

Diana Sofia Fernandes Lourenço

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA POR HPLC-FD PARA DETERMINAÇÃO DOS METABOLITOS DE PAHs EM CEFALÓPODES

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Pena e  
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“A investigação é como correr numa maratona sem nunca cortar a meta mas ainda assim, sentir que se atingiu uma grande vitória”.

*Natália Antunes*

## AGRADECIMENTOS

---

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Professora Doutora Angelina Pena, minha orientadora, que desde logo aceitou a orientação deste trabalho, agradeço o imprescindível e valioso apoio prestado em todas as suas fases de execução, desde a intenção até à redação, os ensinamentos transmitidos, à dedicação, à exigência e à confiança que depositou em mim.

À Doutora Liliana Silva agradeço igualmente os ensinamentos que me transmitiu, as horas passadas em conjunto no laboratório a desvendar os PAHs, a paciência e o empenho. A ela, lhe devo tudo o que sei a nível laboratorial. Muito obrigada!

Ao Doutor André Pereira pelo apoio, otimismo e ajuda prestada sempre que necessário no laboratório de Bromatologia.

À D. Isabel e à D. Anabela pela ajuda concedida durante a realização deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, principalmente à Patrícia, pela companhia nas horas passadas no laboratório e na biblioteca, pelo incentivo e ajuda prestada nas dificuldades diárias.

Aos meus pais, pela forma como me inculcaram a fazer tudo o melhor possível, pelo apoio incondicional, compreensão e por estarem sempre presentes para que possa realizar os meus sonhos.

À minha irmã pelo apoio prestado, e claro por estar sempre a torcer por mim.

A todos os meus amigos, a quem este trabalho retirou alguma disponibilidade da minha parte, obrigada pela compreensão. Um agradecimento especial à Ana Luísa, Ana Costa

e a Natália pela qual estiveram sempre ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força e apoio em certos momentos difíceis.

Ao Professor e grande amigo José Carlos Patrício por desde muito cedo acreditar nas minhas capacidades enquanto estudante, por me apoiar e incentivar em todas as decisões do meu dia-a-dia e nunca me deixar baixar os braços. Apesar de já não estar presente, aqui fica a minha “pequena” homenagem.

Por último, um agradecimento especial ao Rodrigo, pelo apoio e carinho diário ao longo desta árdua e custosa caminhada. Sempre que necessário soube aconselhar e soube criticar como em tudo na vida. Pelas angústias, desânimos, alegrias e momentos felizes e essencialmente pela compreensão, a minha enorme gratidão.

A todos, um enorme bem-haja!

## ABREVIATURAS

---

**ACN** – Acetonitrilo

**ATDSR** – Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças

**B[a]P** – Benzo[a]pireno

**CIIMAR** – Centro Interdisciplinar de investigação Marinha e Ambiental

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**EFSA** – Agência Europeia para a Segurança Alimentar

**FD** – Deteção por fluorescência

**GRAQ** – Grupo de reação e análises químicas

**GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa

**GC-MS/MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa em *tandem*

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta pressão

**IARC** – Agência Internacional para pesquisa sobre Cancro

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada

**LC** – Cromatografia líquida

**LOD** – Limite de Deteção

**LOQ** – Limite de Quantificação

**MAE** – Microextração assistida por micro-ondas

**MeOH** – Metanol

**N<sub>2</sub>** – Azoto

**O<sub>2</sub>** – Oxigénio

**PAHs** – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

**QuEChERS** – Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe

**r<sup>2</sup>** – Coeficiente de correlação

**SPE** – Extração em fase sólida

**SPME** – Microextração em fase sólida

**TBQH** – *Terc*-butil-hidroquinona

**TEF** – Fator de toxicidade equivalente

**US EPA** – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

**WHO** – Organização Mundial da Saúde

## RESUMO

---

O consumo de peixe e frutos do mar é considerado um elemento importante de uma dieta humana equilibrada. Os cefalópodes representam um dos mais importantes grupos capturados na Europa e sendo assim, várias questões com o seu consumo têm surgido devido ao risco da exposição a poluentes químicos.

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), omnipresentes poluentes orgânicos formados, naturalmente ou antropogenicamente, devido a combustão incompleta de qualquer material que contém carbono, estão incluídos na lista prioritária de poluentes da União Europeia e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) devido às suas propriedades mutagênicos e carcinogênicos.

Na determinação dos seus derivados monohidroxílicos resultante da metabolização, o 1-hidroxipireno tem surgido como um biomarcador biológico para a dose de pireno e um indicador indireto para todos os PAHs. Uma vez que os cefalópodes são expostos a estes contaminantes, estes organismos foram relatados como uma importante via de exposição humana.

A análise de PAHs e dos seus metabolitos em amostras de alimentos continua a ser uma tarefa desafiadora.

Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método preciso e sensível para a determinação de 3 metabolitos hidroxilados de PAHs (1-hidroxinaftaleno, 2-hidroxifluoreno e 1-hidroxipireno) em amostras de cefalópodes. A análise foi realizada por extração, hidrólise enzimática e *cleanup* por extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção por fluorescência (FD). A metodologia analítica otimizada mostrou-se sensível, exata e precisa com percentagens de recuperação entre 62 a 110% e limites de detecção de 227, 9 e 46 ng g<sup>-1</sup> para o 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P, respetivamente, tendo, posteriormente, sido aplicada à análise de 18 amostras reais oriundas do Sudoeste e Noroeste Atlântico. Níveis variáveis de 1-OH-NF (786-1145 ng g<sup>-1</sup>) foram detetados nas amostras analisadas. Nenhuma das amostras continha quantidades detetáveis de 2-OH-FI e 1-OH-P, o biomarcador usado para avaliar a ocorrência e os efeitos cancerígenos de PAHs em alimentos.

**Palavras-chave:** PAHs; 1-hidroxinaftaleno; 2-hidroxifluoreno; 1-hidroxipireno; cefalópodes; SPE; HPLC-FD.

## ABSTRACT

---

The consumption of fish and seafood is considered an important part of a balanced diet. Among seafood species, cephalopods represent one of the most important captured groups in Europe. This being true, concern with their consumption has arisen due to the risk derived from exposure to chemical pollutants.

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), omnipresent naturally formed organic pollutants, naturally or anthropogenically, due to incomplete combustion of any material containing organic, are included in the priority list of pollutants of the European Union and United States Environmental Protection Agency (US EPA) due to their mutagenic and carcinogenic properties.

Important substances associated with PAHs are their monohydroxyls derivatives generated as a result of the PAH metabolic process. 1-hydroxypyrene was proposed as a biological biomarker for the pyrene dose and an indirect indicator for all PAHs. Since cephalopods are exposed to PAHs, these organisms have been reported as a major route of human exposure.

The PAHs analysis and their metabolites in samples of food continue to be a challenging task.

A precise and sensitive method for determining the presence of 3 hydroxylated metabolites of PAHs (1-hydroxynaphthalene, 2-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene) in samples of cephalopods has been validated. The analysis was performed through extraction, enzymatic hydrolysis and *cleanup* by solid-phase extraction (SPE) and determination by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (FD). The optimized analytical methodology was sensitive, accurate and precise with recovery rates between 62 to 110% and detection limits of 227, 9 and 46 ng g<sup>-1</sup> for the 1-OH-NF, 2-OH-FI and 1-OH-P, respectively, having subsequently been applied to the analysis of real samples from 18 of the Southwest and Northwest Atlantic. Varying levels of 1-OH-NF (786-1145 ng g<sup>-1</sup>) were detected in the samples analyzed. None of the samples contained detectable quantities of 2-OH-FI and 1-OH-P, the biomarker used to evaluate the occurrence and carcinogenicity of PAHs in food.

**Keywords:** PAHs; 1-hydroxynaphthalene; 2-hydroxyfluorene; 1-hydroxypyrene; cephalopods; SPE; HPLC-FD.

## OBJETIVOS

---

O trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado pretendeu:

- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação de metabolitos de PAHs, mais especificamente, para o 1-hidroxinaftaleno, 2-hidroxifluoreno e 1-hidroxipireno;
- ✓ Avaliar o nível de contaminação através da determinação dos metabolitos 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P em amostras de cefalópodes.

# TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DESTA DISSERTAÇÃO

---

## *Comunicação em poster*

LOURENÇO, D.; SILVA, L.J.G.; LINO, C.; MORAIS, S.; PENA, A. – **Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons monohydroxy derivates in cephalopods.** XX Congreso Español de Toxicología y IV Iberoamericano. Salamanca, 26-28 de Junho de 2013.

## *Publicações em artigo*

LOURENÇO, D.; SILVA, L.J.G.; LINO, C.; MORAIS, S.; PENA, A. – **Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons monohydroxy derivatives in cephalopods by SPE-LC-FD from the Portuguese market.** *Microchemical Journal*, 2013 (submitted).

# ÍNDICE GERAL

---

AGRADECIMENTOS .....	i
ABREVIATURAS .....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
OBJETIVOS .....	vi
TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DESTA DISSERTAÇÃO .....	vii
ÍNDICE GERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE TABELAS .....	xii

## Capítulo I- Enquadramento Teórico

I.1. INTRODUÇÃO .....	2
I.2. ORIGEM DOS PAHs.....	4
I.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PAHs.....	5
I.4. FONTES EMISSORAS .....	9
I.5. EXPOSIÇÃO HUMANA.....	11
I.6. TOXICIDADE .....	14
I.6. 1. Toxicidade aguda .....	14
I.6. 2. Toxicidade crónica .....	14
I.6. 3. Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade .....	15
I.7. METABOLISMO DOS PAHs.....	18
I.7. 1. Absorção.....	18
I.7. 2. Distribuição .....	18
I.7. 3. Metabolização .....	19
I.7. 4. Excreção .....	20

I.8. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E DERIVADOS .....	21
I.9. LEGISLAÇÃO .....	22
I.9. 1. Água .....	22
I.9. 2. Ar ambiente .....	22
I.9. 3. Alimentos.....	23
I.10. PAHs NOS ALIMENTOS.....	25
I.11. METODOLOGIAS ANALITICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE PAHs.....	28
I.11. 1. Extração .....	28
I.11. 2. Hidrólise Enzimática.....	29
I.11. 3. Extração em fase sólida.....	29
I.11. 4. Outros métodos de purificação MAE, SPME e Quercers.....	30
I.11. 5. Deteção e Quantificação .....	31
I.11. 5. 1. Cromatografia líquida .....	31
I.11. 5. 2. Cromatografia gasosa .....	32

## **Capítulo II- Parte Experimental**

II.1. AMOSTRAGEM .....	35
II.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
II.2. 1. Reagentes Químicos .....	37
II.2. 2. Soluções .....	37
II.2. 3. Materiais e equipamentos .....	38
II.2. 4. Metodologia Analítica .....	39
II.2. 4. 1. Extração .....	39
II.2. 4. 2. Hidrólise enzimática .....	39
II.2. 4. 3. Purificação .....	39
II.2. 4. 4. Cromatografia líquida com deteção por fluorescência.....	40
II.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	41
II.3. 1. Linearidade .....	41
II.3. 2. Seletividade.....	41
II.3. 3. Exatidão e Precisão .....	41

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
II.4. 1. Otimização das condições cromatográficas.....	43
II.4. 2. Otimização dos procedimentos de extração .....	44
II.4. 3. Otimização da hidrólise enzimática .....	45
II.4. 4. Otimização da SPE.....	46
II.4. 5. Validação.....	52
II.4. 5. 1. Linearidade.....	52
II.4. 5. 2. Limites de Detecção e limites de quantificação.....	54
II.4. 5. 3. Seletividade .....	55
II.4. 5. 4. Exatidão e Precisão .....	55
II.4. 6. Níveis de I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P nas amostras .....	57
CONCLUSÃO .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Estrutura dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela US-EPA, bem como do dibenzo[a,l]pireno e do benzo[j]fluoranteno (Castro, 2010). .....	7
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do biomarcador 1-hidroxipireno (Costa, 2001).....	21
<b>Figura 3:</b> Cromatograma dos picos dos metabolitos 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P, respectivamente. ....	43
<b>Figura 4:</b> Curva de calibração para a solução padrão do 1-OH-NF.....	52
<b>Figura 5:</b> Curva calibração para a solução padrão do 2-OH-FI. ....	52
<b>Figura 6:</b> Curva de calibração para a solução padrão do 1-OH-P. ....	53
<b>Figura 7:</b> Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente a 1-OH-NF.....	53
<b>Figura 8:</b> Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente a 2-OH-FI. ....	54
<b>Figura 9:</b> Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente a 1-OH-P. ....	54
<b>Figura 10:</b> Cromatograma da amostra sem metabolitos de PAHs (ensaio em branco). ....	55
<b>Figura 11:</b> Cromatograma de uma amostra fortificada com 1- OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P, respectivamente. ....	56

## INDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Propriedades físico-químicas dos PAHs em estudo (Castro, 2010).....	8
<b>Tabela 2:</b> Classificação dos 18 PAHs selecionados neste estudo, quanto à carcinogenicidade e fator de toxicidade equivalente (TEF) (US- EPA, 2005; Castro, 2010; IARC, 2010; Menezes, 2011).....	17
<b>Tabela 3:</b> Valores alvo para o benzo[a]pireno segundo a Diretiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Dezembro de 2004.....	23
<b>Tabela 4:</b> Limites legais de benzo[a]pireno presentes no Regulamento (EC) N° 1881/2006 expressos em $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso fresco. ....	23
<b>Tabela 5:</b> Critérios a cumprir pelos métodos de amostragem e deteção de benzo[a]pireno nos alimentos segundo o Regulamento (EC) N° 333/2007, de 28 de Março de 2007. ....	24
<b>Tabela 6:</b> Características das amostras de lulas analisadas.....	35
<b>Tabela 7:</b> Características das amostras de polvo analisadas.....	36
<b>Tabela 8:</b> Comprimentos de onda de excitação e emissão dos 3 metabolitos em estudo. ....	40
<b>Tabela 9:</b> Ensaios de otimização do procedimento SPE.....	47
<b>Tabela 10:</b> Limites de deteção e quantificação do estudo em causa.....	55
<b>Tabela 11:</b> Valores relativos à exatidão e precisão do 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P.....	57
<b>Tabela 12:</b> Resultados obtidos nas amostras.....	58

# **Capítulo I**

## **Enquadramento Teórico**

## I. I. INTRODUÇÃO

---

A saúde humana é em grande parte determinada pela dieta. Uma dieta recomendável deverá ser capaz de fornecer os nutrientes suficientes e níveis baixos de microrganismos patogénicos, assim como de contaminantes químicos (Ramalhosa et al., 2009).

O peixe e os frutos do mar são considerados alguns dos mais interessantes produtos dietéticos devido ao rico teor em proteína, composição equilibrada de aminoácidos e uma alta proporção de ácidos gordos polinsaturados. Entre as espécies de frutos do mar, os cefalópodes representam um dos mais importantes grupos capturados na Europa. Em Portugal, os cefalópodes representavam, em 2005, 8% das vendas do mercado (Lourenço et al., 2009).

Nas últimas décadas, a contaminação de alimentos por substâncias tóxicas tem sido objeto de intensas pesquisas. Dessas, destacam-se os estudos relacionados com Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), compostos químicos que representam um importante grupo de micropoluentes orgânicos (xenobióticos) devido à alta capacidade de distribuição no ambiente (atmosfera, água e solo) (Cotta et al., 2009).

Os PAHs são compostos quimicamente constituídos por dois ou mais anéis aromáticos ligados e consistem unicamente em carbono e hidrogénio (Alexander et al., 2008).

Formam-se a partir da combustão incompleta de material orgânico e compreendem uma importante classe de contaminantes de diferentes tipos de alimentos, tanto de origem animal como de origem vegetal, devido a fenómenos naturais (processos geoquímicos, atividades vulcânicas e biossíntese por algas) e antropogénicos (queimadas em florestas; atividades industriais como defumação, secagem direta com madeira e torrefação; e poluição ambiental como tráfego, sistemas de aquecimento, vazamentos de óleo) (Sousa et al., 2010).

São poluentes orgânicos de grande persistência ambiental e facilmente lipossolúveis na membrana celular sendo absorvidos pelo Homem por inalação, exposição oral e dérmica, com posterior acumulo no tecido adiposo (Netto et al., 2000).

Muitos deles são capazes de reagir, após transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se genotóxicos, mutagénicos e potenciais carcinogénicos (Ramalhosa et al., 2009).

Pelo seu carácter ubiqüitário, constituem uma ameaça potencialmente fatal para a saúde de toda a população. A Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças (ATDSR) elabora frequentemente uma lista das substâncias de maior risco para as populações, sendo que na lista de 2011 os PAHs se destacavam em 9º lugar (ATDSR, 2011).

A poluição dos ambientes marinhos e estuarinos tornou-se um fenómeno mundial devido ao derramamento de óleo, poluição atmosférica, efluentes industriais e urbanos, conduzindo, assim, a ocorrência de PAHs em águas do mar e consequente contaminação das espécies existentes (Ramalhosa et al.,2012a).

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de metabolitos de PAHs (1-hidroxinaftaleno, 2-hidroxifluoreno e 1- hidroxipireno) em amostras de cefalópodes. Este método analítico baseia-se na extração, hidrólise enzimática e *cleanup* por extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com deteção por fluorescência (FD).

## I. 2. ORIGEM DOS PAHs

---

Em 1775, na cidade de Londres, Sr. Percival Pott observou que existia uma maior incidência de cancro de pele nomeadamente o do escroto e da face em limpadores de chaminés, como resultado da exposição à fuligem (Ferreira et al., 2007).

Mais tarde, em 1808 foram publicados os primeiros estudos sobre a perigosidade dos PAHs, uma vez que estes originavam efeitos negativos na saúde humana (Castro, 2010).

