.....</b>	<b>54</b>
2.3.2	<b>Seletividade .....</b>	<b>55</b>
2.3.3	<b>Linearidade .....</b>	<b>56</b>
2.3.4	<b>Recuperação e veracidade/acurácia.....</b>	<b>57</b>
2.3.5	<b>Repetibilidade e precisão intermediária.....</b>	<b>58</b>
2.3.6	<b>Incerteza de medição .....</b>	<b>59</b>
2.3.7	<b>Limite de decisão, Limite de detecção e Limite de quantificação .....</b>	<b>60</b>
2.3.8	<b>Robustez .....</b>	<b>61</b>
2.3.9	<b>Estabilidade.....</b>	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
3.1	REAGENTES E PADRÕES .....	63

3.2	AMOSTRAS E FASES SÓLIDAS .....	63
3.3	PREPARO DE AMOSTRA E EXTRAÇÃO .....	65
3.4	AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FASES SÓLIDAS .....	67
<b>3.4.1</b>	<b>Análises iniciais em sistema de LC- MS/MS .....</b>	<b>67</b>
3.4.1.1	<i>Parâmetros de avaliação de analitos .....</i>	68
3.4.1.2	<i>Parâmetros de avaliação dos interferentes cromatográficos.....</i>	70
3.4.1.3	<i>Critérios de avaliação .....</i>	70
3.4.1.4	<i>Tabela de pontuação .....</i>	71
<b>3.4.2</b>	<b>Análises em GC-MS/MS .....</b>	<b>72</b>
3.4.2.1	<i>Avaliação da massa da amostra .....</i>	72
3.5	INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS .....	73
3.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	77
3.7	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	77
<b>3.7.1</b>	<b>Efeito de matriz e recuperação.....</b>	<b>79</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Veracidade.....</b>	<b>79</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Seletividade .....</b>	<b>79</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Linearidade .....</b>	<b>80</b>
<b>3.7.5</b>	<b>Repetibilidade e precisão intermediária.....</b>	<b>80</b>
<b>3.7.6</b>	<b>Incerteza de medição (U) .....</b>	<b>81</b>
<b>3.7.7</b>	<b>Limite de detecção, limite de quantificação e limite de decisão.....</b>	<b>81</b>
<b>3.7.8</b>	<b>Robustez.....</b>	<b>81</b>
<b>3.7.9</b>	<b>Estabilidade.....</b>	<b>82</b>
3.8	AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE .....	83
3.9	DESEMPENHO DO MÉTODO VALIDADO .....	84
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	84
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
4.1	AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FASES SÓLIDAS .....	85

<b>4.1.1</b>	<b>Análises em sistema de LC- MS/MS .....</b>	<b>87</b>
4.1.1.1	<i>Efeito de Matriz .....</i>	88
4.1.1.2	<i>Área e razão sinal/ruído dos analitos e dos interferentes cromatográficos .....</i>	89
4.1.1.3	<i>Critérios de avaliação .....</i>	93
4.1.1.4	<i>Tabela de pontuação .....</i>	98
<b>4.1.2</b>	<b>Análises em sistema de GC-MS/MS.....</b>	<b>99</b>
4.1.2.1	<i>Avaliação da massa da amostra .....</i>	100
4.2	<b>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....</b>	<b>104</b>
4.3	<b>VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Efeito de matriz.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Recuperação e veracidade/acurácia.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Seletividade .....</b>	<b>109</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Linearidade .....</b>	<b>111</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Repetibilidade e precisão intermediária.....</b>	<b>112</b>
<b>4.3.6</b>	<b>Limite de detecção, Limite de quantificação e Limite de decisão .....</b>	<b>113</b>
<b>4.3.7</b>	<b>Incerteza de medição .....</b>	<b>113</b>
<b>4.3.8</b>	<b>Robustez .....</b>	<b>114</b>
<b>4.3.9</b>	<b>Estabilidade.....</b>	<b>116</b>
4.4	<b>AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE .....</b>	<b>117</b>
4.5	<b>DESEMPENHO DO MÉTODO VALIDADO.....</b>	<b>121</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>

## **REFERÊNCIAS**

## 1 INTRODUÇÃO

Assegurar a qualidade e a conformidade dos alimentos através de metodologias analíticas confiáveis é de extrema importância. O resultado dessas análises visa não somente proteger o consumidor de possíveis fraudes, mas principalmente garantir a segurança do alimento e a saúde do consumidor (FISHER; CROLEY; KNOLHOFF, 2021). Alguns contaminantes presentes nos alimentos têm limites máximos estabelecidos na legislação, enquanto outros são proibidos devido à alta toxicidade em humanos (EURACHEM, 2014).

A confiabilidade dos métodos analíticos depende de diferentes parâmetros, que devem ser avaliados, otimizados e validados. A validação analítica é um estudo experimental e documentado que tem como objetivo demonstrar que o procedimento avaliado é adequado e os resultados obtidos são confiáveis e atendem à finalidade pretendida (BRASIL, 2011). Dentre as principais etapas envolvidas no procedimento analítico, a etapa de preparo da amostra determina grande parte da qualidade metrológica, sendo esta etapa a principal fonte de erros sistemáticos e imprecisões aleatórias das metodologias analíticas (ARMENTA; GUARRIDES; GUARDIA, 2015; BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

As amostras de alimentos como, por exemplo, o pescado, geralmente apresentam alta complexidade, com a presença de compostos que atuam como interferentes analíticos, dificultando as análises instrumentais. Além disso, muitos analitos de interesse estarão presentes em concentrações muito baixas, o que torna o preparo de amostras uma etapa crucial para a obtenção de um extrato final adequado a ser analisado por uma técnica instrumental (CAPRIOTTI, 2015; HOFF; PIZZOLATO, 2018). Vale destacar que o extrato final é geralmente analisado em equipamentos complexos e de alto custo de aquisição e de manutenção como, por exemplo, a cromatografia acoplada à espectrometria de massas. Quando preparados de forma inadequada, esses extratos podem afetar o desempenho do método, além de ocasionar problemas nas colunas cromatográficas, fontes de ionização e detectores (HOFF; PIZZOLATO, 2018).

Os métodos convencionais de preparo de amostra geralmente são demorados, de baixa sensibilidade, demandam grande consumo de solventes orgânicos de significativa toxicidade e muitas vezes apresentam recuperação insatisfatória de um ou mais analitos. Aliado a isto, no final do século XX, houve um aumento significativo na conscientização sobre o meio ambiente e os impactos que a química possui sobre ele. A partir desse debate, surgiram as primeiras bases da química verde e da química analítica verde. Desde então, o grande desafio é desenvolver

metodologias que visam encontrar o equilíbrio entre aumentar a qualidade e confiabilidade dos resultados e melhorar a compatibilidade ambiental (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

Diferentes metodologias de preparo de amostra que visam desenvolver protocolos analíticos cada vez mais precisos e exatos, além de colaborar o máximo possível com a química verde, tem sido desenvolvidas nos últimos anos (BALLESTER-CAUDET *et al.*, 2019; GALUSZKA *et al.*, 2012; NOWAK; KOSCIELNIAK, 2019; PŁOTKA-WASYLKA, 2018; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022; WOJNOWSKI *et al.*, 2022). Embora ainda não haja um consenso na comunidade científica sobre quais parâmetros são os mais adequados para avaliação do método em relação a química verde (ARMENTA *et al.* 2019), trabalhos recentes tem sido publicados propondo ferramentas métricas para esta avaliação, que consideram tanto os princípios da química analítica verde, quanto os princípios do preparo de amostra verde (BALLESTER-CAUDET *et al.*, 2019; GALUSZKA *et al.*, 2012; NOWAK; KOSCIELNIAK, 2019; PŁOTKA-WASYLKA, 2018; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022; WOJNOWSKI *et al.*, 2022).

Uma das metodologias de preparo de amostra, é a dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*), que consiste basicamente em dispersar a amostra em uma fase sólida, capaz de promover o rompimento da estrutura da matriz, por meio de forças mecânicas de cisalhamento, com a finalidade de expor uma área superficial maior ao solvente de extração. Além disto, pode também haver interações hidrofílicas e/ou hidrofóbicas da fase sólida com os componentes da matriz (WIANOWSKA; DAWIDOWICZ, 2016). No Brasil, as fases sólidas comercialmente disponíveis são geralmente importadas, o que pode representar um custo elevado em uma rotina de análises. Além do custo significativo, é crescente a busca por fases sólidas naturais que sejam amplamente disponíveis e que atendam aos princípios da química verde (CAPRIOTTI, 2015).

A MSPD é frequentemente associada com a extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*), que consiste basicamente em uma extração por solvente, submetida a aquecimento e pressurização (RAUT *et al.*, 2015). Nessas condições, a viscosidade e a tensão superficial do solvente diminui, aumentando a solubilidade dos analitos, facilitando e reduzindo o tempo de extração, além de diminuir a quantidade de solvente, o que atende muitos dos princípios da química verde (GALLART-MATEU *et al.*, 2017; VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2015). Assim, o uso da técnica de MSPD seguido por PLE utilizando fases sólidas naturais disponíveis localmente se torna uma alternativa promissora para o preparo de amostra

e extração de compostos de interesse em amostras de alimentos, especialmente para aqueles laboratórios com alta frequência analítica e que atuam junto aos órgãos regulatórios.

No Brasil, os laboratórios federais oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), realizam serviços de fiscalização e inspeção em alimentos, além de pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos. Dentre estes laboratórios está o Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC), localizado em São José (SC). Dentre as diferentes análises realizadas no SLAV-SC, está a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em pescado.

Os HPAs são compostos orgânicos hidrofóbicos, com dois ou mais anéis aromáticos fundidos, encontrados em diversos nichos ambientais, podendo se difundir nos ambientes aquáticos. Suas principais fontes são atividades antropogênicas, como derramamento de óleo ou seus derivados (fontes petrogênicas), combustão incompleta de combustíveis fósseis ou biomassa (fontes pirogênicas) e descarga de esgoto doméstico e industrial (ALMEIDA *et al.*, 2018; LE BIHANIC *et al.*, 2014). O consumo de pescado e outros alimentos contaminados com HPAs pode acarretar em danos à saúde dos consumidores, uma vez que a Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC) considera alguns HPAs como carcinogênicos e outros como possivelmente carcinogênicos, além de acarretarem outros problemas à saúde (FLEMING *et al.*, 2006).

De maneira geral, as metodologias para determinar HPAs em alimentos apresentam diversas etapas de preparo de amostras e consumo elevado de reagentes e outros consumíveis. Diante dessas questões e considerando o alto consumo de pescado, é crescente o interesse em otimizar métodos analíticos e monitorar a ocorrência de HPAs em pescado (LOURENÇO *et al.*, 2021). Assim, o emprego de materiais naturais alternativos como fases sólidas representaria economia para laboratórios de análises de alimentos, além de melhorias no preparo de amostras em termos de eficiência da extração e purificação dos extratos, maior resposta de sinal analítico, menor uso de solventes e diminuição dos efeitos de matriz (CAPRIOTTI, 2015).



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver, otimizar e validar método de preparo de amostra de pescado, utilizando materiais naturais como novas fases sólidas alternativas para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes fases sólidas naturais no preparo de amostra de pescado para determinação de HPAs, em técnica de dispersão de matriz em fase sólida, seguida de extração por líquido pressurizado e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Comparar o desempenho das fases sólidas naturais com a fase comercial utilizada no método oficial de determinação de HPAs em pescado, considerando principalmente os princípios da química analítica verde e do preparo de amostra verde.
- Determinar a fase sólida mais adequada para determinação de HPAs em pescado, considerando a média ponderada dos atributos analíticos de área de pico, razão sinal/ruído, recuperação absoluta e incerteza da medição.
- Investigar a interação da matriz de pescado com a fase sólida natural selecionada usando microscopia eletrônica de varredura, em comparação com a fase sólida comercial.
- Validar o método analítico proposto pela avaliação da linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, seletividade, recuperação, veracidade, repetibilidade, precisão intermediária, estabilidade, efeito de matriz, robustez e incerteza da medição.
- Determinar o caráter verde da metodologia desenvolvida e comparar com a metodologia oficial, através das ferramentas métricas AGREE e AGREEprep.
- Avaliar o desempenho do método validado através de participação em ensaio de proficiência.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS

A análise de alimentos é uma área de extrema importância, pois através dela podemos assegurar a conformidade de uma amostra alimentícia. Essa conformidade é composta pelos níveis de garantia de um alimento (por exemplo, teor mínimo de proteína ou teor máximo de um conservante) mas também pela ausência de substâncias indesejadas ou tóxicas, como alergênicos e diversos contaminantes (FISHER; CROLEY; KNOLHOFF, 2021).

Em geral, a verificação da conformidade exige não somente a análise sensorial ou percepção satisfatória do produto pelo avaliador, mas também depende de análises laboratoriais físico-químicas e/ou microbiológicas, de maneira a averiguar se os riscos físicos, químicos e biológicos estão ausentes ou dentro dos limites de aceitabilidade (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; JANUSZ PAWLISZYN, 2015).

A determinação de contaminantes químicos em alimentos é a área que demanda métodos e instrumentos mais complexos, pois comumente estes contaminantes se encontram em níveis baixos, na ordem de miligramas ou mesmo microgramas (MELO *et al.*, 2022b).

Os alimentos compreendem um grupo de matrizes complexas, constituídas por diversos compostos (como proteínas, lipídeos, pigmentos, fibras, minerais e vitaminas) com diferentes características físico-químicas. Esses compostos podem causar efeitos de matriz significativos em métodos de análises físico-químicas, comportando-se como interferentes, dificultando as análises instrumentais e impedindo a correta avaliação e quantificação destes contaminantes químicos nos alimentos (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; JANUSZ PAWLISZYN, 2015).

Além da complexidade das amostras de alimentos, muitos analitos de interesse podem estar presentes em concentrações muito baixas, sendo o preparo de amostras uma etapa crucial para a obtenção de um extrato final adequado a ser analisado por uma técnica instrumental (HOFF; PIZZOLATO, 2018). O preparo de amostras visa isolar/concentrar os analitos da matriz. Desse modo, além de realizar a limpeza (*clean up*) dos extratos, ainda pode proporcionar grande fator de enriquecimento dos analitos na fração a ser analisada. Portanto, considera-se ideal o método de preparação de amostra capaz de realizar a extração e purificação simultaneamente, a fim de evitar a obtenção de extratos que contenham interferentes co-extraídos da matriz e, concomitantemente, apresente um fator de concentração adequado para a faixa de leitura dos analitos (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015; HOFF; PIZZOLATO, 2018).

As principais etapas envolvidas no procedimento analítico são: amostragem, armazenamento e transporte, preparo de amostra, separação, identificação e quantificação, validação analítica, avaliação estatística e tomada de decisão. Dentre essas etapas, o preparo de amostra é responsável por determinar grande parte da qualidade dos resultados obtidos, sendo a principal fonte de erros sistemáticos e imprecisões aleatórias das metodologias analíticas (ARMENTA; GUARRIDES; GUARDIA, 2015; BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

É importante mencionar que até o ano de 1990, o desenvolvimento da instrumentação era o principal foco da química analítica, porém atualmente a etapa de preparo de amostra tem sido uma tendência importante em pesquisas da área, com um aumento significativo de publicações sobre o assunto (KOKOSA; FRIENDLY, 2022; RICHTER; ARISMENDI; BECERRA-HERRERA, 2021; RICHTER; ARISMENDI; WOJNOWSKI *et al.*, 2022; SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015).

Vale destacar que o extrato final obtido após uma ou mais etapas de preparo de amostra é geralmente analisado em equipamentos caros e complexos, como sistemas de cromatografia, espectrofotometria ou espectrometria de massas. Em relação a técnicas de cromatografia acoplada à espectrometria de massas, extratos inadequados podem afetar intensamente o desempenho do método, produzindo efeitos de matriz na forma de supressão ou intensificação de íons. Podem ainda ocasionar problemas nas colunas cromatográficas, fontes de ionização e detectores, muitas vezes causando danos irreversíveis em componentes destes sistemas. Desta forma, a fim de garantir a confiabilidade dos métodos analíticos bem como aumentar o desempenho e durabilidade dos equipamentos, estudos têm sido realizados com ênfase na otimização dos métodos para preparo de amostras alimentícias (CAPRIOTTI, 2015; HOFF; PIZZOLATO, 2018, PANG *et al.*, 2022).

Os métodos convencionais de preparo de amostra e análise de alimentos geralmente são demorados, de baixa sensibilidade, com grande consumo de solventes orgânicos de significativa toxicidade e muitas vezes com recuperação insatisfatória de analitos. Desta forma, além de prejuízos analíticos, esses métodos não contribuem com a química verde e com os objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) estabelecidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022; ONU, 2023).

Se por um lado a química analítica contribui para a proteção do meio ambiente, avaliando os impactos das atividades químicas, por outro pode aumentar o impacto com problemas ambientais, diante da quantidade de substâncias perigosas utilizadas e o grande volume de resíduos gerados em procedimentos analíticos, além de danos à saúde dos analistas

e alto consumo de energia. Por esses motivos, é crescente a preocupação no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras e metodologias analíticas mais verdes (ANASTAS; EGHBALI, 2010; LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

### **2.1.1 Preparo de amostra e a química verde**

No final do século XX, houve um aumento significativo na conscientização sobre o meio ambiente e os impactos que a química possui sobre ele. Um marco neste sentido foi a Lei de Prevenção da Poluição de 1990 (*Pollution control act of 1990*), promulgada nos Estados Unidos (EPA, 1990). Diante de tais preocupações, o conceito de Química Verde (*green chemistry*) foi proposto pela primeira vez por Clive Cathcart em 1991 (DE LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012) e se refere a utilização de um conjunto de ações que reduzam ou eliminem o uso ou a geração de substâncias perigosas no projeto, fabricação e aplicações de produtos químicos. Desde então, houve a criação de diversos programas e iniciativas governamentais sobre química verde em todo o mundo (ANASTAS, EGHBALI, 2010).

Em 1998, Paul Anastas e John Warner introduziram doze princípios da química verde conforme demonstra o Quadro 1, projetados para atender às necessidades da química sintética (ANASTAS, EGHBALI, 2010), porém apenas alguns desses princípios podem ser aplicados diretamente à química analítica. Desta forma, nos anos 2000 a Química Analítica Verde (GAC, do inglês: *green analytical chemistry*) emergiu da Química Verde, com o intuito de desenvolver instrumentação e metodologias analíticas para reduzir o impacto negativo das análises químicas no meio ambiente e permitir a implementação de princípios de desenvolvimento sustentável aos laboratórios analíticos. Desde então, o maior desafio da química analítica verde é encontrar um equilíbrio entre aumentar a qualidade e confiabilidade dos resultados e melhorar a compatibilidade ambiental das metodologias analíticas (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Quadro 1- Os doze princípios da química verde.

<b>Princípios</b>	<b>Descrição dos princípios</b>
1- Prevenção	É melhor prevenir os resíduos do que tratar ou limpar os resíduos depois de formados
2 Economia do átomo	Métodos sintéticos devem ser projetados para maximizar a incorporação de todos os materiais usados no processo no produto final
3 Síntese química menos perigosa	Sempre que possível, metodologias sintéticas devem ser projetadas para usar e gerar substâncias que apresentem pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente
4 Projetando produtos químicos mais seguros	Os produtos químicos devem ser projetados para preservar a eficácia da função e ao mesmo tempo, reduzir a toxicidade.
5- Solventes e auxiliares mais seguros	O uso de substâncias auxiliares (por exemplo, solventes, agentes de separação, etc) deve ser dispensado sempre que possível e, quando usados, ser inócuos
6- Projeto para eficiência energética	Os requisitos de energia dos processos químicos devem ser reconhecidos por seus impactos ambientais e econômicos e devem ser minimizados. Se possível, os métodos sintéticos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes
7- Uso de matérias-primas renováveis	A matéria-prima deve ser renovável
8- Reduzir Derivativos	Derivatização desnecessária (uso de grupos de bloqueio, proteção/desproteção e temporária modificação de processos físicos/químicos) devem ser minimizados ou evitados se possível, pois tais etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos
9- Catálise	Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são superior aos reagentes estequiométricos
10- Design para degradação	Os produtos químicos devem ser projetados de forma que, ao final de sua função, se decomponham em produtos de degradação inócuos e não persistam no meio ambiente
11- Análise em tempo real para prevenção da poluição	As metodologias analíticas precisam ser mais desenvolvidas para permitir o monitoramento e controle em tempo real do processo antes da formação de substâncias perigosas
12- Química inerentemente mais segura para prevenção de acidentes	As substâncias e a forma de uma substância usada em um processo químico devem ser escolhidas para minimizar o potencial de acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios

Fonte: Adaptado de Anastas e Eghbali (2010).

Artigos publicados por Anastas (1999), Koel e Kaljurand (2006) e Armenta e colaboradores (2008), discutem os principais fundamentos da GAC (NOWAK; WIETECHA-POŚLUSZNY; PAWLISZYN, 2021). Já em 2013, outros autores propuseram utilizar quatro princípios da Química Verde propostos por Anatas e Warner (1998), complementando com

mais oito princípios, compondo assim os doze princípios gerais da GAC. É importante mencionar que o primeiro princípio propõe realizar técnicas analíticas diretas e assim evitar o tratamento da amostra, conforme mostra a Quadro 2 (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Quadro 2- Os doze princípios da química analítica verde.

Número	Princípios da química analítica verde
1	Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra
2	O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são objetivos
3	As medições <i>in situ</i> devem ser realizadas
4	A integração de processos e operações analíticas economiza energia e reduz o uso de reagentes
5	Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados
6	A derivatização deve ser evitada
7	A geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e o gerenciamento adequado de resíduos analíticos deve ser fornecido
8	Métodos multianalitos ou multiparâmetros são preferidos em relação aos métodos que usam um analito de cada vez
9	O uso de energia deve ser minimizado
10	Os reagentes obtidos de fonte renovável devem ser preferidos
11	Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos
12	A segurança do operador deve ser aumentada











Fonte: Adaptado de Galuszka, Migaszewski e Namieśnik (2013).

Este primeiro princípio ainda é de aplicação bastante restrita na área de alimentos. Ainda que diversos métodos de análise direta tenham sido desenvolvidos, para a área de alimentos ainda não foi produzido o salto tecnológico necessário para propiciar a implementação mais ampla desta diretriz. Em muitos casos, as amostras de alimentos associam complexidade da matriz com concentrações muito baixas de analitos. Nestes casos, a análise direta não é ainda uma opção viável, sendo necessário um protocolo adequado de preparo de amostra para obtenção de um extrato final apropriado e compatível com a instrumentação analítica (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

Diante desta limitação e considerando técnicas de preparo de amostras mais “verdes” reportadas na literatura científica e que demonstraram sua aplicação em matrizes complexas

com excelentes resultados, pesquisadores propuseram em 2022 os dez princípios do preparo de amostra verde com a adoção de procedimentos ambientalmente corretos, seguros à saúde do analista e em direção aos ODS estabelecidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022). O Quadro 3 apresenta os dez princípios do preparo de amostra verde.

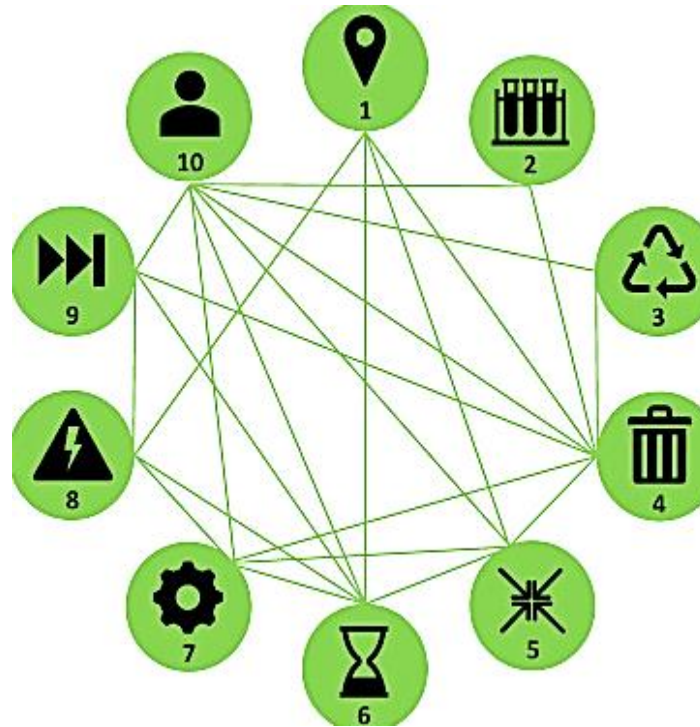
Quadro 3- Os dez princípios do preparo de amostra verde.

Número	Princípios do preparo de amostra verde
	Favorecer a preparação de amostras <i>in situ</i>
	Usar solventes e reagentes mais seguros
	Visar materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis
	Minimizar o desperdício
	Minimizar as quantidades de amostras, produtos químicos e materiais
	Maximizar o rendimento da amostra
	Integrar etapas e promover a automação
	Minimizar o consumo de energia
	Escolher a configuração de preparação pós-amostra mais ecológica possível para análise
	Garantir procedimentos seguros para o operador

Fonte: Adaptado de López-Lorente *et al.*, (2022).

López-Lorente e colaboradores (2022) discutem neste trabalho a importância que a etapa do preparo de amostra representa nos resultados analíticos de matrizes complexas. Também reforçam o quanto o desenvolvimento de metodologias de preparo de amostra verde é relevante para o meio ambiente, para a saúde dos analistas e conseqüentemente para a GAC de modo geral. Os autores relatam que apesar dos princípios estarem apresentados por uma sequência numérica, todos eles estão interligados (Figura 1). Desta forma, as melhorias aplicadas a um dos princípios podem ajudar sinergicamente a reduzir as deficiências associadas a outros princípios.

Figura 1- Sistema integrado mostrando as interconexões entre os dez princípios do preparo de amostra verde.



Fonte: López-Lorente *et al.* (2022).

Exemplo deste sinergismo pode ser observado no princípio 1 (preparação de amostras *in situ*), que colabora também com a quantidade de resíduos gerados, miniaturização, economia de tempo e energia (princípios 4, 5, 6 e 8 respectivamente). Os princípios 2 (solventes e reagentes mais seguros) e 3 (priorizar materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis) estão associados com à redução da geração de resíduos e à proteção dos operadores (princípios 4 e 10) (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

Mafrá *et al.* (2020) revisaram recentemente o potencial de aplicação do princípio 3, analisando o uso de produtos naturais renováveis (como cortiça, algodão, pólen e subprodutos agrícolas), como fases sólidas adsorventes em microextração em fase sólida (SPME, do inglês: *solid-phase microextraction*), visando minimizar o impacto negativo dos procedimentos analíticos no meio ambiente e, conseqüentemente, contribuindo com outros princípios do preparo de amostra verde.

O princípio 7 também apresenta ligação com vários outros princípios, pois ao integrar etapas e promover automação, também é possível diminuir o desperdício, aumentar rendimento das amostras, diminuir consumo de reagentes e solventes e minimizar o consumo de energia (princípios 4,5,6 e 8). Um exemplo prático da aplicação do princípio 7 é o uso da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês: *matrix solid phase dispersion*), na etapa de preparo



de amostra. Esta técnica pode integrar etapas de extração e purificação, com uso de fase sólida adequada que pode promover remoção de interferentes das amostras ao mesmo tempo que, por abrasão, rompe a estrutura da matriz e melhora a interação do analito com o solvente de extração (GÓMEZ-MEJÍA, 2021; MALINOWSKI, 2022).

Quando associada à extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês: *pressurized liquid extraction*), a MSPD possui outros benefícios, como a automatização, aumento da eficiência e diminuição do tempo de extração (HOFF; PIZZOLATO, 2018). Também pode significar menor consumo de energia, além de minimizar os erros de manuseio atribuídos ao analista. Tudo isso contribui com outros princípios do preparo de amostra verde, incluindo a proteção ao operador (princípio 10) por menor exposição a produtos químicos e à risco de acidentes (LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022). A aplicação prática e interação entre os princípios do preparo de amostra verde podem ser observados em diversos trabalhos sobre o tema, a partir de diferentes técnicas (BORDIN *et al.*, 2016, KOKOSA, 2019; KOKOSA; FRIENDLY, 2022; MALINOWSKI, 2022; RICHTER, ARISMENDI, BECERRA-HERRERA, 2021; MUSARURWA; TAVENGWA, 2021).

Essas diferentes metodologias visam colaborar o máximo possível com a química verde, juntamente com o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais precisos e exatos, o que é um grande desafio para a química analítica em análise de matrizes complexas como os alimentos. De maneira geral, quatro etapas interdependentes da química analítica verde (amostragem, preparo da amostra, análise e impacto ambiental) devem ser consideradas no desenvolvimento de uma metodologia analítica, resultando em maior segurança humana, menor consumo de energia e produção de resíduos, além de atender aos requisitos econômicos e analíticos (KOKOSA; PRZYJAZNY, 2022).

Em síntese, ainda não há um consenso na comunidade científica sobre os parâmetros de avaliação do caráter verde das metodologias analíticas (ARMENTA *et al.* 2019). Entretanto, trabalhos recentes tem sido publicados propondo ferramentas para esta avaliação (BALLESTER-CAUDET *et al.*, 2019; GALUSZKA *et al.*, 2012; NOWAK; KOSCIELNIAK, 2019; PŁOTKA-WASYLKA, 2018; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022; WOJNOWSKI *et al.*, 2022).

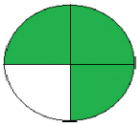

Uma das primeiras ferramentas utilizadas para avaliar o caráter verde dos métodos, publicada em 2002, é o NEMI (do inglês: *National Environmental Methods Index*). A partir de então, outras ferramentas foram desenvolvidas a fim de abordar as deficiências encontradas nas ferramentas anteriores. Dentre as ferramentas mais recentes, pode-se citar: a Modified NEMI

(do inglês: *Modified National Environmental Methods Index*), Analytical Eco-Scale, HPLC-EAT (do inglês: *Environmental Assessment Tool*), AMVI (do inglês: *Analytical Method Volume Intensity*), GAPI, (do inglês: *Green Analytical Procedure Index*, ComplexGAPI (do inglês: *Complementary Green Analytical Procedure Index*), AMGS, (do inglês: *Analytical Method Greenness Score*), AGREE (do inglês: *Analytical Greenness*) e AGREEprep (do inglês: *Analytical greenness metric for sample preparation*).


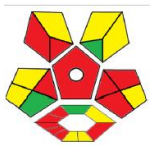

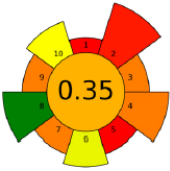
É importante que os pesquisadores conheçam as vantagens e desvantagens das diferentes ferramentas métricas de avaliação do caráter verde das metodologias analíticas, a fim de comparar e selecionar qual estratégia é mais adequada à sua aplicação (IMAM; ABDELRAHMAN, 2023, NOWAK; KOSCIELNIAK, 2019; PŁOTKA-WASYLKA, 2018, SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022; WOJNOWSKI *et al.*, 2022). O Quadro 4 apresenta as ferramentas métricas mais modernas para avaliação do caráter verde de metodologias analíticas.

Quadro 4- Ferramentas para avaliação do caráter verde de metodologias analíticas.