Ichikawa e Yamagina (investigadores japoneses), em 1920 descobriram que os tumores da pele poderiam ser gerados em ratos submetidos ao alcatrão da hulha, confirmando assim as observações feitas por Pott, formuladas 150 anos antes (Ferreira et al., 2007; Castro, 2010).

Em 1929, os PAHs foram separados do alcatrão de hulha sendo o primeiro composto puro carcinogénico isolado do extrato de fuligem no “ Chester Beatty Research Institute” pelo Sr. Kennaway, o dibenzo[a,h]antraceno (Castro, 2010).

Em 1953, estudos estatísticos comprovaram que o fumo do cigarro é a causa primária de cancro do pulmão destacando o benzo[a]pireno como o composto mais perigoso dentro dos muitos carcinogénicos revelados (Ferreira et al., 2007).

Vários estudos epidemiológicos demonstram o efeito tóxico dos PAHs no Homem e a sua atividade carcinogénica, sendo alvo de pesquisa constante (Castro, 2010).

### **I. 3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PAHs**

---

Os PAHs são compostos orgânicos constituídos por átomos de carbono e de hidrogénio, organizados na forma de dois ou mais anéis aromáticos condensados (Faria et al., 2004). Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, existem atualmente mais de 100 PAHs reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Entre estes, só alguns são considerados relevantes em função das informações químico-físicas, toxicológicas, industriais e ambientais existentes (Ferreira et al., 2007).

Os PAHs têm uma estrutura planar rígida, apresentam solubilidade baixa em água (exceto o naftaleno e os seus compostos alquilados que são relativamente solúveis) e em geral, a sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis (Netto et al., 2000). A solubilidade depende não apenas da natureza do composto, mas também de fatores como a temperatura, força iónica, pH, concentração de material em suspensão e da matéria orgânica dissolvida. Os pontos de fusão apresentam uma ampla faixa de variação e os pontos de ebulição são acima de 200° C (Cordeiro, 2003; Ferreira et al. 2007).

Apresentam também, coeficientes de partição octanol/água superior a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica, causando um importante potencial de adsorção sobre as matérias particuladas em suspensão no ar e na água, bem como um forte potencial de bioconcentração nos organismos (Netto et al., 2000).

Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento da massa molecular e conseqüentemente, os PAHs de massas mais baixas são mais voláteis. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry que diminuem com o aumento da massa molecular destas substâncias. Dada a sua natureza semi-volátil os PAHs são ubíquos e altamente móveis no ambiente, distribuindo-se entre o ar, água e solo (Castro, 2010).

Nos organismos os tempos de semi-vida dos compostos de maior massa molecular são relativamente mais elevados e indicam que a sua degradação é mais lenta. É ainda de referir que as reações de oxidação e redução destes compostos diminuem com o aumento da massa molecular (Ferreira et al., 2007).

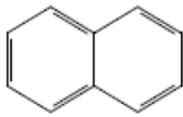
Os valores de algumas constantes físico-químicas relevantes para a compreensão do comportamento toxicológico destes compostos, são apresentados na Tabela I (Castro, 2010).

Os PAHs podem ser formados a partir da decomposição térmica de matérias orgânicas sendo as principais fontes antropogénicas (resultantes da ação/atividade humana) de origem pirolítica e petrogénica (Faria et al., 2004).

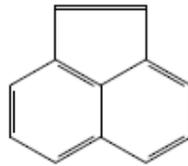
Os PAHs que apresentam na sua estrutura molecular até três anéis aromáticos são geralmente oriundos do petróleo e denominados **petrogénicos**. Os principais PAHs presentes no petróleo bruto são o naftaleno, o fenantreno e os seus derivados alquilados (Barroso, 2010).

Por outro lado, os PAHs que apresentam mais de três anéis aromáticos na sua estrutura molecular e baixo grau de alquilação são principalmente originados na combustão e denominados **pirogénicos** (Barroso, 2010). Provêm maioritariamente da combustão incompleta de combustíveis como carvão mineral, óleo, madeira e gás para geração de energia, aquecimento residencial e transporte veicular e também, a partir de alguns processos de preparação de alimentos. A quantidade de PAHs formados sob condições definidas de pirólise depende, no entanto, da temperatura de reação, bem como do material (Faria et al., 2004).

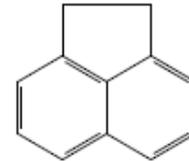
A figura I ilustra as fórmulas estruturais e a nomenclatura IUPAC dos 16 PAHs parentais prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (USA-EPA) assim como do dibenzo[a,l]pireno e do benzo[j]fluoranteno (Castro, 2010).



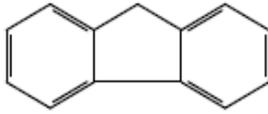
Naftaleno



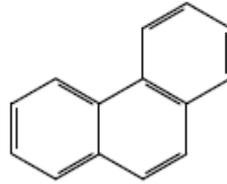
Acenaftileno



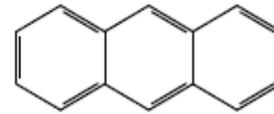
Acenafteno



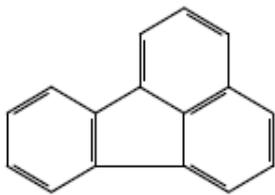
Fluoreno



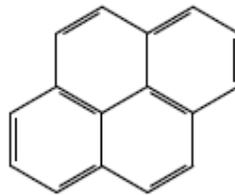
Fenantreno



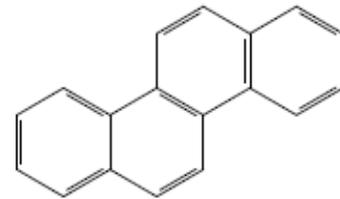
Antraceno



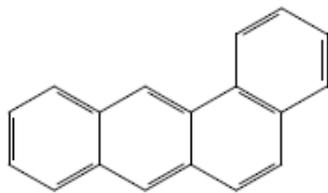
Fluoranteno



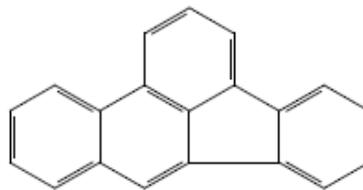
Pireno



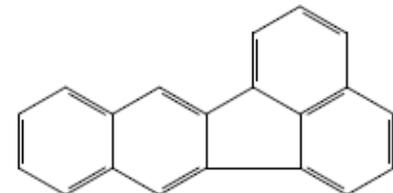
Criseno



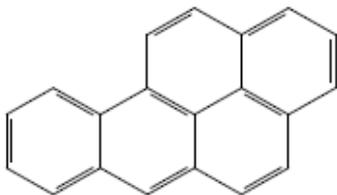
Benzo[a]antraceno



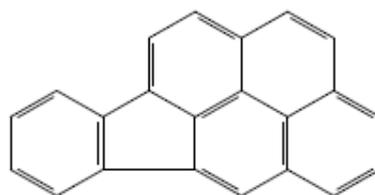
Benzo[b]fluoranteno



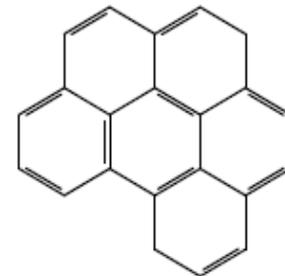
Benzo[k]fluoranteno



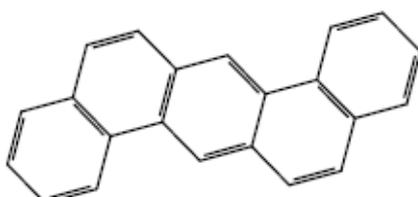
Benzo[a]pireno



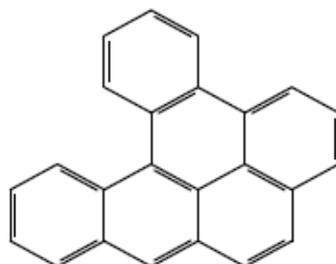
Indeno[1,2,3-cd]pireno



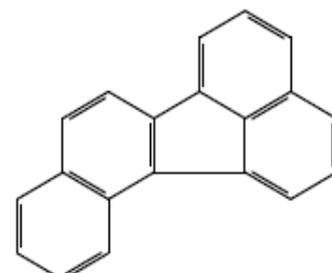
Benzo[g,h,i]perileno



Dibenzo[a,h]antraceno



Dibenzo[a,h]antraceno



Benzo[j]fluoranteno

**Figura I:** Estrutura dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela US-EPA, bem como do dibenzo[a,h]pireno e do benzo[j]fluoranteno (Castro, 2010).

**Tabela I:** Propriedades físico-químicas dos PAHs em estudo (Castro, 2010).

Composto	Abreviatura	Fórmula condensada	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Ponto fusão (°C)	Ponto ebulição (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Pressão de vapor a 25°C (Pa)	Solubilidade em água a 25°C (µg L <sup>-1</sup> )	Constante de Henry a 25°C (kPa)
<b>Naftaleno</b>	Naph	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128,17	81	218	3,40	10,4	3,17 × 10 <sup>4</sup>	4,89 × 10 <sup>-2</sup>
<b>Acenaftileno</b>	Aci	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152,19	92-93	265	4,07	8,9 × 10 <sup>-1</sup>	3,93 × 10 <sup>3</sup>	1,14 × 10 <sup>-3</sup>
<b>Acenafteno</b>	Ace	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154,21	95	279	3,92	2,9 × 10 <sup>-1</sup>	3,4 × 10 <sup>3</sup>	1,48 × 10 <sup>-2</sup>
<b>Fluoreno</b>	Fl	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,22	115-116	295	4,18	8,0 × 10 <sup>-2</sup>	1,98 × 10 <sup>3</sup>	1,01 × 10 <sup>-2</sup>
<b>Antraceno</b>	Ant	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	216	342	4,50	8,0 × 10 <sup>-4</sup>	73	7,3 × 10 <sup>-2</sup>
<b>Fenantreno</b>	Phe	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,23	100	340	4,60	1,6 × 10 <sup>-2</sup>	1,29 × 10 <sup>3</sup>	3,98 × 10 <sup>-2</sup>
<b>Fluoranteno</b>	Ft	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,25	109	375	5,22	1,2 × 10 <sup>-3</sup>	260	6,5 × 10 <sup>-4</sup>
<b>Pireno</b>	Pyr	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,25	150	393	5,18	6,0 × 10 <sup>-4</sup>	135	1,1 × 10 <sup>-3</sup>
<b>Benz[a]antraceno</b>	B[a]A	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	161	400	5,61	2,8 × 10 <sup>-5</sup>	14	-----
<b>Criseno</b>	Chr	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	254	448	5,91	8,4 × 10 <sup>-5</sup>	2,0	-----
<b>Benzo[b]fluoranteno</b>	B[b]F	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,31	167	357	5,80	-----	1,2	-----
<b>Benzo[k]fluoranteno</b>	B[k]F	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	251,31	216	480	6,84	1,3 × 10 <sup>-7</sup>	0,76	4,4 × 10 <sup>-5</sup>
<b>Benzo[a]pireno</b>	B[a]P	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	278,35	178	496	6,50	7,3 × 10 <sup>-7</sup>	3,8	3,4 × 10 <sup>-5</sup> (20°C)
<b>Dibenz[a,h]antraceno</b>	DB[a,h]A	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,35	267	524	6,50	1,3 × 10 <sup>-8</sup> (20°C)	0,5 (27°C)	7,0 × 10 <sup>-6</sup>
<b>Indeno[1,2,3-cd]pireno</b>	InP	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,33	164	536	6,58	1,3 × 10 <sup>-8</sup> (20°C)	62	2,9 × 10 <sup>-5</sup> (20°C)
<b>Benzo[g,h,i]perileno</b>	B[g,h,i]P	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,33	278	545	7,10	1,4 × 10 <sup>-8</sup>	0,26	2,7 × 10 <sup>-5</sup> (20°C)
<b>Benzo[j]fluoranteno</b>	B[j]F	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,31	165	480	6,12	2,0 × 10 <sup>-6</sup>	2,5 (20°C)	-----
<b>Dibenzo[a,l]pireno</b>	DB[a,l]P	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	302,36	----	----	----	-----	-----	-----

## I. 4. FONTES EMISSORAS

---

Os PAHs são emitidos por fontes naturais e antropológicas (resultantes da atividade humana). A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas, processos hidrotérmicos e emissões vulcânicas (Costa, 2001; Menezes, 2011). As fontes antropológicas representam o principal processo de produção de PAHs e dizem respeito a:

- Pirólise de madeira para produção de carvão;
- Operações de transporte e refinação do petróleo;
- Incineração de resíduos domésticos e industriais;
- Queimas de matéria orgânica de campos e florestas;
- Geração de energia via queima de combustíveis fósseis;
- Produção do alumínio, ferro e aço;
- Pirólise de querosene para a formação de benzeno, tolueno e outros solventes orgânicos;
- Emissão de motores de veículos (particularmente a diesel);
- Fumo do tabaco;
- Cozinhados;
- Incêndios (Who, 2000; Ferreira et al., 2007).

A combustão envolve dois processos principais: a **pirólise** e a **pirossíntese**. O primeiro processo ocorre quando a temperatura excede os 500°C e as ligações carbono-hidrogénio e carbono-carbono são quebradas, formando estruturas menores, sendo a maioria radicais livres. Por sua vez, estes compostos formados durante a pirólise, recombina-se para formar moléculas maiores e mais estáveis tornando-se mais resistentes à degradação térmica, ocorrendo assim a pirossíntese (Bettin et al., 2005; Ravindra et al., 2008; Sousa et al., 2010).

Esses compostos são libertados da zona de combustão na forma de vapor e devido às suas baixas pressões, a maioria deles condensa-se sobre partículas ou formam, elas mesmas, partículas muito pequenas que depois podem ser transportados para longas distâncias (Mastandrea et al., 2005).

O tipo de fonte emissora determina a composição e a complexidade da mistura dos PAHs obtida, assim como, a quantidade e os tipos de PAHs formados dependem das

condições específicas do processo e do tipo de combustível, uma vez que processos mais eficientes emitem menos quantidades de PAHs (Manoli et al., 2004; Ferreira et al., 2007).

Os PAHs antropológicos podem ainda ser divididos em fontes estacionárias ou de emissões móveis. As fontes estacionárias contribuem com a maior parte da emissão total dos PAHs para a atmosfera através da atividade industrial (produção de alumínio), da incineração e geração de energia elétrica e de calor, podendo emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta (Costa, 2001; Manoli et al., 2004).

Contudo, nos grandes centros urbanos as fontes móveis prevalecem devido ao aumento do tráfego veicular e à dificuldade de dispersão dos poluentes nos aglomerados urbanos (Sharma et al., 2007). A estabilidade de muitos PAHs aliada à turbulência na atmosfera, variações na direção e velocidade dos ventos, faz com que esses compostos possam ser transportados a grandes distâncias atingindo recetores bem afastados dos pontos onde foram emitidos (Boer et al., 2003; Roose et al., 2005).

## I. 5. EXPOSIÇÃO HUMANA

---

A atmosfera constitui um importante meio de transporte para os compostos orgânicos e inorgânicos emitidos por fontes naturais e antropológicas.

A contaminação não só da atmosfera mas também de rios, mares e florestas, pode causar danos irreparáveis à natureza e à saúde humana (Costa, 2001).

A exposição humana (e de outros animais) a PAHs ocorre por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada (Castro, 2010).

Outros importantes modos de exposição a PAHs são o hábito de fumar, a inalação (passiva) de fumo de cigarros e a exposição ocupacional em atividades e processos que envolvem a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos, podendo alcançar até 90% da quantidade absorvida pelo organismo (Ferreira et al., 2007).

### **VIAS DE EXPOSIÇÃO:**

→ **Ar** – A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau da contaminação atmosférica, que está diretamente relacionada com o grau de urbanização, o tráfego automóvel e com o tipo de industrialização da área (WHO, 2000).

É do conhecimento geral, que a qualidade do ar respirável tem influência direta na saúde. A poluição atmosférica, por ser uma fonte de exposição direta aos poluentes através da respiração e inalação, é responsável por um número significativo de doenças crónicas ao nível do sistema respiratório e ao nível do sistema cardiovascular, sendo responsável pelo aumento da mortalidade prematura da população (Brunekreef et al., 2002).

→ **Alimentos** – Os PAHs estão presentes em quantidades substanciais em alguns alimentos, dependendo da origem, do modo de confeção, conservação e armazenamento. São detetados essencialmente nas carnes fumadas, peixe, folhas de vegetais (espinafres, alface, etc.), óleos e gorduras vegetais (EFSA, 2008). Nas plantas concentram-se mais na superfície e nos animais mais nos tecidos internos. A presença de PAHs em alimentos não processados de origem vegetal pode ser

atribuída principalmente à deposição atmosférica. Relativamente aos alimentos de origem animal, vários estudos revelaram que as condições atmosféricas de criação do animal influenciam os níveis de poluentes nos seus derivados. Os moluscos bivalves, como os mexilhões e ostras, tendem a acumular os PAHs, podendo transportar estes poluentes para o consumidor (Castro, 2010).

A dieta é, normalmente, a principal fonte de exposição em pessoas que não estão expostas diariamente ao fumo do tabaco, ou seja, os não fumadores. Já em fumantes, a participação do tabagismo e via alimentar podem ser de semelhante magnitude (EFSA, 2008).

- **Água** – Devido à baixa solubilidade e elevada afinidade para a matéria particular, os PAHs não são, normalmente, encontrados na água em elevadas concentrações. A maior fonte de contaminação dos PAHs em água potável é devido ao alcatrão da hulha que é usado para proteger os canos da água potável da corrosão. Esta situação faz com que os valores de PAHs na água potável aumentem, e deste modo também os valores nos alimentos aumentam devido à água que usamos para confeccionar (Ferreira et al., 2007).
  