(continua)

Ferramenta	Demonstração dos resultados	Características principais	Desvantagem
NEMI		Avaliação da toxicidade e corrosividade de produtos químicos/reagentes, perigos e quantidade de resíduos gerados	Cada ameaça é retratada como estando acima ou abaixo de um nível específico porque não são indicados dados sobre a quantidade de resíduos ou ameaças
Modified NEMI		Atualização do NEMI. Avaliação com base em cinco elementos: saúde, segurança, meio ambiente, quantidade de resíduos gerados e uso de energia	O conhecimento específico da fonte das ameaças está ausente
Analytical Eco-Scale	79 (Representação numérica)	Baseia-se na atribuição de pontos de penalização aos parâmetros do método analítico (reagentes, quantidade de perigos, energia e resíduos gerados)	Pontuação sem informações sobre a natureza dos componentes perigosos. Pouca informação sobre as causas do impacto não ecológico no meio ambiente, como os tipos de solventes e produtos químicos envolvidos ou os resíduos gerados
HPLC-EAT	36,41 (Representação numérica)	Considera as preocupações de saúde, segurança e meio ambiente relacionadas aos solventes utilizados no processo de cromatografia líquida	Não considera outros fatores da GAC, como instrumentos, energia e critérios de preparação da amostra. Limitada apenas a cromatografia líquida

Quadro 4- Ferramentas para avaliação do caráter verde de metodologias analíticas.  
(conclusão)

AMVI	108 (Representação numérica)	Determinação do volume e resíduos de solventes em um sistema de cromatografia líquida	Considera o volume de solventes, independente da toxicidade, negligencia outros aspectos da GAC (como equipamentos, energia, necessidades de preparo de amostras e seu efeito ambiental. Limitada apenas a cromatografia líquida
GAPI		Abordagem semiquantitativa do caráter verde para cada fase do método analítico, atendendo as preocupações relevantes do processo	Comparado a outras abordagens de avaliação, a principal desvantagem é a dificuldade de funcionamento
ComplexGAPI		Atualização da GAPI, destacando as atividades preliminares realizadas durante a preparação e análise da amostra. Maior aprofundamento dos 12 princípios da GAC (em comparação com a GAPI)	As conclusões gerais do ComplexGAPI podem ser obtidas combinando o GAPI e outros métodos de avaliação
AMGS	709,39 (Representação numérica)	Pontuação numérica que delibera sobre o consumo de energia do instrumento, solventes e a produção de resíduos em relação às questões ambientais, de saúde e segurança	Considerado difícil de manusear por exigir uma grande quantidade de informações
AGREE		Utiliza os 12 princípios da GAC, com atribuição de peso para cada critério. Revela de maneira qualitativa e quantitativa as características negativas e positivas de cada critério	A principal desvantagem é que o raciocínio por trás de fornecer uma ponderação específica para cada critério não está especificada
AGREEprep		Projetado para avaliar o estágio de preparação da amostra, baseado nos 10 princípios do preparo de amostra verde. Atribuição de pesos variados aos critérios com base em sua importância e impacto ambiental, superando as desvantagens da ferramenta AGREE	Não envolve os parâmetros do método analítico (exatidão, precisão e reprodutibilidade) como uma questão crítica para a avaliação global do método, a fim de fornecer o equilíbrio necessário entre o desempenho analítico do método e o impacto ambiental como uma metodologia analítica ideal

Fonte: Adaptado de Imam, Abdelrahman (2023).

As diferentes ferramentas descritas no Quadro 4, apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento da avaliação das metodologias analíticas. Em relação a métodos para análise de matrizes complexas como os alimentos, é importante mencionar a ferramenta, AGREEprep, publicada recentemente (2022). Diferente das demais ferramentas, a AGREEprep aborda os 10 princípios do preparo de amostra verde para realizar a avaliação, já que esta é uma etapa crítica para amostras biológicas e de alimentos e tem sido foco de diversos estudos na área.

Nos últimos anos, os principais métodos de preparo de amostras de alimentos para a determinação de contaminantes incluem a extração em fase sólida convencional (com cartucho, SPE), extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), extração em fase sólida online (online-SPE), extração em fase sólida com ponta de pipeta (PT-SPE), extração magnética em fase sólida (MSPE), extração por sorção com barra de agitação (SBSE), microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME), SPME direto, SPME protegido por membrana e SPME em tubo, dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) e extração por líquido pressurizado (PLE).

Em todas as técnicas acima mencionadas, é indispensável a utilização de uma ou mais fases sólidas. Portanto, a busca por metodologias de preparo de amostra verde, utilizando fases sólidas naturais e renováveis é uma tendência importante na área de análise de alimentos (BORDIN *et al.*, 2016; NOGUEIRA, 2015; WANG *et al.*, 2023).

### **2.1.2 Dispersão de matriz em fase sólida**

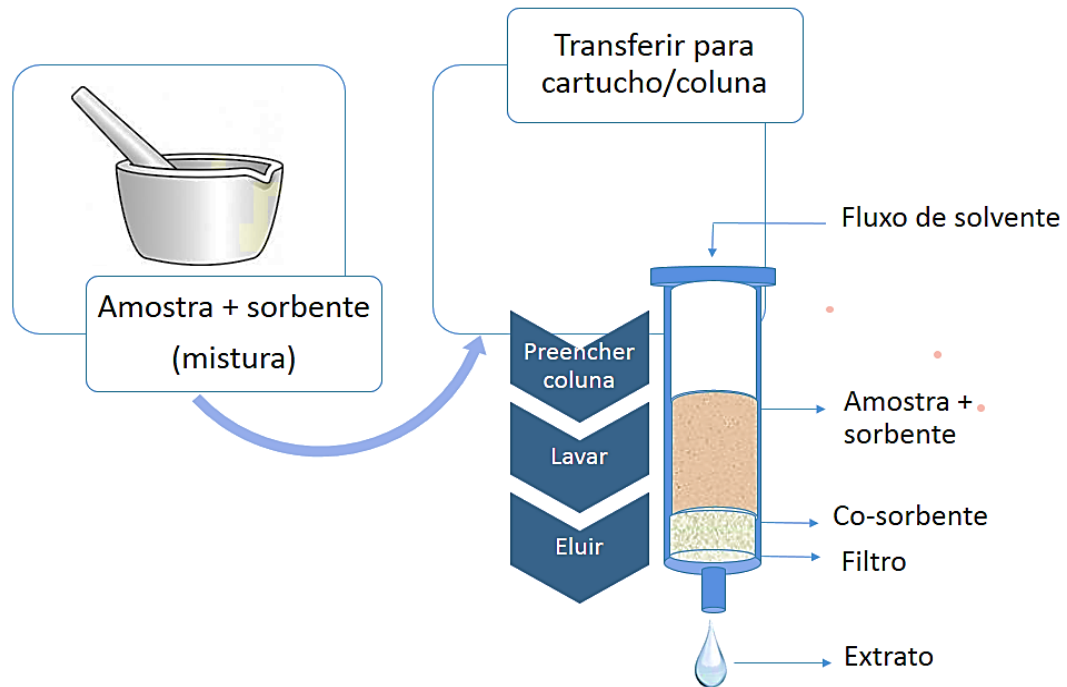
A dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é uma técnica de preparo de amostra bastante versátil em química analítica, aplicável em amostras líquidas, viscosas, semi-sólidas ou sólidas, introduzida por Barker *et al.* (1989). A partir de então, a técnica vem se desenvolvendo constantemente, onde um aumento pronunciado é observado a partir de 2004 (HOFF *et al.*, 2022; MALINOWSKI *et al.*, 2022; RAMOS, 2019, YUAN *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2022).

Desde a sua introdução, a MSPD tem sido utilizada no isolamento de uma grande variedade de compostos orgânicos (contaminantes ou constituintes de ocorrência natural) a partir de uma grande variedade de matrizes complexas, como alimentos e amostras ambientais (PÉREZ; ALBERO; TADEO, 2020). Comparada a técnicas convencionais como Soxhlet, a MSPD possui as vantagens de necessitar pequenas quantidades de amostras e solventes (cerca de 95% menos), além de realizar o procedimento de extração e limpeza simultaneamente, com apenas alguns passos simples em tempo até 90% menor e conseqüentemente consumo de energia significativamente menor (BARKER, 2007; PÉREZ; ALBERO; TADEO, 2020).

Na MSPD geralmente se utilizam pequenas quantidades de amostra (0,1 - 5,0 g) e baixos volumes de solventes (5 - 20 mL), sendo assim considerada uma técnica de microescala (HOFF; PIZZOLATO, 2018). Em geral, a técnica de MSPD consiste em dispersar os componentes da amostra em uma fase sólida adsorvente, transferir a mistura para uma coluna, seguido de dessorção com solvente orgânico apropriado (REZAEI; HOSSEINI, 2011), conforme demonstra a Figura 2. A fase sólida precisa ser capaz de promover o rompimento da estrutura

da matriz, por meio de forças mecânicas de cisalhamento envolvidas no processo, com a finalidade de expor uma área superficial maior ao solvente de extração. Além disto, pode haver interações químicas, hidrofílicas e/ou hidrofóbicas da fase sólida com componentes da matriz (WIANOWSKA; DAWIDOWICZ, 2016).

Figura 2- Diagrama esquemático das principais etapas do procedimento MSPD.



Fonte: Adaptado de Hoff e Pizzolato (2018).

Em geral, a etapa de homogeneização é realizada com o uso de um pilão e um almofariz. O analito interage com a fase sólida adsorvente, através do processo de sorção por forças intermoleculares fracas (van der Waals ou dipolo-dipolo), onde as forças de adsorção são mais fortes do que as de absorção. Nesta etapa ocorre interação do analito com a matriz, do analito com a fase sólida, da matriz com a fase sólida e, havendo uso de fase quimicamente ligada, outras interações acontecem (da matriz e do analito com a fase quimicamente ligada) (DÓREA, 2015).

A escolha da fase sólida dispersante, a proporção entre amostra e fase sólida e a natureza e o volume do solvente, são parâmetros experimentais críticos, pois vão influenciar na seletividade e eficiência do processo. Entretanto, outros aspectos também devem ser considerados, como o tempo de moagem, a possibilidade de incorporar um menor volume de um solvente para facilitar a ruptura da matriz durante a etapa de moagem, a adição de uma fase

sorbente extra (o chamado co-sorbente), tipo de filtro, adição de agente secante (como sulfato de sódio anidro ou sílica) para amostras com alto conteúdo de água, entre outros fatores (RAMOS, 2019).

Após a maceração, a mistura é acondicionada em um dispositivo vazio apropriado para eluir os analitos com o solvente. Em geral, são utilizadas seringas, cartuchos ou colunas de vidro, no qual é inserido um filtro antes (e em alguns casos outro filtro depois) da mistura amostra/ sorbente. O processo de empacotamento deve ser homogêneo a fim de evitar a formação de zonas de ar na mistura amostra/ sorbente. Pode-se utilizar um êmbolo para comprimir suavemente a mistura no dispositivo (HOFF; PIZZOLATO, 2018; WIANOWSKA; GIL, 2019). Nesta etapa, caso necessário, outras estratégias podem ser utilizadas para otimizar o processo de extração e limpeza (*clean-up*), como o uso de um co-sorbente, e/ou um agente secante. Assim a coluna MSPD pode passar a ser formada pela fase sólida de *clean-up*, seguida do agente secante e da mistura amostra/ sorbente, com o objetivo de aumentar a remoção de compostos interferentes e materiais de alto ponto de ebulição. Desta forma, é possível diminuir erros de quantificação, além de contaminação e deterioração das colunas cromatográficas. O tipo e quantidade de massa das fases sólidas de otimização, bem como a fase dispersante serão definidas em função da análise cromatográfica do extrato da amostra (DÓREA, 2015).

Na etapa de eluição, ocorrem interações entre o analito e o solvente, e da mistura amostra/ sorbente com o solvente, sendo que a eficiência da extração estará relacionada com a capacidade de adsorção e de dessorção do analito na fase sólida (DÓREA, 2015). Assim, o eluente deve ter força suficiente para dessorver o analito que está interagindo com a fase sólida e/ou com a matriz. Logo, a escolha do solvente depende das características físico-químicas dos analitos a serem extraídos da amostra, principalmente no que se refere a polaridade (YUAN *et al.*, 2022).

Na escolha do solvente (ou mistura de solventes) também é importante considerar que este seja capaz de solubilizar todos os analitos de interesse, além de ser compatível com o método analítico instrumental utilizado. Em geral, após etapa de eluição, o extrato é concentrado, (logo a volatilidade do solvente deve ser considerada) e após ressuspensionado, e a escolha do eluente de ressuspensão também deve ser compatível com a instrumentação analítica (BARKER, 2007; HOFF, PIZZOLATO, 2018).

Geralmente, na MSPD, as principais fases sólidas comerciais utilizadas são constituídas por partículas de sílica derivadas de polímeros lipofílicos, como C18, C8, fenil, ciano ou amina, porém outros tipos de materiais também são encontrados na literatura (BARKER, 2007).

Apesar da vantagem de estarem disponíveis comercialmente, as fases sólidas convencionais podem possuir um alto custo, especialmente quando se trata de itens de importação, como é o caso do Brasil. Desta forma, nos últimos anos, pesquisas estão sendo realizadas com modificações de fases comerciais bem como uso de novos materiais utilizados como fase sólida de sorção em MSPD (CANADAS *et al.*, 2021; MALINOWSKI *et al.*, 2022; RAN *et al.*, 2021).

Além disso, é crescente em todo o mundo a busca por métodos analíticos baseados no conceito de química verde. Na técnica de MSPD, isso se traduz pela busca por fases sólidas naturais amplamente disponíveis e conseqüentemente mais econômicas, além de serem provenientes de fontes renováveis (CAPRIOTTI, 2015; LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2022).

#### 2.1.2.1 Fases sólidas naturais alternativas

O uso de materiais naturais como fases sólidas no preparo de amostra verde em alimentos tem sido muito discutido em diversos trabalhos (LI *et al.*, 2021; NAZIR; RAOOV; MOHAMAD, 2020; PENG *et al.*, 2021). Hoff e colaboradores (2022) demonstraram o potencial da utilização de materiais a base de mandioca (polvilho doce, sagu e tapioca) como fases sólidas alternativas em técnica de MSPD no preparo de amostras de alimentos (pescado, produtos cárneos embutidos e rações para animais). O trabalho demonstrou que todos os materiais avaliados apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, quando comparado com as fases sólidas comerciais, o polvilho doce foi o material mais promissor por apresentar desempenho equivalente ou até superior a todos os outros avaliados, incluindo a fase comercial utilizada em metodologias oficiais.

Outros pesquisadores desenvolveram e validaram uma metodologia de MSPD combinada com cromatografia líquida de alta eficiência equipada com um detector de diodos (HPLC-DAD), para a determinação simultânea de 10 contaminantes (bisfenol-A, bisfenol-F, bisfenol-S, nonilfenol-9, nonilfenol, dietil ftalato, dibutil ftalato, di-2-etilhexil ftalato, diclorodifeniltricloroetano, diclorodifenildicloroetano e diclorodifenildicloroetileno) em mexilhões. Areia do mar lavada, florissil e sulfato de sódio anidro foram utilizados como fase sólida em MSPD, sendo obtida boa sensibilidade, precisão e repetibilidade para análise de mexilhões (CANADAS *et al.*, 2021). Pesquisadores avaliaram como fase sólida em técnica de MSPD carvão ativado à base de casca de mangostão, seguida de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada com espectrometria de massas com analisador de tempo de voo quadrupolo (UHPLC-Q-TOF/MS, do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography*

*coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry*) para extração e determinação de compostos flavonoides de *Dendrobium huoshanense* (planta medicinal, também utilizada como alimento funcional). Os resultados da validação do método, demonstraram que o sorbente proposto demonstrou ser eficiente (alta sensibilidade, exatidão e precisão satisfatórias e excelente reprodutibilidade), além de ser um material de baixo custo, natural e renovável (PENG *et al.*, 2021).

Mafra e colaboradores (2020) em um estudo de revisão, discutiram o potencial da aplicação de produtos naturais renováveis (como cortiça, algodão, pólen e subprodutos agrícolas) como fases sólidas de extração, visando minimizar o impacto negativo dos procedimentos analíticos no meio ambiente, e conseqüentemente contribuir com os princípios do preparo de amostra verde. As características físico-químicas dos materiais e potencial aplicação foram discutidas, demonstrando aplicação em diferentes matrizes e analitos.

Em um trabalho realizado por Li e colaboradores (2021), grãos de pólen foram utilizados como fase sólida, no preparo de amostra de solo para a extração e separação de ácidos orgânicos. Neste estudo, os grãos de pólen foram empregados como sorbente hidrofílico e os autores investigaram a influência de vários parâmetros de extração. Os resultados indicaram que os grãos de pólen podem ser uma alternativa sustentável, ecológica e segura para aplicações de extração e separação de ácidos fenólicos em solo, o que contribui para aplicação em diferentes matrizes, incluindo matrizes complexas como os alimentos.

É importante mencionar que o emprego de materiais naturais alternativos como fases sólidas no preparo de amostras pode representar significativa economia para órgãos regulatórios, e laboratórios de rotina, além de resultar em melhorias no preparo de amostras em termos de eficiência da extração e purificação dos extratos, maior resposta de sinal analítico, menor uso de solventes e diminuição dos efeitos de matriz (CAPRIOTTI, 2015).

Também cabe ressaltar que nos últimos anos, além da utilização de diferentes fases sólidas de dispersão, a técnica de MSPD tem sido combinada com outras técnicas de extração para reduzir tempo e uso de solventes de extração, como por exemplo a combinação da MSPD com a extração por líquido pressurizado (RAMOS, 2017; RAMOS, 2019; WIANOWSKA; GIL, 2019).



### 2.1.3 Extração por líquido pressurizado

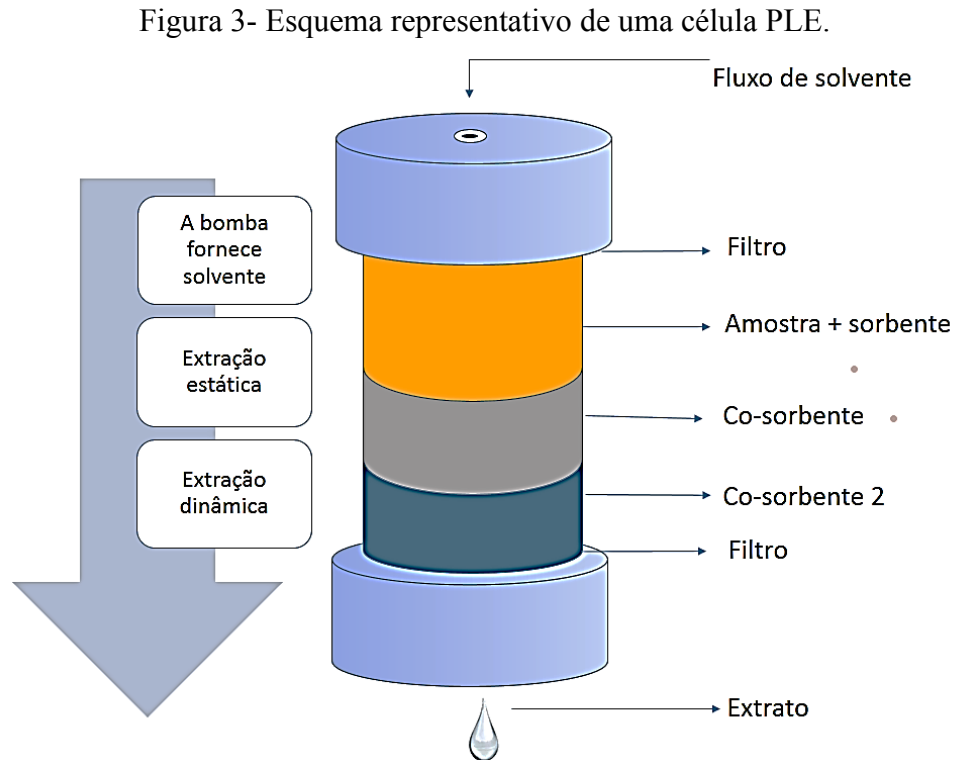
A extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês: *pressurized liquid extraction*), também conhecida como extração acelerada por solvente (ASE, do inglês: *accelerated solvent extraction*), foi descrita pela primeira vez em 1996 como um sistema inovador de preparação de amostras (RICHTER *et al.*, 1996). A PLE é uma técnica automatizada que consiste basicamente em uma extração por solvente, submetido a aquecimento e pressurização. Nessas condições, os solventes aquosos podem apresentar características físico-químicas similares aos solventes orgânicos (RAUT *et al.*, 2015).

Esta técnica visa obter extração exaustiva de matrizes sólidas e semissólidas, reduzindo o consumo de solvente e aumentando o rendimento da amostra quando comparado com outras técnicas convencionais. Devido ao uso da temperatura e pressão elevadas, há uma diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente, aumentando a solubilidade. Como consequência, o solvente penetra nas amostras com maior eficiência, facilitando a extração de analitos presentes na matriz, o que diminui a quantidade de solvente utilizada e reduz o tempo de extração (GALLART-MATEU *et al.*, 2017).

O processo de extração ocorre em uma célula geralmente construída em aço inoxidável (com volumes que variam de 1 a 100 mL), hermeticamente fechada, a fim de ser submetida a altas temperaturas e pressões. As amostras são utilizadas em estado natural ou liofilizadas, misturadas ou não com uma fase sólida. A montagem da célula de PLE é realizada da mesma forma que uma coluna MSPD, onde na parte inferior e superior da célula pode ser colocada uma quantidade de suporte sólido inerte, e entre essas camadas a amostra (dispersa ou não com uma fase sólida), que deve ser levemente compactada a fim de evitar espaços vazios (ANDREU; PICO, 2019; HOFF; PIZZOLATO, 2018).

Esta célula é fechada com dois encaixes finais de filtração bem ajustados para resistir à pressão, sendo que na parte inferior é inserido um filtro de membrana (em geral nylon ou celulose). Os filtros são úteis principalmente para amostras com material particulado, bem como evitar obstrução devido a partículas do agente dispersante. Após a montagem, as células são inseridas em uma bandeja específica. Em sequência, um braço robótico transfere cada célula separadamente para uma câmara de extração, onde inicia o processo PLE com as condições otimizadas. Em termos gerais, a temperatura é mantida em torno de 50–200 °C e a pressão entre 500–3000 psi, por curtos períodos de tempo (5 a 10 minutos). O gás comprimido é usado para purgar o extrato da amostra da célula para um recipiente de coleta que está acondicionado em

uma outra bandeja (HOFF; PIZZOLATO, 2018; RICHTER *et al.*, 1996). Um esquema representativo de uma célula PLE, é demonstrado na Figura 3.



Fonte: Adaptado de Hoff e Pizzolato (2018).

O uso de PLE aumentou desde sua inclusão como um método oficial da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA do inglês: *Environmental Protection Agency*) para poluentes orgânicos persistentes. Desde então, devido à sua fácil manipulação, curto tempo de extração, pequena quantidade de amostra e solvente e bom desempenho, tem sido cada vez mais utilizada na rotina de muitos laboratórios para análise de contaminantes orgânicos, incluindo matrizes complexas de alimento (RASPE; SILVA; COSTA, 2023; VÁZQUEZ-ROIG; PICO, 2015; WANG *et al.*, 2023).

Merlo e colaboradores (2021), realizaram a validação de um método de extração alternativo de líquido pressurizado utilizando uma máquina de café expresso para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em bacon defumado. Terra diatomácea foi utilizado como fase sólida de dispersão para o preparo de amostra e a quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS). Os resultados obtidos demonstraram que o método pode ser aplicado em laboratórios

de rotina de controle de qualidade de alimentos, através de uma metodologia, rápida, fácil e de baixo custo.

Em 2022, pesquisadores realizaram a validação de método para determinação de HPAs em pescado por extração de líquido pressurizado e posterior quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização química à pressão atmosférica (PLE-LC-APCI-MS/MS, do inglês: *pressurized liquid extraction and subsequent quantitation by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization source*) também utilizando uma máquina de café expresso para a etapa PLE, precedida por técnica de MSPD. Os autores demonstraram que apesar de várias metodologias para análise de HPAs estarem disponíveis, métodos simples e rápidos de preparo de amostras ainda são escassos na literatura, principalmente para matrizes complexas como o pescado (MELO *et al.*, 2022a).

Sendo assim, o uso da técnica de MSPD seguido por PLE, tem demonstrado resultados interessantes e abre portas para novas otimizações do processo para análise de matrizes complexas, como por exemplo a utilização de fases sólidas naturais que estão disponíveis localmente. Esta é uma alternativa promissora para obtenção de protocolos analíticos mais alinhados com a química verde, especialmente para aqueles laboratórios com alta frequência analítica e que atuam junto aos órgãos regulatórios.

## 2.2 PESCADO

A denominação genérica “pescado” compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana (BRASIL, 2017).

A carne do pescado é uma das mais consumidas mundialmente. De maneira geral, esta proteína possui alta qualidade em aminoácidos essenciais, abundância em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e baixa concentração de gorduras saturadas, além de possuir vitaminas e minerais essenciais para dieta humana. Pesquisadores demonstram que consumir ao menos duas porções de pescado na semana pode contribuir com a saúde do coração, reduzir risco de doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (LI *et al.*, 2020). Porém por outro lado, o consumo do pescado pode ser associado a alguns riscos à saúde, devido a possíveis contaminações que esses animais podem estar sujeitos por exposição a substâncias químicas presentes no ecossistema aquático (CHALAMAIAH *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2022; RIFAT *et*

*al.*, 2023). Tal problemática é resultado de contaminações ambientais, tanto por fontes naturais quanto por fontes antrópicas. Alguns exemplos de contaminações no pescado preocupantes à saúde do consumidor, são as toxinas marinhas, metais pesados e HPAs (FUTIGAMI; DUTRA; VERRUCK, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2021; NYARKO *et al.*, 2021).

### **2.2.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em pescado**

Os HPAs são uma importante classe de contaminantes orgânicos ambientalmente persistentes (JALILI; BARKHORDARI; GHASVAND, 2020). Os HPAs são constituídos por centenas de compostos com características lipofílicas, contendo dois ou mais anéis aromáticos conectados. Esses compostos podem coexistir em estado sólido e gasoso, sendo divididos quimicamente em dois grupos de acordo com o número de anéis aromáticos. Em um grupo estão os HPAs com dois ou três anéis, de baixa massa molecular, mais voláteis e que existem principalmente na fase gasosa; no outro grupo estão os HPAs com mais de quatro anéis aromáticos, de alta massa molecular e que se apresentam como sólidos (NAZIR; RAOOV; MOHAMAD, 2020).

Os HPAs de maior massa molecular estão presentes em menor proporção e apresentam menor solubilidade quando comparados aqueles de baixa massa molecular, porém são considerados os principais contaminantes sob o ponto de vista da avaliação do impacto à saúde. Isso ocorre porque os organismos com baixa capacidade de metabolizar HPAs, como, por exemplo, os moluscos bivalves, apresentam maior tendência de acumular os HPAs de alta massa molecular em seus tecidos. Desta forma, o risco de contaminação e toxicidade persiste por maior período, enquanto os HPAs de baixa massa molecular são eliminados rapidamente (BRASIL, 2019). A Tabela 1 apresenta a estrutura química, número de anéis, massa molecular, solubilidade e N° CAS dos 16 HPAs listados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA): naftaleno, antraceno, fenantreno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fluoranteno, benzo [a]antraceno, criseno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno e benzo[ghi]pirileno (ZELINKOVA; WENZL, 2015).

Tabela 1- Estrutura química, número de anéis, massa molecular, solubilidade e N° CAS dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) listados como poluentes prioritários pela US-EPA.

(continua)

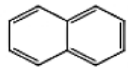
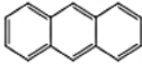
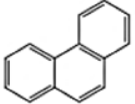
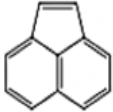
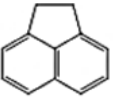
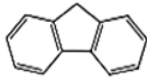
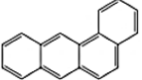
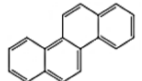
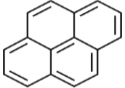
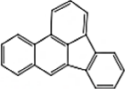
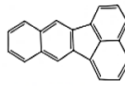
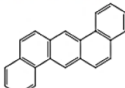
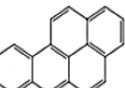
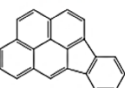
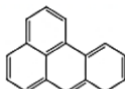
Composto	Estrutura	Número de anéis	Massa Molecular (g/mol)	Pressão de vapor mmHg à 25°C	LogP	Solubilidade (mg/L)	N° CAS
Naftaleno		2	128,17	0,2±0,2	3,45	31	91-20-3
Antraceno		3	178,23	0,0±0,3	4,68	0,045	120-12-7
Fenantreno		3	178,23	0,0±0,3	4,68	1,1	85-01-8
Acenaftileno		3	152,20	0,0±0,3	4,26	16,1	208-96-8
Acenafteno		3	154,21	0,0±0,3	4,19	3,8	83-32-9
Fluoreno		3	166,22	0,0±0,3	4,16	1,9	86-73-7
Benzo(a)antraceno		4	228,29	0,5±0,5	5,91	0,011	56-55-3
Criseno		4	228,29	0,0±0,5	5,91	0,0015	218-01-9

Tabela 1- Estrutura química, número de anéis, massa molecular, solubilidade e N° CAS dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) listados como poluentes prioritários pela US-EPA.

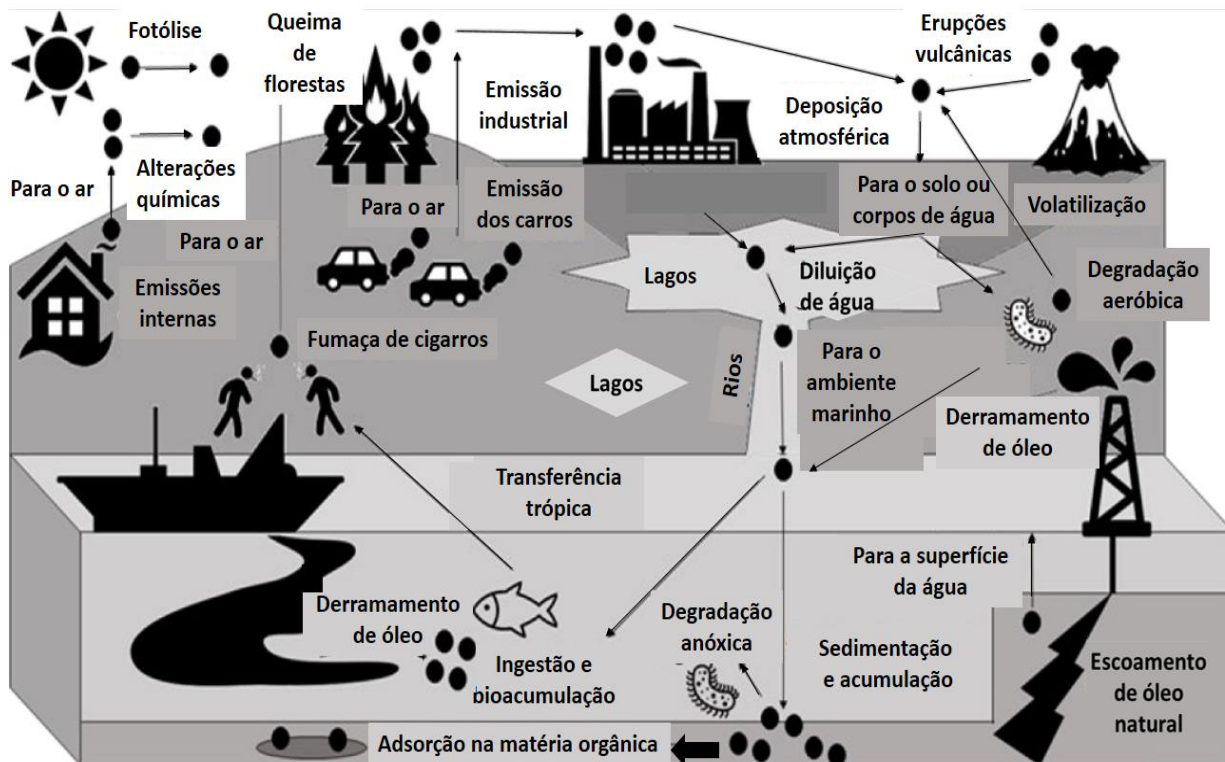
(conclusão)

Composto	Estrutura	Número de anéis	Massa Molecular (g/mol)	Pressão de vapor mmHg à 25°C	LogP	Solubilidade (mg/L)	N° CAS
Pireno		4	202,26	0,0±0,4	5,17	0,132	129-00-0
Benzo(b)fluoranteno		5	252,32	0,0±0,6	6,40	0,0015	205-99-2
Benzo(k)fluoranteno		5	252,32	0,0±0,6	6,40	0,0008	207-08-9
Dibenz(a, h)antraceno		5	278,35	0,0±0,7	7,14	0,0005	53-70-3
Benzo(a)pireno		5	252,32	0,0±0,6	6,40	0,0038	50-32-8
Indeno(1, 2, 3-c, d)pireno		6	276,34	0,0±0,6	6,89	0,062	205-893-2
Benzo(g, h, i)perileno		6	276,34	0,0±0,6	6,89	0,00026	191-24-2

Fonte: Adaptado de ChemSpider (2023) e INCA (2021).