- **Solo** – Para além da deposição atmosférica, outra forma de contaminação de alimentos (principalmente os de origem vegetal) são os solos contaminados. Vários PAHs considerados cancerígenos são frequentemente encontrados na superfície dos solos. Nos solos florestais e rurais o teor de PAHs pode ocasionalmente atingir os 1000 mg kg<sup>-1</sup> (WHO, 2000). Em solos de áreas metropolitanas, o teor de PAHs geralmente é superior ao encontrado em solos rurais, devido fundamentalmente à atividade industrial e tráfego automóvel característico das áreas urbanas (WHO, 2000).

Além da exposição involuntária através das principais vias, alguns grupos de trabalhadores são expostos a PAHs específicos, durante o manuseamento contínuo dos mesmos, quando estes são utilizados como reagentes diretos ou intermediários em processos industriais de elevada produção. Dos PAHs listados como poluentes prioritários pela US-EPA, alguns são aplicados diariamente em processos de fabrico industrial, nomeadamente: o naftaleno, usado no fabrico de corantes, plásticos e alguns solventes; o

acenafteno, aplicado como intermediário na produção de alguns corantes e produtos farmacêuticos; o fluoreno, usado como intermediário na formação de resinas e também no fabrico de corantes; o antraceno, usado como intermediário na produção de fibras sintéticas e indústria farmacêutica; o fenantreno, usado no fabrico de tintas e explosivos; e por último o fluoranteno, que pode ser aplicado no revestimento de tubagens maleáveis de ferro para água potável e reservatórios. Para os restantes PAHs prioritários não se conhece qualquer aplicabilidade como reagentes a não ser, em trabalhos de investigação. Deste leque de PAHs com aplicação industrial, apenas o naftaleno é considerado possivelmente carcinogénico (Who, 2000).

Contudo, a falta de carácter cancerígeno, não implica que sejam inofensivos, já que consoante o nível de exposição podem provocar reações adversas na saúde humana (US-EPA, 2005; Castro, 2010).

## I. 6. TOXICIDADE

---

De acordo com o grau de exposição, a toxicidade dos PAHs pode ser aguda (exposição em curto período de tempo, mas em elevadas concentrações) ou crónica (exposição longa, e com baixas concentrações). Esses dois tipos de toxicidade geram respostas diferentes nos organismos dependendo também da concentração absorvida na alimentação, hábitos de fumar, poluição do ar, entre outros fatores (Sousa et al., 2010).

### I. 6.1. Toxicidade aguda

Em geral, os PAHs têm uma toxicidade aguda baixa nos humanos. Contudo, são observados efeitos hematológicos nomeadamente agranulocitose, anemia, leucopenia e pancitopenia em ratos (Ferreira et al., 2007).

### I. 6.2. Toxicidade crónica

A toxicidade crónica verifica-se nos seguintes níveis:

→ **Respiratório:** Irritação, tosse crónica, bronquite e cancro dos pulmões.

→ **Gastrointestinal:** Leucopenia e cancro dos lábios e da cavidade oral.

→ **Hepático:** Hepatotoxicidade (demonstrada em animais de laboratório).

→ **Geniturinário:** Hematúria, cancro de bexiga e rim.

→ **Dermatológica:** fotossensibilização e cancro; Verrugas do alcatrão da hulha - lesões pré-cancerígenas (por exposição a luz UV), eritema, queimaduras, lesões acneiformes (Ferreira et al., 2007).

→ **Imunológico:** Os PAHs exercem efeitos importantes no sistema imunitário uma vez que desenvolvem neoplasmas. A dose e a via de exposição vão determinar a natureza do efeito na resposta imunitária (Ferreira et al., 2007).

→**Reprodutivo:** Alguns estudos indicam que os PAHs podem afetar o desenvolvimento fetal e alterar a *performance* reprodutiva do homem e da mulher. Estudos demonstram a presença de PAHs na placenta e nos tecidos fetais. Estes são transferidos e ativados pelo feto, tanto em fumadores como em não fumadores sendo os níveis relativos superiores em fumadores. A ocorrência e extensão da toxicidade desenvolvida dependem em parte do genótipo maternal e fetal (Ferreira et al., 2007).

Os PAHs podem produzir alterações no DNA dos fetos. Isso é demonstrado em filhos de mães expostas a poluição atmosférica industrial e doméstica com PAHs. Além disso, os recém-nascidos mostram uma significativa diminuição do tamanho, do peso e do perímetro do crânio (Perera et al., 1998; Whyatt et al., 2000).

→**Efeitos Cardiovasculares:** Tem surgido a hipótese que os PAHs veiculado através do fumo do cigarro ou dos produtos de combustão podem causar lesões no endotélio e alterações no crescimento celular das células musculares, levando a expansão destes nas paredes das artérias, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose. É inequívoco que o fumo do tabaco é um dos maiores riscos para doenças cardiovasculares e há alguma evidência científica que a exposição ocupacional a produtos de combustão contendo PAHs podem estar associada a um aumento no risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, não tem sido estabelecida nenhuma relação causal entre risco cardiovascular e exposição aos PAHs provenientes do tabaco ou a produtos de combustão em exposição ocupacional (Ferreira et al., 2007).

→**Carcinogenicidade:** É o efeito tóxico dos PAHs mais significativo e muitos só se tornam tóxicos após metabolismo. O aumento da incidência de cancro na pele e na bexiga, pulmões e trato gastrointestinal verifica-se sobretudo em trabalhadores expostos (Ferreira et al., 2007).

### I. 6. 3. Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

Os PAHs, bem como os seus derivados nitrados e oxigenados são poluentes orgânicos capazes de reagir, após transformações metabólicas, com o DNA, o que os torna compostos potencialmente cancerígenos e mutagénicos. Nos últimos 30 anos têm recebido especial atenção por constituírem uma ameaça para a saúde de todas as espécies, sendo

essencial a sua monitorização em matrizes biológicas e ambientais (IARC, 2010; Castro, 2010).

Algumas entidades estabeleceram critérios de avaliação quanto à classificação carcinogénica dos PAHs. A tabela 2 exhibe a classificação carcinogénica dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela US-EPA e pela Agência Internacional para pesquisa sobre o Cancro (IARC) e o fator de toxicidade equivalente (TEF) de cada PAH, tendo como base de comparação o benzo[a]pireno (US-EPA, 2005; Menezes, 2011; Castro, 2010; IARC, 2010). O benzo[a]pireno (B[a]P), o PAH mais carcinogénico, possui na sua estrutura química alto grau de reatividade bioquímica e por essa razão, foi selecionado como biomarcador (US-EPA, 2005; Castro, 2010; IARC, 2010).

Contudo, a sua seleção como biomarcador tem sido questionada devido as novas descobertas de PAHs mais potentes do ponto de vista carcinogénico, como é o caso do dibenz[a,h]antraceno e do dibenzo[a,l]pireno que se estima serem aproximadamente 5 e 100 vezes mais cancerígenos que o benzo[a]pireno, respetivamente (Okona-Mensah et al., 2005; Castro, 2010).

Por outro lado, e segundo as orientações da WHO (1998) a avaliação do benzo[a]pireno por si só provavelmente subestima o poder carcinogénico da mistura de PAHs, uma vez que podem também estar presentes outros PAHs cancerígenos.

**Tabela 2:** Classificação dos 18 PAHs selecionados neste estudo, quanto à carcinogenicidade e fator de toxicidade equivalente (TEF) (US- EPA, 2005; Castro, 2010; IARC, 2010; Menezes, 2011).

Composto	Abreviatura	US-EPA <sup>1</sup>	IARC <sup>2</sup>	TEF <sup>3</sup>
<b>Naftaleno</b>	Naph	C*	2B	0.001
<b>Acenaftileno</b>	Aci	D*	não avaliado	0.001
<b>Acenafteno</b>	Ace	não avaliado	3	0.001
<b>Fluoreno</b>	Fl	D*	3	0.001
<b>Antraceno</b>	Ant	D*	3	0.01
<b>Fenantreno</b>	Phe	D*	3	0.001
<b>Fluoranteno</b>	Ft	D*	3	0.001
<b>Pireno</b>	Pyr	D*	3	0.001
<b>Benz[a]antraceno</b>	B[a]A	B <sub>2</sub> *	2B	0.1
<b>Cristeno</b>	Chr	B <sub>2</sub> *	2B	0.1
<b>Benzo[b]fluoranteno</b>	B[b]F	B <sub>2</sub> *	2B	0.1
<b>Benzo[k]fluoranteno</b>	B[k]F	B <sub>2</sub> *	2B	0.1
<b>Benzo[a]pireno</b>	B[a]P	B <sub>2</sub> *	1	1
<b>Dibenz[a,h]antraceno</b>	DB[a,h]A	B <sub>2</sub> *	2 <sup>a</sup>	5
<b>Indeno[1,2,3-cd]pireno</b>	InP	B <sub>2</sub> *	2B	0.1
<b>Benzo[g,h,i]perileno</b>	B[g,h,i]P	D*	3	0.01
<b>Benzo[j]fluoranteno</b>	B[j]F	não avaliado	2B	0.1
<b>Dibenzo[a,l]pireno</b>	DB[a,l]P	não avaliado	2A	100

\*PAHs considerados poluentes prioritários pela US-EPA.

<sup>1</sup> **US-EPA:** **Grupo A** – cancerígeno para os humanos; **Grupo B** – provavelmente cancerígeno para os humanos (**B<sub>1</sub>** – baseado em evidências carcinogénicas limitadas no homem e suficientes em animais; **B<sub>2</sub>** – baseado em evidências carcinogénicas suficientes em animais); **Grupo C** – possivelmente cancerígeno para os humanos; **Grupo D** – não classificável como cancerígeno para os humanos (US-EPA, 2005; Castro 2010).

<sup>2</sup> **IARC:** **Grupo 1** – cancerígeno para os humanos; **Grupo 2A** – provavelmente cancerígeno para os humanos; **Grupo 2B** – possivelmente cancerígeno para os humanos; **Grupo 3** – não classificável como cancerígeno para os humanos (Castro, 2010; IARC, 2010).

<sup>3</sup> Fator de toxicidade equivalente, estimada tendo como base o benzo[a]pireno (Okona- Mensah et al., 2005; Castro, 2010).

## I. 7. METABOLISMO DOS PAHs

---

### I. 7. 1. Absorção

Os PAHs são compostos altamente lipofílicos, sendo rapidamente absorvidos por todas as vias de exposição (inalação, exposição oral e dérmica) e por diversos órgãos do organismo humano (Sousa et al., 2009).

A absorção de PAHs por **inalação** ocorre principalmente através da parede interior dos brônquios e em menor quantidade através dos alvéolos pulmonares (Ferreira et al., 2007).

A absorção **dérmica** é bastante importante em algumas atividades industriais, podendo ser a responsável por até 90% da quantidade absorvida pelo organismo (Costa, 2001).

Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição humana, tanto devido à formação de PAHs durante os tratamentos culinários, como devido à contaminação ambiental dos alimentos. A **absorção gastrointestinal** é rápida e aumenta com a lipofilia ou na presença de gorduras no trato gastrointestinal. Contudo, a absorção por ingestão é baixa (Ferreira et al., 2007).

### I. 7. 2. Distribuição

Os PAHs distribuem-se em quase todos os tecidos e a sua concentração depende da dose de exposição (Ferreira et al., 2007).

Devido à lipofilia, o tecido adiposo e mamário constituem depósitos de armazenagem importantes, mas devido ao rápido metabolismo não se verifica uma acumulação significativa (Sousa et al., 2009).

Distribuem-se amplamente nos tecidos maternos e são detetados no feto uma vez que atravessam a barreira placentária. No entanto, a transferência placentária é limitada e, deste modo, os níveis fetais não são tão elevados como verificados na mãe. Os PAHs também se encontram presentes no cordão umbilical e no leite materno (Ferreira et al., 2007).

### I. 7. 3. Metabolização

Os PAHs são quimicamente inertes e só após metabolização possuem efeitos biológicos, já anteriormente referidos (EFSA, 2008).

Os PAHs são metabolizados por enzimas de fase I e peroxidases, que produzem metabolitos que reagem com o DNA, e por enzimas de fase II que formam conjugados polares. A biotransformação dos PAHs envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise e de enzimas que catalisam reações de conjugação. Estas enzimas estão distribuídas em todos os tecidos orgânicos (Xue et al., 2005).

Este é um processo com vários passos, sendo eles a epoxidação (citocromo P450), hidratação do epóxido e uma epoxidação subsequente. O resultado é o último metabolito carcinogénico - um diolepóxido. Monoxigenases dependentes do citocromo P450 são responsáveis pela oxidação enzimática dos PAHs e agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrónica formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxidos hidrolases, produzirem di-hidrodióis. Destes fenóis, alguns são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolepóxidos). O carbono benzílico dos dihidrodiolepóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas do DNA e iniciar um processo mutagénico. Os di-hidrolepóxidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolisados a tetraóis, cuja formação pode ser utilizada como marcador de formação de diolepóxidos (Xue et al., 2005).

Os fenóis, as quinonas e os di-hidrofenóis podem sofrer conjugação formando sulfatos e glucuronatos. Os óxidos de arenos, as quinonas e os diolepóxidos também reagem com o glutathione e podem ser eliminados através da urina sob a forma de tioéteres (Xue et al., 2005).

A maior capacidade metabolizadora encontra-se no fígado, seguido do pulmão, mucosa intestinal, pele e rins mas o metabolismo também pode ocorrer no tecido nasal, glândulas mamárias, baço, cérebro, folículos do cabelo e eritrócitos, plaquetas, leucócitos, placenta e útero (EFSA, 2008).

No entanto, há uma grande variabilidade individual na capacidade de metabolização dos PAHs: pessoas deficientes em enzimas que ativam PAHs a metabolitos reativos deverão ter menos risco de desenvolver cancro; pessoas com deficiência em enzimas que detoxificam metabolitos reativos poderão ter este risco mais elevado. Muitos fatores

incluindo raça, sexo, tabaco, álcool, fatores genéticos podem induzir ou inibir o metabolismo o que indica que existem interações complexas (Ferreira et al., 2007).

#### **I. 7. 4. Excreção**

Quando absorvidos diretamente da fase gasosa, os PAHs são rapidamente metabolizados e eliminados pelo organismo (o benzo[a]pireno, por exemplo, é eliminado em cerca de 1 hora). Contudo, quando estão associados a partículas respiráveis, esta eliminação é bem mais demorada podendo levar semanas. As maiores vias de eliminação destas substâncias após metabolismo hepático (metabolitos dos PAHs e seus conjugados) são predominantemente as fezes e em níveis muito baixos, a urina, independentemente da via de administração (Ferreira et al., 2007).

A maior parte dos PAHs são excretados pelo sistema digestivo e pelos rins tanto que, após a ingestão de dietas contendo PAHs, em níveis muito baixos, os metabolitos são detetados na urina (Cordeiro, 2003; Ferreira et al., 2007).

## I. 8. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E DERIVADOS

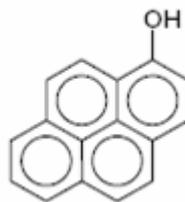
---

Os biomarcadores são produtos de biotransformação/alterações bioquímicas, cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar inalado avaliam a exposição de um organismo a um determinado agente químico (Amorim, 2003, Barbosa, 2009).

Os biomarcadores de exposição são usados para avaliar a exposição de um indivíduo a um contaminante, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (Amorim, 2003).

Vários trabalhos identificaram diversos tipos de biomarcadores que podem ser usados como indicadores de exposição a contaminantes, incluindo os PAHs (Barbosa, 2009).

O 1-hidroxipireno, principal metabolito do pireno tem sido amplamente utilizado como indicador de exposição aos PAHs, devido à sensibilidade, simplicidade e à rapidez na sua análise. O Pireno é metabolizado no organismo humano com formação do intermediário 1-hidroxipireno e 1-hidroxipireno-glucuronidase que posteriormente, são excretados por via urinária (Costa, 2001).



**Figura 2:** Estrutura química do biomarcador 1-hidroxipireno (Costa, 2001).

No presente estudo, foram analisados três derivados hidroxilados dos PAHs, sendo eles o 1-hidroxinaftaleno, o 2-hidroxifluoreno e o 1-hidroxipireno, correspondendo a baixo, médio e alto massa molecular, respetivamente.

É de realçar que o naftaleno, por possuir uma estrutura mais simples (constituído por dois anéis benzênicos e com baixa massa molecular), é frequentemente encontrado no solo e nos ambientes aquáticos (Santos, 2009).

## I. 9. LEGISLAÇÃO

---

Os PAHs encontram-se quase sempre em mistura tornando-se difícil avaliar a toxicidade de cada um. Assim sendo, recorre-se, tal como já foi referido, ao benzo[a]pireno, devido ao seu elevado potencial carcinogénico (Ferreira et al., 2007).

As Autoridades Europeias e Portuguesas acompanham a evolução dos conhecimentos sobre a toxicidade dos PAHs e do seu potencial risco para a saúde, tendo sido criados, ao longo dos tempos, diretivas e regulamentos com o objetivo de regular as quantidades máximas de exposição de PAHs a que o Homem pode estar exposto. Neste sentido, têm-se também desenvolvido esforços para a realização de programas de monitorização para conhecer o grau de poluição da água, ar e alimentos.

### I. 9. 1. Água

No domínio hídrico, encontra-se atualmente em vigor o Decreto-Lei nº 243/2001 do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, de 5 de Setembro que estabelece para águas destinadas ao consumo humano, o valor paramétrico  $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$  para o benzo[a]pireno e para a soma das concentrações do benzo[b]fluoratenos, benzo[k]fluoratenos, benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno, o valor  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O Decreto-Lei nº 243/2001 também aborda as especificações dos métodos usados para determinar as concentrações dos poluentes e no que diz respeito aos PAHs define os parâmetros de aceitação de metodologia analítica tais como, limites de aceitação para a exatidão, precisão e limite de deteção.

### I. 9. 2. Ar ambiente

Em 15 de Dezembro de 2004 foi publicada a Diretiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabeleceu o valor-alvo de  $1 \text{ ng m}^{-3}$  para o benzo[a]pireno no ar ambiente com o intuito de evitar, prevenir ou limitar os efeitos nocivos dos PAHs na saúde humana e no ambiente na sua globalidade.

**Tabela 3:** Valores alvo para o benzo[a]pireno segundo a Diretiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Dezembro de 2004.

Poluente	Valor alvo
Arsénio	6 ng m <sup>-3</sup>
Cádmio	5 ng m <sup>-3</sup>
Níquel	20 ng m <sup>-3</sup>
Benzo[a]pireno	1 ng m <sup>-3</sup>

### I. 9. 3. Alimentos

Atualmente, os limites de vários contaminantes encontram-se legislados no Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão da Comunidade Europeia de 19 de Dezembro, recomendando o benzo[a]pireno como biomarcador.

**Tabela 4:** Limites legais de benzo[a]pireno presentes no Regulamento (EC) N° 1881/2006 expressos em µg Kg<sup>-1</sup> de peso fresco.

Produto	Nível máximo (µg kg <sup>-1</sup> peso fresco)
Óleos e gorduras destinadas ao consumo humano direto ou à utilização como ingredientes alimentares.	2.0
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a latentes e crianças jovens.	
Fórmulas para latentes e fórmulas de transição, incluído leite para bebés e leite de transição.	1.0
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos especificamente destinados a latentes.	
Carnes fumadas e produtos fumados à base de carne.	5.0
Parte comestível de peixe fumado e produtos fumados da pesca, excluindo moluscos bivalves.	5.0
Parte comestível do peixe, exceto de peixe fumado.	2.0
Crustáceos, cefalópodes, exceto fumados.	5.0
Moluscos bivalves.	10.0

As características dos métodos de amostragem e deteção para o controlo oficial do teor de benzo[a]pireno (biomarcador dos PAHs) nos produtos alimentares encontram-se descritas no Regulamento (CE) N° 333/2007 da Comissão da Comunidade Europeia, de 28 de Março de 2007. O Regulamento define como critérios de aceitação para os métodos utilizados, no que se refere aos seguintes parâmetros: aplicabilidade, limite de deteção ( $0,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), limite de quantificação ( $0,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), precisão e recuperação (50-120%).

**Tabela 5:** Critérios a cumprir pelos métodos de amostragem e deteção de benzo[a]pireno nos alimentos segundo o Regulamento (EC) N° 333/2007, de 28 de Março de 2007.

<b>Paramêtros</b>	<b>Valores</b>
<b>Aplicabilidade</b>	Alimentos especificados no Regulamento (EC) N° 1881/2006
<b>LOD</b>	Menos de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$
<b>LOQ</b>	Menos de $0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$
<b>Precisão</b>	Inferiores a 2 (Repetibilidade)
<b>Recuperação</b>	50 a 120 %

Contudo, a 4 de Fevereiro de 2005, a Comissão da Comunidade Europeia recomendou à Agência Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) uma revisão dos níveis máximos dos PAHs nos vários grupos de alimentos registados, tendo em conta a evolução dos conhecimentos científicos e tecnológicos relativos à presença de benzo[a]pireno e outros PAHs carcinogénicos nos alimentos (Ferreira et al., 2007).

Em 29 de Junho de 2007 a EFSA concluiu que a contaminação dos alimentos era relativamente baixa em alguns grupos de alimentos, tal como podemos verificar na tabela 4, uma vez que existem valores superiores a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Alguns destes grupos já estão regulamentados mas outros como plantas e especiarias, suplementos alimentares, café e outras infusões não existe legislação acerca dos limites para estas categorias de alimentos. O processamento alimentar é responsável pela formação de PAHs uma vez que este processo está diretamente relacionado com o aumento da temperatura de processamento (Ferreira et al., 2007).

Sendo assim, parece ser necessário rever a legislação atual em relação aos limites de PAHs para certos grupos de alimentos.

## I. 10. PAHs NOS ALIMENTOS

---

A contaminação de alimentos por PAHs pode ocorrer através de quatro fontes principais: fontes naturais (ex.: queima de florestas), poluição ambiental (ex.: contaminação de solo e água), materiais de embalagens e alguns tipos de processos culinários (Philips, 1999; Camargo et al., 2006).

Existem estudos sobre a contaminação de alimentos por PAHs, nomeadamente o benzo[a]pireno, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos fumados, chás, café, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados, entre outros (Marques et al., 2009).

Nos óleos vegetais, a presença desses compostos deve-se na etapa de secagem dos grãos. Embora a desodorização (etapa de filtragem do óleo para eliminação de substâncias indesejadas) minimize os teores de PAHs é necessário o controlo por parte das indústrias de modo a remover estas substâncias (EFSA, 2008; Sousa et al., 2010).

A contaminação em frutas e vegetais deve-se, principalmente, à poluição ambiental. O nível de contaminação depende da localização e da área de superfície do alimento exposta à contaminação (Camargo et al., 2002).

Como os PAHs acumulam-se nas ceras de frutas e vegetais, uma simples lavagem não minimiza a presença destes contaminantes nos alimentos *in natura*, pois essa cera, assim como os PAHs, são insolúveis em água. Para reduzir a presença desses contaminantes recomenda-se, o descasque dos alimentos o quanto possível. Contudo, é importante lembrar que muitos dos nutrientes encontram-se na casca e com este procedimento, alguns deles serão perdidos (Sousa et al., 2010).

A contaminação de cereais dá-se de maneira análoga à de frutas e vegetais, sendo a área de cultivo um fator muito importante. Outra via de contaminação dos grãos é a secagem dos mesmos pela aplicação de gases de combustão, sendo que os teores de PAHs presente neste grupo de alimentos serão em função do tipo de combustível utilizado e das condições da queima (Marques et al., 2009).

Relativamente ao café, a contaminação com contaminantes ocorre no processo de torrefação dos grãos que, mais tarde, passarão para a bebida quando este é fervido. O chá geralmente apresenta níveis superiores de PAHs em relação ao café torrado mas no entanto, apenas uma pequena quantidade é transferida para a bebida durante a infusão. A

contaminação do chá dá-se devido à poluição ambiental aliada à secagem direta da planta (EFSA, 2008).

A presença de PAHs nos produtos de origem marinha deve-se principalmente à contaminação ambiental que ocorre através de derramamento ou vazamento de óleo, efluentes industriais, ou de deposição de PAHs da atmosfera. Esses compostos são assim absorvidos e acumulados por organismos marinhos. Em geral, os peixes apresentam maior capacidade de metabolizar os PAHs, apresentando capacidade de bioconcentração. Os moluscos, por sua vez, tendem a apresentar maiores níveis de PAHs, pois são incapazes de metabolizá-los e excretá-los (Phillips, 1999).

Em produtos fumados, as partículas de PAHs são formadas através queima incompleta da madeira utilizada no processo. A quantidade de partículas formadas também depende da madeira utilizada no processo de fumação. Do ponto de vista toxicológico, há preferência pelo uso de madeiras duras, como carvalho, bétula, mogno e tipos de noqueira, pois as madeiras macias são mais ricas em lignina e mais resinosas, tendendo a formar mais compostos cancerígenos (Simko, 2002; Sousa et al., 2010).

Os fumados e grelhados podem contribuir significativamente para o consumo de PAHs visto que estes produtos fazem parte da dieta humana. Por exemplo, grelhados de carne foram o segundo maior contribuinte, após o “pão, cereais e grãos” do grupo, num estudo realizado nos EUA (EFSA, 2008). Quando os alimentos são grelhados, no caso da carne, a gordura cai sobre as brasas, sofre pirólise e então volta à carne, contaminada com PAHs na forma de fumo. Quanto maior o teor de gordura da carne, maior a quantidade de PAHs presente no produto. Por isso, processos culinários que utilizam baixas temperaturas são os mais saudáveis, uma vez que reduzem a formação destas substâncias (Bettin et al., 2005; Grainger et al., 2006).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar quais são os alimentos ou grupo de alimentos que mais contribuem na ingestão diária de PAHs. Contudo, as fontes de exposição variam de acordo com o país e os respetivos hábitos alimentares, assim como, as diferentes faixas etárias sendo que a população jovem/adulta é uma das mais afetadas, devido a uma alimentação inadequada com grande consumo de *fast foods* (sanduíches, pizzas, salgados, entre outros), refrigerantes, carnes grelhada, bebidas alcoólicas, entre outros.

No grupo dos *fast foods*, as pizzas são as mais contaminadas pelos PAHs, principalmente se forem preparadas em fornos a lenha (Camargo et al., 2002). Além disso, esses alimentos são compostos por muita margarina e maionese, sendo estas fontes de B[a]P (Sousa et al., 2010).

Segundo Galinaro e Franco (2009), até mesmo as bebidas alcoólicas, bastante consumidas pelos jovens e adultos, incluem PAHs. A cachaça e o rum podem sofrer contaminação através da queima da cana-de-açúcar durante a colheita, por meio de adição de caramelo (utilizado para a correção da coloração da bebida envelhecida) no produto final ou durante o período de maturação (envelhecimento) em túneis de madeira cuja parte interior é submetida a queima durante a sua confeção.

De acordo com decisão do Comité Científico da Alimentação Humana, da Comunidade Europeia (CE), os níveis de PAHs nos géneros alimentícios devem ser reduzidos a concentrações tão baixas quanto possível e é de extrema importância a monitorização em alimentos (EFSA, 2008; Marques et al., 2009).

## **I. II. METODOLOGIAS ANALITICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE PAHs**

---

Os elevados riscos para a saúde humana associados à contaminação dos alimentos por metabolitos de PAHs, resultam no desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis para a determinação dos mesmos nas matrizes alimentares (BLAHOVA, et al., 2010).

A grande maioria dos métodos descritos na literatura científica envolve extração, recorrendo a misturas de solventes, seguido de uma hidrólise enzimática e posteriormente, um processo de purificação em extração em fase sólida (SPE). Posteriormente, a separação por cromatografia líquida de alta pressão com deteção por fluorescência (HPLC-FD) ou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GS-MS) são os métodos mais frequentemente utilizados para a identificação e quantificação de metabolitos (BLAHOVA, et al., 2010).

Desde os anos 70, a cromatografia líquida de alta pressão tem vindo a ser incrementada dada as vantagens que apresenta relativamente a outras técnicas de separação e de quantificação destes compostos. A partir de 1980, verificaram-se progressos no uso do HPLC para separação, identificação e quantificação dos PAHs, sobretudo em misturas complexas. Como tal, tem sido muito empregue na determinação de metabolitos de PAHs em alimentos, água, lamas, biótopos marinhos, amostras de ar, fumo de cigarro, combustíveis, etc (Alpendurada, 1993).

### **I. II. I. Extração**

As técnicas de extração devem ser simples de modo a proporcionar a obtenção de extratos com o mínimo de interferentes e que possua a máxima concentração dos nossos compostos em estudo (Castro, 2010).

A extração líquido-líquido baseia-se na partição do composto em estudo entre duas fases imiscíveis, para que o analito passe de uma fase para outra fase. O processo de extração é repetido, de modo a maximizar a extração do composto em estudo, com o mínimo de interferentes, para subsequente análise (Pereira, 2009).

Na extração com solventes orgânicos, a polaridade dos solventes, aliada à polaridade dos compostos em análise, a sua estabilidade e a sua relação com a matriz, constituem parâmetros condicionantes dos solventes a usar nesta fase (Pereira, 2009). Com o objetivo de garantir uma extração eficaz dos PAHs presentes em matrizes alimentares, o solvente

mais utilizado tem sido o ACN (Manoli, 2004; Ramalhosa et al., 2012 a). Contudo, outros solventes com o *n*-hexano (Rey-Salgueiro et al., 2009) e acetona (Cotta et al., 2009) também se encontram descritos em outros estudos.

Após a extração procede-se à centrifugação para separar a parte sólida da amostra da fase aquosa. Nesta etapa, várias velocidades e temperaturas são utilizadas para efetuar uma boa separação, sendo normalmente efetuada mais do que uma centrifugação. As centrifugações com maior força (g) e temperaturas mais baixas são as mais rápidas e eficazes (Pereira, 2009).

## **I. 1.1. 2. Hidrólise Enzimática**

Uma vez que os metabolitos hidroxilados resultantes da fase I de metabolização podem ser conjugados com o ácido glucorónico na fase II, é necessário proceder à hidrólise enzimática dos conjugados (Xue et al., 2005).

A obtenção de metabolitos hidroxilados na forma livre ocorre após reação com a  $\beta$ -glucuronidase.

## **I. 1.1. 3. Extração em fase sólida**

Introduzida em meados da década de 70 é uma técnica de separação líquido-sólido que apresenta várias vantagens nomeadamente a rapidez de execução, simplicidade de manuseamento, obtenção de extratos mais limpos e melhor precisão dos resultados. Esta metodologia é adaptável à automatização, conduzindo a uma melhor exatidão e precisão (Wang et al., 2005; Pereira, 2009).

Para a efetivação desta etapa, pode recorrer-se a diferentes tipos de colunas, sílica  $C_{18}$  e colunas de fase reversa. As colunas mais utilizadas para SPE são as Oasis HLB (colunas de fase reversa) sendo estas compostas por um polímero macroporoso poli (divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Apresentam características lipofílicas e hidrofílicas e são estáveis para todo o intervalo de pH. O monómero lipofílico é constituído pelo grupo divinilbenzeno que possibilita uma maior retenção dos metabolitos, particularmente importante na recuperação de compostos polares. O carácter hidrofílico é conferido pelo grupo N-vinilpirrolidona, que confere ao enchimento propriedades hidrofílicas, evitando os problemas de humidade encontrados para os enchimentos de sílica octadeciligada ( $C_{18}$ ) (Pereira, 2009).

É necessário proceder a um acondicionamento no material de enchimento para o processo de ativação, em que é utilizado um pequeno volume de água, seguido normalmente de metanol (Costa et al., 2001; Ferrari et al., 2002; Wang et al., 2005; Marder et al., 2010).

Após passagem dos extratos da amostra, na qual ocorre a retenção seletiva do analito no material de enchimento, procede-se a uma etapa intermédia de lavagem com água onde são eliminados os interferentes polares. A eluição dos analitos é efetuada com o menor volume de solvente possível para a completa remoção dos analitos retidas (Wang et al., 2005; Marder et al., 2010).

Após este passo, a solução é evaporada à secura em corrente suave de azoto, para evitar a decomposição dos compostos, e depois redissolvida num solvente apropriado, sendo este, antes da sua introdução no equipamento de Cromatografia Líquida (LC), filtrado com um microfiltro de amostra (Pereira, 2009).

#### **I. 11. 4. Outros métodos de purificação MAE, SPME e Quenchers**

Outro Processo de Purificação é a Microextração em fase sólida (SPME). É uma técnica de pré-concentração baseada na partição do analito entre uma solução e a fase de recobrimento da fibra de extração. Basicamente utiliza-se uma fibra de sílica fundida coberta com um polímero ou sólido adsorvente, que é exposta à amostra: os analitos são absorvidos e/ou adsorvidos pela fibra, de acordo com o seu coeficiente de partição entre a fase de recobrimento da fibra e a amostra (Ferreira, 2006).

A SPME foi desenvolvida inicialmente para a análise dos compostos voláteis mas, atualmente, tem sido utilizada na análise de uma grande variedade de matrizes líquidas, sólidas e gasosas e para diversos analitos, de voláteis e não voláteis (Menezes, 2011).

O SPME é, frequentemente, considerada como uma outra forma da extração em fase sólida.

Apesar de se tratar de um método simples de análise de PAHs, não é um método exato e sensível uma vez que a extração é demorada (Ferreira, 2006).

QuEChERS (**Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe**) é um método de preparação de amostras recentemente utilizado na análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares (Ramalhosa et al., 2009).

Esta técnica de extração também pode ser aplicada para PAHs apresentando vantagens uma vez que permite recuperações próximas a 100%, remove os possíveis compostos

interferentes da amostra, apresenta boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utiliza pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade) (Prestes et al., 2009).

Devido à rapidez do procedimento é adequado a análise de rotina de um grande número de amostras (Ramalhosa et al., 2009).

Um outro método de purificação para análise de PAHs é a Extração assistida por micro-ondas (MAE). É um processo que utiliza energia por micro-ondas para promover o movimento molecular e rotação do líquido com o dipolo permanente levando a um rápido aquecimento do solvente e da amostra, a fim de que ocorra a partição dos analitos de interesse da matriz da amostra para o solvente (Prestes et al., 2013).

A capacidade de aquecer rapidamente a mistura solvente da amostra é a principal vantagem desta técnica. Contudo, é aplicável apenas a compostos termicamente estáveis (Eskilsson et al., 2000).

A técnica MAE possibilita que várias amostras sejam extraídas simultaneamente com baixo consumo de solvente (10 a 30 mL) mas como solventes apolares não absorvem energia de micro-ondas, pelo menos algum solvente polar, como a água, deve ser utilizado neste método de purificação (Prestes et al., 2013).

Outras das vantagens da MAE são os altos percentuais de recuperação dos analitos e a possibilidade de extração simultânea de diferentes amostras, sem interferências. No entanto, a escolha do solvente é um fator limitante e geralmente é necessária uma etapa adicional de limpeza dos extratos (Prestes et al., 2013).

## **I. 11. 5. Detecção e Quantificação**

### **I. 11. 5. 1. Cromatografia líquida**

A cromatografia líquida é a técnica analítica de separação mais usada. A razão desta popularidade, além de residir na sua elevada sensibilidade, na sua capacidade para efetuar determinações precisas e de separar espécies não voláteis, deve-se sobretudo ao facto de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e na investigação científica (Silva, 2008).