Os HPAs podem ser formados a partir de diversas fontes naturais ou antropogênicas. As fontes naturais, podem ocorrer devido à erupções vulcânicas e incêndios florestais, porém as principais fontes são atividades antropogênicas, como derramamento de óleo ou seus derivados (fontes petrogênicas), combustão incompleta de combustíveis fósseis ou biomassa (fontes pirogênicas) e descarga de esgoto doméstico e industrial (ZELINKOVA; WENZL, 2015). Desta forma, a população em geral pode ser exposta aos HPAs pela contaminação do ar (incluindo fumaça de cigarro), água, solos, produtos farmacêuticos e alimentos. Na alimentação humana, podem contaminar os alimentos por meio de fontes ambientais (por exemplo, adsorção por plantas de águas subterrâneas poluídas e ingestão de pescado de zonas contaminadas) ou preparação de alimentos (por exemplo, grelhar, assar, ou fumar) (MA *et al.*, 2019). A Figura 4 apresenta as possíveis rotas dos HPAs no meio ambiente e consequente contaminação do pescado.

Figura 4- As possíveis rotas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente e consequente contaminação do pescado.



Fonte: Bianco *et al.* (2023).

Conforme demonstra a Figura 4, os HPAs são gerados naturalmente ou artificialmente, podem ser adsorvidos na matéria orgânica, serem combinados com sedimentos e, posteriormente, no ambiente aquático, contaminar os animais através da água e da alimentação

dos mesmos, ocasionando bioacumulação desses compostos no pescado (BIANCO *et al.*, 2023).

A queima de combustíveis fósseis é considerada a principal fonte antropogênica de HPAs na atmosfera, porém em alguns países como o Brasil, as fontes petrogênicas são muito relevantes, devido a intensa extração de óleo cru (petróleo extraído no campo de produção), produção de gasolina e diesel nas refinarias de petróleo (INCA, 2021).

Na Figura 4 é possível observar que uma das fontes de HPAs que se destaca são os acidentes com derramamento de óleos minerais à base de petróleo no ambiente aquático. Esse tipo de acidente em grandes proporções já foi identificado em diferentes localidades ao redor do mundo, como os ocorridos no Golfo do México em 1979 e em 2010, no Alasca em 1989, e mais recentemente em 2019 no Brasil. Esse desastre atingiu as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, sendo considerado o pior derramamento de óleo da história do país e um dos maiores já registrados no mundo (BIANCO *et al.*, 2023; MELO *et al.*, 2022a).

Cabe destacar que os HPAs podem representar de 0,2 a 7% da composição química desses óleos, e estar entre os contaminantes petrogênicos de maior impacto. Devido aos eventos que possibilitam a ocorrência desses compostos nos ambientes aquáticos e a alta lipossolubilidade, os HPAs podem facilmente estar presentes em alimentos gordurosos como o pescado, colocando em risco a saúde do consumidor (MELO *et al.*, 2022b; SHEN; CRIST; NUGEGODA, 2020).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), 129 substâncias químicas são consideradas poluentes prioritários e necessitam de controle devido ao risco associado. Dentre esses compostos, 16 são HPAs, com diferentes classificações pela Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*). Cabe mencionar que a lista de prioridades não se refere à substâncias “mais tóxicas”, e sim à priorizar as substâncias com base em uma combinação de sua frequência de ocorrência, toxicidade e potencial de exposição humana (IARC, 2017; INCA, 2021).

É importante mencionar que alimentos contaminados são considerados uma fonte substancial de exposição humana aos HPAs, especialmente para não fumantes e indivíduos não expostos ocupacionalmente. Estudos epidemiológicos com humanos e com animais de laboratório indicam que a exposição aos HPAs é um dos fatores responsáveis pelo aumento de câncer ao qual a população está exposta (MELO *et al.*, 2022b; MOZANER; ALMEIDA; SILVA, 2019; PURCARO; MORET; CONTE, 2013). Além disso, os HPAs podem causar diminuição da fertilidade, entre outros problemas de saúde (FLEMING *et al.*, 2006).



O HPA mais estudado é o benzo(a)pireno (BaP), classificado pela IARC no grupo 1 (comprovadamente carcinogênico para humanos) e classificado como carcinogênico e genotóxico pelo JECFA (do inglês: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) Comitê Misto de Especialistas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) devido ao seu potencial mutagênico e carcinogênico já bem esclarecidos (BRASIL, 2019).

O uso do BaP como marcador de presença de HPAs em alimentos foi aprovado pelo *Scientific Committee on Food* (SCF) em dezembro de 2002. No entanto, em 2007, a *European Food Safety Authority* (EFSA) afirmou que a utilização apenas do BaP como um marcador para a presença de HPAs em alimentos seria questionável, uma vez que a contaminação geral de alimentos por BaP na União Européia era bastante baixa, porém outros HPAs também preocupantes poderiam estar presentes (AGUS *et al.*, 2023; EFSA, 2007).

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, do inglês: *European Food Safety Authority*) aponta que entre os HPAs prioritários, os mais relevantes em alimentos são os denominados PAH8 (benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, criseno, dibenz[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno). Ao final do estudo, a EFSA concluiu que a combinação de quatro HPAs, denominados PAH4 (benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno), são os indicadores mais adequados de HPAs em alimentos (EFSA, 2007).

A Tabela 2 demonstra os oito HPAs de prioridade em alimentos, seu grau de carcinogenicidade segundo a IARC, a avaliação do JECFA e a potência relativa em comparação ao BaP.

Tabela 2- Grau de carcinogenicidade segundo a IARC, avaliação JECFA e potência relativa em comparação ao BaP, dos oito HPAs de prioridade em alimentos.

Composto	Classificação IARC*	Avaliação JECFA	Potência relativa
Benzo[a]pireno	1	Carcinogênico e genotóxico	1,0**
Benzo[a]antraceno	2B	Carcinogênico e genotóxico	0,145
Criseno	2B	Carcinogênico e genotóxico	0,0044
Benzo[b]fluoranteno	2B	Carcinogênico e genotóxico	0,140
Benzo[k]fluoranteno	2B	Carcinogênico e genotóxico	0,066
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	2B	Carcinogênico e genotóxico	0,232
Dibenzo[a,h]antraceno	2 <sup>a</sup>	Carcinogênico e genotóxico	1,11
Benzo(ghi)perileno	3	Genotóxico	0,022

\* Classificação da IARC (International Agency for Research on Cancer): grupo 1 = carcinogênico para humanos, grupo 2A = provavelmente carcinogênico para humanos, grupo 2B = possivelmente carcinogênico para humanos, grupo 3 = não classificável quanto à carcinogenicidade para humanos. \*\*1,0= Valor de referência da potência relativa, em comparação ao BaP.

Fonte: Adaptado de Brasil (2019).

Desta forma, em 2011, o Regulamento da União Europeia (UE) n.º 835/2011, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006, determina que devem ser introduzidos novos teores máximos para a soma dos PAH4 (BaP, BaA, BbF e Crs) presentes em diferentes gêneros alimentícios, mantendo, um teor máximo diferenciado para o benzo[a]pireno. Assim, fica estabelecido para moluscos bivalves (frescos refrigerados ou congelados) o valor de 5 µg kg<sup>-1</sup> de BaP e 30,0 µg kg<sup>-1</sup> da soma dos denominados PAH4.

Autoridades reguladoras norte-americanas (*Food and Drug Administration* (FDA) e *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceram níveis de preocupação usados como referência para avaliar o risco à saúde humana decorrente do consumo de pescado contaminado com HPAs. No Brasil, em 2019, a ANVISA determinou o limite de preocupação para peixes de 6 µg kg<sup>-1</sup> (BaP equivalentes) e para moluscos e crustáceos, 18 µg kg<sup>-1</sup> (BaP equivalentes), limites muito acima dos estabelecidos pela União Europeia (BRASIL, 2019). Ainda que a contaminação por HPAs represente um risco à saúde humana, no que se refere a legislação para monitorar e estabelecer os limites em alimentos, muitos países ainda não possuem limites

regulatórios próprios, sendo frequentemente utilizados os limites europeus (MELO *et al.*, 2022b).

Os peixes podem metabolizar rapidamente os HPAs, excretando os metabólitos resultantes na bile, com depuração que ocorre geralmente até um mês após exposição a esses contaminantes. Os crustáceos, por possuírem metabolismo menos complexo, podem apresentar tempo de depuração dos HPAs em torno de algumas semanas a alguns meses. Os moluscos bivalves são animais filtradores, sésseis e amplamente distribuídos em água doce e marinha em todo o mundo. Esses animais apresentam maior capacidade de acumular HPAs, demorando meses a até um ano para depurar estes compostos (BRASIL, 2019; CAMPÍNS-FALCÓ *et al.*, 2008). Organismos com maiores teores lipídicos tendem a acumular mais HPAs nos tecidos devido à natureza lipofílica das substâncias. Cabe mencionar que durante o período de desova, ostras e mexilhões podem absorver de 2 a 3 vezes mais HPAs (BRASIL, 2019). Desta forma esses animais são considerados bioindicadores ideais para análises de monitoramento crônico de contaminantes no meio ambiente aquático (FUTIGAMI; DUTRA; VERRUCK, 2021).

Considerando a importância de fiscalizar e monitorar os níveis de HPAs em pescado para garantir a segurança dos consumidores, métodos analíticos confiáveis são de extrema necessidade. Contudo, a extração desses contaminantes da matriz pode representar um grande desafio, principalmente devido à complexidade da matriz com presença de diferentes interferentes e pelos baixos teores em que os HPAs podem estar presentes (YUAN *et al.*, 2019).

Avaliar analitos com baixas concentração em matrizes complexas de alimentos é um trabalho laborioso que pode ser realizado utilizando técnicas avançadas, como cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gas chromatography*) e cromatografia líquida (LC do inglês: *liquid chromatography*) acopladas à espectrometria de massas em modo *single* (MS) ou *tandem* (MS/MS). Porém, mesmo quando protocolos padrão de preparação de amostras são empregados e aliados à instrumentação analítica avançada, os efeitos de matriz têm forte influência na precisão do método proposto. Assim, o sucesso da determinação de HPAs em amostras de alimentos depende primeiramente de procedimentos de preparo de amostra, e desta forma, desenvolver e otimizar métodos de preparo de amostra mais eficientes é de suma importância (AGUS *et al.*, 2023; ZELINKOVA; WENZL, 2015).

De maneira geral, as metodologias para determinar HPAs em alimentos como o pescado envolvem as seguintes etapas: preparo de amostra, extração dos analitos da matriz, limpeza (*clean-up*), concentração dos analitos, seguido de detecção e/ou quantificação dos analitos.

Desta forma, as metodologias estudadas buscam otimizar, sob diferentes aspectos, as diferentes etapas necessárias para determinar o analito (LOURENÇO *et al.*, 2021).

O primeiro método oficial para análise de BaP em alimentos foi desenvolvido pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês: *Association of Official Analytical Chemists*) e pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), adotado como método oficial da AOAC em 1972 e aceito como método recomendado pela IUPAC em 1975.

Desde então, outras metodologias foram desenvolvidas e empregadas, sendo a extração por Soxhlet considerada a abordagem clássica. Embora esta técnica ofereça eficiência de extração, possui algumas desvantagens como tempo excessivo de análise, grandes quantidades de solventes orgânicos, além de necessitar etapas adicionais, como procedimentos de limpeza do extrato, muitas vezes usando cromatografia em coluna aberta (WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA, 2011). Várias outras metodologias são utilizadas e estão descritas na literatura para determinar HPAs em matrizes complexas, como a extração ultrassônica, QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração com fluido supercrítico (SFE), extração por maceração com agitação mecânica, extração por líquido pressurizado (PLE), microextração em fase sólida (SPME), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) seguida de diferentes métodos de extração, entre outras (BADIBOSTAN *et al.*, 2019; CAMPÍNS-FALCÓ *et al.*, 2008; DUEDAHL-OLESEN *et al.*, 2020; GRATZ *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2022; KUCUKSEZGIN *et al.*, 2020 ; LIN *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2022a).

A técnica de MSPD associada à PLE, têm sido utilizadas no preparo da amostra para promover a extração, enriquecimento e limpeza do extrato em única etapa. Na MSPD diferentes fases comerciais estão disponíveis, porém estudos mais recentes buscam por fases mais seletivas, com menor custo e a base de materiais naturais (HOFF *et al.*, 2022; SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015). A PLE tornou-se mais relevante na análise de HPAs após ser incluída como método oficial na determinação de HPAs em pescado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) (MELO *et al.*, 2022b).

Em relação a instrumentação analítica para determinar HPAs e atingir medições exatas e precisas, métodos cromatográficos usando cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC) foram desenvolvidos e avaliados extensivamente. Porém é importante mencionar que em comparação com LC, a GC é preferida para determinar HPAs, pois normalmente oferece maior seletividade, resolução e sensibilidade para separação, identificação e quantificação (LEE *et al.*, 2018).

No Brasil, os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), realizam serviços de fiscalização e monitoramento em alimentos, além de pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos. Um dos laboratórios é o Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC), localizado em São José (SC) (MAPA, 2022). Dentre as diferentes análises realizadas no SLAV-SC está a determinação de HPAs em pescado.

Diante do alto consumo de pescado, aliados a preocupação com o meio ambiente, com a saúde dos consumidores e dos analistas, é crescente o interesse em desenvolver e otimizar métodos analíticos mais verdes, confiáveis, eficientes e plausíveis de se instalar na rotina de análises de laboratórios oficiais e de alto desempenho, para monitorar a ocorrência de HPAs em pescado (ARMENTA *et al.*, 2019; LOURENÇO *et al.*, 2021).

### 2.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

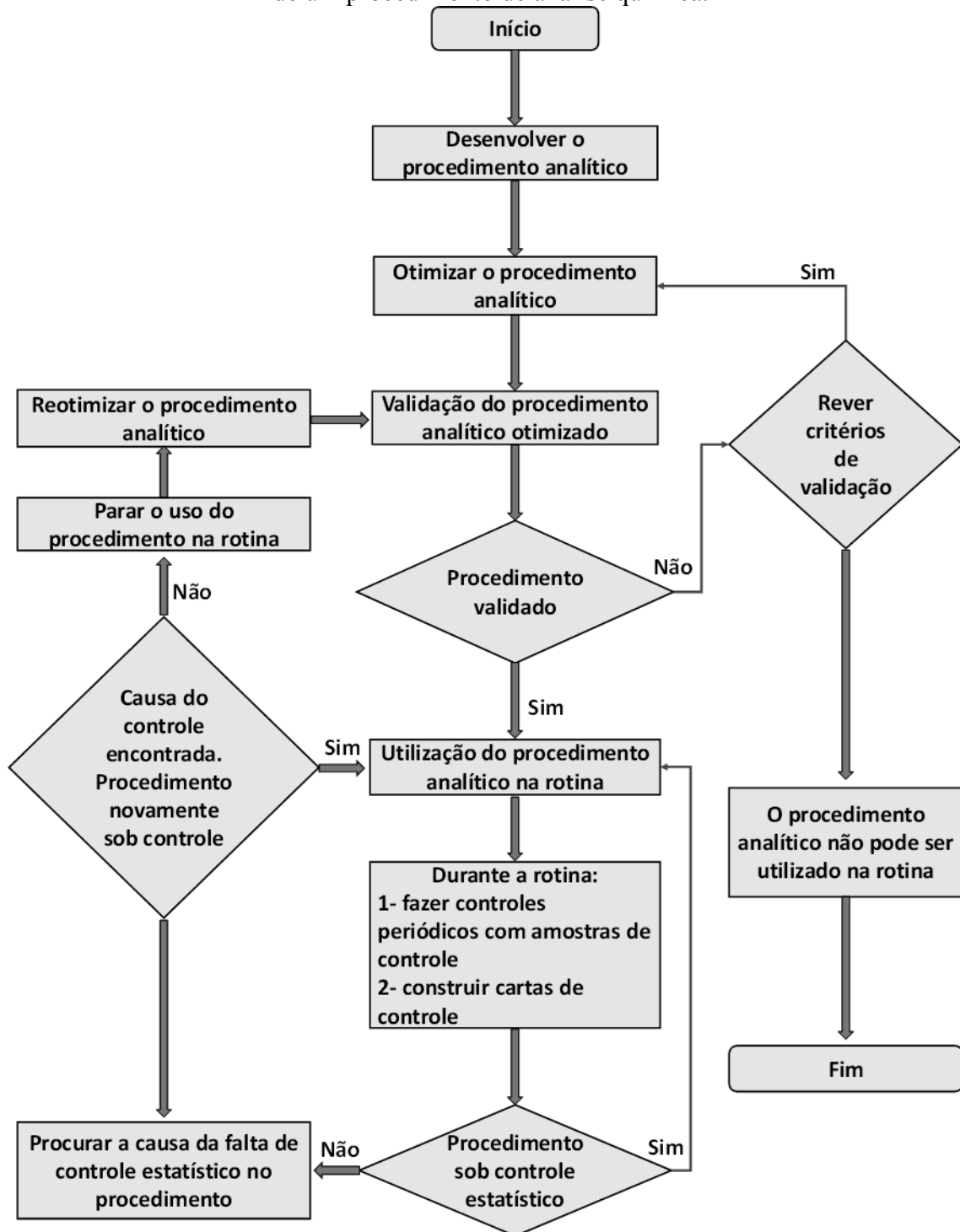
A validação analítica é um estudo experimental e documentado com o objetivo de demonstrar que o procedimento avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2011).

No que se refere a validação de metodologias analíticas para análise de alimentos, a confiabilidade do método, sua correta execução e capacidade de demonstrar que o resultado é confiável, é de extrema importância. Este resultado está atrelado não somente à caracterização de um alimento e confirmação de fraudes com valor econômico, mas principalmente à garantir a segurança da saúde do consumidor quanto a ingestão de um alimento impróprio para o consumo. Esta conformidade pode estar associada a presença de contaminantes acima dos limites estabelecidos em legislação, bem como a presença de compostos proibidos em alimentos (EURACHEM, 2014).

O desenvolvimento e a otimização de um procedimento analítico devem preceder a etapa de validação do método, a fim de evitar o não atendimento dos requisitos da validação, perda de tempo, trabalho e recursos do laboratório. O estudo aprofundado dos diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico, o treinamento dos analistas, a verificação e adequação dos instrumentos de medições, instalações do laboratório, adequação dos reagentes e demais insumos analíticos são exemplos de otimização interna do procedimento analítico (BRASIL, 2011). Cabe mencionar, que durante a validação do método, alguns parâmetros podem ser realizados de maneira conjunta, otimizando tempo e economizando recursos. A

Figura 5 mostra em forma de fluxograma as etapas básicas que compreendem o desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química.

Figura 5- Fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química.



Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

A validação integral ou parcial do método deve ser documentada através de um relatório de validação, que deve conter a descrição dos procedimentos, dos parâmetros analíticos, dos critérios de aceitação e os resultados, com detalhamento suficiente para possibilitar sua reprodução e, quando aplicável, sua avaliação estatística (BRASIL, 2017).

Conforme apresentado no fluxograma da Figura 5 após o procedimento validado, é importante realizar o acompanhamento do desempenho do método, através de monitoramento periódico com amostras de controle, uso de cartas de controle e dados estatísticos (BRASIL, 2011).

Os parâmetros de validação devem seguir os requisitos do guia de validação escolhido que melhor se adequar a finalidade pretendida. Estes parâmetros variam a cada guia de validação adotado, sendo os principais a seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação, precisão e robustez. Cabe ressaltar que diversos protocolos nacionais (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017; INMETRO, 2020) e internacionais (AOAC, 2019; EURACHEM, 2014; ICH, 2005) estão disponíveis e devem ser estudados para melhor atender às necessidades da metodologia a ser validada.

### **2.3.1 Efeito de matriz**

O efeito de matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, o que acarreta na diminuição ou ampliação da resposta instrumental (BRASIL, 2011). Os componentes endógenos presentes em matrizes complexas (por exemplo, alimentos), são apontados como a principal fonte deste efeito, por interferir no desempenho da medição, principalmente quando presentes em alta concentração no extrato final e eluídos na mesma janela de tempo de retenção do analito de interesse. Desta forma o estudo do efeito de matriz torna-se uma parte essencial no processo de validação em análise de alimentos (DAMALE *et al.*, 2023; HOFF *et al.*, 2015).

Na validação analítica, o efeito de matriz refere-se a diferença na resposta analítica entre um padrão dissolvido no solvente e um padrão ajustado em função da matriz, com a utilização ou não de correção por meio de um padrão interno (CE, 2021). Assim, este efeito pode ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas em solvente e na amostra. As curvas devem ser estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração. O indicativo de ausência de interferência

dos constituintes da matriz é o paralelismo das retas e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (Teste F (*Snedecor*) e Teste t (*Student*)), com nível de significância de 5% (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

Além deste método, diferentes abordagens para avaliar o efeito de matriz estão descritas na literatura, como a infusão pós-coluna, quantificação pela adição pós-extração, avaliação de cartas de controle, estimativa quantitativa baseada em padrões, entre outras (DAMALE *et al.*, 2023; HOFF *et al.*, 2015, MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; RAPOSO; BARCELÓ, 2021).

Não há limites regulatórios para o efeito de matriz, mas a sua estimativa é considerada obrigatória para todos os guias de validação que tratam deste tema. Caso os resultados demonstrem a presença de efeito de matriz, determinadas medidas devem ser assumidas para a execução do ensaio em rotina, conforme demonstra o Quadro 5 (BRASIL, 2011).

Quadro 5- Possibilidades a serem adotadas, na presença de efeito de matriz.

<b>Possibilidades a serem adotadas, na presença de efeito de matriz</b>	
1	Usar soluções de calibração obtidas de material de referência certificado
2	Usar soluções de calibração obtidas da matriz branca fortificada ou extrato de matriz branca fortificado com o analito
3	Promover mudanças no procedimento analítico de forma a eliminar o efeito de matriz, alterando, por exemplo, o pré-tratamento da amostra ou a separação do analito ou as condições e a detecção do analito
4	Analisar as amostras de ensaio pelo método de adição

Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

### 2.3.2 Seletividade

A seletividade pode ser descrita como o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (AOAC, 2002). Desta forma, um método é considerado seletivo quando produz respostas para vários analitos, mas é capaz de distinguir a resposta de um analito da resposta de outros. A determinação da seletividade deve ser assegurada, pois este parâmetro pode comprometer seriamente a linearidade, a tendência e a precisão da metodologia (INMETRO, 2020).



Conforme demonstra o Quadro 6, a avaliação da seletividade envolve ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2020). Técnicas instrumentais como a espectrometria de massas (acoplada à cromatografia) podem ser extremamente seletivas, o que pode garantir a identificação precisa do analito (BRASIL, 2011).

Quadro 6- Avaliação da seletividade.

Procedimento	Demonstrar	Comentários
a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados	Habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente
b) Analisar amostras contendo vários possíveis interferentes na presença do analito de interesse	Efeito de interferentes - a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse	Se alteram resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado

Fonte: Adaptado de INMETRO (2020).

### 2.3.3 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado, sendo capaz de produzir curvas de calibração que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (BRASIL, 2011). Este parâmetro pode ser obtido por padronização interna ou externa e formulado como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2020). Caso a curva de calibração não seja bem representada por uma reta (função afim), pode-se proceder ao ajuste da curva de calibração à outras funções, incluindo os polinômios de ordem superior a um (curva de calibração polinomial) (BRASIL, 2011).

No procedimento analítico, o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade é chamado de faixa de trabalho (ICH, 2005). Já a faixa linear de trabalho, é a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (EURACHEM, 2014).

Para o estabelecimento da linearidade são necessários no mínimo cinco níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida, para construir a curva analítica. O número de replicatas analisadas de cada concentração deve ser de no mínimo três, e, preferencialmente, com os níveis de concentração analisados em ordem aleatória (INMETRO, 2020).

Todos os cálculos para a avaliação da linearidade devem ser realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais (BRASIL, 2017). Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada, para cada nível de concentração, a ausência de valores aberrantes (*outliers*), que pode ser feita pelo teste de *Grubbs* ou com base nos resíduos padronizados *Jackknife* (INMETRO, 2020). Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados demonstrados no Quadro 7 (BRASIL, 2017).

Quadro 7-Dados necessários para a avaliação da linearidade.

Nº	Dados para a avaliação da linearidade.
1	Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito
2	Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística
3	Equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados
4	Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficientes de correlação (r) e de determinação (r <sup>2</sup> )
5	Avaliação da significância do coeficiente angular
6	A homocedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado
7	Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento)
8	O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990
9	O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero

Fonte: Adaptado de Brasil (2017).

### 2.3.4 Recuperação e veracidade/acurácia

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), a veracidade é o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Este parâmetro está inversamente relacionado ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção (INMETRO, 2012).

A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico, sendo portanto a expressão de sua veracidade. A recuperação não deve ser confundida com a eficiência de extração ou de digestão da amostra, sendo que o objetivo da recuperação é corrigir o resultado

da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas do procedimento analítico, tais como limpeza (*clean-up*), diluições ou pré-concentração, derivatizações e secagens, até a leitura da resposta instrumental (BRASIL, 2011).

A determinação do valor da veracidade em porcentagem pode ser realizada por meio de ensaio de recuperação utilizando material de referência certificado (MRC) ou matriz branca fortificada. Na ausência de MRC e matriz branca, pode-se utilizar amostra de ensaio com baixa concentração do analito (BRASIL, 2011; INMETRO, 2012).

Os critérios de aceitação destes parâmetros devem seguir as orientações normativas da legislação aplicável à área de atividade. Esses parâmetros estão contidos nos guias de validação e, em geral, estão atrelados ao nível de concentração (INMETRO, 2020).

### **2.3.5 Repetibilidade e precisão intermediária**

A precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (BRASIL, 2011). Este parâmetro é usualmente expresso como o desvio-padrão ou coeficiente de variação dos resultados de ensaio através da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, sendo este último, estimado apenas mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017; CE, 2021).

Na repetibilidade, a precisão dos resultados é referente a ensaios independentes obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, pelo mesmo operador, dentro de pequenos intervalos de tempo (CE, 2021). Para avaliar a repetibilidade é importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho, sendo que o número mínimo de repetições para cada nível de concentração geralmente varia entre 6 e 15, conforme preconizado no guia de validação escolhido para o estudo (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária, ou reprodutibilidade interna, é a precisão da medição de acordo com uma série de condições intralaboratoriais num laboratório específico (CE, 2021). A avaliação ocorre no mesmo laboratório, com a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, e utilizando o mesmo método. Porém, algumas condições são modificadas propositalmente, como dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras (BRASIL, 2011). Os resultados dos estudos efetuados sob condições variadas podem ser

comparados pelos Testes F e *t* ou pela ANOVA, para avaliar se os grupos testados (ex: analistas diferentes) são considerados estatisticamente semelhantes. O desvio padrão da precisão intermediária é a dispersão mais realista do método, podendo ser usado para cálculo de incerteza de medição (INMETRO, 2020).

### 2.3.6 Incerteza de medição (U)

O Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) define a incerteza de medição como o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012). A incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de adequação ao uso pretendido. Desta forma, a norma internacional ISO/IEC 17025:2017 recomenda que os laboratórios que utilizam um sistema de gestão da qualidade devem avaliar a incerteza de medição de todos os métodos que constituem seu escopo (BRASIL, 2011; MOLOGNONI *et al.*, 2019).

Na prática, a incerteza do resultado pode resultar de muitas fontes, como, por exemplo, preparo da amostra, efeitos de matriz e outros interferentes, condições experimentais e ambientais, operador, pureza dos reagentes, incertezas de equipamentos de avaliação de massa e volume, valores de referência de padrões e materiais de referência, aproximações e convenções do método de medição e no procedimento e no erro aleatório, métodos e equipamentos, entre outros (KIYATAKA, 2006).

Vários conceitos foram desenvolvidos para avaliar a incerteza relacionada a um resultado de medição, porém o Guia para a Expressão de Incerteza na Medição (GUM, do inglês: *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*) é um consenso internacional sobre como estimar o cálculo de incerteza de medição, devido à sua capacidade de abranger modelos específicos com diferentes abordagens e tipos de medições (KIYATAKA, 2006; MOLOGNONI *et al.*, 2016).

De maneira geral, para realizar o cálculo, os componentes da incerteza podem ser divididos em duas metodologias, a que utiliza a estimativa do Tipo A (*Top-Down*) e a que utiliza a estimativa do Tipo B (*Bottom-Up*). A estimativa do Tipo A (experimental) é baseada na análise estatística de medições repetidas feitas durante o processo de medição do mensurando (analito). A estimativa do Tipo B se baseia em informações como características dos instrumentos de medição fornecidas pelo fabricante, certificados de calibração ou de MRC, classe de exatidão

de instrumentos e padrões e outras medições não ligadas diretamente às do mensurando (como as utilizadas durante a validação de um método) (BRASIL, 2011; KIYATAKA, 2006). Cabe mencionar que os componentes utilizados para o cálculo da incerteza, devem respeitar os critérios de adequação ao uso pretendido, bem como a base de cálculo deve obedecer ao guia escolhido para a validação do método.

### **2.3.7 Limite de decisão ( $CC\alpha$ ), Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)**

Durante a validação de um método, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são comumente determinados. Entretanto, determinados ensaios aplicados a resíduos e contaminantes em alimentos, onde existe um limite regulatório definido para a combinação analito/matriz, também é importante considerar o limite de decisão ou valor crítico, também conhecido como limite de decisão para a confirmação ( $CC\alpha$ ), nas diretivas da União Europeia (EU) (EURACHEM, 2014).

De acordo com a Decisão 2021/808/CE, o  $CC\alpha$  é descrito como o limite no qual e a partir do qual se pode concluir, com uma probabilidade de erro de  $\alpha$ , que uma amostra não é conforme, e o valor  $1 - \alpha$  representa a certeza estatística, em percentagem, de que o limite permitido foi excedido. Este parâmetro visa estabelecer um valor do resultado que é considerado para indicar um nível de analito que é significativamente diferente de zero. Estabelecer este nível é importante, pois a partir dele, muitas vezes uma ação é requerida, como por exemplo, declarar se um material é ou não conforme. Os cálculos do  $CC\alpha$  devem ser realizados, preferencialmente, utilizando a curva de calibração adequada ao procedimento analítico, conforme descrito no guia escolhido para a validação (BRASIL, 2011; EURACHEM, 2014).

O limite de detecção (LD) refere-se a obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (não necessariamente quantificado), sob as condições experimentais estabelecidas. Existem diversos modos de se calcular o limite de detecção, como por meio de método visual, da razão sinal-ruído, da determinação do branco ou parâmetros da curva de calibração. A abordagem de cálculo escolhida deve considerar as particularidades do método analítico utilizado (BRASIL, 2017). Após estabelecer o limite de detecção do método, esse valor deve ser confirmado por meio da análise de amostras independentes em número de replicatas pré-estabelecidas. O limite de detecção estabelecido precisa ser detectado em todas

as replicatas. Caso isso não ocorra, significa que este valor pode ter sido estimado de maneira inadequada, devendo o mesmo ser reavaliado (INMETRO, 2020).

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este valor, na prática, geralmente corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Após determinar este limite, o mesmo deve ser testado em amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ, a fim de verificar se a precisão e a recuperação/tendência satisfazem o método. Caso essa concentração não atenda aos requisitos desejados, nova estimativa deve ser realizada com concentrações maiores (BRASIL, 2017, INMETRO, 2020). Para calcular o LQ, diferentes abordagens também podem ser aplicadas, como por meio de Avaliação / Percepção visual, Relação sinal/ruído, curva analítica, desvio padrão do branco, curva de desvio padrão.

### **2.3.8 Robustez**

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução, o que fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira (EURACHEM, 2014). Por não ser considerada uma grandeza física ou química, não se pode atribuir um valor numérico para a robustez, assim, esta verificação é realizada experimentalmente, a fim de demonstrar se a variação de cada fator estudado, tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. O método é considerado robusto, quando nenhum dos fatores estudados e plausíveis de afetar o resultado da medição apresentam efeito significativo (BRASIL, 2011).

Para determinar a robustez, pode-se recorrer ao planejamento de Youden ou de Plackett-Burman. A determinação da robustez pode ser realizada com a análise de um MRC, um padrão, uma matriz branca fortificada, um extrato de matriz branca fortificada, ou uma amostra de Controle de Qualidade (ACQ). O estudo deve ser realizado em no mínimo dois níveis para cada fator que pode afetar o resultado da análise (BRASIL, 2011; INMETRO, 2020). Ressalta-se que quanto maior for a robustez do método, maior será a confiança relacionada a sua precisão e maior sua capacidade de produzir resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo e, principalmente, apresentar maior portabilidade para outro laboratório dentro da organização, no país ou até no exterior (BRASIL, 2011).