As colunas cromatográficas utilizadas são na maioria as de fase reversa  $C_{18}$  para separar pequenas quantidades dos metabolitos a serem analisados. A partir da análise da literatura é possível verificar que na maioria é utilizado uma coluna  $C_{18}$  PAHs 150 x 4 mm

(Ramalhosa et al., 2012 a, 2012 b) ou C18 250 x 4,6 mm (Toriba et al., 2003; Cotta et al., 2009; Ramalhosa et al., 2009; Sakiara et al., 2010; Ruczynska et al., 2011).

Frequentemente é utilizado no sistema HPLC uma pré-coluna com o objetivo de reter sólidos que possam entupir os filtros da coluna. Apresentam as mesmas características que a coluna, e é colocada entre o injetor e a coluna. No que respeita ao tamanho da partícula, a escolha recai preferencialmente para colunas com 5 µm de tamanho de partícula (Toriba et al., 2003; Cotta et al., 2009; Ramalhosa et al., 2009, 2012 a, 2012 b).

No que diz respeito ao volume da amostra injetado no sistema cromatográfico, utiliza-se normalmente um volume de 20 µL (Ruczynska, 2011; Vuontisjarvi et al., 2004; Richardson et al., 2004; Sakiara et al., 2010; Dabrowska et al., 2008). Apesar de outros volumes serem observados na literatura, tal como 10 µL (Benvenuti et al., 2011), 15 µL (Ramalhosa et al., 2009, 2012 b) e 100 µL (Toriba et al., 2003), um volume de injeção mais elevado proporciona um valor de Limite de Detecção (LOD) mais baixo (Silva, 2008).

Os fluxos adotados variam também de procedimento para procedimento. Porém, o fluxo mais utilizado é de 0,8 mL min<sup>-1</sup> (Ramalhosa et al., 2009, 2012 b; Dabrowska et al., 2008; Ferrari et al., 2002; Sakiara et al., 2010; Faria et al., 2004) ou 1 mL min<sup>-1</sup> (Toriba et al., 2003; Vuontisjarvi et al., 2004; Ruczynska et al., 2011) de modo a obter melhor resolução de picos.

A deteção por fluorescência é amplamente usada na análise de metabolitos de PAHs. As principais vantagens deste tipo de detetor consistem na alta sensibilidade e seletividade (Wang et al., 2005). A deteção fluorimétrica é considerada um poderoso meio analítico na análise de resíduos, principalmente quando há necessidade de reduzir ou mesmo eliminar as interferências presentes nos extratos dos alimentos, uma vez que existem poucos compostos naturais que possuam fluorescência nativa (Pereira, 2009).

Contudo, existem estudos realizados de acordo com a literatura científica para a determinação de metabolitos de PAHs com LC, mas com deteção por MS, tal como, procedeu Rey- Salgueiro et al. (2009).

### **I. 11. 5. 2. Cromatografia gasosa**

A cromatografia gasosa (GC) com deteção por espectrometria de massa (MS) apresenta alta rapidez de análise, elevada resolução e boa sensibilidade, tendo capacidade de detetar concentrações na ordem dos picogramas. No entanto, para que esta técnica analítica possa ser aplicada é necessário que os compostos a analisar sejam voláteis e termicamente estáveis, de modo a manterem as mesmas propriedades durante o processo de volatilização

que ocorre a temperaturas relativamente altas. No caso de os compostos terem baixa volatilidade ou serem termolábeis necessitam de processos de derivatização de PAHs de baixa massa molecular, apresentando para estes casos uma ótima resolução (Castro, 2010).

Alguns sistemas sofisticados de cromatografia gasosa permitem a análise no modo GC-MS/MS, ou seja, cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa em *tandem*. Neste modo, as moléculas de interesse sofrem uma dupla fragmentação.

# **Capítulo II**

## **Parte Experimental**

## II. I. AMOSTRAGEM

Um total de amostras de cefalópodes, 12 amostras de lulas e 6 amostras de hemolinfa de polvo (tabela 6 e 7), foram obtidas e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até ao momento da análise.

As lulas do género *Loligo gahi*, oriundas da Argentina Atlântico, Sudoeste (FAO:41) foram colhidas frescas no período de 24 a 30 de Novembro de 2011, a partir de superfícies comerciais na cidade do Porto, Portugal. As 6 amostras de hemolinfa de polvo do género *Octopus vulgaris*, oriundas Noroeste Atlântico, foram colhidas pelo Centro Interdisciplinar de investigação Marinha e Ambiente (CIIMAR) no Grupo de Reações e Análises Químicas (GRAQ) onde se procedeu a recolha da hemolinfa no polvo vivo.

A caracterização biométrica (tabela 6 e 7) foi realizada de acordo com os regulamentos EPA Guide No. 823-B-00-07 e EC No. 333/2007 (US EPA, 2000; European Commission, 2007).

**Tabela 6:** Características das amostras de lulas analisadas.

Amostra lulas (data recolha)	m inteiro (g)	comp. manto (cm)	Comp. braços (cm)
<b>24/11/2011</b> <b><i>Loligo gahi</i></b>	Fresca		
L10A	58.702	18.5/14.5	12.5
L10B	54.537	22.5/85	14.5
L10C	64.742	24.5/10.5	14.5
<b>25/11/2011</b> <b><i>Loligo gahi</i></b>	Fresca		
L18A	98.549	23/9	13
L18B	89.514	22/9	12
L18C	85.548	23.5/10	12.5
<b>28/11/2011</b> <b><i>Loligo gahi</i></b>	Fresca		
L19A	105.242	28/14	12.5
L19B	79.70	24/10.5	12.5
L19C	84.624	25.5/12.5	12.0
<b>30/11/2011</b> <b><i>Loligo gahi</i></b>	Fresca		
L24A	83.838	24/10.5	12.5
L24B	90.420	16.5/3.5	11.5
L24C	79.369	24/10.5	12.5

**Tabela 7:** Características das amostras de polvo analisadas.

<b><i>Polvos Octopus</i></b>					
<b><i>vulgaris</i></b> (hemolinfa dos povos)	<b>m<sub>inteiro</sub> (g)</b>	<b>Total (cm)</b>	<b>Comp. braços (cm)</b>	<b>Comp. manto (cm)</b>	<b>Largura manto (cm)</b>
<b>H51</b>	578.8	48.5	39.0	9.5	7.0
<b>H52</b>	927.9	46.5	37.0	9.5	9.5
<b>H53</b>	654.0	42.0	33.0	9.0	8.0
<b>H54</b>	868.8	46.5	38.0	8.5	6.5
<b>H55</b>	965.3	49.5	39.5	10.0	6.5
<b>H56</b>	920.2	50.0	40.5	9.5	7.0

## II. 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### II. 2. 1. Reagentes Químicos

- Acetonitrilo para HPLC (Carlo ERBA, Milão, Itália)
- Metanol para HPLC (Carlo ERBA, Milão, Itália)
- Água para HPLC obtida através do sistema Millipore (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A)
- Acetato de etilo para HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha)
- N<sub>2</sub> (airliquid)
- Padrões de I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P com grau de pureza superior a 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A)
- β-glucoronidase Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha)
- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A)
- Ácido acético com grau de pureza superior a 99,7% (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Acetato de sódio (Merck, Alemanha)

### II. 2.2. Soluções

A solução de tampão acetato de sódio 0,1 M foi preparada dissolvendo 1,36 g de acetato de sódio em 250 mL de água destilada, ajustando em seguida o pH 5,0 com ácido acético com grau de pureza superior a 99,7%.

A solução de ácido ascórbico 1 mg mL<sup>-1</sup> foi preparada num balão de 100 mL, dissolvendo 100 mg em metanol, uma vez que este solvente apresenta melhor solubilidade para diluir este antioxidante (Shalmashi et al., 2008).

As soluções stock foram preparadas em balões volumétricos de vidro âmbar de 5 mL dissolvendo-se 10 mg dos respetivos padrões em acetonitrilo: metanol (50:50), visto que os metabolitos de PAHs são mais estáveis em acetonitrilo do que em metanol para um armazenamento de longa duração, obtendo-se concentrações finais de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Soluções intermédias foram preparadas a 250, 50 e 5 µg mL<sup>-1</sup> com 5 mL de acetonitrilo: metanol (50:50) para cada um dos compostos. De seguida, foram preparadas soluções padrão de trabalho mistura com 750 de I-OH-NF/ 30 de 2-OH-FI/ 150 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>, 1000 de I-

OH-NF/ 50 de 2-OH-FI/ 200 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup> e 2000 de I-OH-NF/ 75 de 2-OH-FI/ 300 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>.

Para a curva de calibração para o HPLC-FD foram usadas as seguintes concentrações: 750 de I-OH-NF/ 30 de 2-OH-FI/ 150 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>, 850 de I-OH-NF/ 40 de 2-OH-FI/ 175 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>, 1000 de I-OH-NF/ 50 de 2-OH-FI/ 200 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>, 1500 de I-OH-NF/ 60 de 2-OH-FI/ 250 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup> e 2000 de I-OH-NF/ 75 de 2-OH-FI/ 300 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>.

Todas as soluções foram mantidas em balões de vidro âmbar para estarem protegidas da luz e armazenadas a -20°C quando não se encontravam em utilização.

## II. 2.3. Materiais e equipamentos

- Material de vidro âmbar
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285 (Toledo, Suíça)
- Aparelho de ultrasonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha)
- Vortex Retsch Mixer (Alemanha)
- Sistema de vácuo para filtração de fase móvel Buchi (Suíça)
- Filtro de membrana com poro de 0,2 µm e de diâmetro de 50 mm (Whatman, Dassel, Alemanha)
- Membrana para as amostras com poro de 0,45 µm (Millipore, Dassel, Irlanda)
- Centrífuga Sigma Modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A)
- Evaporador Labconco rapidvap vertex (Kansas)
- Eletrodo pH Jenway 3505 (Reagente 5, Porto, Portugal)
- Estufa Memmert (Schwabach, Alemanha)
- Colunas de extração de fase sólida Oasis HLB 6cc/ 200 mg (Damstadt, Alemanha)
- Sistema de vácuo para extração em fase sólida Dinko (Barcelona, Espanha)
- Sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) 321 Pump Module Gilson com loop de 20 µL (Villieres le Bel, França)
- Coluna de HPLC Waters PAH C18 5 µm (Milford, Massachusetts)
- Forno para Coluna HPLC (Reagente 5, Porto)
- Detetor Fluorímetro LabAlliance (USA)
- Injetor Automático 234 (Gilson, França)

## II. 2.4. Metodologia Analítica

### II. 2.4.1. Extração

A metodologia analítica aplicada na extração da lula abrange as seguintes etapas:

1. Pesar 1 grama de lula para um tubo de centrífuga e adicionar 1 mL da solução de ácido ascórbico em metanol.
2. Adicionar 6 mL de ACN ao tubo de centrífuga.
3. Agitar no vortex, seguido de ultrassonificação durante 5 minutos.
4. Centrifugação a 4°C a 10 000g, durante 10 minutos.
5. Separar o sobrenadante do tubo de centrífuga e colocar num tubo de ensaio.
6. Concentração à secura a 37°C sob uma corrente suave de azoto.

### II. 2.4.2. Hidrólise enzimática

7. Adicionar 4 mL de tampão acetato de sódio ao tubo de ensaio, seguido de agitação no vortex e submetido a ultrassonificação durante 5 min.
8. Adicionar 20 µL de β-glucoronidase e substituir o oxigénio por uma atmosfera de N<sub>2</sub>.
9. Incubação a 37°C durante 40 min.
10. Após a reação enzimática, arrefecer a amostra à temperatura ambiente e proceder a nova centrifugação a 10 000g, durante 10 min a 4°C.

### II. 2.4.3. Purificação

Na extração em fase sólida (SPE) utilizou-se uma coluna Oasis HLB, 200 mg (6cc) através das seguintes etapas:

11. Acondicionamento das colunas com 5 mL de Água Milli Q, seguido de 5 mL de MeOH.
12. Passagem do extrato da amostra, seguida de lavagem com 2 mL de Água Milli Q e secagem durante 10 min a 10 mm de Hg.
13. Eluição dos metabolitos com 10 mL de MeOH: Acetato de etilo (50:50).
14. Concentração à secura a 37°C sob uma corrente suave de N<sub>2</sub>.
15. Redissolução com 1 mL de ACN: MeOH (50:50) seguido de agitação no vortex e submetido a ultrassonificação durante 5 min.
16. Antes de injetar, filtrar o extrato através de um filtro de membrana 0,45 µm.

#### II. 2.4.4. Cromatografia Líquida com detecção por fluorescência

O cromatógrafo consistiu no equipamento descrito no subcapítulo II. 2.3 na qual a fase móvel foi constituída por acetonitrilo e água bidestilada, filtrada através de uma membrana com poros de 0,2  $\mu\text{m}$  sob vácuo e desgaseificada por ultrassons durante 15 minutos.

A coluna utilizada foi a PAHs C18 12  $\mu\text{m}$  4.6 x 250 mm, mantida à temperatura de 30°C e com o fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, sendo o volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

O tempo de análise foi de 32 minutos utilizando o seguinte sistema de gradiente da fase móvel: nos primeiros 5 minutos era constituído por acetonitrilo: água (50:50), dos 5 aos 20 minutos aumentava gradualmente a quantidade de acetonitrilo até concluir os 100% e mantinha-se durante 5 minutos. Dos 25 aos 30 minutos aumentava a percentagem de água e nos dois últimos minutos voltava as condições iniciais de acetonitrilo: água (50:50).

As condições do detetor fluorimétrico, acoplado ao sistema HPLC, foram de 500 V e comprimento de onda de excitação de 290 nm e de 336 nm de emissão nos primeiros 6,50 minutos, 266 nm de excitação e 336 nm de emissão dos 6,51 aos 9 minutos e por fim, 346 nm de excitação e 390 de emissão dos 9,01 aos 30 minutos, tal como podemos verificar na tabela 8.

**Tabela 8:** Comprimentos de onde de excitação e emissão dos 3 metabolitos em estudo.

Metabolito	Tempo (min)	Comprimento de onda de excitação (nm)	Comprimento de onda de emissão (nm)
I-OH-NF	0 – 6,5	266	348
2-OH-FI	6,51 – 9	266	336
I-OH-P	9,01 - 30	346	390

## II. 3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

---

Para validar a metodologia analítica, foi necessário observar quatro condições essenciais: linearidade, seletividade, exatidão e precisão.

### II. 3.1. Linearidade

A linearidade define-se como a capacidade de determinado método, permitir a obtenção de resultados diretamente proporcionais entre as áreas obtidas e as concentrações existentes nas amostras, sendo que, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da unidade, maior será a sua relação (Ribani et al., 2004).

Neste estudo, procedeu-se à da curva de calibração para cada um dos metabolitos em causa, através de 5 níveis de concentração sendo os intervalos entre 750 e 2000 ng mL<sup>-1</sup> para o I-OH-NF, 30 e 75 ng mL<sup>-1</sup> para o 2-OH-FI e 150 e 300 ng mL<sup>-1</sup> para o I-OH-P.

### II. 3.2. Seletividade

A seletividade é avaliada através da comparação entre a matriz isenta das substâncias de interesse e a matriz adicionada de padrão, de modo a poder verificar se não existe nenhum interferente nos tempos de retenção dos compostos em estudo (Ribani et al., 2004).

Sendo assim, foram analisadas amostras de lulas utilizando a metodologia referida no ponto II. 2 4., para verificar se surgiam interferentes que pudessem comprometer a identificação e quantificação de I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P.

### II. 3.3. Exatidão e Precisão

A exatidão é avaliada pela percentagem de recuperação, calculada através da razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada (Ribani et al., 2004).

Para avaliação deste parâmetro, foram usados 3 níveis de fortificação com padrões de concentrações conhecidas, sendo a concentração do nível 1 de 750 de I-OH-NF/ 30 de 2-OH-FI/ 150 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>, nível 2 de 1000 de I-OH-NF/ 50 de 2-OH-FI/ 200 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup> e nível 3 de 2000 de I-OH-NF/ 75 de 2-OH-FI/ 300 de I-OH-P ng mL<sup>-1</sup>. As

amostras foram analisadas em triplicado, nas mesmas condições analíticas, seguindo o procedimento de extração, hidrólise enzimática e purificação descrito no sub-capítulo II. 2.4.

A precisão, definida como o grau de concordância dos resultados obtidos numa série de análises de uma mesma amostra, é avaliada pelo desvio padrão absoluto através da repetibilidade intra-dia ( $n=3$ ) e repetibilidade inter-dia (3 dias).

A precisão intra-dia calculou-se através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação de cada dia, para cada composto analisado.

A precisão inter-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação dos três dias, para cada composto analisado (Pereira, 2009).

## II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

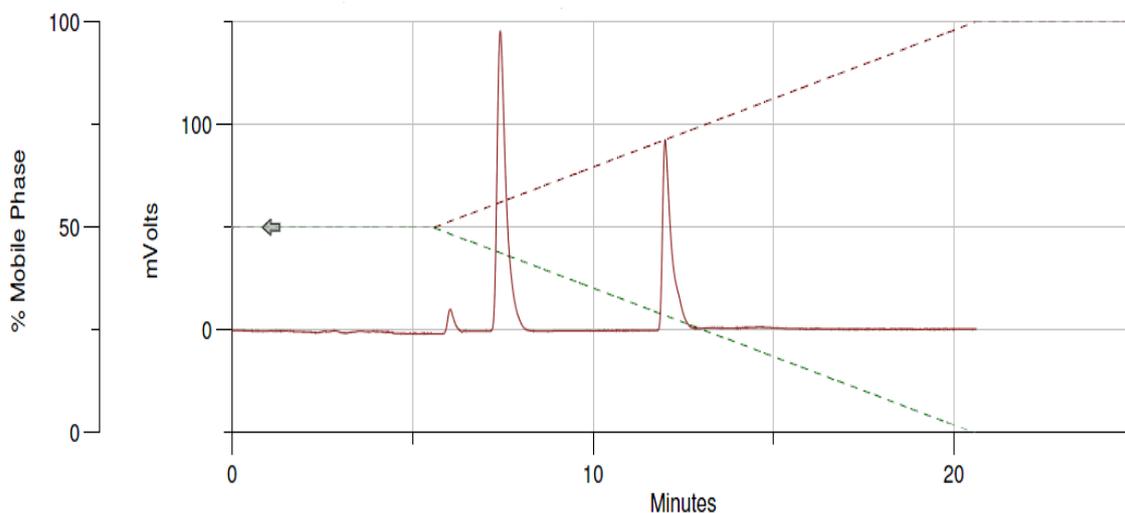
### II. 4.1. Otimização das condições cromatográficas

Relativamente a fase móvel, tal como indicavam a maior parte dos artigos, foi usado uma mistura de água bidestilada e ACN. Contudo, o gradiente não foi igual ao longo da análise, uma vez que o I-OH-NF lança o seu pico com um gradiente de 50:50 dos solventes da fase móvel, enquanto os outros 2 metabolitos surgem com um aumento da quantidade de ACN. Foram testados também vários tempos de análise e os melhores resultados foram obtidos num tempo de 32 min de modo, a que nos minutos finais a coluna sofresse um processo de lavagem com a fase móvel. Foi utilizado diferentes velocidades do fluxo, divergindo entre 1 e 1,5 mL min<sup>-1</sup> e devido ao aumento de pressão no sistema optou-se por 1 mL min<sup>-1</sup>.

Foi utilizado um forno de coluna, de modo a trabalhar a uma temperatura constante, diminuindo a viscosidade da fase móvel, a pressão do sistema e melhorando a separação dos compostos.

Foram efetuados ensaios a 30°C (Rey-Salgueiro et al., 2009) e 40°C (Wang et al., 2005) e obtivemos melhores resoluções dos picos cromatográficos a 30°C.

Uma vez que os metabolitos apresentam diferentes comprimentos de onda, e de modo a maximizar a sensibilidade dos compostos procedeu-se a deteção em modo de comprimento de onda variável (de acordo com a tabela 8 já apresentada) para a determinação simultânea dos 3 metabolitos em estudo.



**Figura 3:** Cromatograma dos picos dos metabolitos I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P, respetivamente.

## II. 4.2. Otimização do procedimento de extração

Foram testados diferentes parâmetros do método de extração, de acordo com a literatura científica, com o objetivo de otimizar a metodologia analítica.

Primeiramente destaca-se a importância da adição de um antioxidante para a extração de metabolitos de PAHs, visto que estes compostos são bastantes sensíveis e de fácil degradação. De acordo com a literatura científica a utilização do ácido ascórbico pode ser feita através da adição de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  na fase móvel ou, proceder à adição *terc*-butil-hidroquinona (TBQH) na preparação das soluções padrão e à amostra.

Neste estudo, procedeu-se à avaliação da ação destes 2 antioxidantes, procedendo à sua adição antes da hidrólise enzimática. Deste modo foram adicionados 0,2 mg e 3 mg de ácido ascórbico e TBQH, respetivamente nos dois ensaios realizados. Verificámos que a adição do TBQH provoca o aumento de fluorescência não permitindo a determinação dos metabolitos em estudo.

Relativamente ao ácido ascórbico, verificou-se que os resultados mantiveram-se semelhantes aos do ensaio sem a adição deste antioxidante. No sentido de proceder a uma melhor avaliação da sua ação antioxidante, adicionou-se o ácido ascórbico à amostra após a sua pesagem, o que resultou num aumento da percentagem de recuperação dos metabolitos em estudo.

Outros dos parâmetros analisados foram a quantidade de reagente de extração e o tempo de extração de modo a maximizar a extração destes compostos. Esta foi realizada com ACN devido ao facto dos PAHs apresentarem elevada solubilidade neste solvente e, num primeiro ensaio foram efetuadas duas extrações com 5 mL de ACN em 20 min. Contudo, os resultados não foram satisfatórios uma vez que estes compostos são fotossensíveis e, apesar de se utilizar material de vidro âmbar, procedemos a estudos comparativos com diferentes tempos de extração de modo a minimizar a degradação por exposição à luz solar. Os melhores resultados foram obtidos após uma única extração com 6 mL de ACN.

A centrifugação foi crucial pois permitiu uma boa separação entre o resíduo da amostra e o solvente de extração, quando uma força de 10 000 g foi aplicada durante 10 minutos, a 4°C.

A concentração sob fluxo de azoto foi avaliada entre 37°C e 42°C, tendo-se verificado que temperaturas superiores a 37°C conduziam à degradação dos metabolitos dos PAHs. O mesmo foi verificado por Martínez-Salinas et al. (2010) para o metabolito 1-hidroxipireno.

### II. 4.3. Otimização da hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática consiste numa reação química catalisada pela  $\beta$ -glucoronidase sendo necessário a adição de água para quebrar a ligação do conjugado glucuronido. A utilização de uma solução tampão apresenta várias vantagens nomeadamente na manutenção de um valor de pH constante, que previne a degradação e promove a conservação dos compostos em estudo.

Nesta etapa foram testadas várias concentrações de tampão acetato de sódio a pH 5: 0,05 M, 0,1 M e 0,5 M. Verificou-se que a utilização de 4 mL da solução tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5 é ideal para evitar a degradação dos metabolitos em estudo. Bouchard et al. (2002) também utilizaram o mesmo volume desta solução tampão na determinação do 1-hidroxipireno.

De acordo com a maioria dos estudos publicados na literatura científica, a quantidade de enzima  $\beta$ -glucoronidase utilizada é de 20  $\mu$ L sendo o volume suficiente para que ocorra a reação e se obtenha percentagens de recuperação elevadas.

Também verificámos que durante a hidrólise enzimática é indispensável a substituição do Oxigénio ( $O_2$ ) por  $N_2$ , logo após a adição da  $\beta$ -glucoronidase, uma vez que também ocorre degradação dos metabolitos na presença de  $O_2$ .

A temperatura e o tempo de reação são também parâmetros cruciais. Neste estudo foram testadas várias condições tais como, 42°C durante 2h30, 40°C durante 1h e 40°C durante 40 min. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstraram a ocorrência de degradação dos metabolitos em estudo. De modo a evitar a sua degradação, procedemos a um quarto ensaio realizado a uma temperatura mais baixa, de 37°C durante 40, 45 e 50 min. A esta temperatura não ocorreu a degradação dos metabolitos e também podemos constatar que o tempo de reação de 40 min, foi suficiente para que ocorresse a reação de hidrólise dos três metabolitos em estudo. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Rey-Salgueiro et al. (2009), que para a determinação dos metabolitos 1-hidroxipireno e 2-hidroxibenzo[a]pireno, procederam à incubação a 37°C durante 45 min.

Após a hidrólise enzimática, procedeu-se à centrifugação para que ocorra uma melhor separação das fases, fundamental na SPE.

## II. 4.4. Otimização da SPE

Neste estudo, testou-se dois tipos de colunas, Waters C18 (500mg/6cc) e Oasis HLB (200mg/6cc).

O primeiro procedimento de SPE estudado, baseado no estudo de Rey-Salgueiro et al. (2009) e Wang et al. (2005), procedeu à avaliação das colunas Waters C18. Verificou-se uma grande variabilidade nos resultados da exatidão obtida nos diversos ensaios realizados com estas colunas, como podemos verificar na tabela 9.

Os melhores resultados foram obtidos com as colunas Oasis HLB 200 mg que permitem um equilíbrio hidrofílico-lipofílico. No entanto, foi necessário proceder a vários estudos de otimização, com solução padrão, de modo a maximizar a retenção destes compostos nestas colunas. Vários parâmetros foram otimizados, nomeadamente o volume e tipo de solventes a ser utilizados no processo de lavagem, eluição e redissolução.

Através da análise da tabela 9 que apresenta os vários ensaios realizados, é possível verificar que o acondicionamento com água e metanol são essenciais uma vez que estes solventes são os ideais para ativação das colunas Oasis. Relativamente ao processo de lavagem das colunas Oasis, foram testados alguns solventes ou mesmo numa fase posterior, procedeu-se à eliminação deste passo. Concluiu-se assim, que para eliminar os interferentes, a água seria o solvente polar ideal uma vez que possui um poder de dissolução suficiente para remover materiais fracamente absorvidos (interferentes) e não remover espécies fortemente absorvidas (analito).

A eluição foi realizada com soluções diferentes e utilizando vários volumes. Os resultados obtidos demonstraram que a presença do metanol na solução de eluição é crucial nesta etapa, de modo a eluir todos os metabolitos em estudo retidos na coluna HLB. Outros ensaios efetuados consistiram na realização de várias eluições consecutivas, com diferentes volumes de solução de metanol, de modo a maximizar a eficiência da eluição dos compostos retidos na coluna com o menor volume de metanol. Concluímos que 10 mL da mistura MeOH: Acetato de etilo são necessários para eluição completa dos metabolitos em estudo. Quanto à evaporação do extrato à secura sob fluxo de azoto foi primordial a sua realização a 37°C, de modo a evitar a sua degradação.

Por último, redissolveu-se o extrato seco em 1 mL do mesmo solvente em que estavam preparados as soluções padrão.

**Tabela 9:** Ensaio de otimização do procedimento SPE.

Colunas	Procedimento	% Recuperação
Oasis HLB 200 mg/ 6cc	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH</li> <li>→ <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN</li> <li>→ <b>Lavagem:</b> 5 mL de 20% MeOH em 2% de acetato de amônia</li> <li>→ <b>Eluição:</b> 8 mL de 2 % de ácido acético em MeOH</li> </ul> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> 67,11%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 93%</p> <p><b>1-OH-P:</b> 10,6%</p>
Oasis HLB 200 mg/ 6cc	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH</li> <li>→ <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN</li> <li>→ <b>Lavagem:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O</li> <li>→ <b>Eluição:</b> 8 mL de 2 % de ácido acético em MeOH</li> </ul> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> -</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 78%</p> <p><b>1-OH-P:</b> -</p>
Oasis HLB 200/ 6cc	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de Diclorometano (DCM); 5 mL de MeOH; 5 mL de H<sub>2</sub>O</li> <li>→ <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN</li> <li>→ <b>Lavagem:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O</li> <li>→ <b>Eluição:</b> 8mL de DCM</li> </ul> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> 39,5%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 88%</p> <p><b>1-OH-P:</b> 7,8%</p>
Oasis HLB 200 mg/ 6cc	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de DCM; 5 mL de MeOH; 5 mL de H<sub>2</sub>O</li> <li>→ <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN + 5 mL de ACN</li> <li>→ <b>Lavagem:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O</li> <li>→ <b>Eluição:</b> 8 mL de DCM</li> </ul> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> 13,32%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 39,23%</p> <p><b>1-OH-P:</b> 4,38%</p>

<p><b>Oasis HLB</b> 200 mg/ 6cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O ; 5 mL de MeOH            → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/ 1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN + 5 mL de tampão [0,05] M            → <b>Lavagem:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O            → <b>Eluição:</b> 8 mL de 2 % de ácido acético em MeOH</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> 55,77%  <b>2-OH-FI:</b> 88,05%  <b>1-OH-P:</b> 3,04%</p>
<p><b>Waters C18</b> 500 mg/ 6 cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de MeOH ;5 mL H<sub>2</sub>O            → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN + 5 mL de tampão [0,05] M            → <b>Lavagem:</b> 5 mL de 20 % MeOH em H<sub>2</sub>O            → <b>Eluição:</b> 10 mL de MeOH: acetato de Etilo (50:50)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p><b>1-OH-NF:</b> 34,03%  <b>2-OH-FI:</b> 81,59%  <b>1-OH-P:</b> 32,19%</p>
<p><b>Waters C18</b> 500 mg/ 6 cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de ACN; 10 mL H<sub>2</sub>O;            → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN + 5 mL de tampão [0,05] M            → <b>Lavagem:</b> ----            → <b>Eluição:</b> (1<sup>a</sup>) 10 mL de MeOH: acetato de Etilo (50:50)                              (2<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH                              (3<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p>(1<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 68,31%  <b>1-OH-P:</b> -</p> <p>(2<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 0,48 %  <b>1-OH-P:</b> -</p> <p>(3<sup>a</sup>) Não foram encontrados metabolitos de PAHs.</p>
<p><b>Waters C18</b> 500/ 6 cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de MeOH; 5 mL de H<sub>2</sub>O;            → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN + 5 mL de tampão [0,05] M            → <b>Lavagem:</b> ----            → <b>Eluição:</b> (1<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH                              (2<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH                              (3<sup>a</sup>) 10 mL de MeOH: acetato de etilo (50:50)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN</p>	<p>(1<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> 15,17%  <b>2-OH-FI:</b> 55,53%  <b>1-OH-P:</b> 32,25%</p> <p>(2<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 0,57%  <b>1-OH-P:</b> 0,78%</p> <p>(3<sup>a</sup>) <b>1-OH- NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 0,51%  <b>1-OH-P:</b> 0,23%</p>

<p>Oasis HLB 200 mg/ 6cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH          → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em MeOH + 5 mL de tampão [0,05]M + 5 mL MeOH          → <b>Lavagem:</b> 5 mL de 20 % MeOH em H<sub>2</sub>O          → <b>Eluição:</b> (1<sup>a</sup>) 5 mL de ACN:MeOH (70:30)          (2<sup>a</sup>) 5 mL de ACN:MeOH (70:30)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de MeOH</p>	<p>(1<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> 62%  <b>2-OH-FI:</b> 113,04%  <b>1-OH-P:</b> -</p> <p>(2<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 95 %  <b>1-OH-P:</b> -</p>
<p>Oasis HLB 200 mg/ 6cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O ; 5 mL de MeOH          → <b>Amostra:</b> 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 5 mL tampão [0,05] M + 1 mL MeOH          → <b>Lavagem:</b> ----          → <b>Eluição:</b> (1<sup>a</sup>) 5 mL de ACN:MeOH (70:30)          (2<sup>a</sup>) 5 mL de ACN:MeOH (70:30)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN: MeOH (50:50)</p>	<p>(1<sup>a</sup>) <b>1-OH-NF:</b> -  <b>2-OH-FI:</b> 43 %  <b>1-OH-P:</b> -</p> <p>(2<sup>a</sup>) Não foram encontrados metabolitos de PAHs.</p>
<p>Oasis HLB 200 mg/ 6cc</p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O ; 5 mL de MeOH          → <b>Amostra: (ensaio A)</b> → 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 5 mL tampão [0,05] M          (<b>ensaio B</b>) → 2,5 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 2,5 mL tampão [0,05] M          (<b>ensaio C</b>) → 1 mL de padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 5 mL tampão [0,05] M + 0,3 mL MeOH          → <b>Lavagem:</b> ----          → <b>Eluição:</b> (1<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH: Acetato de etilo (50:50)          (2<sup>a</sup>) 5 mL de MeOH: Acetato de etilo (50:50)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN: MeOH (50:50)</p>	<p>(A1) <b>1-OH- NF:</b> 60,77%  <b>2-OH-FI:</b> 125,64%  <b>1-OH-P:</b> 68,07%</p> <p>(B1) <b>1-OH- NF:</b> 168,13%  <b>2-OH-FI:</b> 310,12%  <b>1-OH-P:</b> 180,41%</p> <p>(C1) <b>1-OH- NF:</b> 40,70%  <b>2-OH-FI:</b> 131,98%  <b>1-OH-P:</b> -</p> <p>(A2, B2, C2) Não foram encontrados metabolitos de PAHs.</p>

**Oasis HLB  
200 mg/ 6cc**

- **Acondicionamento:** 5 mL de H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH
- **Amostra: (ensaio A)** → 1 mL padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M  
**(ensaio B)** → 1 mL padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4mL tampão [0,05] M  
**(ensaio C)** → 1 mL padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M
- **Lavagem: (ensaio A)** → ----  
**(ensaio B)** → 3 mL de H<sub>2</sub>O  
**(ensaio C)** → 3 mL de solução de 2% MeOH
- **Eluição:** 10 mL de MeOH: acetato de etilo (50:50)

**(A)** 1-OH-NF: 47,39%  
 2-OH-FI: 80,63%  
 1-OH-P: 9,72%

**(B)** 1-OH-NF: 68,57%  
 2-OH-FI: 92,06%  
 1-OH-P: 40,89%

**(C)** 1-OH-NF: 60,52%  
 2-OH-FI: 90,72%  
 1-OH-P: 41,49%

**Redissolução:** 1 mL de ACN: MeOH (50:50)

**Oasis HLB  
200 mg/ 6cc**

- **Acondicionamento:** 5 mL H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH
- **Amostra : (ensaio A)** → 1 mL padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M  
**(ensaio B)** → 1 mL padrão [1-OH-NF/2-OH-FI/1-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 5mL tampão [0,05] M
- **Lavagem:** ----
- **Eluição:** 10 mL de MeOH: acetato de etilo (50:50)

**(A)** 1-OH- NF: 60 %  
 2-OH-FI: 76,40%  
 1-OH-P: -

**(B)** 1-OH- NF: 30,74%  
 2-OH-FI: 17,46 %  
 1-OH-P: -

**Redissolução:** 1 mL de ACN: MeOH (50:50)

<p><b>Oasis HLB 200 mg/ 6cc</b></p>	<p>→ <b>Acondicionamento:</b> 5 mL de H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH</p> <p>→ <b>Amostra: (ensaio A)</b> → 1 mL padrão [I-OH-NF/2-OH-FI/I-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>(ensaio B)</b> → 1 mL padrão [I-OH-NF/2-OH-FI/I-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M</p> <p>→ <b>Lavagem: (ensaio A)</b> → 3 mL de H<sub>2</sub>O</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>(ensaio B)</b> → 3 mL de 2% de MeOH</p> <p>→ <b>Eluição:</b> 10 mL de MeOH: acetato de etilo (50:50)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN: MeOH (50:50)</p>	<p><b>(A) I-OH- NF:</b> 75,57%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 57,88%</p> <p><b>I-OH-P:</b> 85,24%</p> <p><b>(B) I-OH- NF:</b> 65,64%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 40,28%</p> <p><b>I-OH-P:</b> 22,27%</p>
<p><b>Oasis HLB 200 mg/ 6cc</b></p>	<p>- <b>Acondicionamento:</b> 5 mL H<sub>2</sub>O; 5 mL de MeOH</p> <p>- <b>Amostra:</b> 1 mL padrão [I-OH-NF/2-OH-FI/I-OH-P] = [1000/50/150] ng mL<sup>-1</sup> em ACN: MeOH (50:50) + 4 mL tampão [0,05] M</p> <p>- <b>Lavagem:</b> 2 mL de H<sub>2</sub>O</p> <p>- <b>Eluição:</b> 10 mL de MeOH: acetato de etilo (50:50)</p> <p><b>Redissolução:</b> 1 mL de ACN: MeOH (50:50)</p>	<p><b>I-OH- NF:</b> 86,93%</p> <p><b>2-OH-FI:</b> 67,76%</p> <p><b>I-OH-P:</b> 74,71%</p>

## II. 4. 5. Validação

### II. 4.5.1. Linearidade

A avaliação da variação da resposta linear foi efetuada quer com soluções padrão, quer com extratos de amostras fortificadas.