### 2.3.9 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (ANVISA, 2003). É importante avaliar a estabilidade das soluções utilizadas no método analítico, já que a degradação do analito ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados (PASCHOAL, 2008).

De acordo com o regulamento da Comunidade Europeia (UE) 2021/808, deve-se determinar a estabilidade do padrão de calibração, do padrão ajustado em função da matriz e/ou dos padrões de matriz fortificada e dos constituintes do analito ou da matriz na amostra durante o armazenamento ou a análise. Dados referentes ao analito em uma matriz e/ou solução, publicados na literatura científica ou com origem em outro laboratório, podem ser utilizados para demonstrar a estabilidade. Porém, salienta-se que esses dados são aceitáveis somente se condições idênticas no estudo e no laboratório em questão forem aplicadas. Os protocolos recomendados para avaliar a estabilidade podem ser diferentes entre as agências reguladoras. Desta forma, tanto os parâmetros a serem avaliados quanto os cálculos devem seguir o guia de validação escolhido (BRASIL, 2011; CE, 2021; PASCHOAL, 2008).

Dentre os procedimentos de avaliação da estabilidade dos padrões de trabalho e MRC, soluções padrão, e do analito em diversas situações, o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (BRASIL, 2011), apresenta o tópico de estabilidade do analito no extrato ou na solução de abertura de amostra. Este estudo tem como objetivo demonstrar a estabilidade dos analitos nos extratos no período entre a extração/digestão da amostra e o início da análise instrumental. Este parâmetro deve ser avaliado sempre que o extrato não for analisado imediatamente após a extração/digestão. Deve-se realizar o estudo de estabilidade do extrato, logo em seguida à etapa de extração/digestão ou abertura de amostra, sendo este o parâmetro de comparação para as demais análises em diferentes tempos de armazenamento. O período de tempo estudado deve ser superior à duração da corrida analítica ou ao tempo máximo previsto de armazenamento (BRASIL, 2011).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E PADRÕES

Todos os reagentes e padrões usados foram de grau analítico com alto teor de pureza. Os solventes utilizados para as análises cromatográficas eram grau LC-MS ou GC-MS. Acetonitrila e acetato de etila foram adquiridos da JT Baker (EUA) e/ou Sigma Aldrich (EUA). Florisil foi adquirido da Merck (Alemanha). A água utilizada foi de grau ultrapura ou Tipo 1 (Millipore Milli-Q® (Molsheim, França). O padrão analítico de HPAs contendo a mistura de analitos ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), com pureza de 95% ou superior, foi adquirido da Sigma-Aldrich (CRM47940). A solução padrão de HPAs é composta por: benzo[a]antraceno (BaA) (CAS nº 56-55-3), criseno (CrS) (CAS nº 218-01-9), benzo[b]fluoranteno (BbF) (CAS no. 205-99-2), benzo[k]fluoranteno (BkF) (CAS no. 207-08-9), benzo[a]pireno (BaP) (CAS no. 50-32-8), benzo[ghi]pirileno (BgP) (CAS no. 191-24-2), indeno[1,2,3-cd]pireno (IcP) (CAS nº 193-39-5), dibenzo[a,h]antraceno (DbA) (CAS no. 53-70-3). O padrão interno utilizado foi o isótopo de criseno deuterado (CrS-d12) (CAS nº. 1719-03-5) adquirido da Toronto Research Chemicals (Ontário, Canadá). A solução de fortificação de HPAs ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) foi preparada pela diluição da mistura de padrões ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com acetato de etila. A solução estoque do padrão interno (PI) de criseno-d12 ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi preparada em acetona ( $10 \text{ mg}$  do padrão, avolumados em balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$ , e dissolvidos com auxílio de banho de ultrassom). A solução intermediária de criseno-d12 ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi preparada em acetato de etila ( $100 \mu\text{L}$  da solução estoque, avolumada em balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$ ) e a solução de fortificação de criseno-d12 ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) foi preparada em acetato de etila ( $500 \mu\text{L}$  da solução intermediária, avolumada em balão volumétrico de  $25 \text{ mL}$ ). Todas as soluções foram armazenadas em freezer ( $-30$  a  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até o momento do uso.

#### 3.2 AMOSTRAS E FASES SÓLIDAS

As amostras de pescado utilizadas nos ensaios preliminares e de validação foram provenientes de materiais remanescentes de amostras oficiais coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), após a conclusão da rotina de análises fiscais e de monitoramento do Setor Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC/MAPA). As amostras brancas



foram obtidas a partir de material remanescente das análises de rotina laboratorial e foram previamente analisadas para a confirmação quanto a ausência dos analitos de interesse.

As fases sólidas alternativas testadas foram: celulose microcristalina, vermiculita, polvilho doce, polvilho azedo, pó de concha, casca de arroz carbonizada, terra de diatomácea, perlita expandida, cevada, turfa. Os fornecedores das fases sólidas, bem como o preço médio aproximado por quilograma de cada fase sólida está demonstrado no Quadro 8. A nível de comparação, foi utilizada a fase sólida de referência Q-matrix® Hydra (CEM Corporation, EUA), a qual é utilizada no método para determinação de HPAs por LC/MS-MS, atualmente em rotina no SLAV-SC.

Quadro 8- Marca e preço médio das fases sólidas alternativas e comercial, utilizadas no estudo.

<b>Fase sólida</b>	<b>Marca</b>	<b>Preço aproximado Kg(R\$)</b>
Q-Matrix*	CEM Corporation (Matthews, EUA)	1860,00
Terra de diatomácea	Honeywell (Charlotte, EUA)	793,00
Celulose microcristalina	JRS Pharma (Rosenberg, Alemanha)	320,00
Vermiculita	Brasil Minérios (Goiânia, Brasil)	4,99
Polvilho doce orgânico	COOPAFREN (Santo Amaro da Imperatriz, Brasil)	26,00
Polvilho azedo orgânico	COOPAFREN (Santo Amaro da Imperatriz, Brasil)	26,00
Pó de concha	CYSY Mineração (Jaguaruna, Brasil)	5,20
Casca de arroz carbonizada	Terral (Inhaúma, Brasil)	4,99
Perlita expandida	Solovita Compostos Orgânicos (Águas Mornas, Brasil)	22,85
Cevada (malte base pilsen)	Agraria Malte (Guarapuava, Brasil)	6,60
Turfa	All Garden (Jaguariúna, Brasil)	1,00

\* Fase comercial de referência

Fonte: A autora.

Para a realização das análises, a fase sólida de referência (Q-Matrix) e as fases sólidas alternativas foram utilizadas conforme adquiridas pelo fabricante, com exceção das fases perlita expandida, turfa e cevada. A perlita expandida foi preparada com a realização de moagem em um moinho analítico (IKA® A 11 basic). Para o preparo da turfa, foi realizada a secagem em estufa (60 °C, com circulação de ar, *overnight*), que apresentou perda de 56% do peso inicial. A cevada foi adquirida já previamente moída, obtida após processo de maltagem em cervejaria.

A fim de simular o resíduo do processo de produção de cerveja, foi adicionado água na cevada e mantida em banho-maria (65° C) por 60 minutos, após a água foi drenada e, realizada a secagem em estufa (60 °C, com circulação de ar, *overnight*) seguido de moagem. A Figura 6 demonstra as fases sólidas avaliadas no trabalho.

Figura 6- Aspecto físico das fases sólidas utilizadas no processo de triagem do estudo.



Fonte: A autora.

### 3.3 PREPARO DE AMOSTRA E EXTRAÇÃO

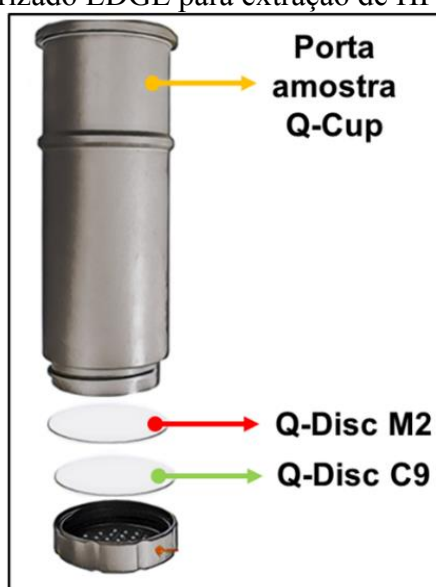
O tecido muscular das amostras de pescado foi homogeneizado utilizando um processador de alimentos (Mixer Philips Walita Pro Mix RI2622/8). Em seguida, foi armazenado em embalagens de alumínio e mantido em um freezer em temperaturas entre -30 a -10 °C até o momento das análises. As ostras e mexilhões foram previamente lavadas em água corrente e retiradas das conchas antes de passarem pelo mesmo processo das outras amostras de pescado.

A metodologia de referência para o preparo de amostra utilizada foi a técnica de dispersão de matriz em fase sólida e extração por líquido pressurizado (MSPD/PLE), seguida de quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS), conforme descrito por Melo *et al.* (2022a), com modificações. Os métodos inovadores desenvolvidos neste projeto consistem na substituição da fase sólida comercialmente utilizada no preparo de amostras por uma fase sólida natural, de origem nacional e com menor custo. A seleção da fase

sólida foi baseada no desempenho analítico, que apresentou resultados similares ou superiores à fase comercial.

No procedimento de extração, foram pesados inicialmente  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguido de fortificação com padrão interno e padrão analítico de HPAs, homogeneizado em vórtex. Em seguida, foi adicionado a fase sólida (~3g) e realizada a técnica de MSPD, (com espátula, por cerca de 20 segundos) para garantir a completa homogeneização da fase sólida com a matriz (Figura 8). O conteúdo (amostra + fase sólida) foi cuidadosamente transferido para um tubo de extração (Q-Cup®) previamente preparado com os filtros C9 + M2 (Figura 7). A extração por líquido pressurizado seguiu as condições apresentadas nas Tabela 3 e 4, e o extrato foi coletado em tubo de polipropileno de 50 mL.

Figura 7- Posicionamento dos filtros no tubo Q-Cup® para uso em sistema de extração por líquido pressurizado EDGE para extração de HPAs em pescado.



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

Tabela 3- Configurações de extração de HPAs em pescado em extrator por líquido pressurizado EDGE.

Ciclo	Solvente de extração	Volume superior (mL)	Volume inferior (mL)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (mm:ss)	Solvente de rinse	Volume de rinse (mL)
1	ACN*	25	10	70	03:00	ACN*	5

\*ACN= acetoneitrila.

Tabela 4- Configurações do programa de lavagem do extrator por líquido pressurizado EDGE..

Lavar	Solvente	Volume (mL)	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)
1	H <sub>2</sub> O	10	00:30	100

Após o processo de extração, todo o volume de solente do extrato foi evaporado em banho-maria à  $40 \pm 2$  °C com auxílio de nitrogênio. Na sequência, o extrato seco foi redissolvido em 500 µL de acetato de etila e os tubos foram levados à mesa agitadora por 20 min a 180 rpm (em ângulo de aproximadamente 45°). Após, o sobrenadante foi transferido para um microtubo de centrífuga de 1,5 mL, adicionado aproximadamente 20 mg de florisil, seguido de homogeneização vigorosa em vórtex. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13300 rpm por 10 min a 4 °C. Após, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para um frasco de GC e analisado em um sistema de GC-MS/MS (Figura 8).

Figura 8- Processo de preparo e extração das amostras de pescado usando MSPD e PLE, seguido de análise em um sistema de GC-MS/MS.



Fonte: A autora.

### 3.4 AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FASES SÓLIDAS

#### 3.4.1 Análises iniciais em sistema de LC- MS/MS

Para a avaliação das 10 fases sólidas alternativas e comparação destas com a fase de referência (Q-Matrix), foram inicialmente realizados experimentos de extração de amostras utilizando as 11 fases sólidas (alternativas e referência) sob as mesmas condições. A análise

instrumental dos analitos foi inicialmente realizada por LC-MS/MS, conforme descrito por Melo *et al.* (2022a), com modificações. Para cada uma das fases sólidas avaliadas, foram realizadas extrações em três tipos de amostras, com 3 replicatas para cada tipo, totalizando 9 amostras por fase sólida: amostras brancas (Br, sem adição de padrão), amostras de recuperação (Rec, fortificação com o padrão de analitos ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) antes da extração) e amostras tipo TS (do inglês: *tissue standard*; com fortificação com o padrão de analitos ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) no extrato, após processo de extração e ressuspensão em acetonitrila). As amostras foram analisadas juntamente com triplicata de padrões em solvente na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Os analitos avaliados foram: benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), dibenzo[a,h]antraceno (DbA), indeno[1,2,3-c,d]pireno (IcP) e benzo[ghi]perileno (BgP).

A partir dos resultados obtidos nestes experimentos, foram calculados para cada uma das fases, o efeito de matriz, recuperação relativa, razão sinal/ruído dos picos dos analitos e de interferentes relacionados a cada analito, a razão de sinal de analito/ sinal do interferente (em termos de área de pico), a estimativa da incerteza de medição ( $U$ ) e a recuperação absoluta.

#### 3.4.1.1- Parâmetros de avaliação de analitos

As áreas de pico dos analitos nas amostras de TS (fortificadas após extração) e em solvente foram utilizadas para o cálculo do efeito de matriz, realizado de acordo com Matuszewski (2003), conforme demonstra a Equação 1.

$$EM(\%) = \frac{A_{TS}}{A_S} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

EM= efeito de matriz

$A_{TS}$  =média das áreas das amostras TS (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

$A_S$  = média das áreas dos analitos em solvente (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

As amostras Rec e Br foram utilizadas para comparação de sinal do analito e dos interferentes, bem como de razão sinal/ruído. O sinal/ruído foi calculado pelo software Analyst® (SCIEX), pela divisão da magnitude do sinal do analito pelo valor estimado do ruído

de fundo, que é selecionado a partir da média de áreas próximas ao pico mas que não contenham nenhum pico significativo.

Foi utilizado o valor das médias ( $n=3$ ) e desvio padrão das áreas (sinal de pico) dos analitos e dos interferentes. A razão analito/ interferente foi calculada dividindo a média da área do analito pela média da área do interferente correspondente.

A estimativa da incerteza de medição foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$U = \sigma * K \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$U$ = incerteza de medição

$\sigma$  = desvio padrão das áreas das amostras Rec (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

$K$ = fator de abrangência ( $k=2$ )

A recuperação relativa foi calculada de acordo com o método proposto por Matuszewski (2003), conforme a equação 3.

$$RE(\%) = \frac{A_M}{A_{TS}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$A_M$  = média das áreas dos picos dos analitos nas amostras Rec (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

$A_{TS}$  = média das áreas dos picos dos analitos nas amostras TS (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

A recuperação absoluta foi calculada de acordo com o método proposto por Matuszewski (2003), conforme a equação 4.

$$RE(\%) = \frac{A_M}{A_S} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$A_M$  = média das áreas dos picos dos analitos nas amostras Rec (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

$A_S$  = média das áreas dos analitos em solvente (na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

### 3.4.1.2- Parâmetros de avaliação dos interferentes cromatográficos

Para cada HPA, foi escolhido o pico interferente originário da matriz com a maior intensidade. A escolha do pico interferente foi baseada em estar presente na transição m/z utilizada para a quantificação de cada analito nas amostras brancas analisadas com a fase sólida de referência (Q-Matrix). A Tabela 5 apresenta o tempo de retenção dos analitos e de seus respectivos interferentes. Para os analitos BbF, BkF e BaP, o pico interferente escolhido (A) apresenta o mesmo tempo de retenção nas três transições m/z, sendo, portanto, a mesma substância interferente.

Tabela 5- Tempo de retenção dos analitos e de seus respectivos interferentes.

Analito	Tempo de retenção do analito (min)	Interferente correspondente	Tempo de retenção do interferente (min)
BaA	3,1	A	1,68
Crs	3,5	A	1,68
BbF	4,2	B	4,82
BkF	5,0	B	4,82
BaP	5,6	B	4,82
BgP	7,4	D	2,81
IcP	8,4	E	2,06
DbA	6,8	C	2,31

### 3.4.1.3 Critérios de avaliação

A fim de elencar as fases sólidas mais adequadas ao método, foram estabelecidos quatro critérios (com pesos diferentes para cada critério).

O primeiro critério escolhido foi a razão entre as áreas de pico do analito e do interferente. Esse critério foi considerado superior à simples comparação do sinal do analito, pois o ideal é que o sinal do analito seja intenso, mas preferencialmente acompanhado de uma redução da intensidade do interferente. Pelas razões de desejabilidade de resultados (incremento do sinal analítico acompanhado de redução do sinal do interferente), para este critério foi atribuído o peso mais alto (4) (Tabela 6).

O segundo critério adotado foi a razão das relações ou razões do sinal/ruído do analito pelo sinal/ruído do interferente, uma vez que esse critério mostra o quanto o sinal do analito se

distingue do ruído de fundo (*background*), associado ao mesmo parâmetro do pico do interferente. Novamente, o cenário projetado ideal é uma alta relação sinal/ruído para o analito e uma baixa relação sinal/ruído para o interferente. Sendo este também um parâmetro bastante relevante, atribui-se o peso 3.

O terceiro critério adotado foi a incerteza da medição, estimada como sendo o desvio padrão multiplicado por um fator de abrangência ( $k = 2$ ). O valor da incerteza foi utilizado como parâmetro da dispersão do erro no preparo de amostra usando uma determinada fase sólida. Por ser uma avaliação da repetibilidade do preparo, foi atribuído peso 2 para este critério.

O quarto critério adotado foi a recuperação absoluta, que expressa a perda de analito em função do processo extrativo, já descontando o efeito matriz.

Os pesos atribuídos para cada critério (Tabela 6) foram estabelecidos de acordo com a adequação ao propósito do ensaio, com base na literatura e experiência prévia adquirida na familiarização com o ensaio (HOFF *et al.*, 2022; MOLOGNONI *et al.*, 2020).

Tabela 6- Critérios de avaliação e pesos estabelecidos para triagem das fases sólidas mais adequadas ao método.

Critério	Peso
Razão Analito/ Interferente (Área de pico)	4
Razão Analito/ Interferente (sinal/ruído)	3
Incerteza da medição	2
Recuperação absoluta	1

#### 3.4.1.4 Tabela de pontuação

A avaliação final dos parâmetros foi realizada através da construção da tabela de pontuação (Tabela 21). Inicialmente, os valores de cada um dos critérios para cada combinação de analito e fase sólida foram ordenados numericamente de acordo com o melhor desempenho. Com este valor, foi realizada a média dos analitos para cada uma das fases sólidas, e este resultado foi utilizado para a pontuação.

A classificação final de cada fase sólida estudada foi obtida pela avaliação da média ponderada dos quatro critérios estabelecidos multiplicados por seus respectivos pesos, de acordo com a Equação 5.

$$MP = \frac{((A*4)+(B*3)+(U*2)+(C*1))}{10} \quad \text{Equação 5}$$



Onde:

MP = média ponderada

A = razão Analito/ Interferente (Área de pico)

B = razão S/R Analito/ S/R Interferente (sinal/ruído)

U = incerteza da medição

C = recuperação absoluta

As três fases sólidas que apresentaram melhor pontuação nas análises realizadas em LC-MS/MS foram utilizadas nos testes seguintes em sistema de GC- MS/MS.

### **3.4.2 Análises em GC-MS/MS**

#### *3.4.2.1-Avaliação da massa da amostra*

Após a triagem das diferentes fases sólidas por LC-MS/MS, iniciou-se a transferência do método para determinação de HPAs em pescado para GC-MS/MS. Inicialmente, foi realizada uma avaliação da quantidade mais adequada de amostra, utilizando 2 e 5 g de amostra. A extração foi realizada usando a fase sólida de referência (Q-Matrix) e as três fases selecionadas na primeira etapa (perlita, polvilho doce e cevada). Para cada uma das fases sólidas, as análises foram realizadas em triplicata de amostra, branca e Rec (fortificação com padrão de analitos na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , antes do processo de extração), uma única replicata em TS (fortificação com padrão de analitos na concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  após o processo de extração), bem como triplicata de padrão em solvente ( $20$  e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). O processo de extração seguiu conforme descrito no item 3.3, e as condições analíticas foram as descritas no item 3.5. Os dados obtidos foram utilizados para comparação de área do pico do analito, efeito de matriz e recuperação, sendo que tais parâmetros foram calculados de acordo com o item 3.4.1.1. Uma vez selecionada a fase sólida alternativa que apresentou melhor resposta nos parâmetros avaliados, esta foi utilizada para a validação completa do método proposto.

### 3.5 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Na etapa de preparo de amostra, foi utilizado um equipamento de extração por líquido pressurizado, modelo EDGE® (do inglês: *Energized Dispersive Guided Extraction*, CEM Corporation, EUA). Na análise instrumental foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem*, com fonte de ionização de elétrons (GC-EI-MS/MS), composto por um GC modelo 7890A e um MS modelo GC-MS Triple Quad 7000 (ambos da Agilent Technologies).

A nível de comparação, na etapa analítica inicial, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS), com fonte de ionização química de pressão atmosférica (APCI), modelo 5500 qTRAP (SCIEX).

Outros equipamentos utilizados foram: agitador de tubos tipo vórtex (Tecnal, Brasil), centrífuga refrigerada para tubos de 15 mL e 50 mL (Thermo Fischer Scientific, EUA), centrífuga refrigerada para microtubos (Thermo Fischer Scientific, EUA), concentrador de amostras (Tecnal, Brasil), ultra-freezer (Panasonic, Brasil), refrigerador, balanças analíticas e semi-analíticas.

As Tabelas 7, 8 e 9, demonstram as condições analíticas utilizadas nas análises iniciais com o sistema de LC-MS/MS, para a primeira triagem das diferentes fases sólidas alternativas.

Tabela 7- Condições instrumentais do método para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS.

(continua)

Sistema HPLC	Agilent 1290 Infinity ou ExionLC			
Espectrômetro de massas	QTRAP 5500 – Sciex			
Pré-coluna (opcional) e coluna	<b>Pré-coluna:</b> C <sub>18</sub> (4.0 mm x 3.0 mm) <b>Coluna:</b> Zorbax Eclipse PAH Rapid Resolution HT (2,1 x 100 mm, tamanho de partícula 1,8 µm, marca Agilent)			
Fase móvel/gradiente de eluição	<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
	0,00	250	15	85
Fase móvel A: água	0,01	250	0	100
Fase móvel B: acetonitrila 99%	11,00	250	0	100
	11,50	250	15	85
	12,00	250	15	85
Tempo de auto-equilíbrio do sistema	5 minutos			

Tabela 7- Condições instrumentais do método para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS.

	(conclusão)
Volume de injeção	10 µL
Válvula	0,1 min = Waste / 0,2 min = MS / 11,9 min = Waste)
<i>Dwell time</i>	50 msec
<i>Entrance potential</i> (EP)	10 volts
Aquisição de dados	Computador integrado (Softwares Analyst, MultiQuant ou Sciex OS)

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

Tabela 8- Parâmetros instrumentais da fonte de ionização APCI.

Parâmetro	Valor
Gás de interface (CUR)	20 psi
Gás de colisão (CAD)	High
Corrente do nebulizador (NC)	3
Temperatura da fonte (TEM)	600 °C
Vazão do gás nebulizador (GS1)	60 psi
Micrômetro na vertical	3,5 mm

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

Tabela 9- Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS.

(continua)						
Analito (abreviação)	Tempo de retenção (min) ± 0,5s	Q1 (m/z, em Da)	Q3 (m/z, em Da)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno (BaA)	3,1	228,1	228	106	45	36
		228,1	226	106	55	16
		228,1	227,1	141	55	16
Benzo[ <i>a</i> ]pireno (BaP)	5,6	252,9	250,1	161	73	12
		252,9	248	161	101	12
		252,9	224,2	161	93	12
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno (BbF)	4,2	252,1	248	150	89	12
		252,1	250	150	57	12
		252,1	224,1	150	77	12
Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno (BgP)	7,4	277,2	272	141	111	12
		277,2	274	236	81	12
		277,2	276	246	47	12

Tabela 9- Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS.

(conclusão)

Analito (abreviação)	Tempo de retenção (min) ± 0,5s	Q1 ( <i>m/z</i> , em Da)	Q3 ( <i>m/z</i> , em Da)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno (BkF)	5,0	252,1	248,0	150	89	12
		252,1	250,0	150	57	12
		252,1	224,1	150	77	12
Criseno (Crs)	3,5	228,1	226,0	106	45	36
		228,1	227,1	106	55	16
		228,1	228,0	141	55	16
Dibenzeno[ <i>ah</i> ]antraceno (DbA)	6,8	279,2	275,9	151	60	12
		279,2	262,9	151	60	12
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno (IcP)	8,4	277,2	272,0	141	111	16
		277,2	274,0	236	81	12
		277,2	276,0	246	47	12
Criseno-d <sub>12</sub> (Crs-d12)	3,3	240,1	236,1	226	59	16

DP: potencial de desagrupamento, do inglês: *declustering potential*; CE: energia de colisão, do inglês: *collision energy*; CXP: potencial de saída da célula, do inglês: *exit cell potential*. Transições *m/z* em negrito correspondem à transição utilizada para quantificação; as demais transições são qualificadoras.

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

As condições instrumentais do método para a determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS proposto neste trabalho, estão descritas nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Tabela 10- Condições instrumentais do método para a determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS.

(continua)

Sistema GC	GC 7890			
Espectrômetro de massas	GC-MS Triple Quad 7000			
Coluna	HP-5MS (30m, 0,25 mm, 0,25 µm)			
Gradiente de fluxo	<b>Taxa</b> ( <i>mL min<sup>-1</sup></i> )	<b>Fluxo</b> ( <i>mL min<sup>-1</sup></i> )	<b>Tempo de permanência</b> ( <i>min</i> )	<b>Tempo de corrida</b> ( <i>min</i> )
	-	1	30	30
	1	1,2	0	45,33
Gradiente de temperatura	<b>Taxa</b> ( <i>°C min<sup>-1</sup></i> )	<b>Temperatura</b> ( <i>°C min<sup>-1</sup></i> )	<b>Tempo de permanência</b> ( <i>min</i> )	<b>Tempo de corrida</b> ( <i>min</i> )
	-	60	1	1
	45	90	2	3,6667
	6	250	0	30,333
	2	280	0	45,333

Tabela 10- Condições instrumentais do método para a determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS.

Volume de injeção	1 $\mu$ L
Gas saver	20 mL min <sup>-1</sup> após 3 min
Temperatura da <i>transferline</i>	280 °C
Temperatura da fonte	300 °C
Temperatura dos quadrupolos	180 °C
Aquisição de dados	QQQ Quantitative Analysis

(conclusão)

Tabela 11- Parâmetros instrumentais da multimode inlet (MMI).

Parâmetro	Valor
Aquecimento ( <i>Heater</i> )	280 °C
Pressão ( <i>Pressure</i> )	8,2317 psi
Fluxo de purga do septo ( <i>Septum purge flow</i> )	3 mL min <sup>-1</sup>
Modo ( <i>Mode</i> )	Split
Razão de split ( <i>Split ratio</i> )	2,5:1
Fluxo total de pós corrida ( <i>Post run total flow</i> )	25 mL min <sup>-1</sup>

Tabela 12- Parâmetros instrumentais da limpeza do sistema de injeção.

Parâmetro	Número lavagens pré injeção	Número lavagens pós injeção	Volume
Solução A	5	-	4 $\mu$ L
Solução B	-	5	4 $\mu$ L
Amostra	3	-	2 $\mu$ L
<i>Pumps</i>	6	-	-

Solução A: acetato de etila, e a solução B: isopropanol.

Tabela 13-Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS.

Analito (abreviação)	Tempo de retenção (min) $\pm 0,5s$	Q1 ( <i>m/z</i> , em Da)	Q3 ( <i>m/z</i> , em Da)	CE (volts)
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno (BaA)	30,5	228	226	38
		228	224	60
Benzo[ <i>a</i> ]pireno (BaP)	36,4	252	250	40
		252	248	40
		252	126	40
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno (BbF)	35	252	250	42
		252	248	60
		252	126	15
Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno (BgP)	43,9	276	274	42
		274	272	60
		274	272	42
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno (BkF)	35,1	252	250	35
		252	248	15
		252	126	50

(continua)

Tabela 13- Parâmetros do espectrômetro de massas para determinação de HPAs em pescado por GC-EI-MS/MS.

Analito (abreviação)	Tempo de retenção (min) $\pm 0,5s$	(conclusão)		
		Q1 ( <i>m/z</i> , em Da)	Q3 ( <i>m/z</i> , em Da)	CE (volts)
Criseno (Crs)	30,6	228	226	38
		228	224	42
Dibenzeno[ <i>ah</i> ]antraceno (DbA)	42,8	278	276	42
		276	274	42
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pire no (IcP)	42,6	278	276	42
		276	274	42
Criseno-d <sub>12</sub> (Crs-d12)	30,5	240	236	25

CE: energia de colisão, do inglês: *collision energy*; Transições *m/z* em negrito correspondem à transição utilizada para quantificação; as demais transições são qualificadoras.

### 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da fase sólida alternativa escolhida para a validação do método e da fase sólida comercial (Q-Matrix). As análises foram realizadas nas fases sólidas isoladas, em amostra branca de mexilhão e nas misturas de cada fase com a amostra de mexilhão, para verificar a dispersão adequada da matriz nos dois materiais. As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio com fita dupla face de carbono e revestidos com ouro (350 Å de espessura) em um revestidor Leica modelo EM SCD 500. A visualização e a fotografia das amostras foram realizadas sob o microscópio eletrônico JEOL JSM-6390LV (JEOL, Tóquio, Japão) a uma voltagem acelerada de 8 kV.

### 3.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Após os diversos experimentos de desenvolvimento e otimização do protocolo de preparo de amostra, foi realizada a validação completa do método com a fase sólida alternativa que apresentou o melhor desempenho. Os estudos de validação foram conduzidos de acordo com os critérios adotados pelos laboratórios do MAPA, tendo como referências principais o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) (BRASIL, 2011) e o Regulamento 2021/808/CE (Comunidade Europeia). A validação foi delineada conforme o Procedimento Operacional Padrão (POP) aplicado pelo SLAV-SC para esta finalidade. Os parâmetros incluídos no estudo de validação foram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), seletividade, recuperação, veracidade,

repetibilidade, precisão intermediária, estabilidade, efeito de matriz, robustez e incerteza da medição.

As principais figuras de mérito da validação foram obtidas pelo preparo de amostras brancas fortificadas em três níveis diferentes (1,25; 2,5; 5,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), com sete replicatas para cada nível, sendo o estudo repetido pelo mesmo analista e nas mesmas condições analíticas em três dias consecutivos. Cada um destes dias de análise foi acompanhado por uma curva de calibração preparada em matriz com sete níveis de concentração. As curvas foram obtidas utilizando amostras em branco, fortificadas de acordo com os volumes de soluções mostrados na Tabela 14.

Para o controle de qualidade, em cada rodada de análises, além das amostras de validação, foi preparada ao menos uma amostra duplo branco (sem analito e sem padrão interno) e uma amostra branca simples (sem analito e com padrão interno).

Com os dados obtidos nestes três lotes de análise, foram calculados os parâmetros de limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), veracidade e repetibilidade.

Os demais parâmetros de validação (linearidade, seletividade, recuperação, precisão intermediária, estabilidade, efeito de matriz, robustez e incerteza da medição), foram obtidos com estudos complementares conforme descrito nos itens a seguir.

Tabela 14- Instruções para preparar a curva analítica em uma matriz branca fortificada.

Pontos da curva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Solução de fortificação de HPAs* 100 ng mL <sup>-1</sup> ( $\mu\text{L}$ )	Solução de fortificação de PI** (Crs-d12) 200 ng mL <sup>-1</sup> ( $\mu\text{L}$ )	Concentração equivalentes na amostra ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Concentração de PI** na amostra ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Br	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,0	50	0,0	5,0
0,75	12,5	50	0,75	5,0
1,25	25	50	1,25	5,0
2,5	50	50	2,5	5,0
5,0	100	50	5,0	5,0
7,5	150	50	7,5	5,0
10,0	200	50	10,0	5,0

\* Solução de fortificação de HPAs contendo com anaçitos, BaA, Crs, BbF, BkF, BgP, Icp e DbA. \*\*PI- padrão interno.

### 3.7.1 Efeito de matriz e recuperação

O efeito de matriz foi determinado pelo preparo, análise e comparação de curvas de calibração preparadas em solvente puro e em extrato de matriz branca fortificada após extração (TS). O resultado está apresentado em porcentagem. Se o efeito de matriz for significativo, deve-se fazer a quantificação dos analitos usando curva de calibração preparada através da fortificação de matriz branca, de modo a compensar o efeito de matriz exercido pelas amostras.