Os resultados da avaliação da linearidade do método analítico foram adequados, no intervalo de concentração estudado para as soluções padrão, observando-se, coeficientes de correlação ( $r^2$ ) de 0,9987 para I-OH-NF e 0,9959 para o 2-OH-FI e para o I-OH-P, tais como demonstram as figuras seguintes (figura 4, 5 e 6).

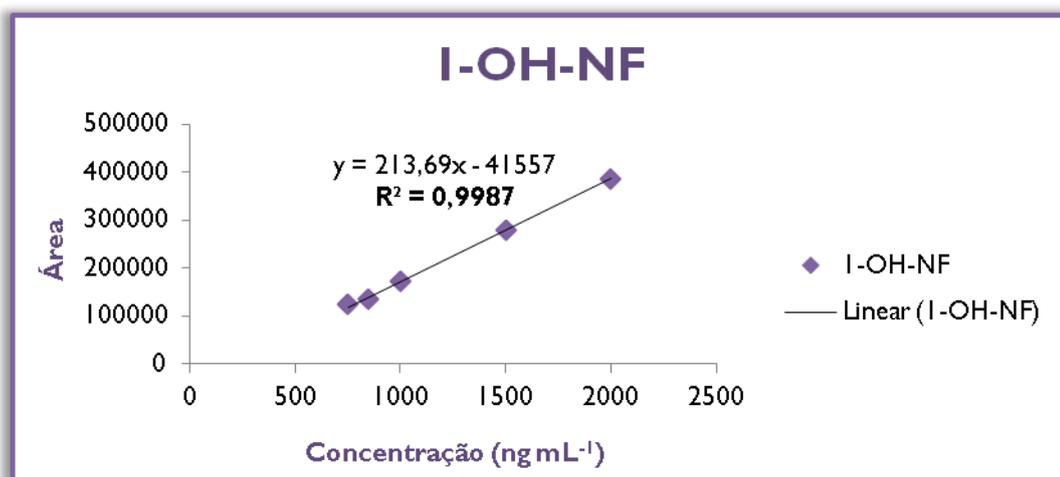


Figura 4: Curva de calibração para a solução padrão do I-OH-NF.

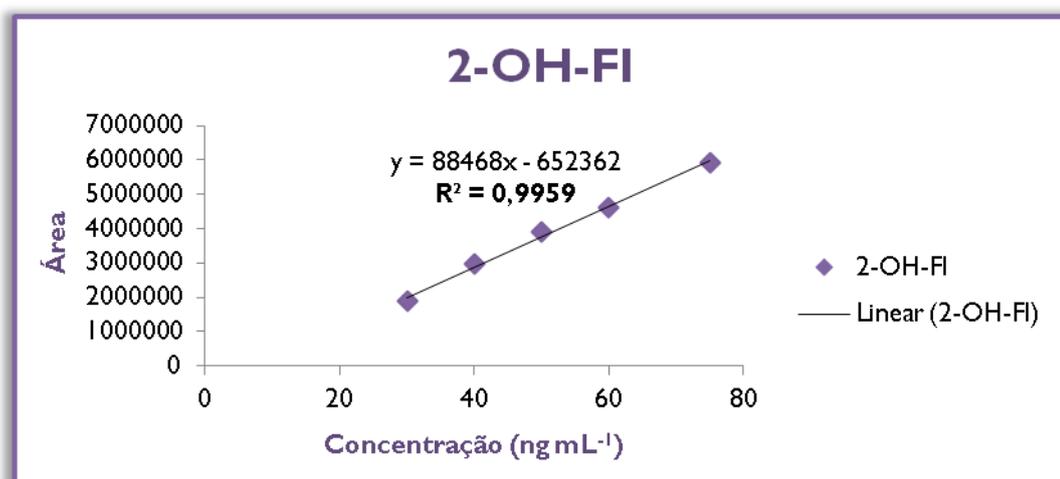
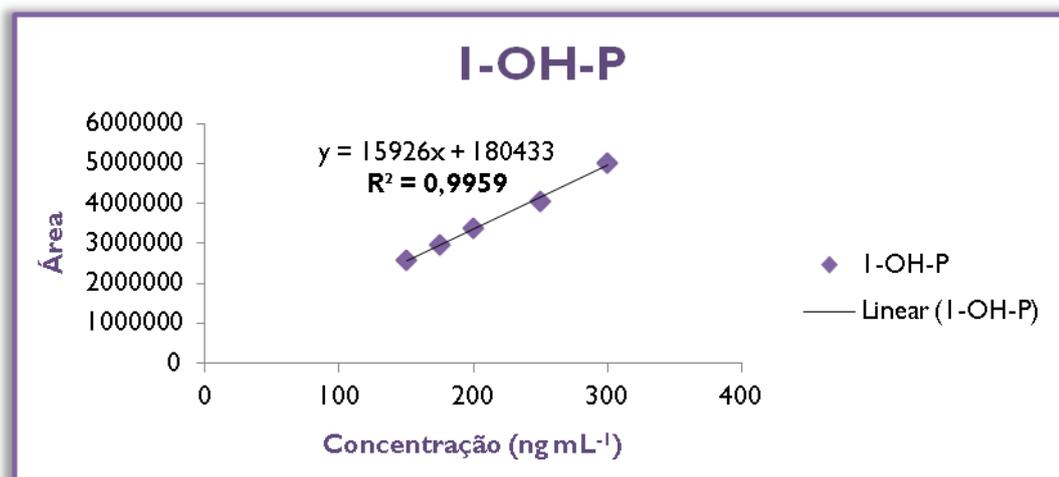
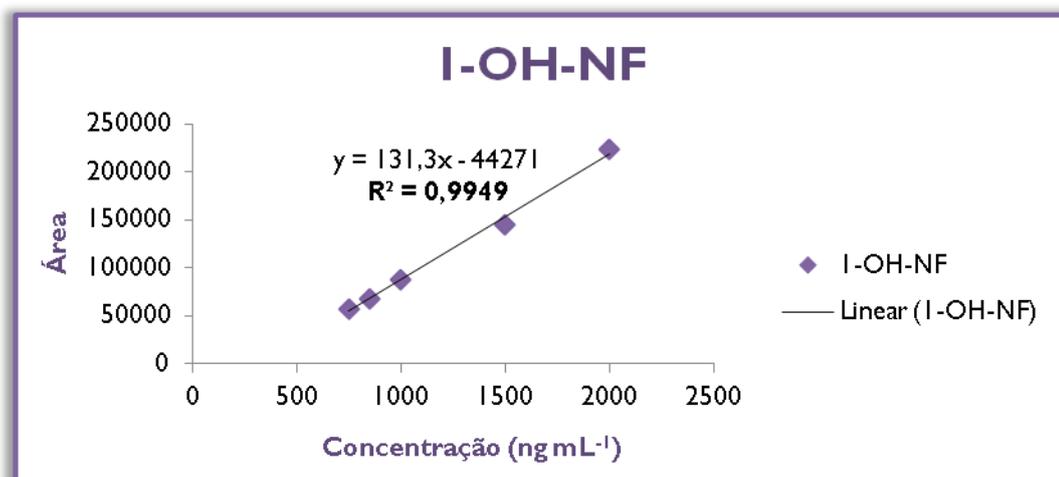


Figura 5: Curva calibração para a solução padrão do 2-OH-FI.

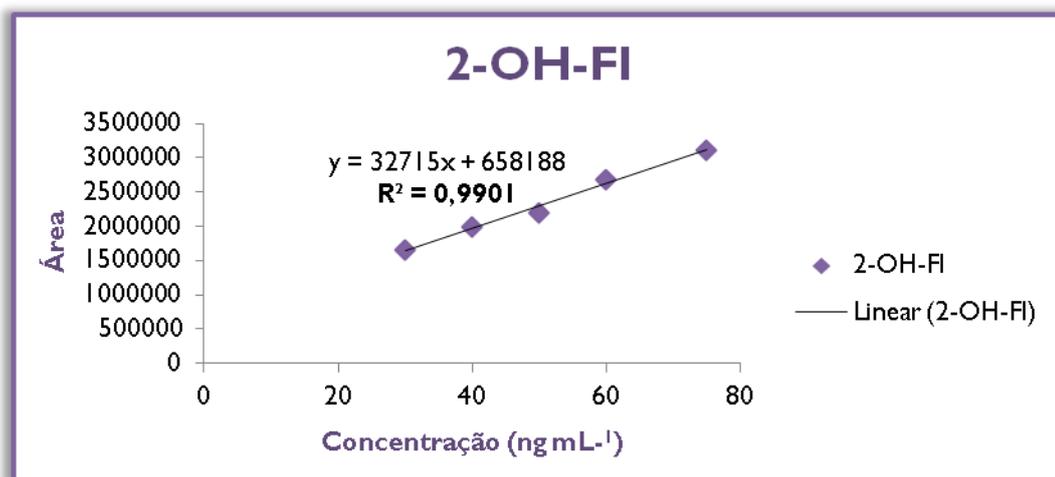


**Figura 6:** Curva de calibração para a solução padrão do I-OH-P.

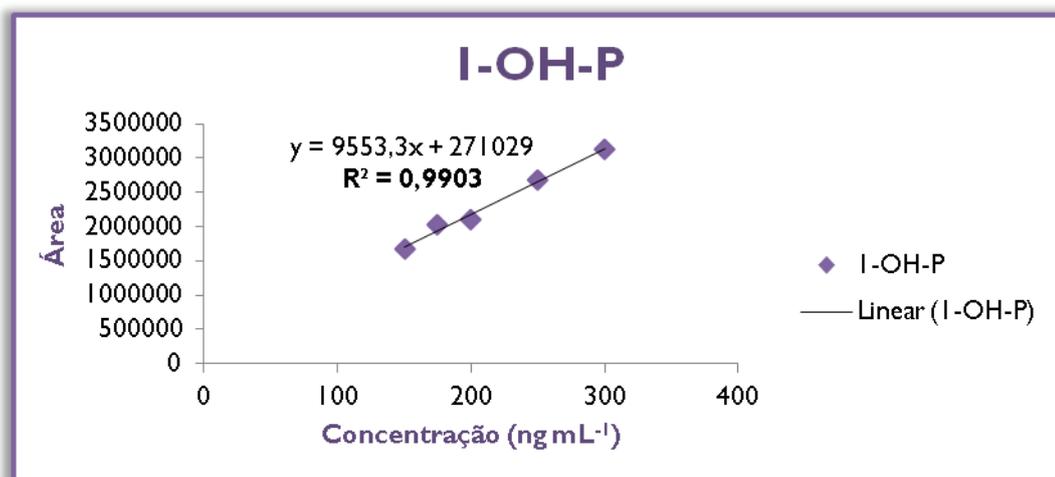
Procedeu-se também á avaliação da linearidade em amostras fortificadas, tendo-se obtido linearidade com boa correlação ( $r^2$ ) de 0,9949, 0,9901 e 0,9903 para I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P, respetivamente, tais como demonstram as figuras seguintes (figura 7, 8 e 9).



**Figura 7:** Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente ao I-OH-NF.



**Figura 8:** Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente ao 2-OH-FI.



**Figura 9:** Curvas de calibração das amostras fortificadas relativamente ao I-OH-P.

#### II. 4.5.2. Limites de Detecção e limites de quantificação

Os limites de deteção (LODs), para um sinal ruído de 3:1, foram de 227,3 ng g<sup>-1</sup> para o I-OH-NF, 9,09 ng g<sup>-1</sup> para o 2-OH-FI e 45,5 ng g<sup>-1</sup> para o I-OH-P.

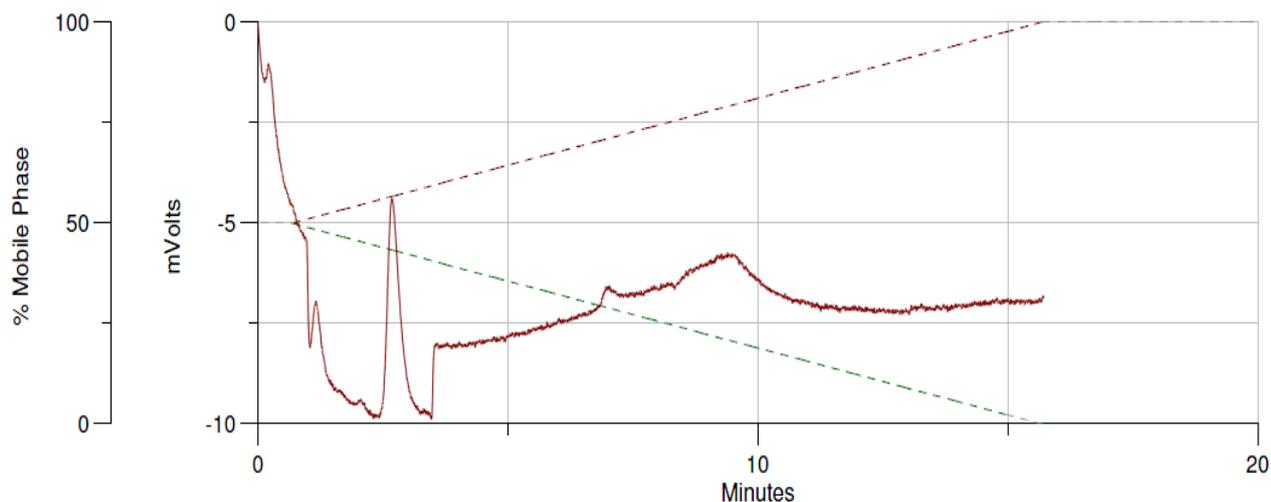
Relativamente aos limites de quantificação (LOQs) obtidos, para um sinal ruído de 10:1, foram de 750 ng g<sup>-1</sup>, 30 ng g<sup>-1</sup> e 150 ng g<sup>-1</sup> para o I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P, respetivamente, sendo estas as concentrações utilizadas no ensaio de fortificação mais baixo.

**Tabela 10:** Limites de Detecção e Quantificação do estudo em causa.

	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )
<b>I-OH-NF</b>	227,3	750
<b>2-OH-FI</b>	9,09	30
<b>I-OH- P</b>	45,5	150

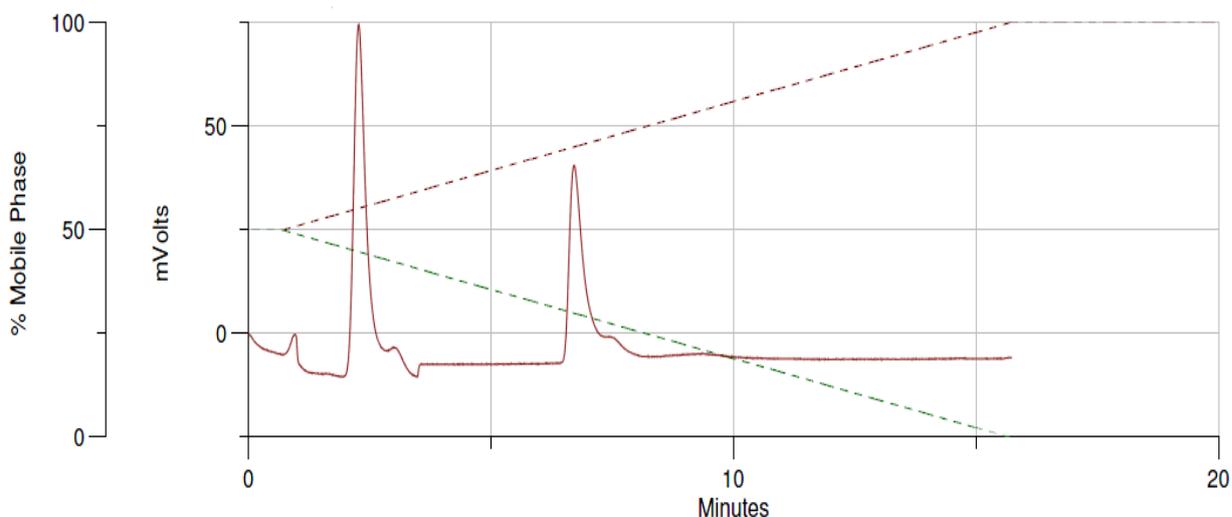
### II. 4.5.3. Seletividade

O procedimento analítico mostrou ser eficaz para esta matriz alimentar, pelo que se pode obter brancos limpos sem interferentes na zona de eluição dos compostos em estudo.

**Figura 10:** Cromatograma da amostra sem metabolitos de PAHs (ensaio em branco).

### II. 4.5.4. Exatidão e Precisão

Relativamente aos ensaios de fortificação, foram avaliados 3 níveis de fortificação, sendo eles referidos anteriormente no subcapítulo II. 3.3. Na figura 11 representa o cromatograma da amostra fortificada com os I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P.



**Figura 11:** Cromatograma de uma amostra fortificada com 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P, respetivamente.

Relativamente à exatidão do método, os resultados das percentagens de recuperação nas amostras fortificadas foram adequados, como podemos constatar na tabela 11. As percentagens de recuperação foram mais elevadas para o metabolito 1-OH-NF, com valores superiores a 98,65%, para todos os níveis de fortificação, oscilando entre 98,65% e 107,37% para níveis de fortificação entre 750 e 200 ng g<sup>-1</sup>, respetivamente. No que respeita ao 2-OH-FI as percentagens variaram entre 70,31% e 79,03% para níveis de fortificação entre 30 a 75 ng g<sup>-1</sup> e para o 1-OH-P os valores foram de 62,23% a 79,93% para níveis de fortificação entre 150 a 300 ng g<sup>-1</sup>.

De realçar que na literatura científica não se encontra descrito nenhuma metodologia analítica que permita a determinação simultânea do 1-OH-NF, 1-OH-P e 2-OH-FI. Comparando os valores das percentagens de recuperação obtidos nos estudos descritos na literatura científica, podemos constatar que os valores obtidos são idênticos para 1-OH-P, com percentagens que variam entre 68% e 83%, e para o 2-OH-FI a percentagens de recuperação reportada foi de 63% (Wang et al., 2005). Relativamente ao 1-OH-NF Ramalhosa et al. (2012b) apresentaram percentagens de 90%.

Como já foi descrito anteriormente, a metodologia analítica descrita neste estudo apresenta percentagens de recuperação superiores para o 1-OH-NF e 2-OH-FI.

Os valores de precisão intra-dia mais altos foram obtidos nos níveis de fortificação mais elevados, exceto para o 1-OH-P apresentando valores de 12,21% para o 1-OH-NF e 7,50% para 2-OH-FI. Relativamente ao 1-OH-P o valor mais alto (1,85%) foi obtido para o

nível de fortificação mais baixo. Quanto aos valores mais baixos, destaca-se os valores para o 2º nível de fortificação do 2-OH-FI e do I-OH-NF, sendo eles de 0,09% e 0,53%, respetivamente. No caso do I-OH-P foi de 0,84% para o nível de fortificação mais alto.

Relativamente à precisão inter-dia, o valor mais alto verificou-se para o I-OH-NF, no nível de fortificação mais alto, com 15,27%. Nos restantes níveis, os valores oscilaram entre 4,49% e 9,52%. Para o 2-OH-FI e o I-OH-P os valores oscilaram entre 5,97% e 7,24% entre 3,65 e 8,61%, respetivamente.

**Tabela II:** Valores relativos à exatidão e precisão do I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P.

	Nível de fortificação (ng g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Precisão intra-dia (% RSD)	Precisão inter-dia (% RSD)
<b>I-OH-NF</b>	750	98,65	6,75	9,52
	1000	110,05	0,53	4,59
	2000	107,37	12,21	15,27
<b>2-OH-FI</b>	30	70,31	1,62	5,97
	50	77,60	0,09	7,24
	75	79,03	7,50	6,13
<b>I-OH-P</b>	150	79,93	1,85	8,61
	200	62,23	1,39	4,82
	300	67,42	0,84	3,65

#### II. 4.6. Níveis de I-OH-NF, 2-OH-FI e I-OH-P nas amostras

Das 18 amostras analisadas, apenas 39 % encontravam-se contaminadas com I-OH-NF, sendo este o único composto possível de detetar. Apenas 5 dessas amostras foram possíveis de quantificar o valor de I-OH-NF, sendo o intervalo entre 786 e 1145 ng g<sup>-1</sup>, tal como é possível verificar na tabela 12. É de realçar que apenas as amostras de *Loligo Gahi* se encontravam contaminadas.

**Tabela 12:** Resultados obtidos nas amostras.

Amostras	I-OH-NF
L 18 A	830 ng g <sup>-1</sup>
L 18 B	786 ng g <sup>-1</sup>
L 10 B	788 ng g <sup>-1</sup>
L 10 C	< LOQ
L 24 A	1013 ng g <sup>-1</sup>
L 24 B	1145 ng g <sup>-1</sup>
L 24 C	< LOQ

A comparação dos valores obtidos nas amostras de cefalópodes através da metodologia analítica descrita neste trabalho, não é possível uma vez que, de acordo com o nosso conhecimento, não há relato de contaminação de metabolitos de PAHs nesta matriz alimentar.

Contudo, vários estudos têm sido realizados para deteção e quantificação de metabolitos em outras matrizes alimentares como por exemplo, Ramalhosa et al., (2012 a) determinou o acenafteno, fluoreno e fenantreno entre espécies de peixes consumidos em Portugal e verificou que a maior quantidade de PAHs estava presente na espécie de peixe Cavala, com 55% de naftaleno.

O leite comercial e cereais para bebés, foi outra das matrizes alimentares analisadas para determinar os metabolitos I-OH-P e 3-OH-B[a]P, estudo este, realizado por Rey-Salgueiro et al. (2009). Estes dois metabolitos foram detetados.

## CONCLUSÃO

---

Foi desenvolvido e validado, pela primeira vez, um método analítico SPE-HPLC-FD para a determinação simultânea dos três metabolitos hidroxilados 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P.

O método otimizado foi sensível, exato e preciso com percentagens de recuperação entre 62 e 110% e limites de detecção de 227, 9 e 46 ng g<sup>-1</sup> para o 1-OH-NF, 2-OH-FI e 1-OH-P, respetivamente.

A metodologia analítica aplicada à análise de 18 amostras adquiridas demonstrou que 39% encontravam-se contaminadas com 1-hidroxinaftaleno com concentrações que variaram entre 786 e 1145 ng g<sup>-1</sup>. Nenhuma das amostras continha 2-OH-FI e 1-OH-P.

A metodologia analítica descrita apresenta-se como uma técnica promissora em programas de monitorização para avaliação dos níveis de contaminação de metabolitos de PAHs em amostras de cefalópodes.

Dada a elevada toxicidade destes compostos, e tendo como objetivo principal a garantia da Saúde Pública, é de extrema importância a continuação destes estudos para uma avaliação global da contaminação dos cefalópodes a nível nacional de modo a garantir a Segurança Alimentar.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

---

Alexander, Jan et al. – **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain.** *The EFSA Journal*, vol. 724 (2008), p. 1-114.

ALPENDURADA, M. F. – **Separação de misturas complexas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa.** *Revista Portuguesa de Farmácia*, vol. XLIV (1994), nº 1.

AMORIM, L. – **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol. 6 (2003), nº 1, p. 1-13.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry – **Detailed Data Table for the 2011 Priority of Hazardous substances that will be the subject of Toxicological Profiles.** Atlanta, 2011. [Consultado a 5 de Setembro de 2013]. Disponível em: [http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR\\_2011\\_SPL\\_Detailed\\_Data\\_Table.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2011_SPL_Detailed_Data_Table.pdf)

BARBOSA, A. – **Avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) na Baía de Santos através de metabolitos biliares.** São Paulo, 2009. Dissertação de Mestrado.

BARROSO, H. – **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica.** Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2010. Tese de Doutorado.

BENVENUTI, M.; BURGESS, J. – **Ensuring Seafood Safety with Rapid screening for Polyaromatic Hydrocarbons Using LC-Fluorescence.** Waters Corporation, USA, 2011.

BETTIN, S.M.; FRANCO, D.W. – **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes.** *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, vol. 25 (2005), p. 234-238.

BLAHOVA, J. et al. – **I-Hydroxypyrene–A Biochemical Marker for PAH Pollution Assessment of Aquatic Ecosystem.** *Sensors*, vol. 10 (2010), p. 203-217.

BOER, J.; LAW, R.J. – **Developments in the use of chromatographic techniques in marine laboratories for the determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1000, 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ed., (2003), p. 223-251.

BOUCHARD, M. et al. – **Urinary excretion kinetics of I-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 65 (2002), p. 1195-1209.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S.T. – **Air pollution and health.** *The Lancet*, vol. 360 (2002), p. 1233-1242.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. – **Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.** *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, vol. 5 (2002), p. 19-26.

CAMARGO, M.C.R. et al. – **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em guaraná em pó (*Paullina cupana*).** *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, vol. 26 (2006), p. 230-234.

CASTRO, D. M. O. – **Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos no ar ambiente.** FEUP, Universidade do Porto, 2010. Tese de Doutoramento.

CORDEIRO, L. – **Hidrocarbonetos Aromáticos nos sedimentos do estuário da laguna dos patos – RS.** Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2003. Dissertação de mestrado.

COSTA, A. – **Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs): I-Hidroxi pireno Urinário.** Rio de Janeiro: Centro

de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, 2001. Dissertação de Mestrado.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D . – **Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados.** *Química Nova*, São Paulo, vol. 32 (2009), n°8, p. 2026-2033.

DABROWSKA, D.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. – **Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products.** *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 17 (2008), p. 17-24.

Decreto-Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro. Ministério do ambiente e do ordenamento do território: Diário da Republica – I Série – A, 2001. N.º 206. [Consultado a 18 de Março de 2013]. Disponível em: [http://www.esac.pt/noronha/legislalimentar/DL%20243\\_01\\_aguas.pdf](http://www.esac.pt/noronha/legislalimentar/DL%20243_01_aguas.pdf)

Diretiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do conselho de 15 de Dezembro de 2004. Jornal Oficial da União Europeia. [Consultado a 18 de Março de 2013]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:023:0003:0016:PT:PDF>

EFSA, European Food Safety Authority. – **Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.** vol. 2 (2008), revision 1, p. 1-55.

ESKILSSON, C; BJORKLUND, E. – **Analytical-scale microwave-assisted extraction.** *Journal of Chromatography A*, vol. 902 (2000), p. 227-250.

EUROPEAN COMMISSION – **Regulation (EC) No. 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo[a]pyrene in foodstuffs.** Brussels, 2007.

FARIA, P. M.; ROSA, H. V. D. – **Determinação do I-hidroxi pireno em amostras de urina por cromatografia líquida de alta eficiência – estudo dos parâmetros de validação.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, vol. 40 (2004), nº 2.

FERRARI, ST.; MANDEL, F.; BERSET, J. D – **Quantitative determination of I-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection.** *Chemosphere*, vol. 47 (2002), p. 173-182.

FERREIRA, A. S.; MENDES, A.; CRUZ, C. – **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs).** FFUP, 2007. [Consultado a 10 de Junho de 2012]. Disponível em: [http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g8\\_hap/toxmet.html](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g8_hap/toxmet.html)

FERREIRA, F. – **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) em amostras de água utilizando um interface (SPME/LC/DAD).** São Carlos, 2006. Tese de Doutorado.

GALINARO, C.A.; FRANCO, D.W. – **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível.** *Química Nova*, vol. 32 (2009), nº 6.

GRAINGER, J. et al. – **Reference range levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites.** *Environmental Research*, vol. 100 (2006), p. 394 – 423.

IARC, International Agency for Research on Cancer – **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 92 (2010), p. 773.

LOURENÇO, et al. – **Elemental composition of cephalopods from Portuguese continental waters.** *Food Chemistry*, vol. 113 (2009), p. 1146-1153.

MANOLI, E.; KOURAS, A.; SAMARA, C. – **Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece.** *Chemosphere*, vol. 56 (2004), p. 867-878.

MARDER, L. S. et al. – **Validação do Método para determinação de I-hidroxi pireno urinário.** XI Salão de iniciação Científica- PUCRS, 2010.

MARQUES, A. C.; VALENTE, T. B.; ROSA, C.S. – **Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e as possíveis consequências para o organismo humano.** *Revista de Nutrição*, Campinas, vol. 22 (2009), p. 283-293.

MARTÍNEZ-SALINAS, R. et al. – **Exposure of children to polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico: assessment of multiple sources.** *International Archives of Occupational and Environmental Health*, vol. 83 (2010), p. 617-623.

MASTANDREA, C. et al. – **Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos.** *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. La Plat. ISSN 0325-2957. vol. 39 (2005), n° 1.

MENEZES, H. – **Análise Ambiental de Benzeno e Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.** Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Tese de Doutorado.

NETTO A.D.P. et al. – **Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAs): a review of methodology.** *Química Nova*, São Paulo, vol. 23 (2000), n° 6, p.765-773.

OKONA-MENSAH, K. W. et al. – **An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43 (2005), p. 1103-1116.

PEREIRA, A. – **Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respetivo impacto na saúde humana.** Coimbra, 2009. Dissertação de Mestrado.

PERERA, F. P et al. – **Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland.** *American Journal of Epidemiology*, vol. 147 (1998), nº3, p. 309-314.

PHILLIPS, D. H. – **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet.** *Mutation Research*, vol. 443 (1999), p. 139-147.

PRESTES et al. – **QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.** *Química Nova*, vol. 32 (2009), nº6, p. 1620-1634.

PRESTES et al. – **O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas.** *Química Nova*, vol. 36 (2013), nº5, p. 697-710.

RAMALHOSA, M. J. et al. – **Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method.** *Journal of separation science*. Porto, 2009. vol. 32, p. 3529 – 3538.

RAMALHOSA, M. J.; PAÍGA, Paula; MORAIS, Sandra et al. – **Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: Inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50 (2012 a), p. 162–167.

RAMALHOSA, M. J. et al. – **Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Optimisation and validation of microwave-assisted extraction.** *Food Chemistry*, vol. 135 (2012 b), p. 234-242.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VA GRIEKEN, R. – **Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation.** *Atmospheric Environment*, vol. 42 (2008), p. 2895-2921.

Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial das União Europeia. [Consultado a 18 de Março de 2013]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>

Regulamento (CE) N.º 333/2007 da Comissão de 28 de Março de 2007. Jornal Oficial das União Europeia. [Consultado a 18 de Março de 2013]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:PT:PDF>

REY-SALGUEIRO, L. et al. – **Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods.** *Food Chemistry*, vol. 115 (2009), p. 814-819.

RIBANI, M. et al. – **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova* (2004), vol. 27, n.º 5, p. 771-780.

ROOSE, P.; BRINKMAN, U.A.T. – **Monitoring organic microcontaminants in the marine environment: principles, programmes and progress.** *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 24 (2005), n.º 11, p. 897-926.

RICHARDSON, D. M. et al. – **Effects of feeding status on biliary PAHs metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*).** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 17 (2004), p. 79-85.

RUCZYNSKA, W. M. et al. – **Assessment of PAH pollution in the southern Baltic Sea through the analysis of sediment, mussels and fish bile.** *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 13 (2011), p. 2535.

SANTOS, T. – **Estudos sobre efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em *Trachinotus carolinus* (perciformes, carangidae) utilizando biomarcadores citogénicos,**

**histopatológicos e bioquímicos.** São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2009. Tese de Doutorado.

SAKIARA, K. A. et al. – **Otimização e validação de uma metodologia analítica para determinação de 1-hidroxi-pireno em urina em cortadores de cana-de-açúcar.** *Eclética química*, vol. 35 (2010), nº 4.

SHARMA, H.; JAIN, V.K.; KHAN, Z.H. – **Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi.** *Chemosphere*, vol. 66 (2007), p. 302-310.

SHALMASHI, A.; ELIASSI, A. – **Solubility of L-(+)-Ascorbic Acid in Water, Ethanol, Methanol, Propan-2-ol, Acetone, Acetonitrile, Ethyl Acetate, and Tetrahydrofuran from (293 to 323) K.** *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 53 (2008), nº6, p. 1332-1334.

SILVA, L. – **Avaliação e validação do grau de exposição de distintos tipos de populações às fumonisin B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: Alimentos contaminados, teor na urina e relação esfingonina-esfingosina.** Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2008. Tese de Doutorado.

SIMKO, P. – **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoking flavoring food additives.** *Journal of Chromatography B*, Vol. 770 (2002).

SOUSA, M.; NASCIMENTO, V. L. – **Benzo[a]pireno em Alimentos.** *Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica. IFPI. ISSN 1982-422X.* vol. 5 (2010), nº 1.

SOUSA, M.; NASCIMENTO, V. L.; In IV CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DA EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA. Belém, 2009 – **Avaliação do teor do Benzo[a]pireno em bacon comercializado em Teresina.** [Consultado a 28 de Maio de 2012]. Disponível em: [http://connepi2009.ifpa.edu.br/connepi-anais/artigos/60\\_1601\\_406.pdf](http://connepi2009.ifpa.edu.br/connepi-anais/artigos/60_1601_406.pdf)

TORIBA, A. et al. – **Quantification of 2-hydroxyfluorene in human urine by column-switching high performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Graduate School of Natural Science and Technology, Japan, 2003.

US-EPA, United States Environmental Protection Agency – **Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories, vol. I. Fish Sampling and Analysis, EPA 823-B-00-007**, third ed. *Office of Science and Technology*. Washington, DC, 2000.

US-EPA, United States Environmental Protection Agency – **Guidelines for Carcinogen Risk Assessment.** Risk Assessment Forum, 2005. Washington, DC, EPA/630/P-03/001F.

VUONTISJARVI, H. et al. – **A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile.** *Polycyclic Aromatic Compounds*, vol. 24 (2004), p. 333-342.

WHO, World Health Organization – **Environmental Health Criteria 202: Selected nonheterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons.** IPCS, International Programme on Chemical Safety, Geneva, 1998.

WHO, Regional Office for Europe – **Air Quality Guidelines – Second Edition; Chapter 5.9 – PAHs**, Denmark, 2000.

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. – **Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 206 (2005), p. 73-93.

WANG, Y. et al. – **Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 383 (2005), p. 804-809.