A recuperação foi obtida pelo cálculo de perda de analito durante o processo extrativo, através da comparação de amostras fortificadas antes e depois da extração. O resultado é apresentado em porcentagem, sendo que as amostras fortificadas após extração foram consideradas como equivalentes a 100%.

### 3.7.2 Veracidade

A veracidade (alternativamente, acurácia ou, também, exatidão) foi estimada pelo grau de concordância (em %) entre o valor teórico esperado e o valor experimental medido de cada amostra fortificada. Foram usados os valores calculados de concentração dos três lotes de validação citados acima (analisados pelo mesmo analista em três dias distintos). Os valores experimentais, calculados usando a curva de calibração de cada um dos lotes, foram então comparados com os valores teóricos. A diferença entre valores experimental *versus* teórico, foi dividida por 100, para produzir resultados em porcentagem. O critério de aceitabilidade para o parâmetro de veracidade do método proposto é de -30% a +20%.

### 3.7.3 Seletividade

A seletividade foi estudada pela análise de 22 amostras de pescado, fortificadas com padrão interno ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e acompanhadas de curva de calibração conforme demonstra Tabela 15. O critério de aceitabilidade para o parâmetro da seletividade do método proposto é a ausência de quaisquer interferentes na região de eluição dos analitos de interesse.



Tabela 15- Matrizes de pescado utilizadas para o estudo de seletividade.

Número da amostra	Matriz	Número da amostra	Matriz
1	Mexilhão	12	Camarão
2	Mexilhão	13	Tilápia
3	Mexilhão	14	Pescada
4	Mexilhão	15	Corvina
5	Tilápia	16	Cação
6	Tilápia	17	Porquinho
7	Tilápia	18	Dourado
8	Ostra	19	Tamboril
9	Ostra	20	Cação
10	Sardinha	21	Tilápia
11	Pescada	22	Cavalinha

Fonte: Autora.

### 3.7.4 Linearidade

A linearidade foi determinada pelo preparo e análise de curvas de calibração em solvente puro, em extrato de matriz branca e em amostras brancas fortificadas antes da extração. Para a faixa linear de trabalho foi adotado como referência o ponto central da curva  $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (limite máximo permitido em legislação), sendo avaliada entre  $0,75$  a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  em curvas preparadas em matriz. O critério para aceitar a linearidade da curva em matriz foi o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior ou igual a  $0,95$ .

### 3.7.5 Repetibilidade e precisão intermediária

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas em três níveis de concentração definidos a partir da curva de calibração ( $1,25$ ;  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Para cada parâmetro foi realizada a extração de sete amostras brancas fortificadas nas três concentrações citadas, acompanhadas de uma curva de calibração preparada em matriz.

A repetibilidade foi avaliada em termos de precisão intra-dia e inter-dia, em lotes analisados pelo mesmo analista, avaliada de acordo com a concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. O critério de aceitabilidade para o parâmetro de repetibilidade é  $CV < 20\%$ .

A precisão intermediária foi avaliada comparando, em termos de coeficiente de variação (%), os resultados obtidos em lotes analisados por três analistas distintos, em três dias de

análise. O critério de aceitabilidade para a precisão intermediária do método proposto é  $CV < 30\%$ .

### 3.7.6 Incerteza de medição (U)

A estimativa da incerteza de medição foi realizada através da abordagem do limite de decisão ( $CC\alpha$ ), conforme definido pelo Regulamento 2021/808/CE da Comunidade Europeia. Desta forma, a incerteza de medição foi estimada pela extrapolação simples do valor de  $CC\alpha$  de modo bicaudal. O critério de aceitabilidade para o parâmetro da incerteza de medição do método proposto é  $< 30\%$ .

### 3.7.7 Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e limite de decisão ( $CC\alpha$ )

O limite de detecção (LD) foi estabelecido utilizando as concentrações de 0,30 e 0,50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dos analitos em uma matriz branca fortificada, acompanhados de curva de calibração em matrix (Tabela 4). Os pontos estudados foram tratados de modo que pode-se distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível detectável.

Para a determinação do limite de quantificação (LQ), foi estabelecido o ponto mais baixo da curva de calibração (0,75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

O  $CC\alpha$  foi calculado plotando as concentrações obtidas nos três lotes de validação realizados pelo mesmo analista. A média do ponto central da curva é somada a 1,64 (valor de  $t$ ) multiplicado pelo desvio padrão do conjunto de medidas. O valor obtido é então recalculado utilizando a equação da reta. O novo valor de concentração resultante é a concentração do limite de decisão, onde uma amostra não-conforme é caracterizada como sendo de fato não-conforme com uma probabilidade de 95% (ou seja, com erro tipo alfa de 5%).

### 3.7.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada e calculada utilizando o delineamento experimental de teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Sete parâmetros foram estudados: tipo de *liner*, marca da acetonitrila, agitação após ressuspensão do extrato, tipo de filtro, grau do solvente de ressuspensão, temperatura do *liner* e tratamento da fase sólida (perlita). Os parâmetros escolhidos foram avaliados em condições nominais (as mesmas utilizadas no

método de análise) e em condições alteradas, com mudanças de pequena e de média intensidade, e combinados em oito experimentos, para avaliar o impacto destas alterações sobre a performance do método. O Quadro 9 demonstra os parâmetros avaliados em condições nominais e condições alteradas.

Quadro 9- Parâmetros avaliados no teste de Youden em condição nominal e condição alterada.

Fator	Parâmetro	Condição nominal	Condição alterada
A/a	Tipo de <i>liner</i>	Lã de vidro (A)	CarboFrit™* (a)
B/b	Marca do acetonitrila	Marca 1 (B)	Marca 2 (b)
C/c	Agitação após ressuspensão do extrato	Vórtex (C)	Mesa agitadora (c)
D/d	Filtro do Q-Cup	M2** (D)	G1***(d)
E/e	Acetato de etila	Grau GC (E)	Grau LC (e)
F/f	Temperatura do <i>liner</i> (°C)	280 (F)	270 (f)
G/g	Perlita	Normal (B)	Lavada (g)

Letras maiúsculas indicam as condições sem alteração (nominais) e as letras minúsculas indicam as condições alteradas. \* CarboFrit™= *plug* para *liner* (marca registrada Restek Corporation), \*\*M2= filtro de membrana finos de 0,25 µm. \*\*\* G1= filtros de fibra de vidro de 0,3 µm.

Fonte: Adaptado de Youden e Steiner (1975).

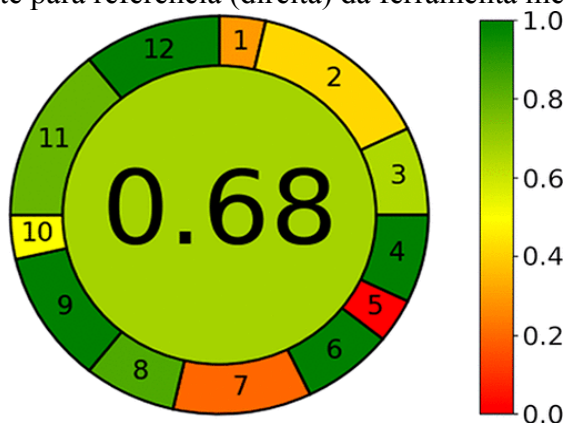
### 3.7.9 Estabilidade

A estabilidade dos extratos foi estudada avaliando a recuperação (em %) para amostras com concentração de 2,5 µg kg<sup>-1</sup> (n = 3). A avaliação se deu através da reinjeção dos extratos após três períodos de tempo diferentes após a extração original: tempo 0, injeção dos extratos no dia da análise; tempo 1, após 7 dias de armazenamento e tempo 2, após 15 dias de armazenamento. Todos os extratos foram armazenados sob refrigeração à -20° C até o momento da análise. No dia referente ao tempo 0, foi realizada a extração de uma nova curva de calibração e todos os extratos foram analisados sob as mesmas condições.

### 3.8 AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE

A avaliação do caráter verde do método analítico desenvolvido foi realizada através das ferramentas métricas *Analytical Greenness calculator* (AGREE) e *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation* (AGREEprep). A utilização da métrica AGREE foi realizada através do software *The Analytical Greenness Calculator*. Para os critérios desta avaliação, são considerados os 12 princípios da Química Analítica Verde, avaliados um a um, em uma escala de 0 a 1. O resultado é demonstrado na forma de um pictograma que indica a pontuação final de 0 a 1 (0 significa pior desempenho em todos os critérios e 1 o melhor desempenho em todos os critérios), assim como através de coloração que vai de verde a vermelho (Figura 9). O peso atribuído pela ferramenta é igual para todos os princípios (peso 2), podendo, porém, serem modificados e justificados pelo usuário, caso necessário.

Figura 9- Pictograma com resultado genérico da avaliação (esquerda) e escala de cores correspondente para referência (direita) da ferramenta métrica AGREE.



Fonte: Pena-Pereira, Wojnowski e Tobiszewski (2020).

Para a avaliação do caráter verde utilizando a ferramenta métrica AGREEprep, foi utilizado o software *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation*. Esta ferramenta utiliza os 10 princípios do preparo de amostra verde como critérios de avaliação, com valores de pontuação que também variam de 0 a 1, assim como a AGREE. Nesta abordagem, a pontuação atribuída a cada princípio não é igual, e pode ser manipulada pelo usuário, se necessário e devidamente justificado.

O resultado é apresentado na forma de um pictograma circular colorido (Figura 10), onde a pontuação geral e a cor contida no círculo interno indicam o desempenho geral do caráter verde da preparação da amostra. As 10 partes contidas ao redor do círculo correspondem a cada

um dos critérios de desempenho e seus comprimentos refletem o peso atribuído ao respectivo critério de avaliação enquanto a cor demonstra o desempenho neste critério.

Figura 10- Pictograma com resultado genérico da avaliação da ferramenta métrica AGREEprep.



Fonte: Adaptado de Wojnowski *et al.* (2022).

A nível de comparação, além da metodologia validada neste trabalho, também foi realizada a avaliação do caráter verde do método anteriormente utilizado pelo MAPA para a determinação de HPAs em pescado (PISSINATTI, 2013).

### 3.9 DESEMPENHO DO MÉTODO VALIDADO

Após a validação do método proposto, o mesmo foi empregado em estudos de aplicabilidade na rotina analítica do SLAV-SC, com análise de amostras reais de pescado para a determinação de HPAs, executado pelo quadro técnico do laboratório. O desempenho do método, foi realizado através dos resultados obtido em ensaios de proficiência (*z-score*).

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

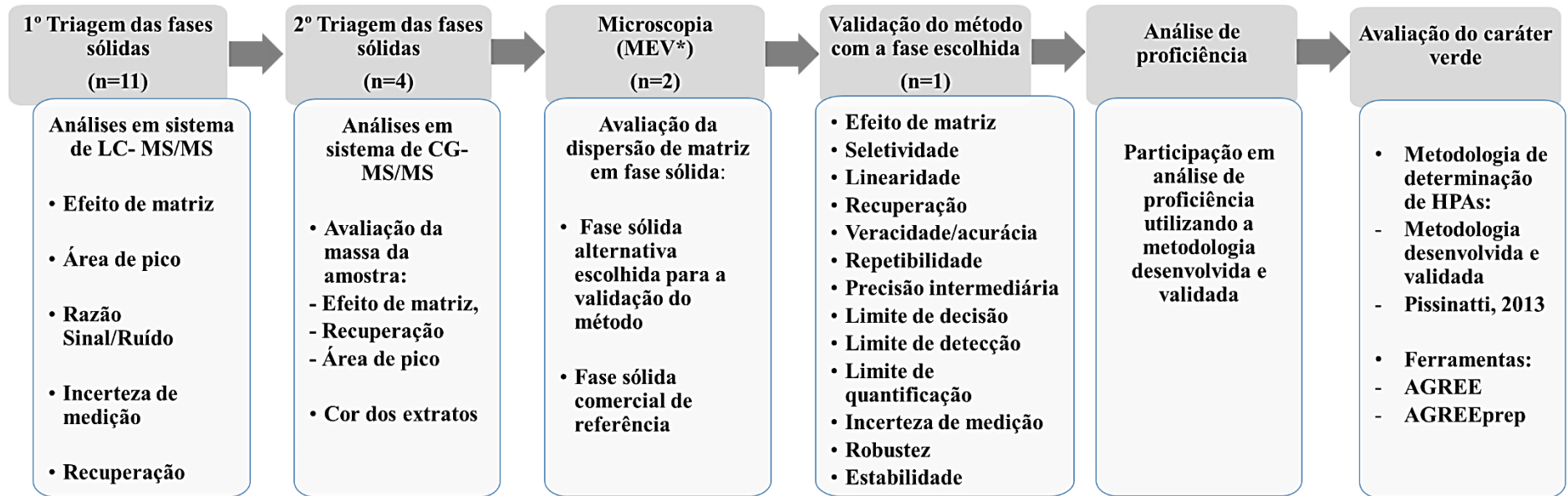
Todas as análises foram realizadas em triplicata, exceto aquelas identificadas em seus respectivos itens. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o software Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, EUA), e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram realizados para verificar diferenças significativas entre as médias e será adotado o nível de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FASES SÓLIDAS**

A Figura 11 demonstra o fluxograma do processo de trabalho, iniciando pela triagem das fases sólidas alternativas em comparação com a fase de referência (Q-Matrix), validação do método com a fase sólida alternativa que apresentou melhor desempenho analítico e posterior participação em análise de proficiência utilizando a metodologia desenvolvida e validada, seguido da avaliação do caráter verde.

Figura 11- Fluxograma do processo de trabalho desde a triagem das fases sólidas alternativas até a validação do método proposto, análise de proficiência e avaliação do caráter verde.



\*Microscopia Eletrônica de Varredura

Fonte: A autora.

#### 4.1.1 Análises em sistema de LC- MS/MS

Para avaliação das diferentes fases sólidas e comparação com a fase de referência (Q-Matrix), a análise dos analitos foi realizada inicialmente em sistema de LC-MS/MS conforme descrito na metodologia de referência (Melo *et al.*, 2022a). Foram analisados por LC- MS/MS oito analitos de HPAs (BaA, Crs, BbF, BkF, BaP, BgP, IcP e DaA) em 11 fases sólidas, e avaliados quanto ao efeito de matriz, recuperação relativa, área de pico dos analitos e dos interferentes relacionados a cada analito, razão sinal/ruído dos picos dos analitos e dos interferentes, a razão de sinal de analito/ sinal do interferente (em termos de área de pico e sinal/ruído), a estimativa da incerteza de medição ( $U$ ) e a recuperação absoluta, calculadas conforme descrito na seção 3.4.1.

Os dados dos analitos BaA e Crs não foram incluídos nos resultados desta primeira etapa de avaliação, pois apresentaram coeluição, o que impossibilitou a integração dos picos, o que pode ser atribuído a perda de resolução da coluna cromatográfica. O tipo de coluna de HPLC utilizado para a análise de HPAs é, em geral, modelos exclusivos (por exemplo, Zorbax Eclipse PAH Rapid Resolution HT (2,1 x 100 mm, tamanho de partícula 1,8  $\mu\text{m}$ , marca Agilent)), que apresenta afinidade específica para este grupo de analitos. Além disso, os HPAs são substâncias de baixo peso molecular e não possuem na sua constituição nenhum heteroátomo, o que torna essas substâncias mais difíceis de serem analisadas por espectrometria de massas devido ao grande número de interferentes, pois moléculas de baixo peso molecular e que contêm na sua composição somente carbono e hidrogênio são muito abundantes na natureza, especialmente em amostras complexas como ostras, mexilhões e pescado em geral. Da mesma forma, os resultados referentes ao pico interferente A não foram considerados para esta etapa, uma vez que tal interferente foi selecionado por apresentar relação com os analitos BaA e Crs.

É importante mencionar que durante as análises de rotina de determinação de HPAs em pescado em sistema de LC-MS/MS, a integração dos picos dos analitos BaA e Crs apresentava certo grau de dificuldade, o que reforçou a necessidade de otimização e validação do método em sistema de GC-MS/MS, uma vez que é o método de escolha para a determinação de HPAs em baixas concentrações. Cabe ressaltar que este instrumento não estava inicialmente disponível no SLAV-SC e por isso, todo o desenvolvimento inicial do ensaio de determinação de HPAs em pescado se deu em um sistema de LC-MS/MS.



#### 4.1.1.1 Efeito de Matriz

A Tabela 16 apresenta os resultados de efeito de matriz e recuperação relativa obtidos para os analitos de interesse nas onze fases sólidas avaliadas.

Tabela 16- Efeito de matriz e recuperação relativa dos analitos de interesse nas diferentes fases avaliadas.

Fase	Parâmetro (%)	BbF	BkF	BaP	DbA	BgP	IcP
<b>Q-Matrix</b>	Efeito de matriz	131	165	211	42	41	37
	Recuperação	89	61	30	89	95	104
<b>Celulose</b>	Efeito de matriz	171	91	98	51	57	52
	Recuperação	58	94	46	62	58	60
<b>Vermiculita</b>	Efeito de matriz	136	103	67	48	54	50
	Recuperação	44	23	37	44	40	44
<b>Polvilho azedo</b>	Efeito de matriz	73	63	63	52	59	55
	Recuperação	75	56	52	63	60	62
<b>Polvilho doce</b>	Efeito de matriz	62	67	64	58	65	63
	Recuperação	59	52	54	58	63	61
<b>Pó de concha</b>	Efeito de matriz	105	92	81	69	191	125
	Recuperação	24	25	23	26	17	20
<b>Casca de arroz</b>	Efeito de matriz	86	85	86	75	98	90
	Recuperação	14	9	7	6	9	9
<b>Terra Diatomácea</b>	Efeito de matriz	63	76	64	65	77	72
	Recuperação	42	38	40	39	35	39
<b>Perlita</b>	Efeito de matriz	59	78	74	74	85	82
	Recuperação	51	40	38	38	37 <sup>a</sup>	39
<b>Cevada</b>	Efeito de matriz	75	81	92	87	99	99
	Recuperação	11	11	9	8	8	8
<b>Turfa</b>	Efeito de matriz	NA*	39	103	62	87	92
	Recuperação	23	54	28	40	30	30

\*NA=não avaliado, devido a presença do analito BbF na fase turfa pura (branca). Valores >100% indicam aumento de ionização e valores <100% indicam supressão de ionização. BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Na Tabela 16, é possível observar que todos os analitos, para todas as fases estudadas, apresentam efeito de matriz. Na maioria dos casos, o efeito de matriz é negativo, ou seja, causa

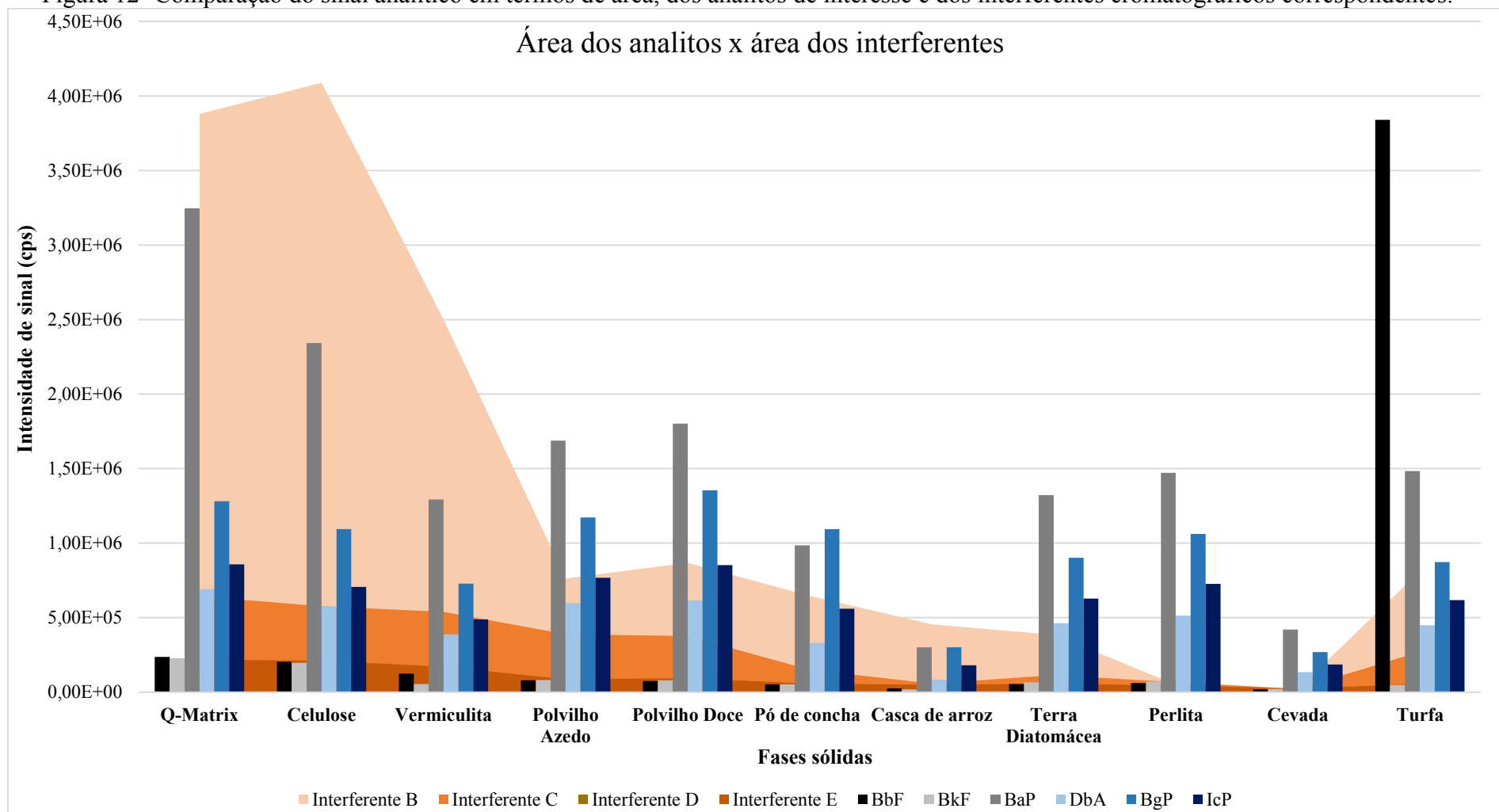
supressão iônica (<100%). As fases sólidas polvilho doce, polvilho azedo, casca de arroz, terra diatomácea, perlita e cevada, apresentaram efeito de matriz negativo com supressão de ionização (valores <100%), e as fases celulose, vermiculita, pó de concha, turfa e Q-Matrix (referência), apresentaram efeito de matriz positivo tanto com aumento de ionização (valores >100%) para alguns analitos, quanto com supressão de ionização para outros analitos. Foi verificado que a fase sólida turfa (amostra branca) apresentou presença do analito BbF. Desta forma, esta fase não será avaliada nas próximas análises, por ter demonstrado risco de apresentar algum analito.

A fim de compensar o efeito de matriz sofrido pelas amostras, a quantificação dos analitos deve ser realizada sempre utilizando curva de calibração preparada com amostra branca fortificada com os analitos.

#### *4.1.1.2 Área e razão sinal/ruído dos analitos e dos interferentes cromatográficos*

Os resultados obtidos de área de pico e razão sinal/ruído dos analitos de interesse e dos interferentes cromatográficos nas diferentes fases sólidas avaliadas estão demonstrados na Figura 12 e 13, respectivamente.

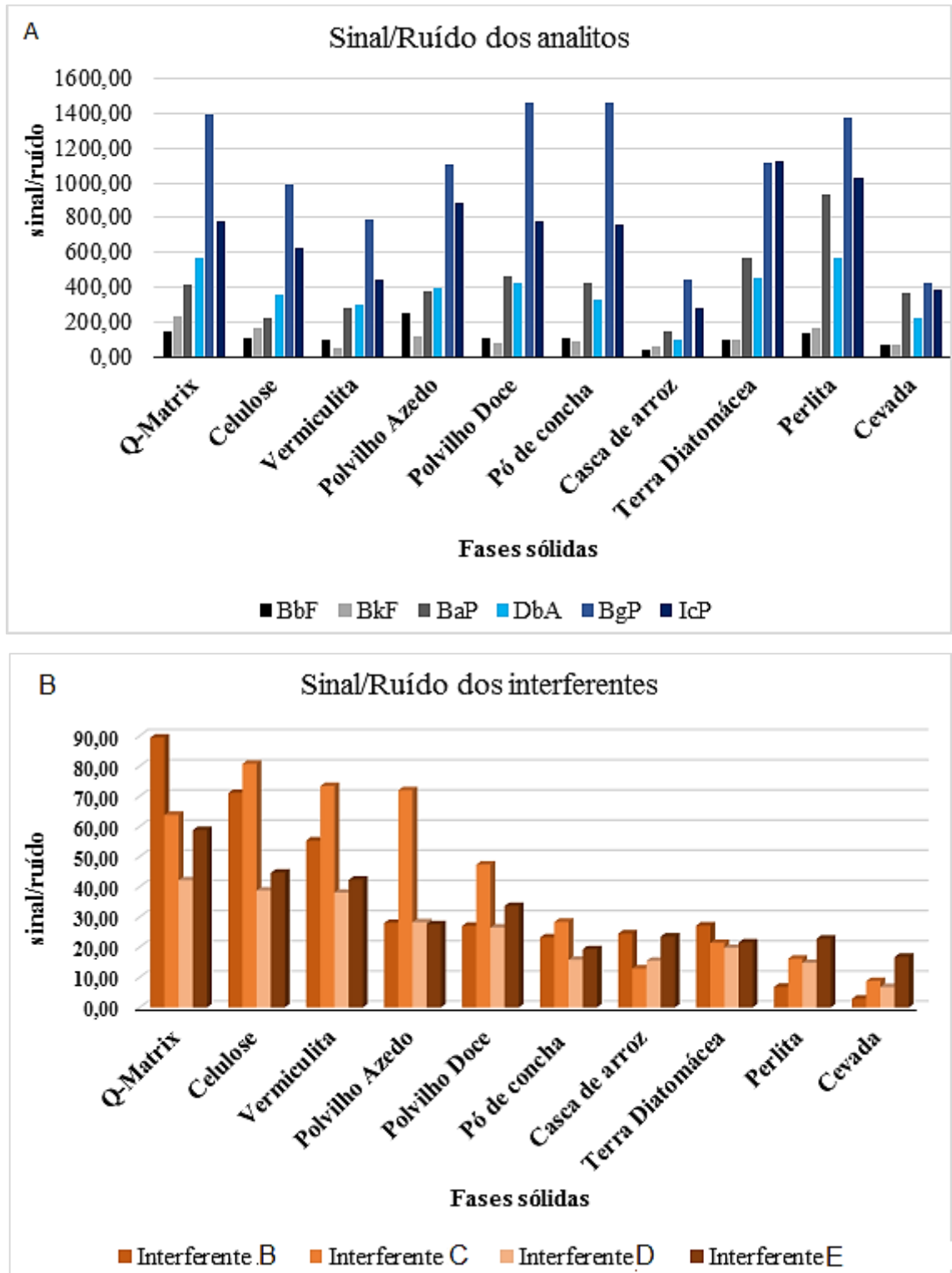
Figura 12- Comparação do sinal analítico em termos de área, dos analitos de interesse e dos interferentes cromatográficos correspondentes.



De acordo com a Figura 12 as fases que apresentaram menor presença de todos os interferentes para todos os analitos foram a perlita e a cevada. As fases vermiculita, celulose e a fase de referência (Q-Matrix) apresentam a maior presença de interferentes, principalmente os interferentes B e C. Na escolha de um método de preparo de amostras, o objetivo geral é alcançar um equilíbrio entre uma extração adequada (com alta concentração do analito e minimizar a presença de compostos co-extraídos) e a sensibilidade/ reprodutibilidade analítica. Desta forma, na dispersão de matriz em fase sólida é importante que a fase sólida seja capaz de promover maior limpeza do extrato e eliminar e/ou diminuir a presença da maioria dos interferentes cromatográficos e, ao mesmo tempo, apresentar sinal analítico dos analitos de interesse.

Assim, foi possível observar que com exceção das fases casca de arroz e cevada, a área de pico dos analitos não apresentou grande variação entre as fases. Entretanto, a intensidade dos interferentes variou de forma significativa, sendo evidente para a maioria das fases avaliadas, incluindo a fase de referência, a qual apresentou os maiores sinais para os picos interferentes monitorados. Também pode-se observar que, entre as fases com menor presença de interferentes (perlita e cevada), a perlita apresentou os sinais dos analitos superiores à cevada. Com relação a cevada destaca-se a importância de não analisar somente a intensidade do sinal dos analitos, mas também avaliar o impacto dos interferentes e as relações sinal/ruído de ambos, embora essa fase tenha produzido baixa presença de interferentes, também apresentou os menores sinais analíticos. Em relação a turfa, como esta apresentou nas análises de amostra branca a presença de área de pico do analito BbF, esta fase sólida foi excluída da avaliação.

Figura 13- Sinal/ruído dos analitos de interesse (A) e dos interferentes cromatográficos (B) nas diferentes fases sólidas avaliadas.



Em relação ao sinal/ruído, espera-se que a fase sólida ideal seja capaz de produzir uma alta relação sinal/ruído para o analito e uma baixa relação sinal/ruído para o interferente. Nos resultados observou-se que a maior parte das fases sólidas apresentou elevada razão sinal/ruído, exceto casca de arroz e cevada. Na Figura 13B, considerando os quatro interferentes cromatográficos, a ordem das fases com melhor desempenho foi: cevada, perlita, casca de arroz, pó de concha, terra diatomácea, polvilho doce, polvilho azedo, vermiculita, celulose e Q-Matrix (fase de referência), que não apresentou remoção satisfatória dos principais interferentes, quando comparada às demais fases sólidas avaliadas. Para a escolha das fases sólidas mais adequadas ao método, é importante considerar além da relação analito/interferente em termos de sinal/ruído, outros parâmetros analíticos, conforme demonstra a seção seguinte (4.1.1.2).

#### *4.1.1.3 Critérios de avaliação*

Os quatro critérios de avaliação e seus respectivos pesos, utilizados para a triagem das fases sólidas mais adequadas ao método, foram estabelecidos e calculados de acordo com a seção 3.4.1.3. A média dos valores estabelecidos para cada um dos critérios estão descritos nas Tabelas 17,18, 19 e 20.

Tabela 17- Razão analito/interferente (área de pico) e a média dos valores estabelecidos para cada analito nas diferentes fases sólidas avaliadas.

Fase sólida	Razão Analito/Interferente (Área de pico)						Valor estabelecido*						Média
	BbF/B	BkF/B	BaP/B	DbA/C	BgP/D	IcP/E	BbF/B	BkF/B	BaP/B	DbA/C	BgP/D	IcP/E	
<b>Q-Matrix</b>	0,06	0,06	0,84	1,08	10,01	3,95	4	4	4	3	3	4	3,67
<b>Celulose</b>	0,05	0,05	0,57	1,00	9,92	3,34	2	3	2	2	2	2	2,17
<b>Vermiculita</b>	0,05	0,02	0,52	0,72	6,93	2,87	1	1	1	1	1	1	1,00
<b>Polvilho Azedo</b>	0,10	0,11	2,21	1,54	16,86	8,90	7	7	7	5	5	6	6,17
<b>Polvilho Doce</b>	0,09	0,09	2,08	1,64	21,17	9,14	6	6	6	6	6	7	6,17
<b>Pó de concha</b>	0,08	0,08	1,52	2,20	36,69	9,90	5	5	5	7	9	8	6,50
<b>Casca de arroz</b>	0,05	0,04	0,66	1,45	12,79	3,65	3	2	3	4	4	3	3,17
<b>Terra Diatomácea</b>	0,14	0,17	3,44	4,08	31,50	11,13	8	8	8	8	7	9	8,00
<b>Perlita</b>	1,22	1,42	29,39	7,68	59,63	16,32	10	10	10	10	10	10	10,00
<b>Cevada</b>	0,86	1,05	20,88	6,25	34,64	8,25	9	9	9	9	8	5	8,17

BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

\*Valor estabelecido para cada fase sólida, de acordo com o melhor desempenho em cada analito, sendo o valor dez considerado como o melhor desempenho.

Tabela 18- Razão analito/interferente (sinal/ruído) e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas.

Fase sólida	Analito/Interferente (Sinal/ruído)						Valor estabelecido*						Média
	BbF/B	BkF/B	BaP/B	DbA/C	BgP/D	IcP/E	BbF/B	BkF/B	BaP/B	DbA/C	BgP/D	IcP/E	
<b>Q-Matrix</b>	1,64	2,64	4,66	8,91	33,10	13,35	3	4	2	5	4	3	3,50
<b>Celulose</b>	1,52	2,35	3,12	4,45	25,70	13,96	1	3	1	2	2	4	2,17
<b>Vermiculita</b>	1,74	0,81	5,14	4,08	20,82	10,38	4	1	3	1	1	1	1,83
<b>Polvilho Azedo</b>	9,13	4,21	13,58	5,45	39,39	32,34	8	8	5	3	5	7	6,00
<b>Polvilho Doce</b>	3,87	2,84	17,06	8,91	55,19	23,30	6	5	6	6	6	5	5,67
<b>Pó de concha</b>	4,42	4,00	18,29	11,55	92,77	39,71	7	7	7	7	9	8	7,50
<b>Casca de arroz</b>	1,58	2,29	5,91	7,91	28,69	12,02	2	2	4	4	3	2	2,83
<b>Terra Diatomácea</b>	3,70	3,68	20,97	21,15	56,43	52,58	5	6	8	8	7	10	7,33
<b>Perlita</b>	19,68	24,94	137,22	35,52	93,71	45,54	9	10	10	10	10	9	9,67
<b>Cevada</b>	24,11	22,76	126,00	25,86	63,45	23,31	10	9	9	9	8	6	8,50

BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

\*Valor estabelecido para cada fase sólida, de acordo com o melhor desempenho em cada analito, sendo o valor dez considerado como o melhor desempenho.



Tabela 19- Incerteza de medição (U(y)), expressa como incerteza padrão expandida em área de pico (sinal analítico) e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas.

Fase sólida	U(y), em área de pico (cps)						Valor estabelecido*						
	BbF	BkF	BaP	DbA	BgP	IcP	BbF	BkF	BaP	DbA	BgP	IcP	Média
<b>Q-Matrix</b>	2,75E+04	2,05E+05	6,48E+05	6,62E+03	5,55E+04	1,44E+05	5	1	3	10	8	6	5,50
<b>Celulose</b>	1,27E+04	1,26E+05	3,83E+05	7,87E+04	5,41E+04	6,71E+04	10	2	4	7	9	8	6,67
<b>Vermiculita</b>	4,11E+04	3,83E+04	3,40E+05	1,18E+05	2,24E+05	1,90E+05	3	4	6	4	5	4	4,33
<b>Polvilho Azedo</b>	1,16E+05	1,20E+04	2,61E+05	1,06E+05	2,85E+05	1,93E+05	1	8	7	5	3	3	4,50
<b>Polvilho Doce</b>	1,37E+04	1,47E+04	1,02E+05	8,14E+04	5,15E+04	5,43E+04	9	7	9	6	10	9	8,33
<b>Pó de concha</b>	3,36E+04	1,04E+04	2,14E+05	6,63E+04	1,74E+05	1,04E+05	4	9	8	8	6	7	7,00
<b>Casca de arroz</b>	1,72E+04	6,91E+03	4,64E+04	2,14E+04	5,74E+04	2,47E+04	8	10	10	9	7	10	9,00
<b>Terra Diatomácea</b>	2,09E+04	3,14E+04	9,65E+05	2,84E+05	5,15E+05	2,84E+05	6	5	2	2	2	2	3,17
<b>Perlita</b>	6,19E+04	5,71E+04	1,24E+06	3,88E+05	9,15E+05	5,70E+05	2	3	1	1	1	1	1,50
<b>Cevada</b>	2,00E+04	1,93E+04	3,78E+05	1,36E+05	2,70E+05	1,88E+05	7	6	5	3	4	5	5,00

BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

\*Valor estabelecido para cada fase sólida, de acordo com o melhor desempenho em cada analito, sendo o valor dez considerado como o melhor desempenho.

Tabela 20- Recuperação absoluta e média dos valores estabelecidos para cada analito, nas diferentes fases sólidas avaliadas.

Fase sólida	Recuperação absoluta						Valor estabelecido*						
	BbF	BkF	BaP	DbA	BgP	IcP	BbF	BkF	BaP	DbA	BgP	IcP	MÉDIA
<b>Q-Matrix</b>	116	100	63	38	39	38	10	10	10	10	9	10	9,83
<b>Celulose</b>	100	86	45	32	33	31	9	9	9	7	7	6	7,83
<b>Vermiculita</b>	60	24	25	21	22	22	8	4	4	4	3	3	4,33
<b>Polvilho Azedo</b>	55	35	33	33	35	34	7	8	7	8	8	8	7,67
<b>Polvilho Doce</b>	37	35	35	34	41	38	6	7	8	9	10	9	8,17
<b>Pó de concha</b>	25	23	19	18	33	25	3	3	3	3	6	4	3,67
<b>Casca de arroz</b>	12	8	6	5	9	8	2	1	1	1	2	1	1,33
<b>Terra Diatomácea</b>	26	29	25	25	27	28	4	5	5	5	4	5	4,67
<b>Perlita</b>	30	31	28	28	32	32	5	6	6	6	5	7	5,83
<b>Cevada</b>	9	9	8	7	8	8	1	2	2	2	1	2	1,67

BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

\*Valor estabelecido para cada fase sólida, de acordo com o melhor desempenho em cada analito, sendo o valor dez considerado como o melhor desempenho.

A fase sólida que apresentou maior média da razão analito/interferente (Tabela 17) em termos de área de pico, para os seis analitos avaliados, foi a perlita, seguida da terra diatomácea, cevada, pó de concha, polvilho doce e polvilho azedo, Q-Matrix, casca de arroz, celulose e vermiculita. Vale observar que a fase sólida de referência (Q-Matrix) apresentou média inferior à seis fases alternativas para este critério. Ressalte-se que este foi considerado como o critério analítico de maior importância, ao qual foi atribuído o maior peso (4) dentre os quatro critérios estabelecidos para a triagem das fases.

Conforme demonstrado na Tabela 18, a ordem decrescente das fases que apresentaram maior média para o razão analito/interferente (em termos de razão sinal/ruído) foi perlita > cevada > pó de concha > terra diatomácea > polvilho azedo > polvilho doce > Q-Matrix > casca de arroz > celulose > vermiculita. Para este critério (peso 3), a fase de referência (Q-Matrix) apresenta média maior somente para três das dez fases sólidas alternativas avaliadas. A fase com melhor desempenho neste critério foi a perlita.

A estimativa da incerteza da medição (Tabela 19) dá uma ideia do erro nas determinações das amostras em replicatas. Logo, quanto menor for o valor da incerteza da medição para as amostras fortificadas em triplicata de uma determinada fase sólida, mais interessante para a análise é o uso dessa fase sólida. Portanto, as amostras foram classificadas de acordo com esta lógica, sendo que quanto menor a incerteza da medição, maior a pontuação obtida para este critério. A fase sólida que apresentou maior média no critério de incerteza de medição foi a casca de arroz, seguida de polvilho doce, pó de concha, celulose, Q-Matrix, cevada, polvilho azedo, vermiculita, terra diatomácea e perlita. Neste critério, a fase de referência teve média abaixo de quatro fases alternativas e desempenho superior à cinco fases alternativas analisadas, incluindo a perlita, que também apresentou melhor desempenho nos dois critérios demonstrados anteriormente.

A fase sólida que apresentou maior média no critério de recuperação absoluta (Tabela 20) foi a fase de referência Q-Matrix, seguida de polvilho doce, celulose, polvilho azedo, perlita, terra de diatomácea, vermiculita, pó de concha, cevada e casca de arroz.

#### *4.1.1.4 Tabela de pontuação*

A Tabela de pontuação final da triagem com as dez fases sólidas foi calculada de acordo com a seção 3.4.1.4 e os resultados são demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21- Média ponderada dos critérios estabelecidos e colocação final da triagem das fases sólidas mais adequadas ao método.

Fase sólida	Razão Analito/ Interferente (Área)	Razão Analito/ Interferente (S/R)	U(y)	Recuperação absoluta	Média ponderada	Colocação Final
Perlita	10,00	9,67	1,50	5,83	7,78	1°
Cevada	8,17	8,50	5,00	1,67	6,98	2°
Polvilho Doce	6,17	5,67	8,33	8,17	6,65	3°
Pó de concha	6,50	7,50	7,00	3,67	6,62	4°
Terra Diatomácea	8,00	7,33	3,17	4,67	6,50	5°
Polvilho Azedo	6,17	6,00	4,50	7,67	5,93	6°
Q-Matrix	3,67	3,50	5,50	9,83	4,60	7°
Casca de arroz	3,17	2,83	9,00	1,33	4,05	8°
Celulose	2,17	2,17	6,67	7,83	3,63	9°
Vermiculita	1,00	1,83	4,33	4,33	2,25	10°

U= incerteza de medição, S/R= relação sinal/ruído.

Conforme demonstrado na Tabela 21, a pontuação final da triagem das fases sólidas mais adequadas ao método, foi perlita com a primeira colocação, seguida da cevada, polvilho doce, pó de concha, terra diatomácea, polvilho azedo, Q-Matrix, casca de arroz, celulose e vermiculita. Deste modo, as fases perlita, cevada e polvilho doce foram avaliadas na etapa seguinte, sempre em comparação com a fase de referência, utilizando GC-MS/MS em substituição à LC-MS/MS.

É importante mencionar que, após esta primeira triagem, foi possível observar que seis entre as dez fases sólidas naturais alternativas avaliadas neste estudo apresentaram melhor desempenho quando comparadas à fase sólida de referência.

#### 4.1.2 Análises em sistema de GC-MS/MS

A triagem em sistema de GC-MS/MS para escolha da fase sólida alternativa mais adequada para o preparo de amostra e validação do método de determinação de HPAs em pescado foi realizada utilizando as fases alternativas perlita, cevada e polvilho doce. A fase de referência (Q-Matrix) foi usada para fins de comparação de performance. Foram analisados os oito analitos de interesse contemplados na metodologia proposta (BaA, Crs, BbF, BkF, BaP, BgP, IcP e DbA).

#### 4.1.2.1 Avaliação da massa da amostra

Para a avaliação da massa de amostra foi utilizado 2 e 5 g de amostra conforme descrito na seção 3.4.2.1. Os dados obtidos foram utilizados para comparação de área de pico dos analitos, efeito de matriz e recuperação, calculados de acordo com a seção 3.4.1.1. A Tabela 22 apresenta o efeito de matriz e recuperação com as diferentes fases sólidas.

Tabela 22- Efeito de matriz e recuperação utilizando 2 e 5 gramas de amostra, com as fases sólidas perlita, cevada, polvilho doce e Q-Matrix em sistema de GC-MS/MS.

Efeito de Matriz e Recuperação Relativa										
Fase sólida	Parâmetro (%)	Massa da amostra (g)	BaA	Crs	BbF	BkF	BaP	BgP	IcP	DbA
Q-Matrix*	Efeito de Matriz	2	100	107	67	58	55	30	33	36
		5	61	63	51	52	48	52	50	61
	Recuperação relativa	2	64	65	67	75	65	62	60	53
		5	35	35	20	20	21	75	77	87
Polvilho doce	Efeito de Matriz	2	89	94	70	66	60	29	34	32
		5	68	71	53	53	46	60	59	69
	Recuperação relativa	2	62	66	58	55	54	62	51	58
		5	39	42	36	36	31	36	35	42
Cevada	Efeito de Matriz	2	58	63	36	35	29	22	20	21
		5	54	56	41	42	38	54	57	67
	Recuperação relativa	2	52	56	56	55	61	56	64	67
		5	9	10	8	7	9	33	32	34
Perlita	Efeito de Matriz	2	136	140	117	112	102	69	72	66
		5	63	65	48	48	41	66	55	77
	Recuperação relativa	2	36	40	35	35	31	36	32	33
		5	40	42	35	35	29	42	47	46

BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno. \*Fase de referência.

A Tabela 22 apresenta o efeito de matriz para os oito analitos analisados em sistema de GC-MS/MS, para as quatro fases sólidas avaliadas com 2 e 5 gramas de massa de amostra (onde apenas o analito BaA quando usada a fase de referência não apresentou efeito de matriz). Com exceção da fase perlita (analitos BaA, Crs, BbF, BkF e BaP) e da fase de referência (analito Crs), que apresentam efeito de matriz positivo com aumento de sinal (valores >100%), todos

os demais analitos, nas quatro fases avaliadas, apresentaram supressão de ionização (valores <100%). Com base neste resultado, foi adotado o uso de curva de calibração em matriz branca fortificada, incluindo todas as análises de validação do método, a fim de compensar o efeito de matriz.

Em relação a recuperação (Tabela 22), a maioria dos analitos, nas quatro fases sólidas analisadas, apresentaram valores de recuperação maiores quando utilizado 2 gramas de amostra, com exceção do BgP, IcP e DaA para a fase Q-Matrix e BaA, Crs, BgP, IcP e DbA para a fase perlita. Os menores valores de recuperação foram observados para a cevada, utilizando 5g de amostra, para os analitos BaA, Crs, BbF, BkF, BaP. A fase polvilho doce apresentou resultados de recuperação muito semelhantes à fase de referência, enquanto a perlita apresentou valores relativamente menores. Vale mencionar que o valor de recuperação é a perda ocorrida no processo de extração, já descontado o efeito de matriz, e que, devido a curva de calibração ser preparada em matriz, não há necessidade de corrigir os resultados pelo fator de recuperação. Cabe ressaltar que outros parâmetros analíticos também devem ser considerados para a escolha da melhor fase de dispersão, como por exemplo a área de pico e razão sinal/ruído.

A Figura 14 demonstra as áreas de pico utilizando 2 e 5 gramas de amostra, nas quatro fases avaliadas.

Figura 14-Áreas de pico utilizando 2 e 5 gramas de amostra, com as fases sólidas Q-Matrix (Q-M), polvilho doce (PD), cevada (CE) e perlita (PE).

(continua)

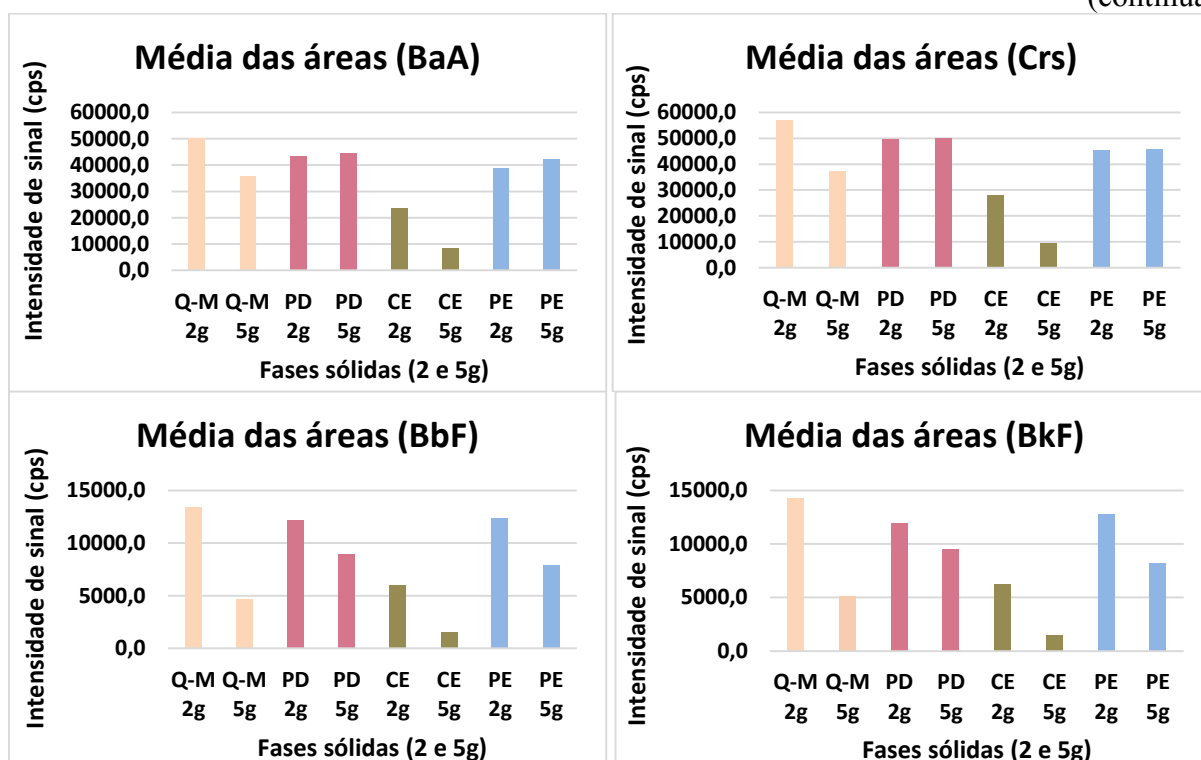
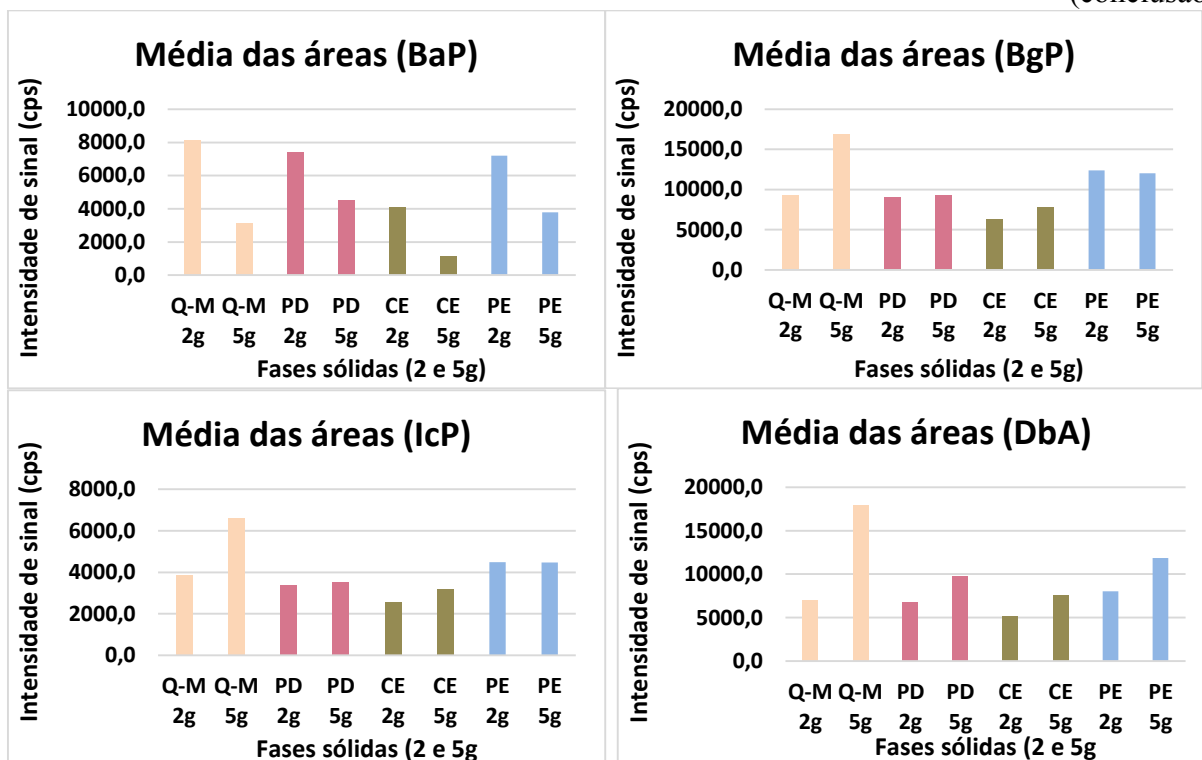


Figura 14- Áreas de pico utilizando 2 e 5 gramas de amostra, com as fases sólidas Q-Matrix (Q-M), polvilho doce (PD), cevada (CE) e perlita (PE).

(conclusão)



BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Considerando os dados demonstrados na Figura 14, pode-se observar que a fase sólida cevada, apresentou área de pico inferior às demais fases para os oito analitos, nas duas massas de amostra avaliadas (2 e 5 gramas). Quanto às demais fases sólidas, o aumento da massa da amostra para 5 gramas, não apresentou aumento na intensidade de sinal (cps, contagens por segundo) para a maioria dos analitos. Ao contrário, com aumento de massa da amostra, houve diminuição ou foi mantido o sinal dos principais analitos do método, BaA, Crs, BbF e BaP (reportados em legislação) para todas as fases estudadas. Desta forma, foi mantida a utilização de 2 g para o preparo de amostra. Em geral, a ideia de um aumento de massa da amostra nesse tipo de análise é obter um sinal mais intenso. No entanto, em espectrometria de massas, geralmente frações mássicas menores ou extratos em volume menor, desde que mais limpos e bem preparados, representam maior vantagem em termos de ganho de sinal.

Embora a avaliação visual se trate de um critério subjetivo, a Figura 15 apresenta a diferença na coloração dos extratos obtidos após extração nas fases alternativas e de referência. Foi possível observar que em comparação com a fase de referência, a cevada produziu extrato mais escuro, enquanto que a perlita e o polvilho doce resultaram em extratos nitidamente mais

claros. Observa-se ainda que, dentre todas as fases avaliadas, a perlita apresentou o melhor resultado, considerando a limpeza dos extratos.

Figura 15- Cor dos extratos utilizando a fase sólida de referência Q-Matrix e as fases sólidas alternativas perlita, cevada e polvilho doce.



Fonte: A autora.

Considerando todos os dados apresentados, a fase sólida alternativa perlita demonstrou ser a fase mais indicada para o preparo de amostra utilizando MSPD, e posterior análise por GC-MS/MS para a determinação de HPAs em pescado.

A perlita é uma rocha vulcânica vítrea, formada pelo resfriamento de erupções vulcânicas. Quando bruta, se apresenta na forma de uma rocha transparente e acinzentada ou preta brilhante, composta principalmente por  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  e água combinada, embora também possa conter  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$  e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  em quantidades menores dependendo de sua origem (OLIVEIRA *et al.*, 2019). A perlita expandida é um material ultraleve, quimicamente inerte que pode ser utilizado como auxiliar de filtração e cargas em vários processos, limpeza de derramamentos de líquidos e como agente de filtração nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia, filtração de piscinas e em estações de tratamento de água, também é utilizada como herbicidas, inseticidas e fertilizantes, adsorção de poluentes, absorção de umidade, entre outros (BJÖRKLUND; LI, 2015; ARGUN *et al.*, 2023).



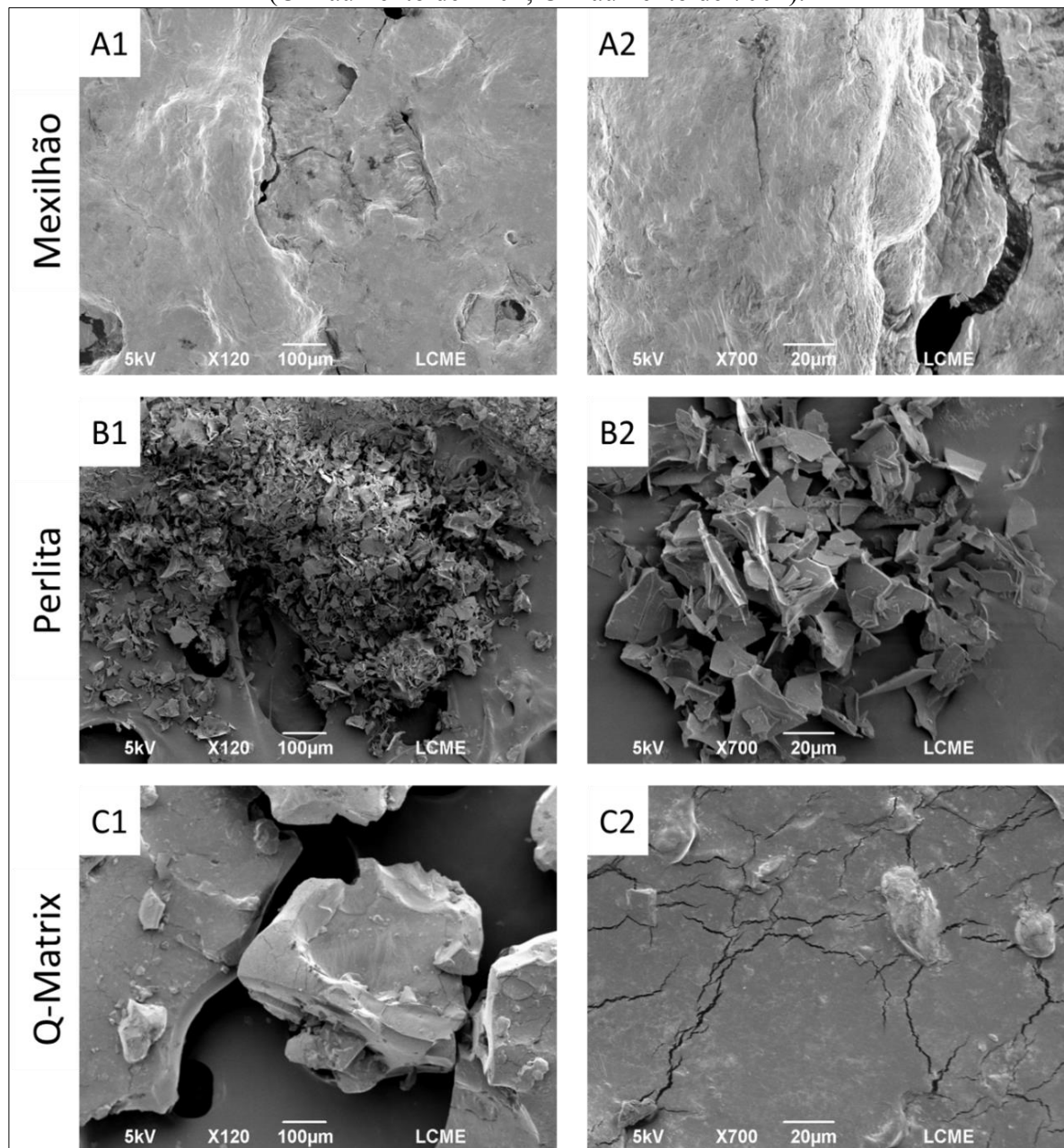
Até o presente momento, nenhum estudo foi publicado na literatura sobre a utilização da perlita como material sorbente para a determinação de HPAs em alimentos. Foi encontrado um estudo que menciona a utilização de perlita, vermiculita e materiais a base de madeira para a remoção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos (incluindo HPAs) em águas pluviais, porém os resultados demonstraram que perlita e vermiculita apresentaram remoção insignificante dos compostos (BJÖRKLUND; LI, 2015). Este dado apresenta concordância com os resultados observados no presente estudo, pois como a perlita apresenta remoção insignificante dos HPAs, isso pode explicar a eficiência deste material no tratamento das amostras de pescado, pois a fase foi eficiente em dispersar a amostra e ao mesmo tempo, deixar os analitos mais disponíveis ao solvente de extração.

Os resultados satisfatórios apresentados pela perlita neste estudo podem ser provavelmente atribuídos à sua alta área superficial, otimizando o processo de MSPD, facilitando a exposição do analito ao solvente de extração e apresentando interação com os componentes da matriz, o que explica os extratos mais limpos. Cabe mencionar que a perlita é um material natural, abundante e de baixo custo.

#### 4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a análise por microscopia de varredura (Figura 16) foi possível observar diferenças nas características físicas entre a fase sólida perlita e a fase de referência (Q-Matrix). Também foi possível demonstrar a eficiência da dispersão da matriz (mexilhão) na fase sólida perlita, em comparação com a fase de referência (Q-Matrix).

Figura 16- - Amostra de mexilhão puro (A1- aumento de 120x, A2- aumento de 700x), fase sólida perlita pura (B1- aumento de 120x, B2- aumento de 700x), e fase sólida Q-Matrix puro (C1- aumento de 120x, C2- aumento de 700x).



Fonte: A autora.

Na Figura 16 A1 e A2, observou-se as características da matriz de mexilhão sem adição de dispersante. Na Figura 16 B1 e B2 é possível visualizar as características físicas dos grânulos de perlita puro, nos aumentos de 120 e 700x, e nas micrografias da Figura 16 C1 e C2, as características dos grânulos de Q-matrix puro. Em comparação entre as fases, foi possível observar a diferença entre perlita (B1) e Q-Matrix (C1) onde a primeira apresenta formato lamelar (forma de lâminas pontiagudas), e granulometria visualmente muito menor em comparação à fase de referência, cuja funcionalidade química principal é absorver água da

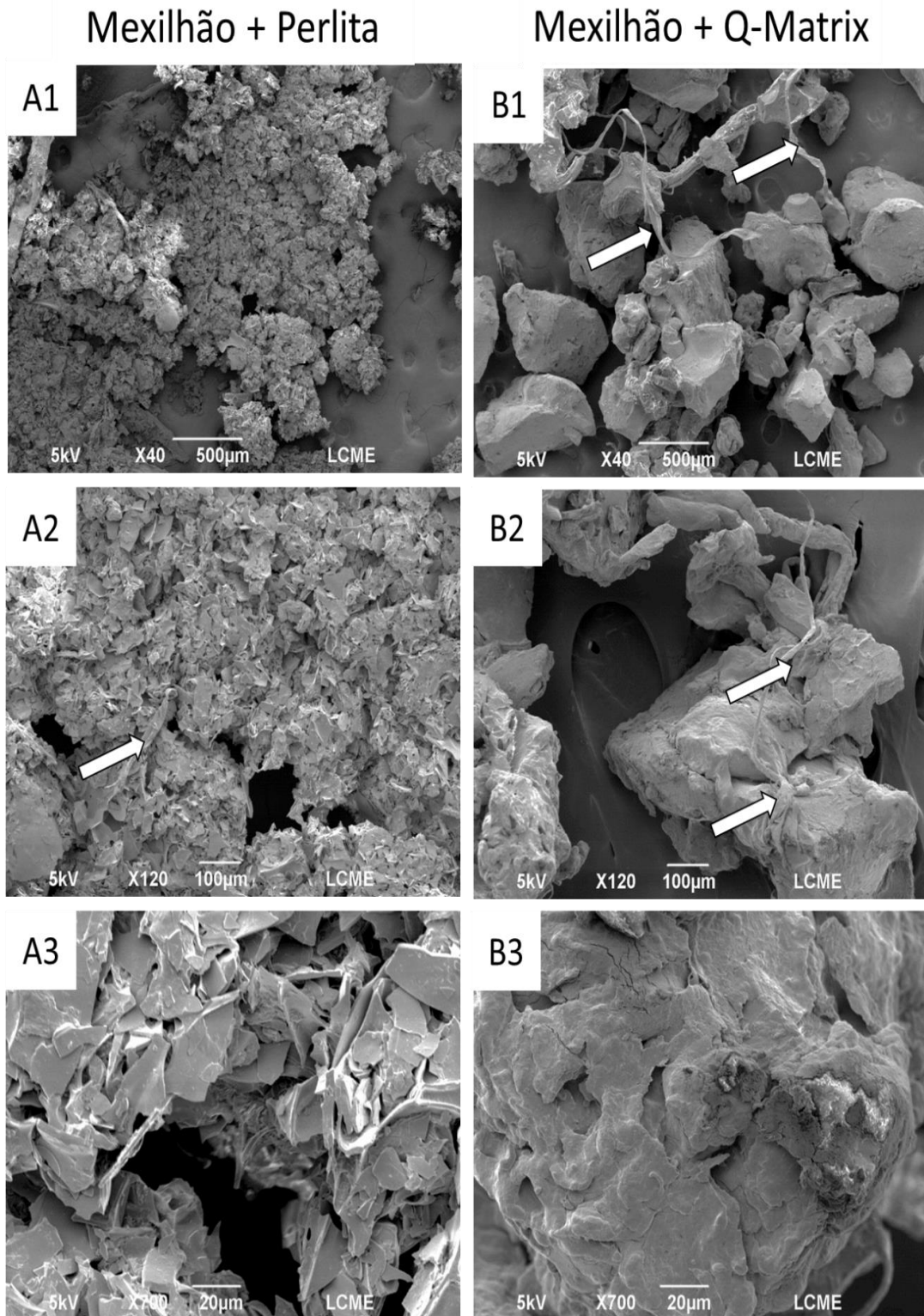
amostra. A perlita forma partículas muito finas e sua área superficial não é conhecida para a maioria das fontes, porém são encontrados na literatura valores em torno de 1 a 2,3 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> (ou seja, muito baixas) (TEKIN *et al.*, 2010; WHEELWRIGHT *et al.*, 2017). No presente estudo, foi realizada a moagem da perlita expandida em moinho analítico, o que resultou em um material com partículas ainda mais finas e área superficial aumentada em muitas vezes.

Nas micrografias B2 e C2 da Figura 16, evidenciou-se ainda mais, uma vez que observou-se diversos grânulos de perlita no aumento de 700x (B2), enquanto na imagem da fase Q-matrix somente é possível observar uma parte de um grânulo da fase sólida (Figura 16 C2).

A Figura 17 exhibe a dispersão da matriz de mexilhão nas fases perlita e Q-matrix. A efetiva dispersão da matriz de mexilhão na fase sólida perlita foi demonstrada através da MEV e pode ser observada nas micrografias da Figura 17 A1, A2 e A3 e comparadas com a dispersão da matriz utilizando a fase de referência (Figura 17 B1, B2 e B3).

Em ambas as fases foi possível observar que a matriz de mexilhão está visivelmente dispersa nas fases sólidas, com apenas alguns fragmentos da matriz visíveis (assinalados pelas flechas brancas). Porém, nas micrografias com maior aumento (120 e 700x), a dispersão é claramente mais efetiva com o uso da perlita, tanto em relação à área superficial, como referente ao espalhamento da amostra na fase sólida, quando comparada à fase de referência. Na fase perlita não foi possível identificar fragmentos de matriz não dispersa, demonstrando que esta fase foi capaz de romper melhor a matriz. Isto pode ser explicado pelo formato lamelar da perlita, que teve maior capacidade de romper as estruturas da amostra, bem como pela menor granulometria, o que tem como consequência um aumento da área superficial promovendo maior interação entre matriz e dispersante. Tal fato pode promover maior acesso do solvente de extração à amostra, quando comparado aos grânulos de Q-Matrix. Nas micrografias B1 e B2 (Figura 17), é possível observar a textura da amostra de mexilhão sobre os grânulos de Q-Matrix, evidenciando ainda mais a diferença de dispersão quando comparada à fase perlita.

Figura 17- Dispersão da matriz de mexilhão com a fase sólida perlita (A1-mexilhão + perlita com aumento de 40X, A2-mexilhão + perlita com aumento de 120X, A3-mexilhão + perlita com aumento de 700X) e com a fase sólida Q-matrix (B1-mexilhão + Q-Matrix com aumento de 40X, B2-mexilhão + Q-Matrix com aumento de 12 X, B3- mexilhão + Q-Matrix com aumento de 700X).



Fonte: A autora.

De maneira geral, a MEV foi capaz de demonstrar que a perlita, fase sólida escolhida para a validação do método, possui características muito satisfatórias para o uso como fase sólida para a técnica de MSPD. A perlita foi considerada como melhor dispersante para análise de HPAs em pescado, quando comparada a fase sólida comercial importada de referência, em termos de custo, acessibilidade, caráter verde e performance analítica.

### 4.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

#### 4.3.1 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi determinado pela razão da área dos picos em extrato de matriz branca fortificada (concentração no ponto central da curva de calibração) pela área dos picos em solvente. Os resultados estão apresentados em porcentagem na Tabela 23.

Tabela 23- Efeito de matriz calculado em porcentagem para cada analito.

Parâmetro	Analitos							
	BaA	Cr	BbF	BkF	BaP	IcP	DbA	BgP
Efeito de matriz (%)	127	134	153	151	155	184	194	168

Valores >100% indicam aumento de ionização e valores <100% indicam supressão de ionização. BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Todos os analitos apresentam efeito de matriz positivo com aumento de ionização. A fim de compensar o efeito de matriz sofrido pelas amostras, a quantificação do analito foi realizada através da fortificação de matriz branca com os analitos, com curva de calibração em matriz isenta. Desta forma, foi adotado a realização da curva de calibração em matriz branca fortificada em todos os lotes de validação, sendo que o mesmo procedimento deve ser empregado durante a rotina de análises.

#### 4.3.2 Recuperação e veracidade/acurácia

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos da recuperação e veracidade do método (%).

Tabela 24- Recuperação relativa e veracidade calculada para cada analito no nível central de estudo da validação (2,50 µg kg<sup>-1</sup>).

Parâmetro	BaA	Cr	BbF	BkF	BaP	IcP	DbA	BgP
Recuperação (%)	17,27	18,69	18,19	17,63	16,05	16,32	16,28	16,29
Veracidade (desvio em relação a 100%)	-0,68	-1,64	-0,49	-1,91	+0,37	-17,57	-13,92	-19,26

BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

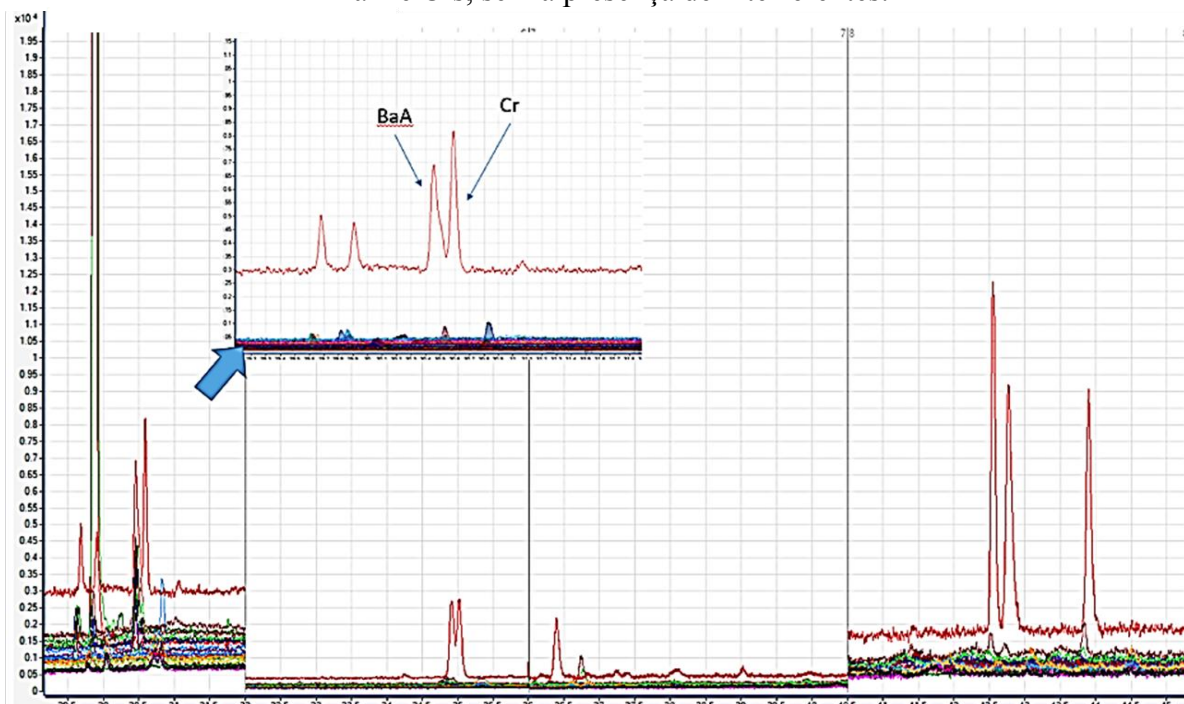
De acordo com a Tabela 24 é possível observar que os valores de recuperação variaram de 16 a 19 %. Apesar de os valores de recuperação serem considerados bastante baixos, este parâmetro foi calculado para fins de conhecimento da performance do ensaio, sendo adotado a curva matrizada. Dessa forma, os resultados podem ser comparáveis com as respostas lidas para a curva de calibração, sem necessidade de realizar correções pelo fator de recuperação.

A veracidade é a concordância entre a concentração calculada e a concentração teórica adicionada em amostras brancas. Os resultados encontrados para o parâmetro de veracidade (Tabela 24), para os oito analitos analisados, variaram de -19,26 a +0,37%. Os resultados demonstram que todos os analitos encontram-se dentro da faixa de veracidade aceitável do método que é -30% a +20% (CE, 2021).

### 4.3.3 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada durante a análise de vinte e duas amostras de pescado. A Figura 18 apresenta os cromatogramas das amostras avaliadas, onde é possível observar que não há presença de picos interferentes em nenhum dos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Figura 18- Cromatograma das amostras avaliadas, com destaque (seta azul) para os analitos BaA e Crs, sem a presença de interferentes.



Os dados encontrados demonstraram que o método é seletivo para todas as amostras avaliadas, com ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse, incluindo os analitos BaA e Crs que apresentaram coeluição em sistema de quantificação por LC-MS/MS. Cabe mencionar que as matrizes avaliadas no estudo de seletividade, foram as mais críticas e/ou relevantes (por exemplo pela presença de pigmentos e gordura) (LI *et al.*, 2020) para a área de aplicação da metodologia. A Tabela 25, demonstra as amostras utilizadas no estudo de seletividade e resposta quanto a presença de picos interferentes.

Tabela 25- Amostras utilizadas no estudo de seletividade e resposta quanto a presença de picos interferentes.

(continua)

Número da amostra	Matriz	Presença de picos interferentes	Número da amostra	Matriz	Presença de picos interferentes
1	Mexilhão	Não	12	Camarão	Não
2	Mexilhão	Não	13	Tilápia	Não
3	Mexilhão	Não	14	Pescada	Não
4	Mexilhão	Não	15	Corvina	Não
5	Tilápia	Não	16	Cação	Não
6	Tilápia	Não	17	Porquinho	Não
7	Tilápia	Não	18	Dourado	Não

Tabela 25- Amostras utilizadas no estudo de seletividade e resposta quanto a presença de picos interferentes.

Número da amostra	Matriz	Presença de picos interferentes	(conclusão)		
			Número da amostra	Matriz	Presença de picos interferentes
8	Ostra	Não	19	Tamboril	Não
9	Ostra	Não	20	Cação	Não
10	Sardinha	Não	21	Tilápia	Não
11	Pescada	Não	22	Cavalinha	Não

#### 4.3.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada entre 0,75 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em curvas preparadas em matriz, conforme demonstrado na Tabela 14. A Tabela 26 apresenta os valores de intercepto e inclinação para as curvas de calibração em matriz e os valores de coeficiente de correlação e determinação obtidos para cada analito.

Tabela 26- Valores de intercepto e inclinação, coeficientes de correlação e determinação de cada analito.

Analito	Intercepto	Inclinação	R	R <sup>2</sup>
BaA	-1275,71	11356,30	0,9985	0,9971
Cr	1427,86	12126,69	0,9985	0,9970
BbF	-228,89	8370,91	0,9996	0,9992
BkF	-464,06	9200,14	0,9993	0,9987
BaP	-802,66	7022,50	0,9984	0,9968
IcP	-1673,88	24535,65	0,9998	0,9995
DbA	-1689,69	20446,34	0,9996	0,9993
BgP	-1673,88	24535,65	0,9998	0,9995

BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Conforme demonstrado, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi maior que 0,99 para todos os analitos avaliados, estando de acordo com os critérios de aceitabilidade da linearidade do método para curvas de calibração preparadas em matriz (R<sup>2</sup>  $\geq$  0,95) (BRASIL, 2011). Desta forma, a faixa linear avaliada foi aceitável e adotada como faixa de trabalho.



### 4.3.5 Repetibilidade e precisão intermediária

Os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) obtidos nos três níveis de concentração avaliados para a determinação da repetibilidade e precisão intermediária estão demonstrados na Tabela 27.

Tabela 27- Resultados da repetitividade e precisão intermediária, nos três níveis de concentração estabelecidos (1,25; 2,50 e 5,00  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Analito	Parâmetro	Repetibilidade Níveis em $\mu\text{g kg}^{-1}$			Precisão intermediária Níveis em $\mu\text{g kg}^{-1}$		
		1,25	2,50	5,00	1,25	2,50	5,00
BaA	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,24	2,48	4,92	1,24	2,48	4,92
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,08	0,16	0,30	0,08	0,16	0,30
	CV (%)	6,76	6,43	6,15	6,76	6,43	6,15
Crs	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,24	2,46	4,89	1,30	2,46	5,16
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,13	0,15	0,31	0,11	0,16	0,20
	CV (%)	10,34	6,26	6,26	8,52	6,70	3,79
BbF	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,20	2,49	4,92	1,32	2,44	4,83
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,18	0,29	0,36	0,08	0,29	0,39
	CV (%)	15,05	11,72	7,40	6,40	11,76	8,07
BkF	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,16	2,45	4,88	1,26	2,48	4,76
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,10	0,21	0,26	0,05	0,19	0,41
	CV (%)	8,68	8,67	5,38	4,35	7,72	8,70
BaP	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,20	2,51	4,71	1,28	2,35	4,68
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,10	0,13	0,22	0,08	0,23	0,26
	CV (%)	7,99	5,34	4,58	6,36	9,85	5,53
IcP	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,08	2,06	3,97	1,21	2,09	4,17
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,13	0,19	0,58	0,07	0,20	0,23
	CV (%)	12,28	9,37	14,51	5,59	9,44	5,48
DbA	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,18	2,15	4,02	1,27	2,17	4,29
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,16	0,24	0,64	0,09	0,25	0,35
	CV (%)	13,85	11,34	15,92	7,29	11,57	8,20
BgP	Média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1,05	2,02	3,97	1,19	2,13	4,25
	DP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,14	0,23	0,64	0,06	0,20	0,28
	CV (%)	13,75	11,31	16,20	4,67	9,43	6,51

CV=coeficiente de variação, DP= desvio padrão. BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Os valores de coeficiente de variação obtidos na repetibilidade, para todos os níveis e analitos, variaram de 4,58 a 16,20 %, sendo menores que o limite máximo aceitável (20%) para repetitividade nesta faixa de trabalho (BRASIL, 2011).

A precisão intermediária foi avaliada em termos de reprodutibilidade interna, onde outros dois analistas foram responsáveis pela execução do ensaio. Pode-se observar na Tabela

27 que os valores de CV obtidos para todos os níveis e analitos, estão entre 3,79 a 11,76%, estando abaixo do máximo estabelecido para esta faixa de trabalho que é de 30% (BRASIL, 2011; CE, 2021). Assim, tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária, foram consideradas adequadas frente aos critérios de aceitabilidade da metodologia proposta.

#### 4.3.6 Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) e Limite de decisão ( $CC\alpha$ )

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando adição de concentrações (0,30 e 0,50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dos analitos em uma matriz branca. A análise foi conduzida e estes pontos foram tratados de tal modo que pode-se distinguir entre o ruído e o sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Tendo em vista que foi possível integrar todos os analitos de interesse de acordo com os critérios estabelecidos no software apenas na concentração de 0,50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , este foi considerado o limite de detecção.

O limite de quantificação (LQ) ficou estabelecido como sendo o ponto mais baixo da curva de calibração (0,75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (BRASIL, 2011).

O Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) é um parâmetro definido no Regulamento de Execução (EU) 808/2021 que mede o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse. A Tabela 28 demonstra os valores de  $CC\alpha$  encontrados para cada analito.

Tabela 28- Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) calculado para cada analito.

Parâmetro	Analito							
	BaA	Cr	BbF	BkF	BaP	IcP	DbA	BgP
$CC\alpha$ ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	2,8	2,8	3,0	2,9	2,8	2,9	3,1	3,0

BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

#### 4.3.7 Incerteza de medição (U)

A incerteza de medição do método foi estimada através da abordagem do  $CC\alpha$ , uma vez que não existem valores oficiais de limite máximo de resíduos (LMR) de HPAs para as matrizes avaliadas no presente estudo de validação. A Tabela 29 demonstra o valor da incerteza de medição calculada para cada analito.

Tabela 29- Incerteza de medição calculada para cada analito.

Parâmetro	Analito							
	BaA	Crs	BbF	BkF	BaP	IcP	DbA	BgP
Incerteza de medição (%)	12,0	12,0	20,0	16,0	12,0	16,0	24,0	20,0

BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Considerando que o critério de aceitabilidade para o parâmetro da incerteza de medição do método proposto é  $< 30\%$  (CE, 2021) e os valores encontrados para cada analito variaram entre 12 a 24 %, pode-se considerar que este parâmetro atende aos critérios de aceitabilidade de validação do método.

#### 4.3.8 Robustez

A robustez do método foi determinada utilizando o teste de Youden, onde 7 fatores foram avaliados. Pequenas variações relacionadas ao método de extração e instrumental foram consideradas, conforme descrito no Quadro 9 do item 3.7.8. A Figura 19, demonstra graficamente a influência dos fatores estudados sobre cada analito.

Figura 19- Influência dos parâmetros analíticos avaliados, para cada analito.

(continua)

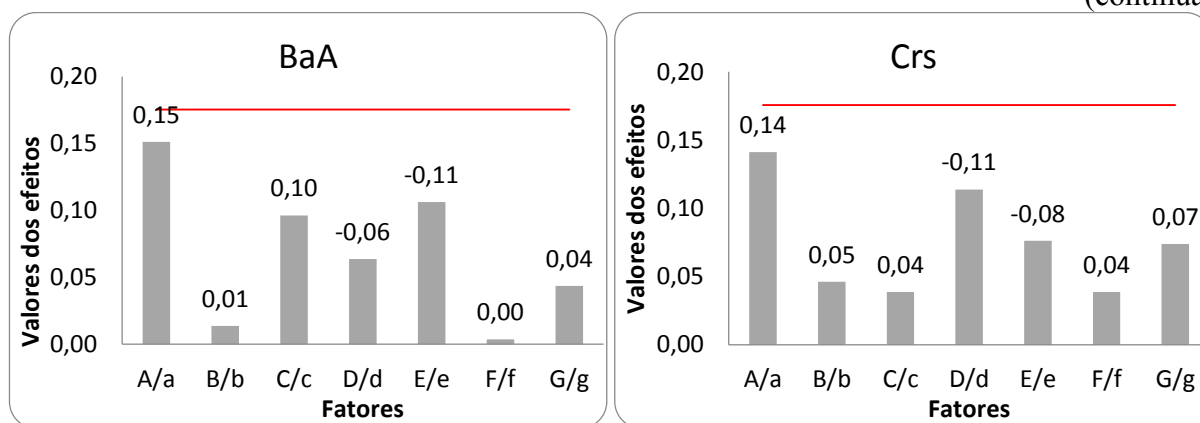
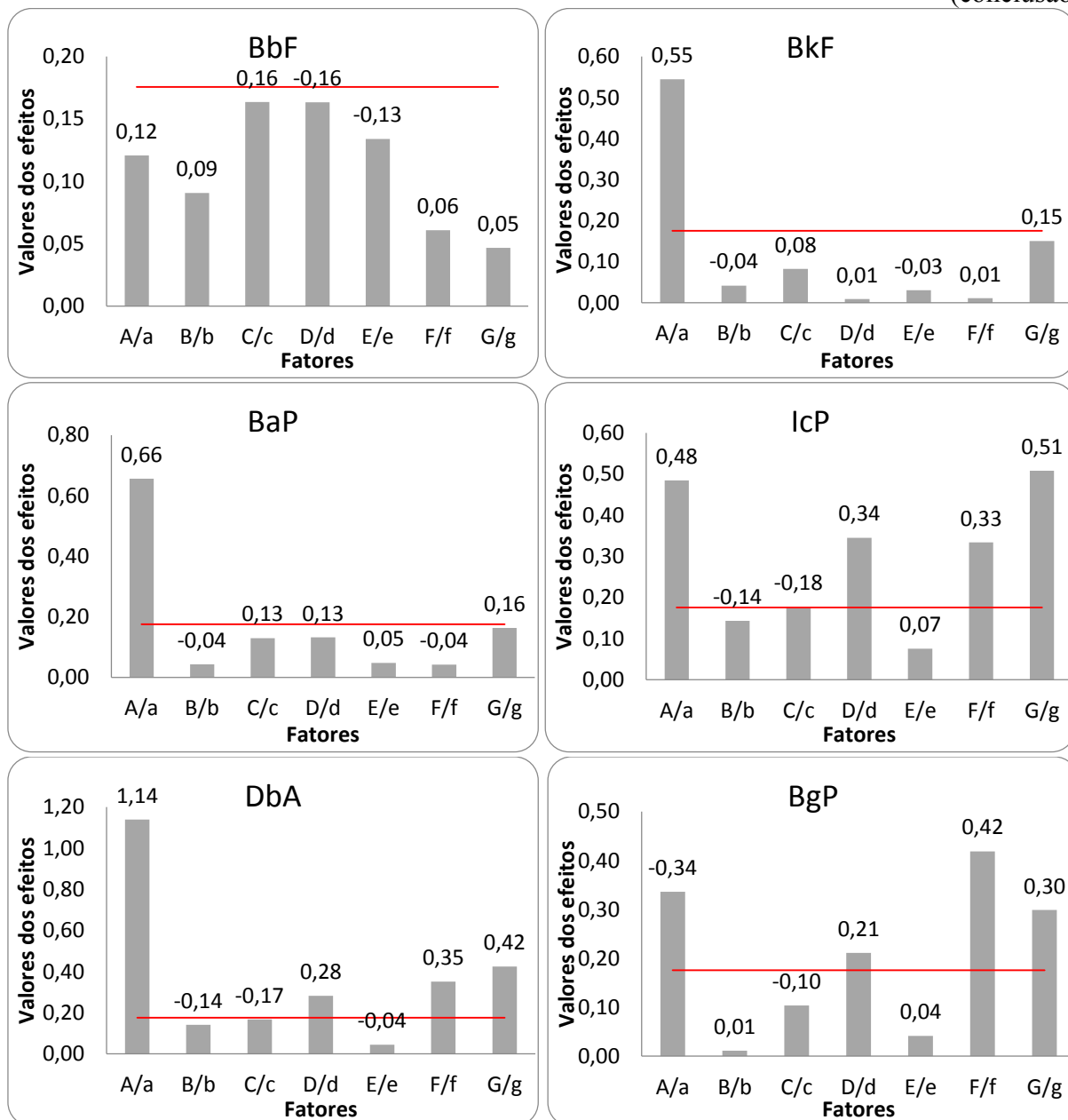


Figura 19- Influência dos parâmetros analíticos avaliados, para cada analito.

(conclusão)



A/a= Liner, B/b= Marca da acetonitrila, C/c= Agitação após adição do acetato de etila, D/d= Filtro do Q-Cup, E/e= Acetato de etila, F/f= Temperatura do liner, G/g= Perlita. BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Na Figura 19 é possível observar os resultados obtidos para cada analito e fatores avaliados, a linha vermelha apresenta o limite para a robustez. O parâmetro abaixo da linha vermelha é considerado robusto. Com base nos resultados, o método se mostrou robusto para todos os parâmetros avaliados, com exceção do preenchimento do *liner* (A/a) para o BgP. Neste caso em particular, o uso do *plug* de CarboFrit™ (marca registrada da Restek Corporation) promoveu acréscimo de sinal para este analito. Tal fenômeno pode ser explicado pelo elevado

efeito de matriz do mesmo, e pelo fato do CarboFrit™ promover maior retenção de matriz no *liner*. Em relação aos outros parâmetros avaliados, pode-se observar que a agitação após a adição do acetato de etila (C/c) em mesa agitadora por 20 min foi positiva. Sendo essa variação robusta ao método, esta foi incluída no procedimento de extração, pois a mesa agitadora permite que todos os tubos da rotina sejam agitados por tempo padrão, sem a subjetividade e aleatoriedade da agitação utilizando o vortex.

Outro parâmetro importante que também foi robusto é a troca do filtro do Q-Cup (D/d) de M2 (filtro de membrana fino de 0,25 µm) para G1 (filtros de fibra de vidro fino de 0,3 µm). O método anteriormente foi validado utilizando os filtros M2, este passou a ser referência para os HPAs. Porém, como os filtros são materiais consumíveis que em caso de ausência não é possível operar o EDGE®, na ausência de filtros M2, podem ser utilizados filtros G1. Deve-se tomar o cuidado, para que toda a batelada (curva e amostras) seja extraída com o mesmo filtro.

A perlita foi avaliada com e sem o processo de lavagem. Para a lavagem, seguiu-se o seguinte procedimento: em 50 g de perlita adicionou-se 100 mL de acetonitrila, homogeneizou-se, e após 10 min a mistura foi filtrada em papel filtro. O filtrado foi seco por 6 horas em estufa a 60 °C com circulação de ar. Este procedimento objetiva retirar possíveis contaminações com HPAs da perlita. O método foi robusto para este parâmetro (G/g), portanto este procedimento pode ser adotado sempre que necessário.

Os demais fatores, marca de acetonitrila (B/b), acetato de etila (E/e) e temperatura do *liner* (F/f) representam as pequenas variações possíveis de ocorrer em rotina, e todos foram robustos para os critérios avaliados.

#### 4.3.9 Estabilidade

No estudo de estabilidade dos extratos de HPAs, as amostras foram avaliadas em três tempos diferentes com diferentes dias de armazenamento. A Tabela 30 demonstra os resultados da estabilidade em termos de reprodutibilidade interna da recuperação dos analitos na concentração de 2,50 µg kg<sup>-1</sup>.

Tabela 30- Resultados da estabilidade em termos de reprodutibilidade interna da recuperação dos analitos na concentração de 2,50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Tempo	Analitos (REC %)							
	BaA	Crs	BbF	BkF	BaP	IcP	DbA	BgP
0 (0 dias de armazenamento)	110,5	94,6	115,8	101,7	114,5	120,3	113,3	102,0
	107,9	95,1	114,2	96,1	105,8	112,0	109,9	103,1
	109,6	90,6	115,3	116,1	121,6	105,7	102,4	90,7
1 (7 dias de armazenamento)	102,3	83,1	101,5	104,9	107,6	80,5	76,7	70,5
	101,6	87,2	101,4	100,2	104,5	95,9	89,1	81,3
	103,8	91,5	109,5	100,5	105,6	100,9	101,6	84,5
2 (15 dias de armazenamento)	106,8	90,8	98,7	95,4	99,7	80,9	89,2	69,5
	110,9	90,6	103,0	101,3	103,5	89,3	91,0	79,1
	100,3	82,0	101,9	85,7	94,1	85,1	80,1	71,8
Média (%)	106,0	89,5	106,8	100,2	106,3	96,7	94,8	83,6
DP (%)	4,1	4,6	6,9	8,1	8,0	14,1	12,7	12,8
CV (%)	3,8	5,1	6,4	8,1	7,5	14,6	13,4	15,3

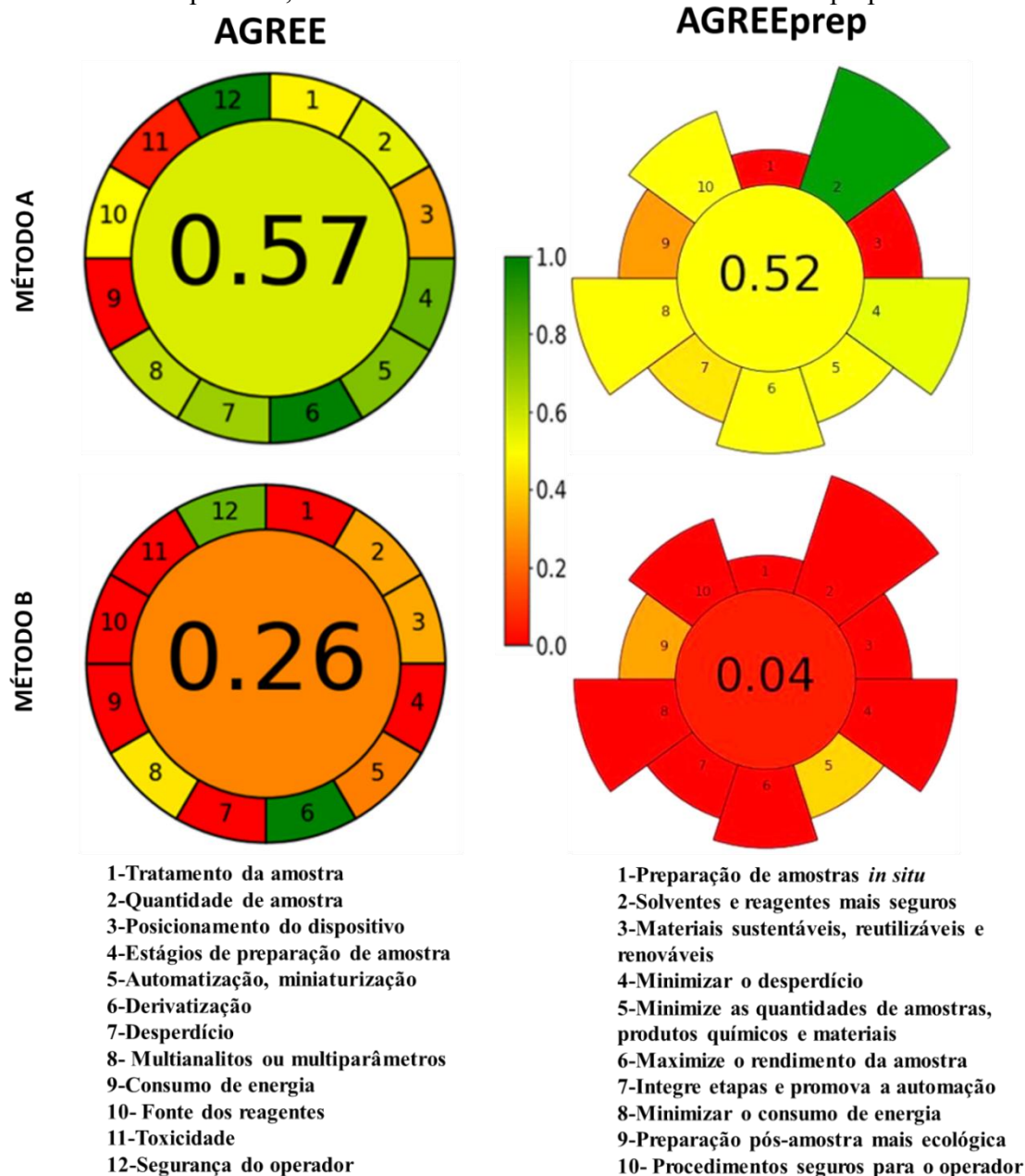
REC=recuperação, DP= desvio padrão, CV= coeficiente de variação. BaA= benzo[a]antraceno, Crs= criseno, BbF= benzo[b]fluoranteno, BkF= benzo[k]fluoranteno, BaP= benzo[a]pireno, DbA= dibenzo[a,h]antraceno, BgP= benzo[ghi]pirileno, IcP= indeno[1,2,3-cd]pireno.

Os resultados obtidos demonstraram que os maiores coeficientes de variação (CV) foram para os analitos IcP, DaA e BgP, com 14,6, 13,4 e 15,3%, respectivamente. Estes resultados são condizentes com os dados de repetitividade interdia para os mesmos analitos (Tabela 27). Sendo assim, foi possível demonstrar que os extratos apresentam estabilidade durante o período de avaliação. Entretanto, recomenda-se que sempre que for analisar diferentes lotes de amostras, uma nova curva de calibração seja extraída em conjunto.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE

A avaliação do caráter verde foi realizada utilizando as ferramentas métricas AGREE (PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020) e AGREEprep (WOJNOWSKI *et al.*, 2022). A Figura 20 demonstra os resultados obtidos na forma de pictograma da avaliação do caráter verde da metodologia proposta validada no presente estudo e atualmente utilizada na rotina de análises fiscais e de monitoramento na SLAV/SC-MAPA. Para fins de comparação, também foi feita a avaliação do método anteriormente adotado pelo MAPA para a determinação de HPAs em pescado (PISSINATTI, 2013).

Figura 20- - Avaliação do caráter verde das metodologias para determinação de HPAs em pescado, utilizando as ferramentas AGREE e AGREEprep.



Método A= metodologia proposta validada, Método B= metodologia oficial anteriormente utilizada nos laboratórios federais do MAPA.

Fonte: A autora.

Foi possível observar que a metodologia desenvolvida no presente trabalho (método A) apresentou maior caráter verde em relação ao método B (PISSINATTI, 2013) de comparação, utilizando tanto a ferramenta AGREE como a AGREEprep. Na abordagem da ferramenta AGREE, a metodologia proposta recebeu pontuação final 0,57, com 57% das pontuações sendo consideradas mais próximas do caráter verde, enquanto o método B, apresentou 26 % de

proximidade com o caráter verde. Cabe mencionar que a ferramenta AGREE estabelece peso 2 para todos os princípios e este peso não foi manipulado para nossa avaliação.

O primeiro princípio da AGREE, estabelece que técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra, e considera pontuações baixas para as amostras que necessitam de preparo, assim como considera o número de etapas executadas no metodologia. Assim ambas metodologias necessitam do preparo de amostra, porém a metodologia desenvolvida por apresentar menor número de etapas, recebeu pontuação de 0,48 enquanto o método B que apresenta várias etapas recebeu pontuação de 0,0. O segundo princípio, estabelece que um tamanho e número mínimo de amostra são preferíveis, desta forma as pontuações foram 0,55 (2 g de amostra) e 0,32 (10 g de amostra) para o método A e o método B, respectivamente.

O terceiro princípio estabelece que, se possível, as medições devem ser realizadas *in situ*. As pontuações foram 0,33 para as duas metodologias, visto que ambas não são realizadas com instrumentos portáteis de campo e sistemas analíticos miniaturizados, sendo necessário o transporte até o laboratório de análises.

O quarto princípio define que a integração de processos e operações analíticas, economiza energia e reduz o uso de reagentes. As pontuações foram 0,8 para o método A (integra etapas de preparo de amostra, extração e limpeza do extrato) e 0,0 para o método B, visto que este necessita de um grande número de etapas, materiais e reagentes para a realização das análises.

O quinto princípio define que métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados. Na metodologia desenvolvida a maioria das etapas são semiautomatizadas ou automatizadas (preparo de amostra, extração, evaporação e etapa analítica), enquanto o método B possui várias etapas manuais e com grande uso de solventes tóxicos, o que aumenta a exposição ocupacional (principalmente a vapores de solventes), risco de acidentes e apresenta certo risco ao meio ambiente se esses resíduos não forem tratados adequadamente. As pontuações foram de 0,75 e 0,25 respectivamente.

O sexto princípio estabelece que a derivatização deve ser evitada, portanto ambas metodologias receberam pontuação máxima (1,0), visto que não realizam derivatização.

O sétimo princípio estabelece que a geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e o gerenciamento adequado de resíduos analíticos deve ser fornecido. As pontuações foram 0,69 e 0,0, já que a metodologia desenvolvida gera por amostra, em torno de 300 µL de resíduo de solvente acetonitrila (que pode causar irritação ocular, é nocivo por



inalação, em contato com a pele e por ingestão) e os resíduos de amostra e fase sólida não são considerados problemáticos. Já o método B utiliza maior quantidade de solventes e com maior toxicidade como o diclorometano (possibilidade de efeito cancerígeno, entre outros), metanol (afeta diversos órgãos, entre outros) e ciclohexano (pode ser fatal se ingerido e penetrar nas vias respiratórias; muito tóxico para os organismos aquáticos, entre outros).

O oitavo princípio estabelece que métodos multi-analito ou multi-parâmetros são preferidos versus métodos que usam um analito de cada vez. Ambas metodologias analisam 8 analitos (multi-analito), porém as pontuações ficaram 0,62 e 0,45 para o método A e o método B respectivamente, pois a última analisa menos analitos por hora.

O nono princípio estabelece que o uso de energia deve ser minimizado. Ambas metodologias receberam pontuação mínima (0,0), pois utilizam a instrumentação analítica de cromatografia que tem alto consumo de energia, quando comparadas às demais listadas na ferramenta.

O décimo princípio estabelece que reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos. O uso de produtos derivados de recursos renováveis é uma abordagem altamente promissora e desejável não apenas na química analítica, mas em todos os ramos da química. Assim o método A recebeu pontuação 0,5, pois uma parte de seus reagentes (incluindo a fase sólida perlita) é de fonte natural, renovável e sustentável, enquanto o método B nenhum dos reagentes são considerados renováveis e apresentou pontuação 0,0.

O décimo primeiro princípio estabelece que reagentes tóxicos devem ser eliminados ou diminuídos, as pontuações foram 0,06 para o método A e 0,0 para o método B. Este critério não estabelece grau de toxicidade para definir a pontuação, o que nos parece ser um ponto de fragilidade da ferramenta de avaliação.

Por fim, o décimo segundo princípio estabelece que a segurança do operador deve ser aumentada, e deve-se informar as ameaças que não podem ser evitadas. Os resultados foram 1,0 para a metodologia desenvolvida (todos os perigos evitados) e 0,4 para o método B, com 60% dos riscos descritos evitáveis.

Na ferramenta AGREEprep pode-se observar que quando considerado o preparo de amostra, a diferença entre as metodologias é ainda maior. Esta metodologia estipula pesos diferentes para os princípios de acordo com a importância no impacto verde da metodologia. Esses pesos podem ser manipulados de acordo com a necessidade de cada metodologia, desde que devidamente justificados. Novamente, na avaliação realizada neste trabalho, os pesos não foram manipulados, sendo utilizados os pesos estabelecidos pela ferramenta, sendo que as

partes maiores do pictograma significam pesos maiores. Na Figura 20 observa-se que a metodologia desenvolvida apresentou mais de 50% do seu processo considerado verde (52%), sendo o princípio 2 (peso 4), considerado o mais verde, seguido do princípio 4 (peso 3). Porém de maneira geral, a maioria dos princípios foram bem avaliados, com exceção dos princípios 1 (peso 1), por não fornecer preparo de amostra *in situ* e do princípio 3 (peso 3), que embora utilize materiais renováveis, sustentáveis e renováveis (como a fase sólida perlita), uma parte dos demais materiais não apresentam a mesma característica.

Já o método B apresentou pontuação de 0,04, não satisfazendo nenhum dos princípios do preparo de amostra verde. Essa comparação é importante para demonstrar a evolução ao longo do tempo das pesquisas de desenvolvimento e validação dos procedimentos analíticos nos laboratórios do MAPA, muitas vezes em parceria com pesquisadores de universidades federais ou outras instituições nacionais e internacionais, em prol de melhores resultados em termos de confiabilidade analítica, economia, maior proteção ao analista e, sempre que possível, em consonância com os princípios da química analítica verde.

Cabe mencionar que a metodologia oficial de comparação (método B) anteriormente utilizada na determinação de HPAs em pescado, estava em rotina até o ano de 2011. Após um longo período sem monitoramento oficial de HPAs em pescado por parte do MAPA, em 2019 foi desenvolvida e validada a metodologia de determinação de HPAs em pescado por LC-APCI-MS/MS (MELO *et al*, 2022a), utilizada como referência para este estudo. Conforme mencionado, devido a necessidade de transposição do método de LC-MS/MS para GC-MS/MS e aquisição deste equipamento, a metodologia de otimização e desenvolvimento de preparo de amostra utilizando fases sólidas naturais em substituição à fase importada de referência, foi desenvolvida e validada. Esta metodologia demonstrou resultados analíticos confiáveis, com maior limpeza do extrato, menor custo, além de atender a maioria dos princípios da química analítica verde e do preparo de amostra verde.

#### 4.5 DESEMPENHO DO MÉTODO VALIDADO

O método validado foi adotado como ensaio oficial do MAPA para a determinação de HPAs em pescado, sendo aplicado na rotina de análises do laboratório.

O desempenho do método foi demonstrado através de participação em análise de proficiência, onde o material recebido (amostra de ostra contendo de um a seis HPAs) foi analisado utilizando o método proposto no presente estudo. Os resultados foram reportados

individualmente para cada analito (BaA, Crs, BbF, BaP, IcP, BgP) e para a soma dos quatro HPAs denominados PAH4 (BaA, Crs, BbF e BaP), conforme determina o Regulamento da Comunidade Europeia (CE, 2011). Os resultados dos *z-score* obtidos, são demonstrados na Tabela 31.

Tabela 31 - Pontuação z (*z-score*) obtido na análise de proficiência, utilizando a metodologia desenvolvida e validada.

	<b>BaA</b>	<b>Cr</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>	<b>IcP</b>	<b>BgP</b>	<b>PAH4</b>
Valor atribuído ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	1,64	2,52	5,30	1,00	Ni	1,42	10,3
Valor reportado ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	1,36	2,10	5,30	0,97	0,98	1,42	9,74
<i>z-score</i> *	-0,8	-0,8	0,0	-0,1	Ni	0,0	-0,2

\*pontuação padrão = número de desvios padrão que cada valor de dados está da média, com uma pontuação Z de zero indicando a média exata. Ni= Não informado.

O valor de *z-score*, se refere ao número de desvios padrão que cada valor de dados estão da média, onde uma pontuação Z de zero indica a média exata. O *z-score* em módulo pode ser avaliado como sendo satisfatório até valor de 2; valores acima de dois, indicam valores questionáveis e em geral acima de três, são considerados insatisfatórios. Os dados apresentados (Tabela 31), demonstraram a confiabilidade do método, onde os analitos BbF e BgP apresentaram *z-score* de 0,0 (valor exato), BaP e PAH4 apresentaram *z-score* de -0,1 e -0,2 respectivamente e BaA e Crs, *z-score* de -0,8. O analito IcP, apesar de presente na amostra, não teve um valor atribuído pelo provedor, devido ao número insuficiente de dados reportados, o que gerou uma alta incerteza.

Cabe mencionar que o teste de proficiência é um requisito obrigatório da acreditação ISO 17025, sendo parte essencial do procedimento de qualidade do laboratório, pois fornece uma avaliação independente do desempenho do laboratório e compara os resultados com outros laboratórios em todo o mundo (FAPAS, 2023). Assim, a participação e os resultados obtidos no teste de proficiência, demonstraram não só a confiabilidade da metodologia desenvolvida, como também dos equipamentos de laboratório e analistas.

## 5 CONCLUSÃO

Como resultados deste trabalho foi possível observar que dentre as dez fases sólidas naturais avaliadas no preparo de amostra de pescado para determinação de HPAs por cromatografia líquida, seis fases (perlita, cevada, polvilho doce, pó de concha, terra diatomácea e polvilho azedo) apresentaram melhor desempenho analítico em comparação com a fase sólida de referência (Q-Matrix) com destaque para perlita, cevada e polvilho doce. Na determinação de HPAs por cromatografia gasosa, as fases perlita, cevada e polvilho doce foram comparadas à fase de referência em relação a quantidade de amostras utilizada na extração e foi observado que a fase perlita apresentou o melhor desempenho analítico, utilizando 2 g de amostra, considerando efeito de matriz, recuperação, área de pico dos analitos e limpeza do extrato, sendo assim, a fase escolhida para a validação do método.

A microscopia eletrônica de varredura, demonstrou que a dispersão da matriz foi mais efetiva utilizando perlita, quando comparada com a fase de referência. Também foi possível observar que a perlita apresentou formato lamelar e alta área superficial, com granulometria muito inferior à fase de referência, facilitando a exposição do analito ao solvente de extração.

O método de determinação de HPAs em pescado utilizando perlita como fase sólida em técnica de MSPD seguida de PLE e detecção por GC-MS/MS foi validado, atendendo a todos os critérios de validação de acordo com o preconizado. O resultado obtido em análise de proficiência demonstrou a confiabilidade do método com valores de *z-score* entre 0,0 e -0,8 para os cinco analitos presentes na amostra e para a soma dos PAH4 (benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno).

A avaliação do caráter verde do novo método validado demonstrou que mais de 50% do protocolo está de acordo com os princípios da química analítica verde e do preparo de amostra verde, ao passo que o método oficial anterior apresentou 26% e 4% de práticas consideradas verdes, respectivamente.

A metodologia desenvolvida no preparo de amostra utilizando perlita e detecção de HPAs por GC-MS/MS foi considerada superior quando comparada a fase sólida de referência assim como em relação a determinação por LC-MS/MS em termos de custo, caráter verde, limpeza do extrato e performance analítica. Tais características e o fato da perlita ser um material natural, de baixo custo e vastamente disponível, demonstram a relevância do trabalho e sua utilização como metodologia oficial, não somente nos laboratórios MAPA, como também em outros laboratórios de alta frequência analítica, tanto em nível nacional, como internacional.

## REFERÊNCIAS

- AGUS, B. A. P.; RAJENTRAN, K.; SELAMAT, J.; LESTARI, S. D.; UMAR, N. B.; HUSSAIN, N. Determination of 16 EPA PAHs in food using gas and liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 116, p. 105038, 2023.
- ALMEIDA, M.; NASCIMENTO, D. V.; OLIVEIRA, P. M. J.; PATIRE, V. F.; ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of a Tropical Bay influenced by anthropogenic activities (Todos os Santos Bay, BA, Brazil). **Marine pollution bulletin**, v. 137, p. 399-407, 2018.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ANDREU, V.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 709–721, 2019.
- ANVISA. **Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899\\_29\\_05\\_2003.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html). Acesso em: 15. set. 2022.
- AOAC. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements 2019**. Disponível em: [https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app\\_f.pdf](https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf). Acesso em: 15. set. 2022.
- ARGUN, M. E.; ARSLAN, F. N.; ATES, H.; YEL, E.; ÇAKMAKCI, Ö.; DAĞ, B. A pioneering study on the recovery of valuable functional compounds from olive pomace by using supercritical carbon dioxide extraction: Comparison of perlite addition and drying. **Separation and Purification Technology**, v. 306, n. October 2022, 2023.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. DE. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8. 2015.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; LA GUARDIA, M. DE. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248–253, 2019.
- BADIBOSTAN, H.; FEIZY, J.; DARAEI, B.; SHOEIBI, S.; RAJABNEJAD, S. H.; ASILI, J.; KARIMI, G. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN INFANT FORMULAE, FOLLOW-ON FORMULAE, AND BABY FOODS In Iran: An assessment of risk. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110640, 2019.
- BALLESTER-CAUDET, A.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; PÉREZ, B.; SANCHO, R.; LORENTE, M.; SASTRE, G.; GONZÁLEZ, C. A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: Summarizing the information in a hexagon. **TrAC - Trends in**

**Analytical Chemistry**, v. 118, p. 538–547, 2019.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 151–162, 10 mar, 2007.

BIANCO, F.; RACE, M.; PAPIRIO, S.; ESPOSITO, G. A critical review of the remediation of PAH-polluted marine sediments: current knowledge and future perspectives. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 11, n. October 2022, p. 100101, 2023.

BJÖRKLUND, K.; LI, L. Evaluation of low-cost materials for sorption of hydrophobic organic pollutants in stormwater. **Journal of Environmental Management**, v. 159, p. 106–114, 15 ago. 2015.

BORDIN, D. C. M.; ALVES, M. N. R.; CAMPOS, E. G.; MARTINIS, B. S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of separation science**, v. 39, n. 6, p. 1168-1172, 2016.

BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C.; MANO, C. Introdução ao preparo de amostras. **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**, 1st edn. Brazil, Rio de Janeiro, p. 2-8, 2015.

BRASIL. Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 27/2019/SEI/GGALI/DIRE2/ANVISA**. 2019. Disponível em: <https://www.nepomuceno.mg.gov.br/res/midias/outros/9c37dfb913dc72c1915e7d9a11b9525b.pdf>. Acesso em: 03. dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: resíduos e contaminantes em alimentos**. 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/a/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf>. Acesso em: 03. dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em: 03. dez, 2022.

CAMPÍNS-FALCÓ, P.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; SEVILLANO-CABEZA, A.; MOLINS-LEGUA, C.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1–2, p. 13–21, 21 nov, 2008.

CAÑADAS, R.; GARRIDO GAMARRO, E.; GARCINUÑO MARTÍNEZ, R. M.; PANIAGUA GONZÁLEZ, G.; FERNÁNDEZ HERNANDO, P. Occurrence of common plastic additives and contaminants in mussel samples: Validation of analytical method based on matrix solid-phase dispersion. **Food Chemistry**, v. 349, 2021.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; STAMPACHIACCHIERE, S.; VENTURA, S.; LAGANÀ, A. Recent advances and

developments in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186–193, 2015.

CE. European Commission. **Regulamento n° 2021/808/CE de 22 de março de 2021**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32021R0808>. Acesso em: 2 jan. 2022.

CE. European Commission. **Regulamento n° 835/2011 da comissão de 19 de agosto de 2011**. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/%20LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:PT:PDF#:~:text=A%20manteiga%20de%20cacau%20foi,PAH%20na%20manteiga%20de%20cau>. Acesso em: 2 jan. 2022.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

ChemSpider. Disponível em: <http://www.chemspider.com>. Acesso em: 23. mai. 2023.

DAMALE, R. D.; DUTTA, A.; SHAIKH, N.; PARDESHI, A.; SHINDE, R.; BABU, K. D.; GAIKWAD, N. N.; BANERJEE, K. Multiresidue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 407, n. November 2022, p. 135179, 2023.

DÓREA, H.S. Dispersão da matriz em fase sólida. In: BORGES, K.B.; FIGUEIRDEO, E.C.; QUEIROZ, M.E.C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. - Rio de Janeiro: LTC, 2015. p.80-87.

DUEDAHL-OLESEN, L.; IVERSEN, N. M.; KELMO, C.; JENSEN, L. K. Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt. **Food Control**, v. 108, p. 106434, 2020.

EFSA. European Food Safety Authority. 2007. **Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-33>. Acesso em: 03. dez. 2022.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Comunicado técnico 113. **Preparo e processamento de amostras de pescado para análise de elementos traço. 2022**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1149683/1/COMUNICADO-113.pdf>. Acesso em: 08. nov. 2022.

EURACHEM, **Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition**. 2014. Disponível em: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf). Acesso em: 18. out. 2022.

FAPAS. **Proficiency Testing**. Disponível em: <https://fapas.com/shop/search?producttypes=1>. Acesso em: 02 jun. 2023.

FISHER, C. M.; CROLEY, T. R.; KNOLHOFF, A. M. Data processing strategies for non-targeted analysis of foods using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 136, p. 116188, 2021.

FLEMING, L. E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A.; WALSH, P. Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. **Marine pollution bulletin**, v. 53, n. 10-12, p. 545-560, 2006.

FUTIGAMI, L.S.; DUTRA, M.O.; VERRUCK, S. Ocorrência de ficotoxinas diarreicas em ostras e mexilhões cultivados entre 2019 e 2020 em Governador Celso Ramos, SC. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 11, n 2, p. 363-369, 2021.

GALLART-MATEU, D.; PASTOR, A.; LA GUARDIA, M. DE; ARMENTA, S.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A. Hard cap espresso extraction-stir bar preconcentration of polychlorinated biphenyls in soil and sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 952, p. 41–49, 2017.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GÓMEZ-MEJÍA, E.; MIKKELSEN, L. H.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; MADRID, Y. A combined approach based on matrix solid-phase dispersion extraction assisted by titanium dioxide nanoparticles and liquid chromatography to determine polyphenols from grape residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1644, 2021.

HOFF, R. B.; RÜBENSAM, G.; JANK, L.; BARRETO, F.; RUARO PERALBA, M. D. C.; PIZZOLATO, T. M.; SILVIA DÍAZ-CRUZ, M.; BARCELÓ, D. 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.; 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.

HOFF, R.B.; FUTIGAMI, L.S.; PIEREZAN, M. D.; DEOLINDO, C. T. P.; DE MELO, A. P. Z.; MOLOGNONI, L.; PIMENTA, R.; BURIN, V.M.; FRANCISCO, A.; DAGUER, H. Cassava-based materials for matrix solid phase dispersion: An alternative for sample preparation in food analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1201, p. 123263, 2022.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Chemical agentes and related occupations: a review of human carcinogens**. Lyon, France: IARC, 2012. p. 111-114. (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100F).

IARC. International Agency for Research on Cancer. List of classification. **Agents classified by the IARC Monographs**, volumes 1-117. Lyon, France: IARC, 2017.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). Forth Version. **ICH Harmonised Tripartite Guideine**: London, 2005.



IMAM, M. S.; ABDELRAHMAN, M. M. How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 38, p. e00202, 1 jun. 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2021. **Ambiente, Trabalho e Câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiologicos-toxicologicos-e-regulatorios>. Acesso em: 03. dez. 2022.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2020. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_08.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf). Acesso em: 15. set. 2022.

INMETRO. **Vocabulário Internacional de Metrologia**. 2016. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim\\_2012.pdf](http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf). Acesso em: 15. set. 2022.

JALILI, V.; BARKHORDARI, A.; GHIASVAND, A. Solid-phase microextraction technique for sampling and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. **Microchemical Journal**, v. 157, n. April, p. 104967, 2020.

KIYATAKA. P.H.M. Incerteza de medição de métodos analíticos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n.1, 2006.

KOKOSA, J. M. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 238–247, 2019.

KOKOSA, J. M.; PRZYJAZNY, A. Green microextraction methodologies for sample preparations. **Green Analytical Chemistry**, v. 3, n. May, p. 100023, 2022.

LE BIHANIC, F.; CLÉRANDEAU, C.; LE MENACH, K.; MORIN, B.; BUDZINSKI, H.; COUSIN, X.; CACHOT, J. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13732-13743, 2014.

LEE, J.; JEONG, J. H.; PARK, S.; LEE, K. G. Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in processed foods and their raw materials. **Food Control**, v. 92, p. 286–292, 2018.

LI, J.; Cho, H. Y.; Kwon, S. W.; Lee, S. J. Pollen grains as a low-cost, green, alternative sorbent for hydrophilic solid-phase extraction. **Analytical Methods**, v. 13, n. 10, p. 1295-1301, 2021.

LI, N.; WU, X.; ZHUANG, W.; XIA, L.; CHEN, Y.; WU, C.; RAO, Z.; DU, L.; ZHAO, R.; YI, M.; ZHOU, Y. Fish consumption and multiple health outcomes: Umbrella review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 99, n. March, p. 273–283, 2020.

LI, Y.; YUAN, L.; LIU, HUIJIE; LIU, HONGYING; ZHOU, Y.; LI, M.; GAO, R. Analysis of the changes of volatile flavor compounds in a traditional Chinese shrimp paste during

fermentation based on electronic nose, SPME-GC-MS and HS-GC-IMS. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 1, p. 173–182, 2022.

LIN, W.; WEI, S.; JIANG, R.; ZHU, F.; OUYANG, G. Calibration of the complex matrix effects on the sampling of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples using solid phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 117–123, 2016.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I.; PENA-PEREIRA, F.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; ZUIN, V. G.; OZKAN, S. A.; PSILLAKIS, E. The ten principles of green sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 148, p. 116530, 2022.

LOURENÇO, R. A.; TANIGUCHI, S.; SILVA, J. DA; GALLOTTA, F. D. C.; BÍCEGO, M. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine mammals: A review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, 2021.

MA, T. T.; SHEN, X. F.; YANG, C.; QIAN, H. L.; PANG, Y. H.; YAN, X. P. Covalent immobilization of covalent organic framework on stainless steel wire for solid-phase microextraction GC-MS/MS determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat samples. **Talanta**, v. 201, n. April, p. 413–418, 2019.

MALINOWSKI, M. H. DE; MACIEL, P. K.; CHAVES, M. DE J. S.; BARBOSA, S. C.; PRIMEL, E. G.; DUARTE, F. A.; SOARES, B. M. Vortex-assisted matrix solid-phase dispersion: An eco-friendly alternative for the determination of halogens in edible seaweed. **Talanta**, v. 244, 2022.

MANSUR, A. R.; KIM, K. J.; KIM, D. B.; YOO, M.; JANG, H. W.; KIM, D. O.; NAM, T. G. Matrix solid-phase dispersion extraction method for HPLC determination of flavonoids from buckwheat sprouts. **LWT**, v. 133, p. 110121, 2020.

MAPA. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. **Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda>. Acesso em: 03. dez. 2022.

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, p. 3019–3030, 2003.

MELO, A. P. Z.; HOFF, R. B.; MOLOGNONI, L.; KLEEMANN, C. R.; OLIVEIRA, T. OLIVEIRA, L. V. A.; DAGUER, H.; BARRETO, P. L. M. 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**, v. 15, n. 7, p. 1826–1842, 2022a.

MELO, A. P. Z.; HOFF, R. B.; MOLOGNONI, L.; OLIVEIRA, T.; DAGUER, H.; BARRETO, P. L. M. Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, p. 111366, 2022b.

MERLO, T. C.; MOLOGNONI, L.; HOFF, R. B.; DAGUER, H.; PATINHO, I.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Alternative pressurized liquid extraction using a hard cap espresso machine for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bacon.

**Food Control**, v. 120, p. 107565, 1 fev. 2021.

MOLOGNONI, L.; VALESE, A. C.; LORENZETTI, A.; DAGUER, H.; LINDNER, J. D. D. Development of a LC–MS/MS method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in Dulce de leche. **Food chemistry**, v. 211, p. 748-756, 2016.

MOLOGNONI, L.; DOS SANTOS, J. N.; KLEEMANN, C. R., COSTA, A. C. O., HOFF, R. B.; DAGUER, H. Cost-Effective and High-Reliability Analytical Approach for Multitoxin Screening in Bivalve Mollusks by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 2691–2699, 2019.

MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; HOFF, R. B.; RODRIGUES, J.; JOUSSEF, A. C.; DE A LINDNER, J. 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, 4 jan. 2020.

MOZANER, L. Q.; ALMEIDA, A. P. D; SILVA, S. A. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: uma revisão sobre metodologias de análise e níveis de contaminação em produtos cárneos defumados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 78, n. único, p. 1–21, 2019.

MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. Emerging green solvents and their applications during pesticide analysis in food and environmental samples. **Talanta**, v. 223, n. P1, p. 121507, 2021.

NAZIR, N. A. M.; RAOOV, M.; MOHAMAD, S. Spent tea leaves as an adsorbent for micro-solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from water and food samples prior to GC-FID analysis. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105581, 2020.

NESTEL, P. J.; BEILIN, L. J.; CLIFTON, P. M.; WATTS, G. F.; MORI, T. A. Practical Guidance for Food Consumption to Prevent Cardiovascular Disease. **Heart, Lung and Circulation**, v. 30, n. 2, p. 163–179, 2021.

NOGUEIRA, J. M. F. Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 214–223, 2015.

NOWAK, P. M.; KOŚCIELNIAK, P. What color is your method? adaptation of the rgb additive color model to analytical method evaluation. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10343–10352, 2019.

NOWAK, P. M.; WIETECHKA-POŚLUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, p. 116223, 2021.

NYARKO, E.; BOATENG, C. M.; ASAMOAH, O.; EDUSEI, M. O.; MAHU, E. Potential human health risks associated with ingestion of heavy metals through fish consumption in the Gulf of Guinea. **Toxicology Reports**, v. 10, p. 117–123, 2023.

OLIVEIRA, A. G.; JANDORNO, J. C.; ROCHA, E. B. D.; SOUSA, A. M. F.; SILVA, A. L. N. Evaluation of expanded perlite behavior in PS/Perlite composites. **Applied Clay Science**, v. 181, p. 105223, 15 nov. 2019.

ONU. Organização das Nações Unidas. Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br>. Acesso em: 15 fev. 2023.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S., AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PENA-PEREIRA, F.; TOBISZEWSKI, M.; WOJNOWSKI, W.; PSILLAKIS, E. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, 1 ago. 2022.

PENSADO, L.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of chromatography A**, v. 1077, n. 2, p. 103-109, 2005.

PENG, L. Q.; ZHANG, Y.; YAN, T. C.; GU, Y. X.; CAO, J. Carbonized biosorbent assisted matrix solid-phase dispersion microextraction for active compounds from functional food. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130545, 2021.

PÉREZ, R. A.; ALBERO, B.; TADEO, J. L. Matrix solid phase dispersion. In: Solid-phase extraction. **Elsevier**, 2020. p. 531-549.

PISSINATI, R. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em café torrado: otimização e validação de método por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas**. 2013. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2013.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, n. September 2017, p. 204–209, 2018.

RAMOS, L. Matrix solid-phase dispersion. Green Extraction Techniques Principles, Advances and Applications (Comprehensive Analytical Chemistry); **Elsevier**: Amsterdam, Netherlands, p. 375-402, 2017.

RAMOS, Lourdes. Use of new tailored and engineered materials for matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 751-758, 2019.

RAN, J.; ZHANG, L.; YAO, J.; WANG, S.; LIANG, P.; DONG, N. Cucurbit [7] uril as a matrix solid-phase dispersion for the extraction of quaternary ammonium pesticides from vegetables and their determination using HPLC–UV. **Food Chemistry**, v. 350, p. 129236, 2021.

RASPE, D. T.; SILVA, C.; COSTA, S. C. Pressurized liquid extraction of compounds from Stevia leaf: Evaluation of process variables and extract characterization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 193, p. 105813, 2023.

RAUT, P.; BHOSLE, D.; JANGHEL, A.; DEO, S.; VERMA, C.; KUMAR, S. S.; ALEXANDER, A. Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active

phytopharmaceuticals. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 6, p. 800-810, 2015.

REZAEI, F.; HOSSEINI, M. R. M. New method based on combining ultrasonic assisted miniaturized matrix solid-phase dispersion and homogeneous liquid–liquid extraction for the determination of some organochlorinated pesticides in fish. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 274-279, 2011.

RICHTER, P.; ARISMENDI, D.; BECERRA-HERRERA, M. The fundamentals, chemistries and applications of rotating-disk sorptive extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 137, p. 116209, 2021.

RIFAT, M. A.; WAHAB, M. A.; RAHMAN, M. A.; NAHIDUZZAMAN, M.; MAMUN, A. A. Nutritional value of the marine fish in Bangladesh and their potential to address malnutrition: A review. **Heliyon**, 2023.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, p. 123046, 2022.

SERPE, F. P.; ESPOSITO, M.; GALLO, P.; SERPE, L. Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 920-925, 2010.

SHEN, H.; GRIST, S.; NUGEGODA, D. The PAH body burdens and biomarkers of wild mussels in Port Phillip Bay, Australia and their food safety implications. **Environmental Research**, v. 188, p. 109827, 2020.

SOUZA-SILVA, ÉRICA A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236-248, 2015.

TEKIN, G. Perlit ve sepiyolit'in amonyumheptamolibdat ile modifikasyonu ve elektrokinetik özellikleri. **Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v. 6, n. 2, p. 35-49, 2004.

TEKIN, N.; DİNÇER, A.; DEMİRBAŞ. Ö.; ALKAN, M. Adsorption of cationic polyacrylamide (C-PAM) on expanded perlite. **Applied Clay Science**, v. 50, n. 1, p. 125-129, 2010.

WANG, M.; MORÓN-ORTIZ, Á.; ZHOU, J.; BENÍTEZ-GONZÁLEZ, A.; MAPELLI-BRAHM, P.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BARBA, F. Effects of pressurized liquid extraction with dimethyl sulfoxide on the recovery of carotenoids and other dietary valuable compounds from the microalgae *Spirulina*, *Chlorella* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134885, 2023.

WHEELWRIGHT, W.; COONEY, R. P.; RAY, S.; ZUJOVIC, Z.; SILVA, K. DE. Ultra-high surface area nano-porous silica from expanded perlite: Formation and characterization.

WIANOWSKA, D.; DAWIDOWICZ, A. L. Can matrix solid phase dispersion (MSPD) be more simplified? Application of solventless MSPD sample preparation method for GC–MS and GC–FID analysis of plant essential oil components. **Talanta**, v. 151, p. 179-182, 2016.

WIANOWSKA, D.; GIL, M. New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 29-51, 2019.

WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M.; PENA-PEREIRA, F.; PSILLAKIS, E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 149, p. 116553, 2022.

YANG, C.; LI, J.; WANG, S.; WANG, Y.; JIA, J.; WU, W.; ZHAO, Q. Determination of free fatty acids in Antarctic krill meals based on matrix solid phase dispersion. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132620, 2022.

YUAN, Y.; LIN, X.; LI, T.; PANG, T.; DONG, Y.; ZHUO, R.; GAN, N. A solid phase microextraction Arrow with zirconium metal–organic framework/molybdenum disulfide coating coupled with gas chromatography–mass spectrometer for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1592, p. 9-18, 2019.

YUAN, J. P.; SUN, Y. M.; ZHAO, J.; YAO, Y. X. Rapid determination of hexabromocyclododecane enantiomers in animal meat by matrix solid phase dispersion coupled with LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 394, p. 133405, 2022.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. Association of Official Analytical Chemistry. **Statistical manual of AOAC**, 1975.

VAN DER WIELEN, J. C. A.; JANSEN, J. T. A.; MARTENA, M. J.; DE GROOT, H. N.; IN'T VELD, P. H. Determination of the level of benzo [a] pyrene in fatty foods and food supplements. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 7, p. 709-714, 2006.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 55-64, 2015.

ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. The occurrence of 16 EPA PAHs in food—a review. **Polycyclic aromatic compounds**, v. 35, n. 2-4, p. 248-284, 2015.

ZIARRUSTA, H.; OLIVARES, M.; DELGADO, A.; POSADA-URETA, O.; ZULOAGA, O.; ETXEBARRIA, N. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, p. 18-30, 2015.